

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Srta. María Augusta Tapia Toaquiza

COORDINADOR DE CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Vanessa Andrade

Sangolquí, julio de 2010

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. **MARÍA AUGUSTA TAPIA TOAQUIZA** como requerimiento parcial a la obtención del título de **INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**.

2 de Julio de 2010

Dr. Edmundo Estévez
PROFESOR DIRECTOR

Dr. Marcelo Grijalva
PROFESOR CODIRECTOR

DEDICATORIA

Dedicado a:

MI MADRE, MI PADRE Y MI HERMANA,

Pilares de mi vida y razón de mi esfuerzo.

María Augusta Tapia Toaquiza

AGRADECIMIENTO

Al Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, a cargo de su director, Dr. Edmundo Estévez, a las colaboradoras y amigas, Marcita y Sandrita y en especial al Dr. Enrique Terán; por su apertura, confianza, e incondicional apoyo; quienes contribuyeron para la realización de este proyecto.

A los Directores de las instituciones participantes, por su cooperación en la recepción de muestras y por la convicción que tuvieron frente al alcance del proyecto en la investigación nacional.

Al Ing. Pedro Romero, catedrático de la Facultad de Biotecnología, por su colaboración para el diseño y análisis estadístico del presente estudio.

A todas las personas anónimas, que me es difícil nombrarlas individualmente, gracias a su aporte y colaboración en la ejecución de este proyecto.

María Augusta Tapia Toaquiza

ÍNDICE DE CONTENIDO

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
LISTADO DE TABLAS	x
LISTADO DE FIGURAS	xi
LISTADO DE ANEXOS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	17
1.1 Introducción.....	17
1.2 Formulación del problema.....	18
1.3 Justificación del problema.....	20
1.4 Objetivos de la Investigación.....	23
1.4.1 Objetivo General.....	23
1.4.2 Objetivos Específicos.....	23
1.5 Marco Teórico.....	24
1.5.1 Historia.....	24
1.5.2 Generalidades familia Reoviridae.....	25
1.5.3 Rotavirus.....	26
1.5.4 Morfología.....	27
1.5.5 Proteínas estructurales.....	28
1.5.6 Proteínas no estructurales.....	37
1.5.7 Clasificación del rotavirus.....	38
1.5.8 Diversidad del rotavirus.....	44
1.5.9 Tropismo de rotavirus.....	45
1.5.10 Ciclo Replicativo.....	45
1.5.10.1 Replicación.....	47

1.5.11 Morfogénesis Viral.....	48
1.5.12 Variabilidad Genética.....	49
1.6 Relación de Genotipos en el Mundo.....	50
1.7 Protección Inmune contra la Infección Natural.....	52
1.8 Relevancia de la Inmunidad Serotipo Específica.....	53
1.9 Epidemiología y Mecanismos de Transmisión.....	54
1.9.1 Epidemiología.....	54
1.9.2 Mecanismos de Transmisión.....	55
1.10 Población en Riesgo.....	56
1.10.1 Morbilidad y Mortalidad.....	57
1.11 Estacionalidad.....	58
1.12 Curso Clínico de la Infección.....	58
1.13 Diagnóstico.....	59
1.14 Exámenes Complementarios.....	59
1.15 Tratamiento.....	60
1.16 Prevención.....	60
1.17 Problemática de la Vacunación.....	62
1.17.1 Vacuna Monovalente Rotarix.....	64
1.17.2 Vacuna Pentavalente RotaTeq.....	66
1.18 Situación en otros países.....	70
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
2.1 Participantes.....	71
2.1.1 Instituciones.....	71
2.2 Zona de Estudio.....	72
2.2.1 Trabajo de campo.....	72
2.2.2 Trabajo de laboratorio.....	72
2.3 Periodo de tiempo de Investigación.....	72
2.4 Diseño Bioestadístico.....	73
2.5 Tamaño de la muestra.....	73
2.6 Hipótesis.....	74
2.7 Operacionabilidad de variables.....	75
2.8 Procedimientos.....	75
2.8.1 Codificación de los individuos participantes.....	76

2.8.2 Conservación y transporte al laboratorio.....	76
2.8.3 Almacenamiento de las muestras.....	76
2.9 Extracción de Ácidos Nucléicos.....	76
2.10 Electroforesis de la extracción de ácidos nucleicos en gel de Agarosa al 1%.....	77
2.11 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction para VP7.....	77
2.11.1 Primer Round.....	77
2.11.2 Segundo Round.....	78
2.12 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction para VP4.....	80
2.12.1 Primer Round.....	80
2.12.2 Segundo Round.....	80
2.13 Visualización de las amplificaciones.....	81
2.14 Métodos.....	82
2.14.1 Genotipificación de RV.....	82
2.14.1.1 Genotipificación del Gen 9 (VP7).....	82
2.14.1.2 Genotipificación del Gen 4 (VP4).....	83
CAPÍTULO III: RESULTADOS	85
3.1 Procedencia de los individuos participantes en el estudio.....	85
3.2 Electroforesis de la extracción de ácidos nucleicos (RNA viral).....	87
3.3 Genotipificación de la proteína VP7 por RT-PCR.....	88
3.4 Visualización de las amplificaciones para VP7.....	90
3.5 Genotipificación de la proteína VP4 por RT-PCR.....	90
3.6 Visualización de las amplificaciones para VP4.....	92
3.7 Genotipificación de las muestras identificadas como ND mediante electroforesis.....	92
3.8 Prevalencia de los serotipos y genotipos de rotavirus.....	93
3.9 Frecuencia de los serotipos y genotipos de rotavirus.....	94
3.10 Identificación de combinaciones de rotavirus presentes en la Región Andina.....	94
3.11 Identificación de combinaciones de rotavirus presentes en la Región Costa	95
3.12 Identificación de combinaciones de rotavirus presentes en la Región Amazónica.....	95
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	96

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	101
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES.....	105
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....	106
ANEXOS.....	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Géneros clasificados dentro de la familia <i>Reoviridae</i>	25
Tabla 1.2 Asignación Gen-Proteína, Localización Proteica y Función del Rotavirus-Grupo A.....	30
Tabla 1.3 Serotipos G VP7 de rotavirus del grupo A.....	41
Tabla 1.4 Genotipos y Serotipos P VP4 de rotavirus del grupo A.....	42
Tabla 1.5 Porcentaje de homología tanto a nivel de secuencia nucleotídica como a nivel de secuencia aminoacídica entre diferentes aislados de G tipos.....	43
Tabla 1.6 Comparación entre vacunas licenciadas.....	69
Tabla 3.1. Cuadro porcentual de muestras analizadas por electroforesis.....	86
Tabla 3.2. Análisis de las muestras que no presentan ningún electroferotipo.....	86
Tabla 3.3 Origen de las muestras.....	86
Tabla 3.4 Género de los individuos participantes en el estudio.....	87
Tabla 3.5 Determinación de electroferotipos según su patrón de migración.....	88
Tabla 3.6 Serotipos mixtos para la proteína VP7.....	89
Tabla 3.7 Porcentaje de patrones electroforéticos según el serotipo.....	89
Tabla 3.8 Serotipos mixtos para la proteína VP4.....	91
Tabla 3.9 Identificación serotipos en muestras no pertenecientes a rotavirus.....	93
Tabla 3.10 Distribución de G y P genotipos de rotavirus en niños ecuatorianos (Enero 2008 a Marzo del 2010).....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Representación esquemática de un virión de rotavirus. El virus está compuesto por tres cubiertas proteicas, la cápside externa, la cápside interna y el core que contiene la doble cadena de RNA.....	26
Figura 1.2.- Izquierda: Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de los 11 segmentos de RNA de doble hebra que componen el genoma del rotavirus. Centro: Esquema de la ubicación de las proteínas y segmentos genómicos a partir de los cuales se originan. Derecha: Reconstitución tridimensional de la partícula a partir de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica. Proteínas importantes desde el punto de vista de su antigenicidad: en azul VP6, en amarillo VP7, en rojo VP4.....	27
Figura 1.3 a) La partícula completa (triple capa) tiene un aspecto similar a una rueda. b) La partícula carente de la capa externa, conocida como partícula de doble capa, presenta una morfología muy rugosa debido a que la periferia muestra subunidades triméricas de la cápside interna. c) La partícula de capa simple, la cual solo muestra el core. Normalmente se encuentra agregada y no presenta genoma.....	28
Figura 1.4 Patrón de migración de rotavirus.....	29
Figura 1.5 Estructura general de un segmento genómico de rotavirus.....	30
Figura 1.6 Esquema de la estructura de la proteína VP4 basada en la secuencia nucleotídica de diferentes aislados de rotavirus y de mutantes que escapan a anticuerpos monoclonales neutralizantes. Se muestran los dominios de hemaglutinación y de unión al ácido siálico (HA/SA). En el codón 394 se encuentra un epítipo neutralizante por anticuerpos monoclonales.....	33
Figura 1.7 Esquema de las propiedades estructurales de la proteína VP6.....	35
Figura 1.8 Esquema de la estructura de VP7.....	36
Figura 1.9 Ciclo replicativo de rotavirus. El virus interacciona con sus receptores en la superficie de la célula y penetra por un mecanismo aun	

desconocido. En el interior de la célula se activa la transcriptasa viral y los ARNm dirigen la síntesis de proteínas virales. Las proteínas se acumulan en estructuras llamadas viroplasma donde se replica el ARN viral y se ensamblan las partículas de dos capas (DLPs) para proseguir la morfogénesis en el retículo endoplásmico..... 46

Figura 1.10 Célula infectada con rotavirus. En verde se tiñeron las fibras de actina, en azul los núcleos y en rojo los viroplasma utilizando un anticuerpo contra la proteína NSP2..... 47

Figura 1.11 Morfogénesis de rotavirus. 1) Replicación del RNA viral en el core dentro del viroplasma; 2) Adición de VP6 al core; 3) Interacción DLP-NSP4 y gemación hacia el lumen del RE; 4) Partícula viral inmadura con membrana lipídica y NSP4; 5) Partícula viral madura o TLP..... 49

Figura 1.12 Gráfica de la reasociación cepas de RV humano y bovino incluidas en la vacuna pentavalente RotaTeq..... 67

Figura 2.1 Comparación entre los primers para la amplificación y tipificación de VP7 y nested PCRs de Gouvea y HDAs. Para cada amplicón obtenido con cada primer se muestra su tamaño y el tipo al que corresponde (en el caso de la tipificación de G12 y de la nested PCR los primers se muestran juntos pero se emplean en reacciones separadas)..... 83

Figura 2.2 Representación de la proteína VP4, mostrando la localización de las regiones consensus: Se muestra el amplicón empleado como sustrato para el secuenciamiento de la región 9con1-9con2 junto con el *pool* de primers usados para la Genotipificación de los P tipos..... 84

Figura 3.1 Distribución geográfica de la procedencia de los pacientes incluidos en el estudio..... 85

Figura 3.2 Perfiles de Rotavirus en agarosa al 1%. Los clusters característicos de este virus permiten la detección mediante este método.....	87
Figura 3.3 Distribución porcentual de serotipos G analizados por RT-PCR. Muestras recolectadas de niños ecuatorianos con cuadro diarreico entre Enero del 2008 a Marzo del 2010.....	89
Figura 3.4 Visualización de los productos de amplificación de la PCR para la proteína VP7.....	90
Figura 3.5 Distribución porcentual de serotipos P analizados por RT-PCR. Muestras recolectadas de niños ecuatorianos con cuadro diarreico entre Enero del 2008 a Marzo del 2010.....	91
Figura 3.6 Visualización de los productos de amplificación de la PCR para la proteína VP4.....	92
Figura 3.7 Distribución de G y P genotipos de rotavirus en niños ecuatorianos en la Región Andina. (Enero 2008 a Marzo del 2010).....	94
Figura 3.8 Distribución de G y P genotipos de rotavirus en niños ecuatorianos en la Región Costa. (Enero 2008 a Marzo del 2010).....	95
Figura 4.1 Frecuencia de G y P genotipos de rotavirus en niños ecuatorianos. (Enero 2008 a Marzo del 2010).....	97

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A Buffer TBE 10X.....	113
ANEXO B Solución de PBS.....	113
ANEXO C Datos de los individuos participantes, código, edad, procedencia y provincia a la cual pertenece.....	114
ANEXO D Datos de los individuos participantes, código, edad, provincia a la cual pertenece, electroferotipo de la muestra y genotipificación de rotavirus por el método Nested RT-PCR.....	119

RESUMEN

El Rotavirus es el mayor agente etiológico de diarrea infantil a nivel mundial. La mortalidad es especialmente alta en países en vías de desarrollo. En décadas pasadas, la diarrea y la desnutrición (patologías relacionadas) han contribuido significativamente a la mortalidad infantil (Berois, 2003). La diarrea sigue siendo la mayor causa de morbilidad en niños.

Rotavirus del grupo A se encuentra clasificado en G y P serotipos de acuerdo a las diferencias de los antígenos neutralizantes de las proteínas VP7 y VP4. Además, las secuencias nucleotídicas que codifican para estas proteínas han sido usadas para clasificar al rotavirus dentro de G y P genotipos.

El presente trabajo abarcó el estudio en tres zonas geográficas del Ecuador: Sierra, Costa y Oriente. Los participantes fueron niños de cero a cinco años previamente vacunados contra rotavirus y que presentaban un cuadro de diarrea aguda y síntomas de deshidratación, estos asistieron a una casa de salud pública para ser evaluados y atendidos, dando lugar a la recepción de una muestra de heces para su análisis en el laboratorio de la institución. Dada la alta concurrencia de pacientes de variadas localidades del Ecuador a las instituciones participantes se pudo obtener muestras de las tres regiones antes mencionadas, ya que este trabajo tuvo como objetivo identificar las cepas de rotavirus circulantes en la población ecuatoriana; se realizó un genotipado de las proteínas VP4 y VP7, para determinar la predominancia de las cepas circulantes. De esta forma se evaluó la acción de la vacuna Rotarix aplicada por el Ministerio de Salud Pública, ante la presencia de los genotipos circulantes en nuestra población.

Las cepas de mayor predominancia son G2P[4] seguida de G2P[NT], con predominancias de 27 y 15% respectivamente.

ABSTRACT

The Rotavirus is the principal etiologic agent of infantile diarrhea world-wide. The Mortality rate is especially high in developing countries. In last decades, diarrhea and undernourishment (related pathologies) have contributed significantly to child mortality (Berois, 2003). Diarrhea continues to be the principal cause of morbidity among children.

Rotavirus A is classified in G and P serotypes according to the differences of the antigen neutralizing of proteins VP7 and VP4. In addition, the nucleotide sequences that they codify for these proteins have been used to classify the rotavirus within G and P genotypes.

The study comprehended three geographic zones of Ecuador: Mountain range, Coast and Orient. The participants were children from zero to five years old previously vaccinated against rotavirus who presented acute diarrhea and symptoms of dehydration, they attended a public clinic to be evaluated and taken care of health, a stool sample was provided for analysis in the laboratory of the institution. Given the high attendance of patients from various localities from Ecuador to the participant institutions it was possible to obtain samples from all three regions mentioned above, since this work had as objective to identify the circulating stocks of rotavirus in the Ecuadorian population; genotyping of proteins VP4 and VP7 was realized to determine the predominance of the circulating stocks. Thanks to the results the effectiveness of Rotarix vaccine, administered by the Ministry of Public Health, was evaluated against the presence of the circulating genotypes in our population.

The stocks of greater prevalence are G2P[4] followed of G2P[NT], with prevalence of 27 and 15% respectively.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

La diarrea neonatal es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años a nivel mundial. Dentro de los posibles agentes causales de esta enfermedad el rotavirus (RV) es la segunda causa más importante y la primera de origen viral. El material genético del este virus se encuentra compuesto por 11 segmentos de RNA de cadena doble, los cuales codifican para doce proteínas, seis estructurales y seis no estructurales. Dos proteínas VP4 y VP7 recubren la superficie externa del virus y son los principales blancos en el momento de generar respuesta inmune adaptiva por parte del huésped.

La variabilidad genética de estas proteínas como mecanismo de evasión de dicha respuesta inmune ha determinado que hasta hoy se conozcan más de 15 genotipos distintos de VP7 (G-tipos) y más de 21 variables de VP4 (P-tipos) en humanos. La mayor parte de los estudios epidemiológicos de RV se han centrado en la genotipificación de estas dos proteínas principalmente de VP7 con el fin de evaluar los G y P tipos predominantes y su posible evolución en el tiempo.

A nivel mundial los genotipos predominantes en humanos son G1, G2, G3 y G4 asociados principalmente a los P tipos P[8] y P[4].

En el presente estudio se pretende determinar los genotipos de rotavirus circulantes en la población ecuatoriana en el período 2008-2010, aplicando como metodología una Semi-nested PCR, seguida de una amplificación y análisis de secuencias de los genes VP7 y VP4.

1.2. Formulación del Problema

La diarrea neonatal es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años a nivel mundial (Gray *et al*, 2008). La causa más común de gastroenteritis en niños es de origen viral. La gastroenteritis vírica puede ser causada por un gran número de virus como rotavirus, calicivirus, astrovirus, adenovirus, etc. Los rotavirus producen una inflamación del estómago y del intestino con las consecuentes diarreas, vómitos, dolor abdominal, dolor de cabeza y fiebre. Para la mayoría de las personas no se trata de una enfermedad grave, pero para aquellos que no tienen acceso a líquidos para poder reemplazar las pérdidas de fluidos por los vómitos y diarreas, puede convertirse en una enfermedad letal debido a la deshidratación (Villena, 2003).

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que los rotavirus son una de las principales causas de gastroenteritis grave en niños y en animales, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. Aunque la diarrea es una de las enfermedades más comunes en este grupo de edad en todo el mundo, tiene especial importancia en los países en vías de desarrollo donde constituye una de las principales causas de mortalidad infantil. Se calcula que 125 millones de niños menores de 11 meses de edad y 450 millones de niños de entre 1 y 4 años residen en países en vías de desarrollo. La incidencia de diarrea es 3,8 episodios por niño menor de 11 meses y 2,1 por niño entre 1 y 4 años de edad. La gastroenteritis es una de las seis principales causas de muerte y una de las tres primeras causas de muerte por enfermedad infecciosa (Villena, 2003).

Los síntomas clínicos asociados con enfermedades gastroenteríticas producidas por virus entéricos no son suficiente característica para distinguir entre una enfermedad causada por virus u otra causa de gastroenteritis. Por consiguiente, los procedimientos de laboratorio como microscopía electrónica (EM), enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), passive particle agglutination test (PPAT), poliacrylamide gel electrophoresis (PAGE), o reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR),

son necesarios para confirmar un diagnóstico clínico de una gastroenteritis causada por un virus (Gray *et al*, 2008).

El esfuerzo por entender la biología molecular del rotavirus ha llevado al desarrollo de procedimientos que pueden usarse para estudiar la replicación y transcripción del este genoma viral, la estructura del rotavirion, y la estructura y función de sus proteínas (Villena, 2003).

Por este motivo se ha planteado como problema:

¿El rotavirus es el causante de la mayoría de cuadros diarreicos en niños ecuatorianos menores de cinco años, a los cuales se les ha administrado la vacuna contra este agente?

1.3. Justificación del Problema

Se estima que a los tres años de edad virtualmente todo niño habrá sido infectado al menos una vez por rotavirus, siendo variable la consecuencia clínica de estas infecciones. El mayor causante de patología en humanos es el rotavirus del grupo A. Estos agentes han sido reconocidos como la causa individual más importante de diarrea severa en niños pequeños causando gran mortalidad en países en desarrollo y siendo la causa de ingentes gastos asociados a morbilidad en todo el mundo (Castello, 2004).

La infección por rotavirus produce un espectro de manifestaciones que va desde lo subclínico a la diarrea severa con deshidratación grave y en ocasiones fatal, producida por un desbalance de electrolitos. El primer episodio de gastroenteritis por RV (primoinfección) es el que se presenta con mayor severidad clínica, disminuyendo la gravedad en los episodios subsiguientes. Las infecciones asintomáticas son frecuentes en los recién nacidos, en los niños mayores y en los adultos. La re-infección, en general asintomática, se presenta en los contactos adultos. El período de incubación, por lo general, es de 1 a 3 días (Castello, 2004; Sociedad Argentina de Pediatría, 2003).

Se produce una menor deshidratación en niños amamantados, las posibles explicaciones a este hecho son la transferencia de anticuerpos IgA, la provisión de vitamina A y la más importante el aporte de lactaderina, la cual protege contra la infección sintomática por RV. Esta protección es de 50% en los menores de 6 meses y 40% en menores de 1 año. También se ha correlacionado la protección contra rotavirus con la presencia de anticuerpos IgG provenientes de pasaje trasplacentario en niños no alimentados con leche materna (Castello, 2004; Sociedad Argentina de Pediatría, 2003).

Un escollo importante en el desarrollo de vacunas contra rotavirus es la falta de un conocimiento adecuado de los mecanismos que median la inmunidad. Esto a pesar del gran esfuerzo dedicado a ese objetivo y el desarrollo de varios modelos de estudio

en animales. La infección por rotavirus no genera inmunidad específica, por lo que las re infecciones son posibles a lo largo de toda la vida. Sin embargo, se ha observado tempranamente que la primo-infección hace que la probabilidad de presentar la enfermedad con cuadro grave se reduzca en las infecciones subsiguientes. De esta forma se comprende la lógica de la estrategia utilizada en la mayoría de las vacunas desarrolladas contra rotavirus que tienen como objetivo disminuir o eliminar la enfermedad severa pero no evitar la infección (Castello, 2004)

Un estudio de prevalencia de la infección diarreica causada por rotavirus en los hospitales pediátricos del Ecuador en 1080 niños menores de 5 años realizado por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador a cargo de la Dirección de Control y Mejoramiento de la Salud Pública, Programa Ampliado de Inmunizaciones, demostró que la prevalencia de rotavirus era del 40.8 %, con una incidencia alta, afectando a 1 de cada 3 niños menores de 5 años, con una tasa de mortalidad de 4,0 por mil niños. (Ministerio de Salud Pública, 2006). Un estudio realizado por la Pan American Health Organization nos indica que las cepas con mayor incidencia son P[8]G9 y P[4]G2; seguidas por las cepas P[6] G4; P[8] G2; P[6] G9; P[6] G11; P[6] G12, indicando de esta manera los serotipos más virulentos circulantes en nuestra población.

Es por esto que se debe considerar de manera trascendental la importancia de conocer las cepas de Rotavirus circulantes en nuestra población y el origen de las mismas, para poder comprobar el impacto de la vacuna ante las cepas circulantes y de esta forma poder verificar la protección heterotípica contra los serotipos presentes en las vacunas. Sin embargo el trabajo de investigación debe continuar con la verificación del surgimiento de nuevas cepas o recombinaciones con patrones muy distintos de genotipos a nivel regional y entre los países vecinos, desarrollando de esta forma vacunas específicas para los serotipos regionales.

Este proyecto de investigación permitirá el avance científico y el desarrollo de conocimientos basados en las realidades de la población ecuatoriana en el área de biotecnología humana, para de esta forma discernir los medicamentos o vacunas a ser

aplicados según nuestras necesidades. Por otro lado, la comunicación entre laboratorios que realicen caracterización molecular de rotavirus en la región ayudará a sistematizar y ampliar la base genética de los rotavirus circulantes.

1.4. Objetivos de la Investigación

1.4.1. Objetivo General

- Identificar los genotipos de rotavirus circulantes en la población infantil ecuatoriana que ha sido previamente vacunada con la vacuna monovalente y presenta diarrea aguda causada por el mismo.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Optimizar la técnica de aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras de heces.
- Determinar mediante la técnica de RT- PCR los serotipos de rotavirus presentes en la población infantil ecuatoriana que recibieron la vacuna monovalente contra el rotavirus y que presentan diarrea aguda por este agente.
- Evaluar el impacto de la introducción de la vacuna monovalente en la población infantil ecuatoriana.

1.5. Marco Teórico

1.5.1. Historia

A pesar de la magnitud del problema de la diarrea infantil, no se empezaron a conocer los agentes causantes de tales diarreas hasta los años 70 del pasado siglo. Los virus entéricos fueron descubiertos en los años 50 y aún siendo posible el cultivo in vitro de algunos de ellos, se tardaron varios años en encontrar su conexión como importantes agentes infecciosos causantes de diarrea (Villena, 2003)

Con el descubrimiento del virus de Norwalk y su asociación a una gastroenteritis epidémica viral en jóvenes y adultos en 1972 por Kapikian y colaboradores, seguido del hallazgo de rotavirus humano y su asociación con una grave gastroenteritis endémica en niños en 1973 por Bishop y colaboradores, se empezó a ver por vez primera la importancia de esos agentes virales. Ambos fueron identificados mediante visualización directa en el microscopio electrónico. El virus Norwalk fue identificado en heces mediante microscopía, mientras que los primeros rotavirus fueron visualizados a partir de cortes ultrafinos de mucosa duodenal. Inmediatamente, otros rotavirus fueron identificados en heces por microscopía electrónica (Villena, 2003)

Pronto se estableció que los rotavirus eran un importante agente etiológico de diarrea en niños y jóvenes, causante de entre el 35 y 50% de las hospitalizaciones por gastroenteritis durante los dos primeros años de vida (Villena, 2003)

En la actualidad, el agente viral más frecuente encontrado en niños menores de 5 años con gastroenteritis aguda son los rotavirus grupo A, causantes del 25 al 65% de gastroenteritis graves infantiles. El segundo agente encontrado corresponde a calicivirus (7-22%), y el tercer lugar se lo disputan astrovirus y adenovirus, con un 2-9% y 2-6% respectivamente.

1.5.2. Generalidades familia *Reoviridae*

Los rotavirus integran uno de los nueve géneros dentro de la familia Reoviridae, sus miembros poseen un genoma formado por 10, 11 o 12 segmentos de RNA de doble cadena, comparten una morfología icosaédrica, con un diámetro entre 60 y 85 nm, tienen tres cubiertas proteicas, distribuidas en capas concéntricas siguiendo una simetría icosaédrica. La replicación tiene lugar en el citoplasma, formándose viroplasmos en las células infectadas. Dentro de los géneros que se agrupan en esta familia (Tabla 1.1) Orthoreovirus, Orbivirus, Rotavirus y Coltirus infectan a mamíferos y aves (Villena, 2003).

Tabla 1.1: Géneros clasificados dentro de la familia Reoviridae.

Familia	Género	Especie tipo	Huésped
<i>Reoviridae</i>	Orthoreovirus	Mammalian orthoreovirus	Vertebrados
	Orbivirus	Bluetongue virus	Vertebrados
	Rotavirus	Rotavirus A	Vertebrados
	Coltirus	Colorado tick fever virus	Vertebrados
	Aquareovirus	Aquareovirus A	Vertebrados
	Cypovirus	Cypovirus 1	Invertebrados
	Fijivirus	Fijivirus 1	Plantas
	Phytoreovirus	Rice dwarf virus	Plantas
	Oryzavirus	Rice regged stunt virus	Plantas

Fuente: Villena, 2003

Cabe destacar que de las 6 familias víricas existentes con genoma dsRNA (Reoviridae, Birnaviridae, Totiviridae, Partitiviridae, Hypoviridae y Cystoviridae), Reoviridae es la que posee mayor diversidad de huéspedes (Villena, 2003)

1.5.3. Rotavirus

Los rotavirus son partículas virales de forma icosaédrica y sin cubierta lipídica mide entre 60 a 85nm, su genoma se encuentra formado por once segmentos de RNA de doble cadena, cada segmento codifica para al menos una proteína. Se encuentra conformado por tres capas proteicas a las cuales nos referiremos como cápside externa, cápside interna y core (Fig.1.1) (Castello, 2004). La cápside externa está compuesta por las proteínas estructurales VP7 y VP4, mientras que en la cápside interna se encuentra principalmente VP6. El core, localizado dentro de la cápside interna, contiene el genoma viral, compuesto de 11 segmentos/de RNA de cadena doble (Wihelmi *et al*, 2003), con un peso total de 6120kDa o 18555 bp. La cápside contiene todas las enzimas necesarias para la replicación del RNA (Gray *et al*, 2008).

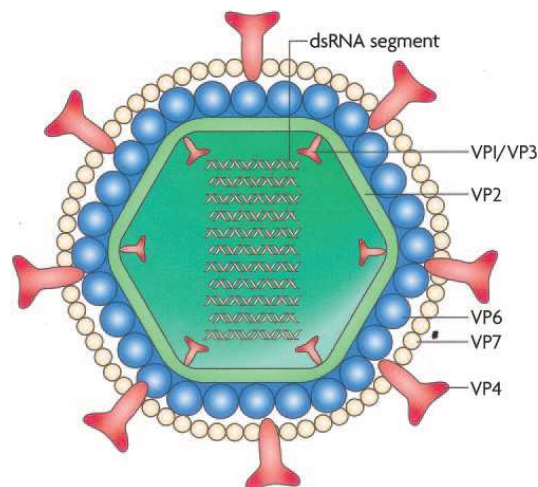


Figura 1.1 Representación esquemática de un virión de rotavirus. El virus está compuesto por tres cubiertas proteicas, la cápside externa, la cápside interna y el core que contiene la doble cadena de RNA (Dennehy, 2008).

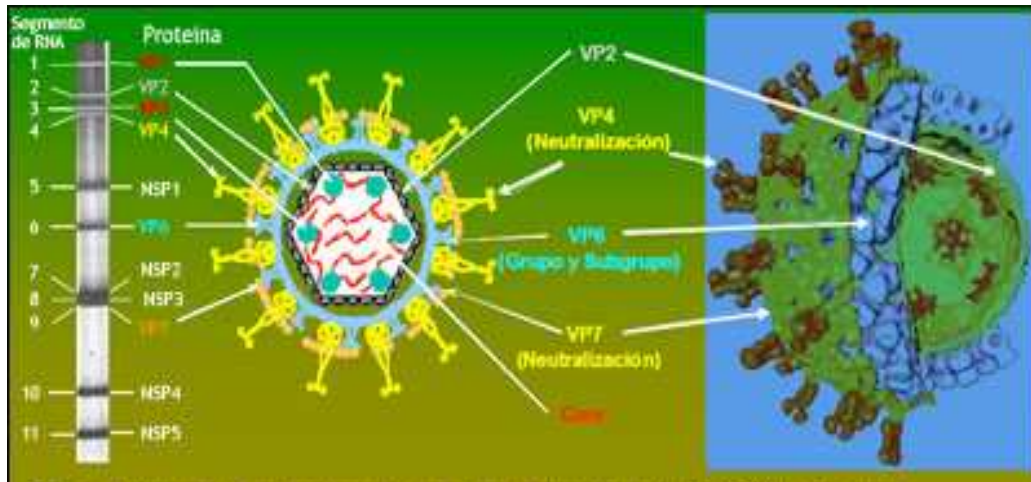


Figura 1.2.- Izquierda: Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de los 11 segmentos de RNA de doble hebra que componen el genoma del rotavirus. Centro: Esquema de la ubicación de las proteínas y segmentos genómicos a partir de los cuales se originan. Derecha: Reconstitución tridimensional de la partícula a partir de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica. Proteínas importantes desde el punto de vista de su antigenicidad: en azul VP6, en amarillo VP7, en rojo VP4 (Castello, 2004)

Cada gen codifica para una proteína, siendo un total de 6 proteínas estructurales (VPs) y 5 proteínas no estructurales (NSPs). Los genes del 1 al 6 codifican para las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, VP4 y VP6 respectivamente, pero la proteína VP7 puede ser codificada por los genes 7, 8 ó 9. Los genes 5, 7, 8, 10 y 11 codifican para las proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 y NSP5) respectivamente. (Gray *et al*, 2008 & Bok *et al*, 2001)

1.5.4. Morfología

Mediante técnicas de microscopía electrónica es posible observar tres morfologías distintas de viriones de rotavirus. (Figura 1.3)

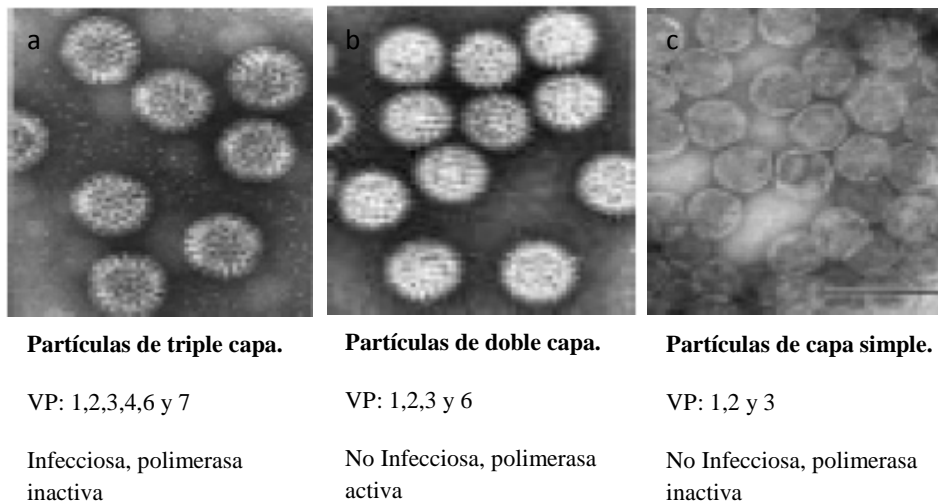


Figura 1.3 a) La partícula completa (triple capa) tiene un aspecto similar a una rueda. b) La partícula carente de la capa externa, conocida como partícula de doble capa, presenta una morfología muy rugosa debido a que la periferia muestra subunidades triméricas de la cápside interna. c) La partícula de capa simple, la cual solo muestra el core.

Normalmente se encuentra agregada y no presenta genoma.

Fuente: Villena, 2003

1.5.5. Proteínas Estructurales

Los 11 segmentos de dsRNA han sido numerados según el orden de migración en geles de poliacrilamida al 10%, siendo el 1 el más lento y el 11 el más rápido. En la tabla 1.2 se muestran las características y funciones conocidas de cada uno de los productos proteicos codificados por cada uno de los segmentos (Arguelles, *et al*, 1999). El patrón migratorio de cada uno de los aislados de rotavirus serogrupo A puede variar. En los RV del grupo A (como por ejemplo Wa) se reconocen normalmente 3 segmentos de gran peso molecular (7-9) y 2 de incluso menor peso molecular (10 y 11) (Figura 1.4). Sin embargo, algunos RV del grupo A poseen un patrón migratorio diferente. Por ejemplo, en los RV de origen avícola el quinto segmento migra muy cerca del cuarto y los segmentos 10 y 11 son muy difíciles de distinguir. En algunas cepas de origen humano el onceavo segmento migra más lentamente de lo habitual, encontrándose entre el noveno y el décimo segmento. Este último patrón es conocido como electroferotipo

corto (RV DS-1), que casi siempre corresponde al subgrupo antigénico I de RV humano. El electroferotipo largo (RV Wa) es característico de RV humano de subgrupo antigénico II (Villena, 2003).

El análisis del electroferotipo es relativamente sencillo, rápido y una técnica muy popular para la detección de RV y para estudios moleculares epidemiológicos donde es posible observar reorganizaciones genómicas. Sin embargo, no es posible utilizarlo como único método de clasificación de las cepas de RV, ya que cepas muy diferentes pueden compartir el mismo patrón electroforético. (Iturriza *et al*, 2004).

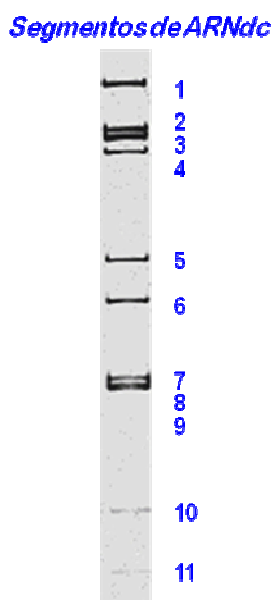


Figura 1.4 Patrón de migración de rotavirus

Los 11 segmentos de dsRNA se encuentran dentro del core de las partículas virales y no son infecciosos por si solos. Las partículas virales poseen su propia enzima RNA polimerasa RNA dependiente, la cual transcribe cada segmento individual en mRNA. Cada cadena positiva del segmento de RNA empieza con una guanidina, seguida de una secuencia conservada que forma parte de una región no codificante del extremo 5': 5'GGCUUUUAAA3' (Figura 1.5). Posteriormente hay una región codificante con una única pauta de lectura (a excepción del gen 7, 9, 10 y 11) que finaliza con un codón stop. Seguido se encuentra una segunda región no codificante que contiene una secuencia conservada 3' terminal, que finaliza con dos citosinas:

5'UUAAGUUAGAACUGUAUGAUGUGACC3'. La longitud de las secuencias no codificantes varía para cada uno de los genes. Las secuencias de RNA genómicas de RV son ricas en bases A+U (58-67%) y no presentan una señal de poliadenilación final (Villena, 2003)

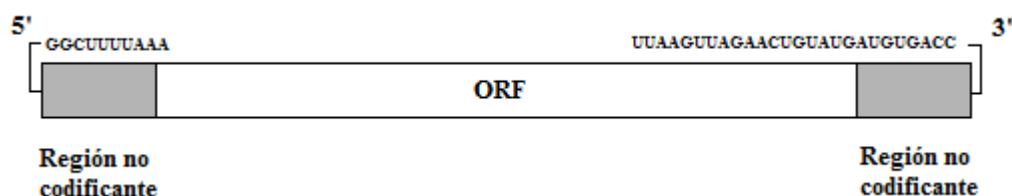


Figura 1.5 Estructura general de un segmento genómico de rotavirus.

Tabla 1.2 Asignación Gen-Proteína, Localización Proteica y Función del Rotavirus-Grupo A

Segmento de ARN (Gen)	Tamaño (pb)	Producto Proteico ¹	Peso (kDa)	Localización	Características y Función
1	3302	VP1	125.0	core	RNA polimerasa, unión al ssRNA, unión a VP3.
2	2690	VP2	102.7	core	Unión al dsRNA, requerida para la actividad replicasa de VP1
3	2591	VP3	88.0	core	Guaniltransferasa, metiltransferasa, unión a ssRNA, unión con VP1
4	2362	VP4	86.7	cápside externa	Hemaglutinina, Antígeno neutralizante, potenciación infectividad por proteasa, virulencia, región de fusión, adhesión a la célula, induce protección.

¹ Los productos proteicos han sido denominados a propuesta de Mason y modificados por Lui y Mattion y colaboradores (1994).

5	1611	NSP1	58.6	proteína no estructural	Dedos de Zinc, unión al ssRNA.
6	1356	VP6	44.8	cápside interna.	Hidrofóbica, Trimérica, antígeno de subgrupo.
7	1104	NSP3	36.7	proteína no estructural.	Ácida, dimérica, unión al extremo 3' del mRNA viral, inhibe la traducción del huésped.
8	1059	NSP2	34.6	proteína no estructural	Básica, oligomérica, unión al ssRNA.
9	1062	VP7 (1)	37.4	cápside externa	Glicoproteína integrada en la membrana del RE, trimérica, antígeno neutralizante, 2 regiones hidrofóbicas NH ₂ terminales, unión al Ca ²⁺ , induce protección.
		VP7 (2)	33.9		
10	751	NSP4	20.3	proteína no estructural	Glicoproteína transmembrana del RE, participa en la morfogénesis, enterotoxina, induce protección.
11	667	NSP5	21.7	proteína no estructural.	Básica, fosfoproteína, unión al ssRNA, proteína quinasa, interacción con NSP2 y NSP6.
		NSP6		proteína no estructural.	Interacción con NSP5, presente en viroplasmatas y en la mayoría de cepas.

Fuente: Villena, 2003; Gray *et al*, 2008

VP1 se encuentra en el core, tiene actividad polimerasa, en una célula infectada esta enzima produce la transcripción del ARNm para la síntesis de proteínas virales y produce copias de los segmentos del genoma (Lee *et al*, 2001)

VP2 Se encuentra localizada en el Core, e interactúa con el ARNs de manera inespecífica y se cree que es este hecho el que la hace indispensable en el momento de la replicación. Además se sabe que de todas las proteínas estructurales, VP2 es la única que tiene la capacidad de auto ensamblarse en su forma icosaédrica nativa, cuando es expresada en células de insecto, lo que sugiere que VP2 jugaría un rol importante en el ensamblaje del virión interactuando con el resto de las proteínas estructurales (Chandra *et al*, 1999).

VP3 se encuentra localizada en el core, posee actividad metiltransferasa y al mismo tiempo es una guanidiltransferasa. La misma une nucleótidos GTP e incorpora los CAPs a los extremos 5' del ARNm viral, el cual está desprovisto de cola poliA en su extremo 3'; además protege al ARN de las nucleasas (Alberti, 2007; Villena, 2003).

La proteína VP4 es el producto proteico del segmento genómico 4, no glicosilado, que se encuentra en la capa más externa de la cápside. Constituye un 1.5% de la proteína viral. En muchas cepas es una hemaglutinina, responsable de la adhesión a la célula (Villena, 2003)

Esta proteína se ha definido como determinante de virulencia en ratones y cerdos. Induce anticuerpos neutralizantes y anticuerpos dirigidos contra VP4 neutralizan la infectividad del virus in vitro y pasivamente protege a ratones de la infección vírica heteróloga in vivo. Posteriores estudios han mostrado que es capaz de inducir protección inmunitaria en animales, y es inmunogénica en niños y animales. (Villena, 2003)

Una división proteolítica de VP4 genera dos pequeños polipéptidos designados como VP5* y VP8*. Análisis antigénicos han demostrado que la subunidad VP8* posee el mayor epítipo responsable de la especificidad para serotipo, mientras que la subunidad VP5* contiene lugares responsables de la reacción cruzada entre diferentes VP4. Solo la variación nucleotídica existente entre los aminoácidos de las posiciones 84 y 180 de la subunidad VP8* ha sido útil para definir los epítipos específicos del tipo P. La poca disponibilidad de anticuerpos y antisueros que reconocieran específicamente los diferentes serotipos de la proteína VP4, llevó a la necesidad del estudio de sus propiedades basándose en la secuencia nucleotídica del gen que codifica para ésta. (Mascarenhas *et al*, 2007).

En la mayoría de aislados de RV animales la proteína VP4 contiene 776 aminoácidos. En cambio todos los aislados de RV humano presentan un aa menos entre las posiciones 134 y 136 de la proteína VP8*. Por otro lado, la secuencia nucleotídica y el análisis directo de la secuencia aminoacídica ha permitido conocer los lugares exactos de procesamiento proteolítico. Se han identificado tres lugares de corte para la tripsina (arginina 231, arginina 241 y arginina 247) siendo las argininas 241 y 247 altamente conservadas en todas las cepas de RV señaladas en la Figura 1.6

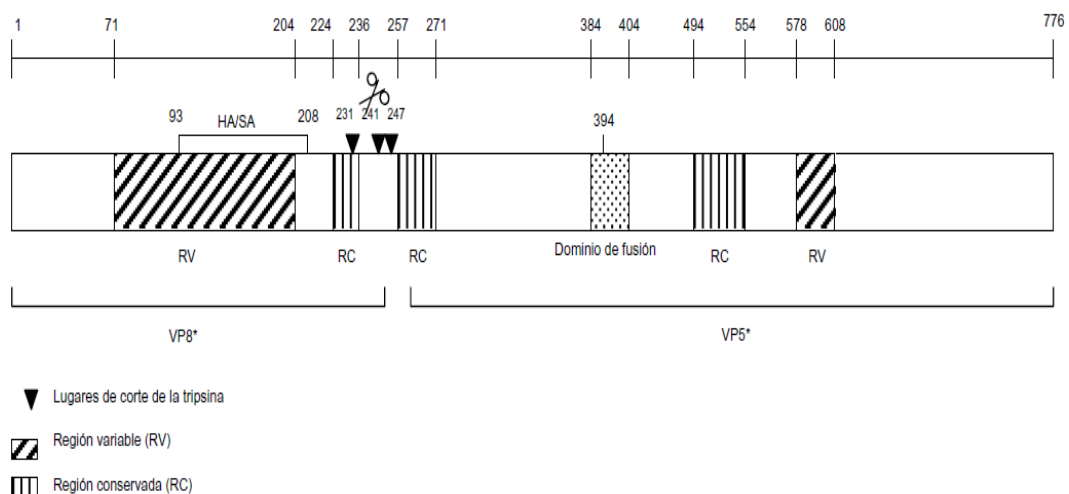


Figura 1.6 Esquema de la estructura de la proteína VP4 basada en la secuencia nucleotídica de diferentes aislados de rotavirus y de mutantes que escapan a anticuerpos monoclonales neutralizantes. Se muestran los dominios de hemaglutinación y de unión

al ácido siálico (HA/SA). En el codón 394 se encuentra un epítipo neutralizante por anticuerpos monoclonales. (Villena, 2003)

La región comprendida entre los aa 384 y 401 es una región altamente conservada entre todas las cepas de rotavirus sugiriendo que podría encontrarse involucrada en una función importante en el ciclo de replicación del virus. Esta región también comparte una alta homología con lugares de fusión interna encontrados en otros virus como en el virus Semliki Forest y en el virus Sindbis especulándose su posible implicación en el proceso de entrada del virus a la célula o en el proceso de maduración de la partícula vírica durante su gemación de la membrana del retículo endoplasmático, o ambos (Villena, 2003). La mayor variación se encuentra entre los aminoácidos 71 y 240 de la subunidad VP8* y los análisis de secuencia han correlacionado el tipo P con los aa 84 y 180 (Villena, 2003).

VP4 crea 60 estructuras en forma de pico (espículas) que se proyectan más de 10 nm desde la superficie viral. VP4 es la hemaglutinina viral (Rondon, 2006) y tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del virus, incluyendo la unión al receptor y la penetración a la célula que infecta; por lo tanto, las propiedades de esta proteína son importantes ante la célula huésped, la virulencia, el tropismo, e inducción de inmunidad protectora (Rojas *et al*, 2008)

La proteína VP6 es el principal componente estructural de los viriones. Interacciona simultáneamente con la proteína del core VP2 y con las dos proteínas de la cápside más externas VP4 y VP7. La proteína VP6 forma trímeros espontáneamente y es extremadamente estable. Éstos pueden ser disociados y reasociados con cambios de pH. Si se elimina esta proteína de los viriones, ellos pierden la actividad polimerasa aunque no se sabe el motivo de tal fenómeno. Es el principal antígeno utilizado en las pruebas de diagnóstico debido a que presentan epítopes muy conservados entre muchas de las cepas de rotavirus. Es una proteína hidrofóbica, altamente antigénica e inmunogénica, que puede inducir protección inmunitaria (Villena, 2003)

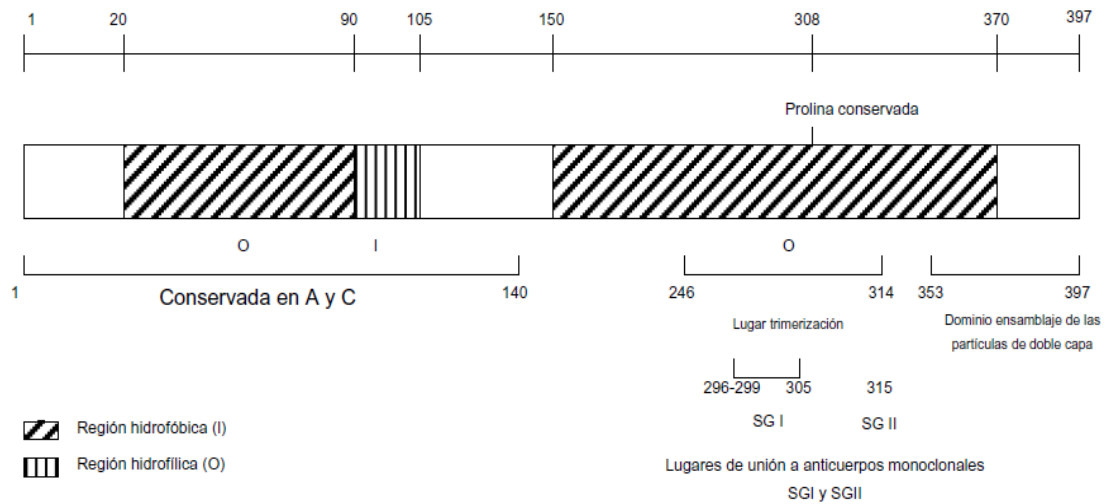


Figura 1.7 Esquema de las propiedades estructurales de la proteína VP6 (Villena, 2003)

El dominio de trimerización se encuentra entre los aa 246 y 314, y un dominio necesario para la formación de partículas de doble capa se encuentra entre los residuos 353 y 397. Los residuos 296-299 y 305 son importantes porque determinan el epítipo del subgrupo I reconocido por el anticuerpo monoclonal 255/60. El residuo 315 se encuentra implicado en la especificidad del subgrupo II. La prolina 308 está implicada en la estabilización del trímero. La región N-terminal es crucial para el ensamblaje del virus. Se cree que está implicada en el transporte de la proteína VP6 hacia las inclusiones viroplasmáticas. Estudios con anticuerpos monoclonales han puesto de manifiesto que los aa 58-62 no son accesibles y que podrían encontrarse en la interfase con VP2 (Villena, 2003).

La proteína VP7 es la segunda proteína más abundante del virión ya que constituye el 30% de la proteína viral. Es una glicoproteína presente en la cápside externa (Cooney et al, 2001). Es traducida y glicosilada con oligosacáridos de manosa mientras es insertada en la membrana del retículo endoplasmático, una inserción dirigida por una secuencia señal de corte encontrada en el extremo amino terminal de la proteína. Inicialmente se pensó que era el único antígeno que contenía determinantes neutralizantes (VR5, VR7, VR8 y VR9), y esto estimuló muchos estudios de su estructura, biosíntesis y función. (Villena, 2003)

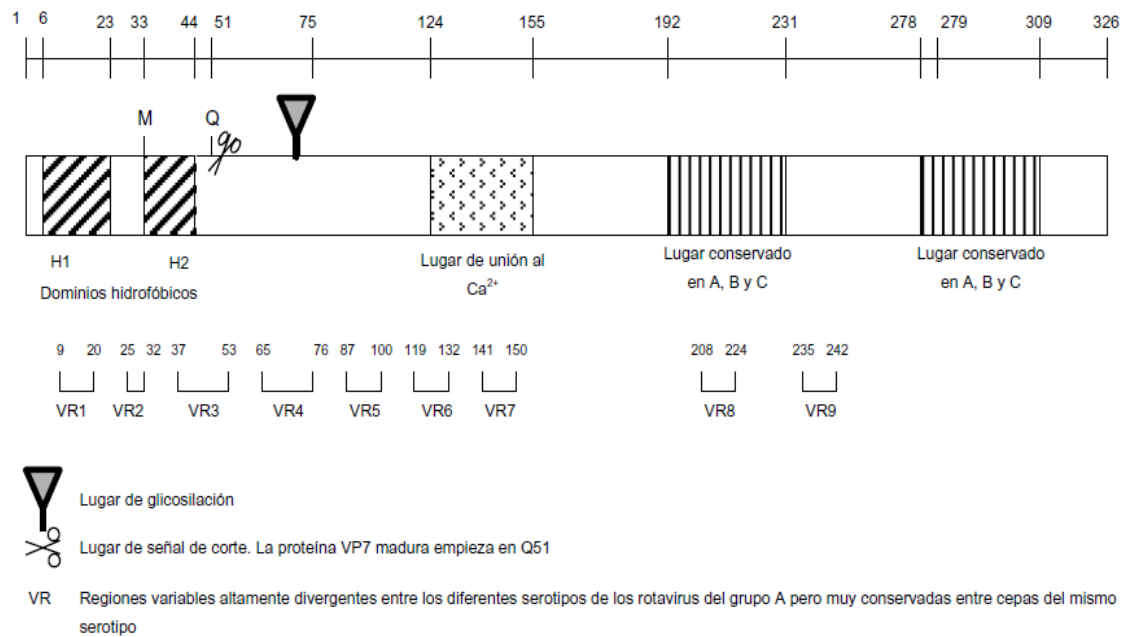


Figura 1.8 Esquema de la estructura de VP7 (Villena, 2003)

Comparando la secuencia aminoacídica deducida de un gran número de aislados tanto de origen animal como humano se descubrieron importantes características biológicas. El ORF de 326 aa empieza con un codón de iniciación con una secuencia consenso débil (Cooney et al, 2001). Un segundo ORF con una secuencia consenso fuerte se encuentra a 30 codones de distancia (Figura 1.8). A ambos codones de iniciación preceden regiones de aminoácidos hidrofóbicos (H1 y H2) que podrían actuar como secuencias señal para dirigir la proteína VP7 hacia el retículo endoplasmático (Figura 1.8). En algunas cepas se encuentra un tercer ORF después del segundo dominio hidrofóbico (H2). El lugar de glicosilación en SA11 es en el aminoácido 69, pero otras cepas pueden llegar a presentar hasta 3 lugares diferentes (Villena, 2003)

VP7 constituye el 90% de la superficie lisa de la cápside externa, la cual es perforada por 132 canales que penetran el virión y alcanzan el centro viral. VP7 puede también jugar un papel en la absorción viral y en la penetración en las células epiteliales (Rondon, 2006).

1.5.6. Proteínas no estructurales

Se piensa que éstas pueden facilitar la replicación viral y así aumentar la eficiencia de la formación del virus (Mori *et al*, 2002)

NSP1, el producto del gen 5, es una proteína poco conservada, se asocia con el citoesqueleto celular y con el extremo 5' del ARN viral. Se postula que formaría un complejo NSP1-ARNviral-NSP3 que facilitaría la llegada del material genético a los viroplasmata, donde a partir de ellos se llevaría a cabo la síntesis de ARN doble hebra que va a formar parte de las partículas virales nacientes (Alberti, 2007).

NSP2 es una proteína oligomérica con actividad NTPasa que se une preferentemente al ARN de cadena simple e interacciona con otra proteína no estructural del virus como es NSP5. Se sabe que NSP5 es una fosfoproteína que se auto ensambla en dímeros y posee actividad quinasa y junto con NSP5 y NSP6 forman la estructura básica de un viroplasma. Se cree que la expresión de NSP2 y NSP5 es suficiente para la formación de al menos los viroplasmata. Por tanto, si bien el mecanismo por el cual estas proteínas interactúan entre ellas y con el ARN no se conoce muy bien, se cree que cumplen un rol fundamental en el reclutamiento de los ARN doble hebra y de otras proteínas desde su sitio de síntesis, el encapsulamiento del ARN y la traslocación de las partículas virales nacientes desde los viroplasmata al retículo endoplasmático (Berois *et al*, 2003).

NSP3 se encuentra en el citoplasma, y se le atribuyen varias funciones. Además de facilitar la función conjunta con NSP1, tiene la capacidad de interactuar con eIF4GI el cual es un factor de iniciación de la traducción eucariote y también con una proteína que se une a las regiones poli-A del extremo 3' de los mensajeros celulares (PABP, poli-A binding protein). Se ha postulado que mediante esta interacción, NSP3 puede desplazar la unión simultánea de la PABP con el factor eIF4GI *in vivo*, lo que favorecería la síntesis de proteínas virales e interferiría con la traducción de los ARNm celulares (Alberti, 2007).

NSP4 es codificada por el gen 10, tiene 22 residuos de aminoácidos, reside en el retículo endoplasmático, posee un dominio transmembrana mediante el cual se mantiene unida a dicho organelo y un dominio carboxiterminal orientado hacia el citoplasma a través del cual NSP4 interactúa con VP6 y media la transición de las partículas de doble capa desde los viroplasma al retículo endoplasmático. Por otra parte se sabe que NSP4 actúa como una enterotoxina viral uniéndose a un receptor de membrana celular y aumentando así los niveles intracelulares de calcio, lo que genera la liberación de cloro y concomitante disminución de la absorción de sodio y agua. (Mori *et al*, 2002)

Además es una proteína multifuncional ya que además del mecanismo de inducción de diarrea por liberación de cloro se le atribuyen otras actividades que se cree convergen en el mismo evento. Se ha visto que NSP4 tiene la capacidad de bloquear transportadores de membrana de la familia de los SGLT-1 los cuales son responsables del co-transporte de sodio y glucosa al interior de los enterocitos, evento que contribuye a la pérdida de agua como consecuencia de un aumento en la presión osmótica en el lumen del intestino. El mecanismo de inducción de diarrea por la enterotoxina es el utilizado para explicar la acción patológica de la infección por RV cuando no hay daños histopatológicos observables (Alberti, 2007).

1.5.7. Clasificación del rotavirus

Los rotavirus se clasifican en grupos, subgrupos y finalmente, serotipos/genotipos según las propiedades antigénicas/genómicas de las proteínas VP4, VP6 y VP7 (Gray *et al*, 2008)

La proteína de la cápside interna, VP6, es la determinante de las reactividades de grupo dependiendo de los diferentes epítopes presentes en esta proteína, habiéndose constatado hasta ahora 7 grupos (A, B, C, D, E, F y G). Los grupos A, B y C han sido aislados tanto en humanos como en animales, mientras que los grupos D, E, F y G han

sido aislados solo en animales. La mayoría de infecciones por rotavirus en humanos son causadas por rotavirus del grupo A. Este virus es capaz de intercambiar segmentos de su genoma entre miembros de su mismo grupo (Villena, 2003)

De entre todos, el rotavirus del grupo A es el mejor caracterizado y de mayor repercusión clínica, ya que es a nivel mundial el agente infeccioso más prevalente en la gastroenteritis aguda infantil, se lo asocia típicamente a diarreas en personas y animales jóvenes. Los rotavirus B han sido identificados en brotes epidémicos y casos esporádicos, pero con epidemias extensas de enfermedad diarreica grave, tanto en adultos como en niños en Asia. Finalmente, los rotavirus del grupo C son patógenos, principalmente del cerdo, pero se ha reportado que causan enfermedad diarreica poco frecuente, esporádica, entre niños, en USA, Japón, Reino Unido, y España con frecuencias del 1-7% de los casos de gastroenteritis (Pachón *et al*, 2006; Villena, 2003)

Dentro del grupo A se han definido diferentes subgrupos (SG) atendiendo a la presencia o ausencia de distintos tipos de epítopes inmunoreactivos frente a determinados anticuerpos monoclonales. Se conocen los subgrupos, I, II, I+II, no I y noII según sean reactivos o no a los anticuerpos monoclonales 255/60 y 631/9. El subgrupo I es el más frecuente entre las cepas humanas, mientras que el subgrupo II es el más frecuente entre las cepas de origen animal (Villena, 2003).

Los rotavirus del grupo A comprenden gran número de serotipos definidos mediante ensayos de neutralización. Estos ensayos han desenmascarado la existencia de dos proteínas externas de la cápside, altamente reactivas frente a anticuerpos neutralizantes de la infección: las proteínas VP7 y VP4 (Fig. 1.2). El hecho de que los genes que codifican para ambas proteínas puedan segregarse independientemente da la posibilidad de la existencia de antígenos de neutralización heterólogos (Villena, 2003). Además determinan la clasificación de rotavirus en los denominados serotipos/genotipos “G” y “P” respectivamente. Cuando el método de detección es inmunológico se habla de serotipos, mientras que si el método de detección es molecular se habla de genotipos. A pesar de la existencia de la correlación entre

serotipos y genotipos virales, en la actualidad y mundialmente se prefiere utilizar los métodos de biología molecular para la caracterización (genotipado) de cepas circulantes (Pachón *et al*, 2006)

Considerando las diferencias en la proteína VP7, se han caracterizado al menos quince genotipos G (denominados así por la naturaleza glicoproteica de VP7), de los cuales diez de ellos afectan al ser humano (G1 a G6, G8 a G10 y G12). Los genotipos G1 a G4 son los responsables de la mayoría de las infecciones en el humano (97,5%). (Ramírez *et al*, 2007; Gray *et al*, 2008)

Las diferencias antigénicas frente a la proteína VP4 determinan los tipos P, denominados así por su sensibilidad a la proteasa. En la actualidad se conocen al menos veinte y un serotipos P, de los que nueve han sido detectados en humanos (P1A, P1B, P2A, P3A, P3B, P4, P5A, P8 y P11). Todos los genotipos G han sido caracterizados como serotipos, sin embargo, éste no es el caso para todos los genotipos P (Villena, 2003).

Por tanto, la nomenclatura designada se ha basado en que cada virus tiene un P tipo, indicado por un orden numérico para el serotipo, y por un orden numérico entre corchetes para indicar el genotipo, y para el G-serotipo, se indica con un orden numérico que coincide con el número del genotipo. Así P1A[8]G1 (P-serotipo 1A, P-genotipo 8; G-sero/genotipo 1); P[6]G4 (P-genotipo 6, P-serotipo no determinado; G-sero/genotipo 4) y así sucesivamente. Varias combinaciones de G y P pueden ser observados *in vivo* e *in vitro*, tanto en humanos como en animales. (Gray *et al*, 2008)

Tabla 1.3 Serotipos G de rotavirus del grupo A.

Serotipo	Humanos	Animales ^a
G1	Wa, KU, RV-4, K8, D, M37, Mont, WI79, AU32, HN-1, GR475/87	Bo/T449, Po/C60, Po/C91, Po/C95, Po/CN117, Po/C86, Po/S7, Po/S8
G2	DS-1, S2, RV-5, RV-6, KUN, HN-126, 1076, E201, E210, HU5, TA3, TA20	
G3	Ito, YO, P, M, Nemoto, AU-1, RV-3, W178, AK-35, ST8, MO, McN13, McN14, HCR3, CHW927A, Ro1845, O264, AU228, PA710, 02/92, CH-32, CHW2, CHW17, CH-55, AI-75, J-12, TK08, TK28	Si/SA11 CI3, Si/SA11 4fm, Si/SA11-SEM, Si/SA11-FEM, Si/RRV, Ca/K9, Ca/CU-1, Ca/A79-10, Ca/LSU79C-36, Ca/RS15, La/ALA, La/C-11, La/R-2, La/BAP-2, Eq/H-2, Eq/FI14, Eq/HO-5, Eq/69, Eq/124, Eq/K1673, Eq/311, Fe/Cat97, Fe/Cat2, Fe/Cat22, Fe/taka, Fe/FRV64, Fe/FRV-1, Mu/EW, Mu/EB, Mu/EL, Mu/EC, Mu/EHP, Mu/YR-1, Po/CRW-8, Po/A131, Po/A138, Po/LCA843, Po/A821, Po/A411, Po/BEN-307, Po/PRV 4F, Po/AT/76, Ov/LRV1, Po/MDR-13 ^b
G4	Hochi, Hosokawa, ST3, 57M, ST4, VA70	Po/Gottfried, Po/SB-1A, Po/SB-2A, Po/BEN-144, Po/BMI-1
G5	IAL28 ^c , BR1054	Po/OSU, Po/EE, Po/TFR-41, Po/A34, Po/A46, Po/C134, Po/CC17, Po/S8, Eq/H-1
G6	PA151, PA169, MG6	Bo/NCDV-Lincoln, Bo/UK, Bo/B641, Bo/RF, Bo/C486, Bo/WC3, Bo/KN-4, Bo/IND, Bo/BRV033, Bo/B-60, Bo/CR231/39, Ov/LRV2, Cap/Cap455
G7		Ch/Ch-2, Ty/Ty-1, Ty/Ty-3, Pi/PO-13, Bo/993/83
G8	69M, B37, HAL1166, HAL1271, HMG89	Bo/678, Bo/A5, Bo/NCDV-Cody, Bo/J2538, Eq/26/94
G9	WI61, F45, Mc523, AU32, US1205, Mc345, 116E	Po/ISU-64, Po/S8, Ov/LRV
G10	I321, Mc35, A28, A64	Bo/B223, Bo/61A, Bo/V1005, Bo/KK3, Bo/B-11, Bo/A44, Bo/CR129, Bo/BR65/255, Eq/R-22, Ov/Ip14, Ov/K923
G11		Po/YM, Po/A253
G12	L26, L27	
G13		Eq/L338
G14		Eq/FI23, Eq/FR4, Eq/FR5, Eq/FR8, Eq/EQ431, Eq/CH3
G15		Bo/Hg18

^a Aislados de origen animal indicados por las abreviaciones: Si, simio; La, conejo; Po, porcino; Ca, canino; Mu, murino; Ty, pavo; Ch, pollo; Pi, paloma; Eq, equino; Fe, felino; Bo, bovino; Ov, ovino; Cap, cabrío.

^b Po/MDR-13 tiene reactividad serotípica dual (G3 y G5) (Nagesha *et al.*, 1990).

^c Hu/IAL28 tiene reactividad serotípica dual (G5 y G11) (Timenetsky *et al.*, 1997).

Tabla 1.4 Genotipos P de rotavirus del grupo A

Genotipo	Serotipo	Humanos	Animales ^a
P[1]	P6	MP409	Bo/C486, Bo/NCDV, Bo/BRV033, Bo/BRV16, Bo/A5, Bo/CR231/39, Bo/J2538, Bo/RF, Si/SA11 4fm, Si/SA11-FEM, Eq/26/94, Ov/LRV1
P[2]	P5B		Si/SA11 CI3, Si/SA11-SEM
P[3]	P5B		Si/RRV, Fe/FRV64
	P5A	Ro1845, HCR3	Ca/K9, Ca/CU-1, Ca/RS15, Fe/Cat97
P[4]	P1B	RV5, DS-1, S2, L26, KUN, E201, E210, CHW17	
P[5]	P7		Bo/UK, Bo/WC3, Bo/B641, Bo/61A, Bo/678, Bo/V1005, Bo/IND, Po/PRV 4S
P[6]	P2A	M37, 1076, RV-3, ST3, McN13, US1205, NnB1, S12/85	
	P2B		Po/Gottfried, Po/BEN-144, Po/S5, Po/S7, Po/SB-2A
	P2C	AU19	
P[7]	P9		Po/OSU, Po/TRF-41, Po/C60, Po/A821, Po/A138, Po/YM, Po/A253, Po/BMI-1, Po/AT/76, Po/SB-2A, Po/C95, Po/C134, Po/CC117, Po/CN117, Po/SB-1A, Po/CRW-8, Po/BEN-307, Po/A131, Po/EE, Po/ISU-64, Eq/H-1
P[8]	P1A	Wa, KU, P, YO, MO, VA70, D, AU32, CH-32, CH-55, CHW2, CH927A, CH927B, WI61, F45, AI-75, AI-53, AI-36, AI-39, Hochi, Hosokawa, BR1054, TK-08, TK-28, TK-15, 97'B53, J-12, CJN, 95-91, 95-87, Ito	Po/S8A, Po/S8B, Ov/LRV
P[9]	P3	K8, AU-1, PA151, M318, AU228, 02/92	Fe/FRV-1, Fe/Cat2
P[10]	P4	69M, 57M	Eq/H2, Eq/FI23, Eq/FI14
P[11]	P8	116E, I321	Bo/B223, Bo/A44, Bo/KK3, Bo/B-11, Bo/KN-4, Bo/CR129, Bo/BR65/255, Eq/R-22, Ov/LRV2
P[12]	P4		Eq/H-2, Eq/FI14, Eq/FI23, Eq/FR4, Eq/FR8, Eq/69, Eq/124, Eq/EQ431, Eq/K311, Eq/K1673, Eq/CH3
P[13]	P13		Po/MDR-13, Po/A46, Po/Clon8
P[14]	P11	PA169, HAL1166, HAL1271, HAL8590, Mc35, MG6, GR475/87	La/ALA, La/C-11, La/BAP-2, Cap/Cap455
	P11?		La/R-2
P[15]			Ov/lp14, Ov/lp16
P[16]	P10		Mu/Eb, Mu/EW, Mu/EC
P[17]			Pi/PO-13, Bo/993/83, Ch/Ch-1, Ty/Ty-1, Ty/Ty-3
P[18]	P12		Eq/L338
P[19]			Po/PRV 4F
P[20]			Mu/EHP
P[21]			Bo/Hg18

^a Aislados de origen animal indicados por las abreviaciones: Si, simio; La, conejo; Po, porcino; Ca, canino; Mu, murino; Ty, pavo; Ch, pollo; Pi, paloma; Eq, equino; Fe, felino; Bo, bovino; Ov, ovino; Cap, cabrío.

Fuente Villena, 2003.

La homología entre diferentes aislados representantes de casi todos los serotipos de VP7 conocidos se muestra en la Tabla 1.5. Se aprecia que incluso aislados que comparen el mismo G serotipo presentan un grado de homología a nivel de secuencia de aminoácidos no mayor al 94.5% (Villena, 2003).

Tabla 1.5 Porcentaje de homología tanto a nivel de secuencia nucleotídica como a nivel de secuencia aminoacídica entre diferentes aislados de G tipos.

G SEROTYPE	1	2	3	3	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Strain	Wa	DS-1	P	SA11	RRV	ST3	OSU	UK	Ch2	69M	WI61	B223	YM	L26	L338	FI23
1	Wa	74.6	76.3	75.8	74.8	76.9	76.6	74.0	62.5	72.2	75.8	74.7	74.0	74.8	72.1	73.3
2	DS-1	74.2	75.2	74.2	74.2	71.3	72.9	73.8	61.4	73.6	73.9	73.1	75.9	73.7	71.3	71.2
3	P	82.8	74.9	81.7	82.6	75.6	78.2	79.2	63.8	76.3	79.3	77.9	78.1	76.5	76.0	78.0
3	SA11	81.6	75.2	91.4	84.4	74.7	76.9	77.4	61.5	75.4	78.7	77.4	78.0	77.3	76.0	78.6
3	RRV	80.7	74.9	92.3	94.5	75.1	77.6	78.1	63.6	77.0	79.5	77.2	79.2	76.1	75.7	81.1
4	ST3	76.7	71.8	78.1	77.3	76.7	76.6	74.5	63.8	71.9	76.4	73.3	75.2	73.7	71.8	72.7
5	OSU	78.2	73.9	85.0	84.4	85.0	75.5	75.6	64.6	75.2	78.9	74.2	82.9	75.5	73.2	73.8
6	UK	81.6	76.1	84.4	85.3	85.9	78.2	82.2	62.4	76.0	75.9	75.5	74.8	75.3	72.9	73.4
7	Ch2	58.3	57.5	58.9	58.9	58.6	62.9	58.1	59.9	61.3	61.9	63.2	61.1	62.5	62.8	62.2
8	69M	75.5	75.5	83.4	83.7	84.7	74.3	81.3	82.5	58.0	75.1	76.2	75.9	73.7	72.3	73.2
9	WI61	78.8	76.1	84.7	86.8	87.1	76.5	81.3	83.4	58.8	81.6	74.9	78.0	76.2	73.4	76.7
10	B223	79.1	73.3	84.7	84.1	85.3	74.5	80.1	82.8	60.8	81.0	81.9	74.9	73.3	73.3	72.0
11	YM	78.5	75.8	85.9	87.7	87.7	75.8	89.0	83.4	58.4	84.1	84.4	81.9	74.1	72.4	75.1
12	L26	76.3	76.1	79.8	80.1	81.0	76.3	80.1	78.2	58.4	79.1	80.4	78.8	80.1	73.4	74.2
13	L338	74.8	72.4	81.6	81.3	82.2	74.2	77.9	78.2	58.4	77.0	77.6	76.4	78.5	77.9	76.4
14	FI23	78.8	73.9	84.4	86.8	87.1	77.3	79.5	80.1	59.9	80.7	84.4	77.9	83.4	78.5	77.6

% amino acid identity

% nucleotide identity

Fuente: Villena, 2003.

En el caso de la proteína VP4, el grado de homología existente entre diferentes genes pertenecientes al mismo genotipo es superior al 85% (Villena, 2003)

1.5.8. Diversidad de rotavirus

La epidemiología de las infecciones por RV es compleja. La mayoría de las infecciones en humanos está causada por el grupo A, sin embargo los rotavirus son más diversos y presentan mayor tendencia al cambio que lo que se consideraba anteriormente. Las asociaciones G/P predominantes de rotavirus humanos son: G1, G3 y G4 con P[8] (también denominado P1A, y G2 con P[4] (también denominado P1B). En los últimos años han emergido por todo el mundo tipos antes infrecuentes, especialmente el G9, con dos genotipos P diferentes, P[8] y P[6] (Mori *et al*, 2002; Miren *et al*, 2000).

Los primeros estudios que examinaron la diversidad de las cepas identificaron cinco genotipos claramente preferentes a nivel mundial: G1, G2, G3, G4 y P[8]. Estos representan más del 90% de los circulantes, por lo que se consideraron como la base de las vacunas recombinantes que incorporaron cepas humanas y animales (Pachón *et al*, 2006)

La variabilidad antigénica de los rotavirus ha motivado la realización de múltiples ensayos para identificar los genotipos predominantes en los diferentes países. De esta manera se ha podido comprobar que se detectan importantes variaciones en la distribución de los tipos antigénicos circulantes entre diferentes poblaciones y/o periodos de tiempo. Recientemente se ha publicado una revisión en la que se documentan más de 40.000 cepas según la combinación de las proteínas de superficie. Como ejemplo de esta diversidad se encuentra el genotipo G9, que en los últimos ocho años ha emergido mundialmente y ya representa el 4,1% del total de infecciones por rotavirus, por delante del G3 (3,8%), con lo que se ha convertido en el cuarto genotipo más detectado globalmente (América, Australia e India). En Europa se ha detectado en diversos países (Italia, Gran Bretaña, Francia, Albania, Holanda, Hungría, Alemania, Irlanda) a partir de 1990 y en España desde 1998. Durante el 2005 se ha detectado una prevalencia elevada del genotipo G9 en nuestro medio. (Pachón *et al*, 2006)

1.5.9. Tropismo de rotavirus

Los rotavirus tienen un tropismo muy específico, ya que únicamente infectan las puntas de las vellosidades del intestino delgado, esto sugiere que deben existir receptores específicos que permitan su entrada a la célula huésped. In vitro, estos virus también muestran un tropismo restringido ya que, aunque pueden unirse a la superficie de una gran variedad de líneas celulares, solo son capaces de infectar eficientemente aquellas derivadas de epitelio renal o intestinal. Este tropismo es debido, cuando menos en parte, a la interacción del virus con sus receptores celulares; aparentemente, la entrada de estos virus a la célula huésped es un proceso que se lleva a cabo en varios pasos, en los cuales están involucrados diferentes dominios de las proteínas de superficie del virus, así como varios receptores celulares, que incluyen a las integrinas a2b1, a4b1, axb2, avb3 y a la proteína hsc70. Además de estas proteínas, se ha sugerido que las balsas lipídicas (microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos) tienen un papel importante en la infección. Aun se desconoce la vía de internalización del virus, aunque se ha propuesto que podría ser a través de endocitosis dependiente de balsas lipídicas o mediante un mecanismo de penetración directa a través de la membrana plasmática (Rojas *et al*, 2008)

1.5.10. Ciclo Replicativo

Durante el proceso de entrada, la partícula viral pierde las proteínas de la capa externa y se activa la transcripción que depende de la RNA polimerasa viral (VP1). Los transcritos virales recién sintetizados tienen dos funciones; por una parte funcionan como mRNAs que dirigen la síntesis de las seis proteínas estructurales (VPs) y las seis proteínas no estructurales (NSPs) del virus y por la otra, sirven como blancos para la síntesis de la cadena negativa (que es complementaria al mRNA) y da lugar al RNA de doble cadena (dsRNA) que constituye el genoma viral. (Rojas *et al*, 2008)

Una vez que se acumula una masa crítica de proteínas virales, de 3 a 4 horas después de la infección, se forman en el citoplasma celular estructuras electrodensas llamadas viroplasmias (Fig. 1.9), en donde se ha propuesto que se lleva a cabo la replicación del genoma viral. En estas estructuras también se ensamblan las partículas de doble capa que posteriormente geman al interior del retículo endoplásmico y adquieren durante este proceso la tercera capa proteica, dando lugar a la partícula madura (Fig. 1.10). Las proteínas NSP2 y NSP5 son esenciales para la formación de los viroplasmias, ya que en ausencia de cualquiera de ellas no se forman estas estructuras y el ciclo replicativo del virus se interrumpe. (Mascarenhas *et al*, 2007)

Poco tiempo después de su entrada, el virus se apodera de la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula, de modo que la mayoría de las proteínas que son sintetizadas durante la infección son las proteínas virales y la síntesis de proteína celular se ve casi abatida completamente. Los mRNAs virales tienen una estructura Cap- en el extremo 5', pero a diferencia de la mayoría de los mRNAs celulares, no contienen poli-A en el extremo 3', y en su lugar, tienen una secuencia consenso (GACC3') que está conservada en los once segmentos del ARN viral. (Rojas *et al*, 2008)

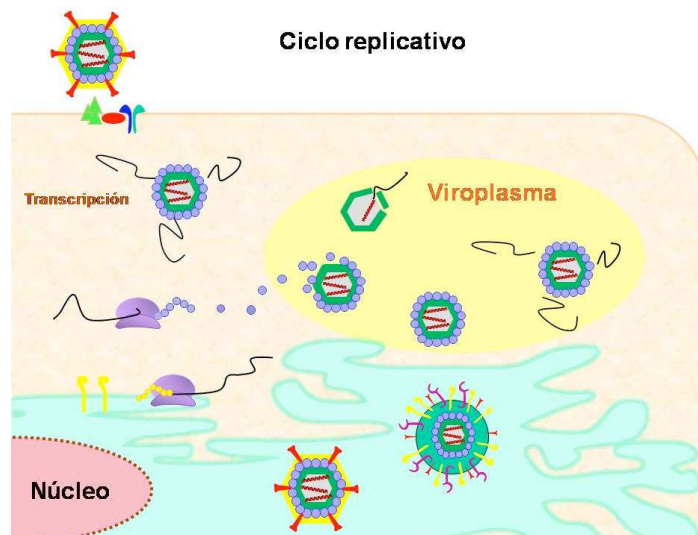


Figura 1.9 Ciclo replicativo de rotavirus. El virus interactúa con sus receptores en la superficie de la célula y penetra por un mecanismo aun desconocido. En el interior de la célula se activa la transcriptasa viral y los ARNm dirigen la síntesis de proteínas virales. Las proteínas se acumulan en estructuras llamadas viroplasmias donde se replica el ARN

viral y se ensamblan las partículas de dos capas (DLPs) para proseguir la morfogénesis en el retículo endoplásmico. (Rojas *et al*, 2008)

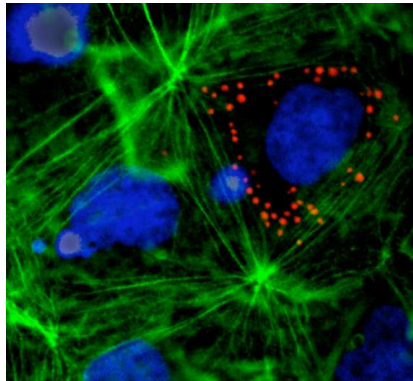


Figura 1.10 Célula infectada con rotavirus. En verde se tiñeron las fibras de actina, en azul los núcleos y en rojo los viroplasmas utilizando un anticuerpo contra la proteína NSP2. (Rojas *et al*, 2008)

1.5.10.1. Replicación

En los viroplasmas, o fábricas virales, es donde los mensajeros virales cumplen su segunda función, servir como templado para la replicación del genoma. La serie de eventos necesarios para este proceso no se conoce completamente, sin embargo, se han descrito complejos de ARN con proteínas virales que han sido propuestos como intermediarios de replicación (IRs). La unidad mínima está formada por las proteínas VP1 y VP3 en asociación con el ARNm. El siguiente intermediario se define como el pre-core, en el que además de VP1 y VP3, se añaden las proteínas NSP2 y NSP5, las cuales probablemente ayudarían a un proceso activo de entrada del ARNm hacia el interior del core, al que se ha agregado VP2; es en estos IRs donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral. Posteriormente, VP6 se ensambla sobre el core, para formar a la partícula de dos capas o DLP, la cual ya contiene los elementos necesarios para llevar a cabo una nueva ronda de transcripción del genoma (Rojas *et al*, 2008).

La falta de un sistema eficiente de genética reversa para rotavirus ha hecho muy complicada y limitada la investigación acerca de la función de cada una de las proteínas virales durante el ciclo replicativo del virus. Recientemente, se ha utilizado el sistema de interferencia de ARN como una alternativa para inhibir de manera específica la traducción de cada una de las proteínas virales y analizar el fenotipo resultante en células infectadas.

1.5.11. Morfogénesis Viral

La morfogénesis viral es el proceso que comprende todos los pasos necesarios para el ensamble de las partículas virales infecciosas. La morfogénesis de los rotavirus inicia en los viroplasmatas, con el ensamble de los intermediarios de replicación que posteriormente dan origen a las DLP's. En células infectadas, la proteína VP7 y la proteína no estructural NSP4 son glicoproteínas que durante su traducción se insertan y modifican en la membrana del retículo endoplásmico (RE) (Figura 5).

Las DLP's presentes en los viroplasmatas (que se encuentran alrededor del RE), geman hacia el lumen del RE y se ha propuesto que la proteína NSP4 funge como receptor de la DLP en la membrana del RE y favorece su gemación; durante este proceso, las DLP's adquieren una membrana lipídica transitoria que contiene, además de NSP4, a la glicoproteína VP7 y a VP4 que es la proteína que forma las espículas del virus.

Finalmente, las partículas envueltas pierden la membrana lipídica, NSP4 se disocia y la capa externa, formada por VP4 y VP7, adquiere su conformación final (Figura 5). El mecanismo por el cual se lleva a cabo este último paso en la morfogénesis no está claro; en estudios previos se había observado que, *in vitro*, tanto VP4 como NSP4 tienen actividad desestabilizante de membranas y por lo mismo, estas proteínas habían sido propuestas como las responsables de remover la membrana lipídica de las partículas presentes en el lumen del RE. Por otra parte, se había propuesto que las

proteínas VP4, VP7 y NSP4 formaban un receptor hetero-trimérico que permitía el proceso de gemación de las DLP's, hacia el interior del RE (Rojas *et al*, 2008)

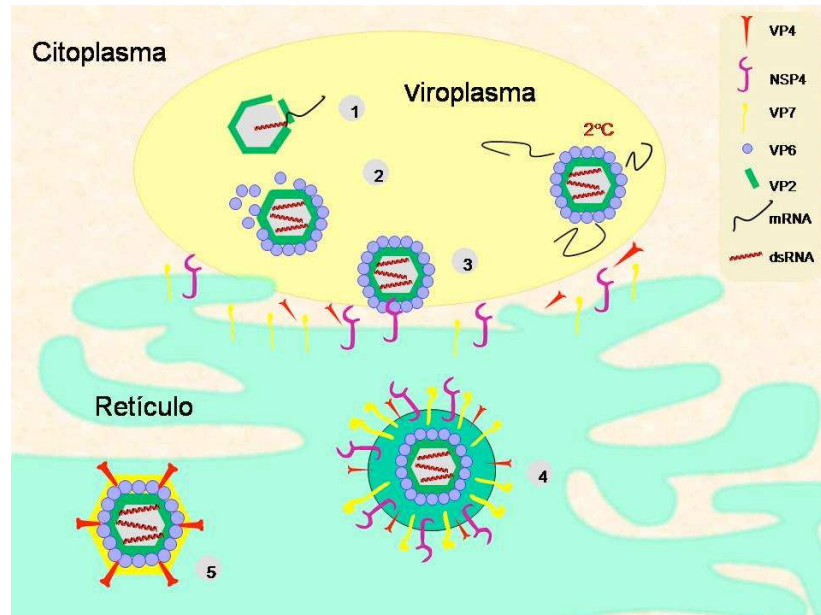


Figura 1.11 Morfogénesis de rotavirus. 1) Replicación del RNA viral en el core dentro del viroplasma; 2) Adición de VP6 al core; 3) Interacción DLP-NSP4 y gemación hacia el lumen del RE; 4) Partícula viral inmadura con membrana lipídica y NSP4; 5) Partícula viral madura o TLP. (Rojas *et al*, 2008)

1.5.12. Variabilidad Genética

El rotavirus tiene una alta capacidad de mutación por varios factores. Primero, la enzima responsable de su replicación, ARN polimerasa tiene baja fidelidad; por otro lado debido a su organización segmentada que muestran sus genes, se pueden presentar una gran combinación y diversidad en las cepas de este virus. (Ramírez *et al*, 2007)

En los rotavirus, al igual que en otros virus de ARN, a la polimerasa del virión le falta la actividad de exonucleasa 3'-5', por lo que no tiene la función de reparación que presentan las polimerasas de los virus de ADN y el orden de mutación por la falta

de este mecanismo se encuentra en el orden de 10^{-4} a 10^{-5} errores por nucleótido incorporado y si consideramos que el genoma completo de rotavirus es de 18,556 nt, la potencialidad que presentan de generar mutantes es de una mutación por cada copia del genoma. (Ramírez *et al*, 2007)

Existen otros mecanismos que provocan variabilidad genética: la capacidad de recombinación y los rearrreglos genéticos, los cuales se manifiestan en las coinfecciones (introducción de cepas de rotavirus animal a la población humana) con diferentes cepas de rotavirus. Sin embargo, de estos mecanismos el más importante en la generación de nuevas variedades es la denominada recombinación por rearrreglos génicos, también llamada reordenamientos genéticos. (Ramírez *et al*, 2007)

1.6. Relación de Genotipos en el Mundo

A la fecha se han reportados 15 genotipos G (glicoproteína) y 21 genotipos P (actividad proteolítica). El rotavirus humano presenta enorme diversidad, las proteínas G y P pueden ser segregadas independientemente, dando por lo menos 42 combinaciones diferentes G-P, los genotipos en circulación más comunes resultan de la combinación con los genotipos P1A[4] y P1A[8] con los genotipos G1, G2, G3, G4 y G9. P1A[8]G1 es la cepa predominante a nivel mundial, representando sobre el 70% de las infecciones de rotavirus en Norte América, Europa y Australia; 30% de las infecciones en América del Sur y Asia, y 23% en África. G9 constituye la cepa predominante en muchas partes de Asia y África, G8 es proporcionalmente más frecuente aislada en África. En América del Sur, la cepa G5 ha emergido en niños con diarrea, y G9 es aislada con más frecuencia en casos de enfermedad severa en Latinoamérica. Simultáneamente, la distribución de la cepa P2A[6] difiere de acuerdo a la región, ahora sobrepasa el 50% de las cepas circulantes en África, considerando que la cepa P1A[8] está asociada con una mayor predominancia en el mundo (Ramírez *et al*, 2007; Dennehy, 2008)

Se ha reportado que el genotipo de las cepas de rotavirus en circulación en un área geográfica puede variar de una temporada a otra. Lo anterior se puede deber a que el genoma del rotavirus está continuamente sufriendo modificaciones debido a mutaciones y rearrreglos de los genes que codifican para las proteínas externas VP4 y VP7 desencadenando nuevas combinaciones que se reflejan en nuevos genotipos. (Ramírez *et al*, 2007)

Aunque las vacunas están elaboradas para proteger contra serotipos más frecuentes en brotes epidémicos, las mutaciones que se acumulan en el genoma y se expresan en los sitios antigénicos de las proteínas de superficie externa VP4 y VP7 de rotavirus pueden limitar su efectividad, ya que cada vez es más frecuente la falla de los anticuerpos que se producen para reaccionar contra el serotipo correspondiente, por lo que aparecen cepas de rotavirus que pueden escapar a la neutralización por los anticuerpos y continuar diseminándose entre la población humana. (Ramírez *et al*, 2007)

Es por esto que se hace necesario el desarrollo de estudios epidemiológicos acerca de los genotipos presentes en nuestra región y de la identificación de las cepas prevalentes según la situación geográfica. De esta forma, la documentación que se genera de estos será de gran utilidad para el Ministerio de Salud Pública, y se podrá verificar la eficacia de la vacuna adquirida ante los genotipos circulantes, ya que las vacunas comerciales están producidas con genotipos predominantes en otras partes del mundo. Ello provocará una modificación del comportamiento natural de la evolución del rotavirus, pudiéndose provocar de esta forma la generación de nuevas cepas del virus. Otro punto que se debe considerar es la importancia de enfocarnos a obtener una vacuna con genotipos que sea específica para los infantes de la región.

1.7. Protección Inmune contra la Infección Natural

La mayoría de las infecciones sintomáticas, causadas por rotavirus ocurre entre los 3 meses y los 2 años de edad, con una mayor incidencia entre los 7 y los 15 meses siendo éstas más severas que las infecciones que atacan a infantes más jóvenes o niños mayores de 2 años y adultos. (Dennehy, 2008)

El amamantamiento es la mejor protección inmune que transfiere la madre al niño, ya que la leche materna es la fuente de anticuerpos, vitaminas y proteínas que protegen al neonato de ésta y otras enfermedades. Como resultado, la mayoría de neonatos infectados por rotavirus tendrán una enfermedad asintomática o el curso de esta será apacible. Una excepción en el infante a pre-término es que tendrá un mayor riesgo de contraer una enfermedad severa, debido a la falta transplacentaria de anticuerpos. (Dennehy, 2008)

Después de la primera infección natural por rotavirus, los infantes desarrollan una respuesta de anticuerpos neutralizantes en suero contra el serotipo G de la cepa infectante y en menor medida contra otros tipos. Conjuntamente están protegidos en un 40% contra una enfermedad sintomática subsecuente, se reduce la frecuencia de ataques de diarrea y el 88% de los niños están protegidos contra gastroenteritis severa indiferentemente si la primera infección fue sintomática o asintomática (Dennehy, 2008). Esta primera exposición induce no sólo una respuesta inmune al serotipo específico involucrado (inmunidad homotípica), sino que también induce inmunidad a un alto porcentaje de serotipos de rotavirus adicionales (inmunidad heterotípica). Una segunda, tercera y cuarta infección confieren protección progresiva, sin embargo si la re infección es por una cepa con el mismo tipo G que la primera, su curso será muy probablemente asintomático sugiriendo protección homotípica. Con esto en mente, es claro que la meta de la vacunación contra rotavirus debe ser imitar y hasta exceder la respuesta inmune a la infección natural. (Castello, 2004; Rondon, 2006 & Dennehy, 2008)

VP6 es el antígeno inmunodominante ante la respuesta inmunológica del anticuerpo por una infección de rotavirus humano. La presencia de anticuerpos IgA e IgG en suero, está considerada como un indicador de inmunidad después de una infección o de la vacunación. Altos niveles del anticuerpo IgA en el suero actúan intracelularmente en células de rotavirus infectadas. Anticuerpos neutralizantes contra antígenos VP7 y VP4 claramente juegan un papel en la protección después de la infección del rotavirus natural (19), pero su papel en la inmunidad vacuna-inducido es menos claro. Las vacunas de rotavirus tipo oral con virus vivo actuales utilizan el concepto que la inmunidad a los antígenos de superficie de rotavirus es esencial o importante para protección vacuna-inducido. Sin embargo, las vacunas que inducen niveles bajos de anticuerpos en suero han sido eficaces en ensayos de campo (Villena, 2003)

1.8. Relevancia de la Inmunidad Serotipo Específica

Los seguimientos por períodos prolongados demuestran que un genotipo puede predominar por largos períodos en una población, lo cual parecería incompatible con un rol exclusivo de anticuerpos tipo-específicos en la protección. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que variaciones intragenotípicas podrían explicar este fenómeno por lo que son necesarios más estudios sobre la deriva antigénica de los serotipos en períodos prolongados. Desde un punto de vista epidemiológico, la aparición de especificidades emergentes sin causar enfermedad especialmente severa o desplazando completamente a los serotipos previos ha sido interpretado como evidencia de mecanismos protectores de reacción cruzada entre serotipos (inmunidad heterotípica) (Castello, 2004).

Un caso especial lo representan las cepas P[4]G2, las cuales causan brotes de diarrea en niños en edad escolar y en adultos en una proporción mayor a la esperada de acuerdo a su frecuencia epidemiológica. Se ha sugerido que estas diarreas se producen por falta de protección heterotípica de largo término ya que los genotipos que con

mayor probabilidad infectan a los individuos en los primeros años de vida (P[8]G1, G3, G4) no comparten los antígenos de neutralización VP4 y VP7 con los virus P[4]G2. Aún más, ambos conjuntos de virus son incluso más divergentes ya que pertenecen generalmente a genogrupos distintos. El genoagrupado es una técnica que permite evidenciar relaciones de homología entre distintas cepas. Por este método los rotavirus humanos se asignaron a tres grupos cuyos miembros comparten gran homología (genogrupos): Wa like, DS-1 like y AU-1 like. Las cepas P[8]G1, G3, G4 y G9 pertenecen generalmente al tipo Wa y las P[4]G2 son generalmente tipo DS-1 por lo que todas las proteínas de éstas últimas (no solo los antígenos de neutralización) comparten bajo nivel de homología con las primeras. Por esto se considera que los rotavirus humanos del tipo P[4]G2 podrían constituir un desafío para las vacunas monovalentes. (Castello, 2004)

En resumen, podría decirse que la inmunidad serotipo específica jugaría un papel importante aunque no exclusivo ya que existe evidencia de que la inmunidad heterotípica es clínicamente significativa. El caso más importante en el cual los mecanismos inmunes serotipo específicos serían determinantes para la protección son las cepas P[4]G2 del genogrupo DS-1. (Castello, 2004)

1.9. Epidemiología y Mecanismos de Transmisión

1.9.1. Epidemiología

El reservorio de la enfermedad son probablemente solo los humanos no habiéndose encontrado patogenicidad por virosis animal, excepto para los grupos B y C. Los rotavirus de los grupos B y C detectados en seres humanos son, al parecer, muy diferentes de los encontrados en animales. (Pachón *et al*, 2006)

1.9.2. Mecanismos de Transmisión

La forma primaria de transmisión es fecal-oral, aunque se han notificado bajos títulos del virus en secreciones respiratorias y otros fluidos corporales. El virus es estable en el medio ambiente por lo que la transmisión puede ocurrir a través de la ingestión de agua o comida contaminada y mediante el contacto con objetos o superficies contaminadas. También la transmisión aérea, por las gotas respiratorias, ha sido sugerida ya que puede explicar algunas situaciones en las que no hay transmisión fecal-oral durante brotes de diarrea por rotavirus. Además, a pesar de que es raro, también se puede producir la transmisión a través del vómito. (Franco *et al*, 2006)

El virus es transmisible durante la fase aguda y más tarde mientras persiste la excreción y diseminación del virus. Generalmente deja de detectarse a los 8 días después de la infección aunque, en pacientes inmunodeprimidos, la excreción se ha notificado incluso pasados los 30 días. La dosis infectiva es muy pequeña y el rotavirus es excretado en grandes cantidades en las heces de los niños infectados. Ambos elementos contribuyen de forma importante a la alta contagiosidad del rotavirus. (Pachón *et al*, 2006)

El patrón de transmisión nosocomial es por contacto directo o indirecto fecal-oral. El principal vector de transmisión son los trabajadores sanitarios. Los rotavirus se encuentran en las manos en un 76-78% de los trabajadores encargados de los niños con infección comunitaria por rotavirus. Además, el virus es capaz de sobrevivir durante días en las manos y durante 1 a 10 días en superficies secas y poco porosas en ambiente con poca humedad. La elevada proporción de portadores asintomáticos contribuye a la rápida diseminación del rotavirus (Pachón *et al*, 2006). Su resistencia a la inactivación física mostrada en experimentos con rotavirus humanos y animales frente a diferentes temperaturas puede ser una de las causas de su eficiente transmisión. Un rotavirus de ternera retuvo su infectividad en heces durante 7 meses a temperatura ambiente. Otras observaciones que sugieren la contaminación ambiental como fuente de infección son la persistencia de infecciones en guarderías. También su habilidad en retener su

infectividad una vez desecado en superficies bajo diferentes condiciones puede contribuir a su transmisión. Una humedad relativa alta (superior al 80%) resulta en una rápida pérdida de infectividad en rotavirus humanos. Una desinfección efectiva del material contaminado y una cuidadosa limpieza de las manos constituye de las más importantes medidas para evitar la transmisión de la infección por rotavirus (Villena, 2003).

Ciertos rotavirus animales comparten antígenos de neutralización con rotavirus humanos y que ciertos rotavirus animales hayan infectado humanos refuerza esta hipótesis. De todas formas este tipo de transmisión interespecie parece ser muy rara en la mayor parte del mundo, aunque la cepa humana-bovina reassortant I321 o una humana-porcina reassortant parecen ser endémicas en áreas como India y Brasil respectivamente. (Villena, 2003)

El periodo de incubación es de 24 a 72 horas, variando las manifestaciones clínicas desde infección asintomática a enfermedad grave. La enfermedad se caracteriza por vómitos y diarrea acuosa que dura unos 3 a 8 días, con presencia con frecuencia de fiebre y dolor abdominal. La duración de la enfermedad es de 3 a 9 días y la estancia media de hospitalización requerida en los casos de deshidratación severa es de 4 días. (Pachón *et al*, 2006)

1.10. Población en Riesgo

La población en riesgo son los niños entre 0 y 5 años de edad, pero el riesgo de deshidratación es mayor en los 2 primeros años de vida. Como demuestran muchos estudios de prevalencia de anticuerpos en suero, la mayoría de las infecciones por rotavirus ocurren durante los primeros 3 años de vida, siendo la máxima incidencia de infección entre los 6 y 24 meses de edad. (Glass, 2006)

El riesgo de hospitalización en la infección neonatal está asociado con el bajo peso al nacer y la prematuridad; otros factores asociados son el género masculino, madre fumadora y madre menor de 20 años. (Pachón *et al*, 2006)

El riesgo no parece variar según diferentes zonas geográficas, pero se sugiere que las desventajas socioeconómicas y la prematuridad son un riesgo añadido a la hospitalización por diarrea, siendo mucho más frecuente ésta última en el caso de la infección nosocomial, donde una de los factores de riesgo asociado es la infección cruzada entre el personal sanitario, y el incremento de infección por personal no médico en los hospitales (Pachón *et al*, 2006).

La higiene ambiental es también un factor a considerar como se demuestra en el caso de la infección cruzada nosocomial (Pachón *et al*, 2006). Entre los adultos se han descrito brotes en centros geriátricos, familiares y personal sanitario que trabaja en maternidades y unidades neonatales y personas inmunodeprimidas. (Pachón *et al*, 2006).

1.10.1. Morbilidad y Mortalidad

Hasta el descubrimiento de los rotavirus, solo una pequeña porción de gastroenteritis graves en niños y neonatos podía ser relacionada con un agente etiológico. Sin embargo, con la acumulación de estudios epidemiológicos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, ha quedado establecido que RV es uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis grave infantil en todo el mundo (Villena, 2003).

1.11. Estacionalidad

En los países de clima templado la enfermedad tiene un patrón estacional de predominio en invierno, con epidemias anuales generalmente entre los meses de noviembre y abril. En climas tropicales, los brotes se producen todo el año, con un ligero ascenso en los meses más fríos y secos (Berois *et al*, 2003).

1.12. Curso Clínico de la Infección

La infección por rotavirus está precedida por un periodo de incubación de 24-72 horas. Los síntomas oscilan desde fiebre, vómito y diarrea acuosa sin sangre de corta duración, hasta gastroenteritis severa con deshidratación considerable y acidosis, que pone en peligro la vida, secundaria a pérdida de fluidos gastrointestinales. La infección también puede estar acompañada por síntomas respiratorios, como tos y resfrío. La deshidratación severa puede causar la muerte si el paciente no es tratado adecuadamente. También son comunes fiebre y dolor abdominal. El vómito y la fiebre ceden dentro de los primeros 2-3 días de la enfermedad, mientras que la diarrea suele persistir por 5-8 días. La infección es usualmente autolimitada en niños con un sistema inmune normal y saludable y un nivel de nutrición adecuado (Rondon, 2006; Sociedad Argentina de Pediatría, 2003)

La infección primaria por rotavirus frecuentemente es la más severa y las infecciones subsiguientes, causan síntomas progresivamente más benignos. En realidad, después de una segunda infección, virtualmente todos los niños están protegidos contra gastroenteritis severa por rotavirus y la mayoría están protegidos contra cualquier gastroenteritis por rotavirus. Aparte de la gastroenteritis, otros rasgos clínicos de la enfermedad por rotavirus incluyen la exacerbación de anorexia y depresión. También se ha observado una elevación transitoria en las enzimas hepáticas con la infección por rotavirus. Además, han sido asociados con las infecciones por rotavirus síntomas sistémicos, circulatorios y respiratorios (Rondon, 2006)

1.13. Diagnóstico

Para el diagnóstico, al no haber ningún rasgo clínico o característica de las deposiciones que sea específico de este agente etiológico, es necesario la confirmación de la infección con la detección del rotavirus en las heces. Los niños infectados eliminan un alto número de partículas virales en las heces, pudiendo haber excreción viral en pacientes inmunocompetentes hasta 10 días después de la aparición de síntomas. El diagnóstico de gastroenteritis por rotavirus se realiza mediante diversas pruebas comerciales de ELISA y de aglutinación, las cuales tienen como base la detección de un antígeno específico, común a todos los rotavirus del grupo A, las pruebas de látex son más sencillas y económicas pero poseen baja especificidad y sensibilidad. Por tal motivo, las técnicas de ELISA son las pruebas de elección. (Pachón *et al*, 2006 ; Sociedad Argentina de Pediatría, 2003)

Otras técnicas, como aislamiento viral, microscopía electrónica, amplificación e hibridación de ácidos nucleicos, electroforesis o cultivo, se usan normalmente sólo en investigación debido a su complejidad y altos costos (Pachón *et al*, 2006).

1.14. Exámenes Complementarios

Los inmunoanálisis enzimáticos (EIA, PCR) nos permiten identificar los rotavirus del grupo A, con una especificidad y sensibilidad de un 90%. A través de ELISA se pueden identificar antígenos del virus (proteína de cápside VP6) en muestras de materia fecal. También se puede conocer la genotipificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genotipos G y P. Los casos dudosos se pueden estudiar con microscopía electrónica de heces, electroforesis de RNA e hibridación de ácidos nucleicos (Tamayo *et al*, 2007).

1.15. Tratamiento

El tratamiento de la gastroenteritis por rotavirus es sintomático, encaminado a prevenir y tratar la deshidratación secundaria al proceso. Para ello se indica el inicio de forma precoz de aporte de líquidos en forma de solución rehidratante oral, que, además de corregir el déficit hídrico existente, asegure un aporte adecuado de electrolitos frente a las pérdidas mantenidas por vómitos y diarrea. En los casos con incapacidad de ingesta de líquidos por boca, deshidratación grave o afectación clínica importante será necesario el ingreso hospitalario y la administración de fluidoterapia intravenosa y, en ocasiones, alimentación parenteral (Pachón *et al*, 2006)

En la actualidad se indica el comienzo precoz de la alimentación habitual del niño para favorecer la nutrición y la recuperación funcional del enterocito. En los estudios realizados administrando inmunoglobulinas orales y probióticos como los lactobacilus se ha objetivado un efecto beneficioso con acortamiento del cuadro clínico y del periodo de excreción viral (Khetawat, 2002)

Como en todas las infecciones virales, los antibióticos son inapropiados y actualmente no hay agentes antivirales efectivos contra el rotavirus (Rondon, 2006).

Se han realizado estudios en los que se ha usado probióticos en el tratamiento y prevención de las diarreas, con resultados prometedores (Sociedad Argentina de Pediatría, 2003).

1.16. Prevención

Se cree que la inmunidad pasiva por la transferencia de anticuerpos maternos transplacentarios y la lactancia materna juegan un papel en la protección contra la enfermedad por rotavirus en recién nacidos. Este enfoque es apoyado por hallazgos de

numerosos estudios que indican que los lactantes no suelen desarrollar enfermedades severas por rotavirus durante sus primeros seis meses de vida. Por esta razón es altamente recomendable la lactancia materna, para limitar la exposición a rotavirus (y otros patógenos que afectan el tracto intestinal), ya que se considera que la alimentación con biberón en lactantes ha sido asociada con un aumento en el riesgo de infección, en un estudio realizado en Inglaterra. (Rondon, 2006)

Rigurosas prácticas de control de infecciones en pabellones de hospital pueden ayudar a prevenir infecciones intrahospitalarias por rotavirus en pacientes jóvenes o susceptibles por otras causas. En centros de cuidado diurno y jardines de niños, la desinfección rutinaria de áreas de juego y juguetes limita los riesgos de exposición, lo mismo que el lavado frecuente de manos del personal y los niños. (Rondon, 2006) Los niños con diarrea por RV, en los que sus heces no pueden ser retenidas por los pañales o por el uso del baño, deben ser excluidos de concurrir a la guardería hasta que finalice la diarrea (Sociedad Argentina de Pediatría, 2003)

Aunque el mejoramiento en la higiene, abastecimiento de agua y eliminación de aguas residuales puede llevar a una reducción en el número de casos de la infección severa por rotavirus, como se expuso previamente, la semejanza en la incidencia de la enfermedad en países en desarrollo y países desarrollados sugiere que el problema no será controlado por esas medidas. Realmente, a causa de la magnitud de la carga para la salud mundial atribuida a la enfermedad por rotavirus, el desarrollo de vacunas contra rotavirus es la estrategia de primera línea para la prevención (Weekly epidemiological record, 2006)

Hoy en día existen sobradas evidencias de que los mecanismos de prevención de las diarreas son distintos para las diarreas virales y las de origen bacteriano. Éstas últimas pueden ser controladas mejorando el medio ambiente y la calidad de agua que se consume. En cambio, las de origen viral no están asociadas a la calidad de vida y la protección contra ellas surge de la memoria inmunológica.

1.17. Problemática de la Vacunación

En primera instancia, los motivos para lograr la inmunización contra rotavirus esta dado porque la infección ocurre por igual en países desarrollados y en vías de desarrollo, controles y mejoras en la higiene ambiental no controlan la infección, la mayor mortalidad ocurre en comunidades pobres con escasa cobertura médica. Es una enfermedad de alto impacto familiar, social y económico y no hay disponible un tratamiento antiviral efectivo (Sociedad Argentina de Pediatría, 2003).

Con base en esta epidemiología y debido a la gran cantidad de muertes a nivel mundial a causa de la gastroenteritis severa infantil causada por rotavirus, la única medida de control que tendría realmente un impacto significativo en la incidencia de la enfermedad sería el uso de una vacuna efectiva (Angel *et al*, 2007). De entre todos los serogrupos, los rotavirus grupo A son los realmente importantes desde el punto de vista de la salud pública, ya que infecta a niños y a crías de muchos animales. La recomendación de la OMS y de otras instituciones fue de favorecer fuertemente el desarrollo de una vacuna contra rotavirus; sin embargo, uno de los factores limitantes para el éxito de una vacuna es la inestabilidad de su genoma, ya que se inducen cambios constantes de serotipo/genotipo, además existe reacción cruzada entre algunos antígenos de rotavirus de diferentes serotipos (Ramírez *et al*, 2007; Villena, 2003)

Se ha demostrado que solo los virus de cadenas homólogas replican eficientemente, por lo tanto, con base en el principio Jener, se ha experimentado con cepas de rotavirus vivos, atenuados y antigénicamente relacionados pero de origen no humano. Esta aproximación se basó en la teoría de que las cepas de rotavirus de origen animal y humano compartían un antígeno de grupo común y confería protección heterotípica (Villena, 2003).

La primera vacuna desarrollada en bovinos fue RIT4237 que contenía la cepa combinada P6[1]G6, mostrando un alto nivel de protección en Finlandia; sin embargo,

su protección contra la diarrea severa por rotavirus no fue eficaz en países en vías de desarrollo. Una segunda vacuna bovina (WC3) se dirigió contra el serotipo P7[5]G6 y mostró buena tolerancia en infantes entre 5 y 11 meses de edad, no obstante se observaron niveles variables de protección dependiendo de la región geográfica en donde fue probada. Posteriormente, una tercera vacuna oral tetravalente, generada por coinfección de cultivos celulares con cepas de rotavirus de simios MMU18006 conteniendo la combinación P5B[3]G3 que compartían especificidad neutralizante con las cepas de RV humanos G3, además crecía fácilmente en cultivo celular, pero los niños vacunados presentaban una gran reacción (3 ó 4 días de fiebre tras la vacunación) (Ramírez *et al*, 2007; Villena, 2003 & Castello *et al*, 2006).

Actualmente, una vacuna atenuada monovalente P[12]G10 se produjo a partir de un ovino en Lanzhou, China. Esta cepa se atenuó después de varios pasajes en un cultivo celular. Un ensayo de pre licenciatura se dirigió contra esta vacuna, la cual fue administrada a niños de 6 a 24 meses en una sola dosis, y se observó una respuesta inmune favorable sin efectos adversos. No hay ningún dato disponible a cerca de los ensayos aplicados después de aprobar esta vacuna. (Castello *et al*, 2006)

Las siguientes generaciones de vacunas fueron diseñadas de manera que incluyeran más de un serotipo. La capacidad de los rotavirus de mezclar sus fragmentos genómicos (reassortar) durante infecciones mixtas *in vitro* permitía la producción de vacunas reassortar o aproximaciones de vacunas jennerianas modificadas (Villena, 2003)

En Agosto de 1998 se licenció en Estados Unidos la vacuna tetravalente reassortant de rotavirus humano y simio RRV-TV. Esta vacuna se componía de una mezcla de cuatro cepas de virus, representando las cepas más comunes de los G-tipos vistos, entre ellas, las cepas de origen humano: G1, G2 y G4 fueron sustituidas en el gen VP7 de la cepa RRV, y la cuarta cepa era el genotipo G3 de simio. RRV-TV fue extensamente evaluada en los programas de vacunación infantiles en Estados Unidos, Finlandia y Venezuela y después de la inmunización de casi 1 millón de niños, la

eficacia de esta vacuna fue determinada de 88% para enfermedad grave y 48% para enfermedad leve. Entre las reacciones adversas detectadas se encontraba hipertermia mayor a 28°C en el 15% de los pacientes y mayor a 39°C en 1 a 2% de los mismos, diarrea en el 3% de los casos e intususcepción (obstrucción del intestino debido a una invaginación de éste) en el 0.05% de los niños vacunados. El riesgo más grande de intususcepción se encontraba entre los días 3 y 10 tras la primera de las tres dosis orales. La vacuna fue retirada del mercado 9 meses después del inicio de su comercialización por la FDA por su probable asociación con invaginación intestinal. (Villena, 2003; Sociedad Argentina de Pediatría, 2003, & Dennehy, 2008).

Esta situación llevó a que para la aprobación de nuevas vacunas contra rotavirus se exigiese que los estudios incorporasen más de 65000 voluntarios antes de su aprobación por los organismos de control (Sociedad Argentina de Pediatría, 2003).

1.17.1. Vacuna Monovalente Rotarix

Es una vacuna atenuada de RV, originalmente fue desarrollada en Cincinnati, OH, por un pasaje de cultivo de células de un aislado de rotavirus humano tipo silvestre (89-12), la cual contenía el serotipo G1 y el genotipo P1A[8]. La vacuna además fue desarrollada por Avant Immunotherapeutics y licenciada por la compañía farmacéutica Glaxo SmithKline Biologicals S.A, quien la modificó para clonarla por pasajes en tejido celular, resultando la vacuna, RIX 4414 (Rotarix) resultando más atenuada que la cepa original (89-12). Los ensayos de seguridad, inmunidad y eficacia fueron desarrollados en Finlandia. (Pachón *et al*, 2006; Dennehy, 2008)

Posteriormente fue probada en 11 países de América Latina y Finlandia. La vacuna fue administrada en dos dosis orales a los 2 y a los 4 meses de edad, con reacciones similares a las del placebo en términos de fiebre, diarrea y vómito.

Un subconjunto de 20000 infantes del ensayo fue monitoreado para evaluar la eficacia de la vacuna. Los resultados demostraron una protección de 85% ante una gastroenteritis severa por rotavirus, y de un 100% ante episodios de deshidratación severa. La vacuna demostró ser eficaz ante la prevención de gastroenteritis de cualquier severidad causada por el serotipo G1 predominante (92% de eficacia), G3, G4 ó G9 (88% de eficacia) y para el serotipo G2 (44% de eficacia). Aunque Rotarix no era eficaz contra el serotipo G2 en la fase III del ensayo, significó una protección cruzada contra los serotipos no-G1 y no-P[8] mostrando mayor eficacia (81%) contra la cepa P[4]G2. Este hallazgo fue confirmado por un reciente ensayo europeo. En ese estudio, la eficacia contra el gastroenteritis del rotavirus de cualquier severidad fue del 79%, contra rotavirus severo fue del 90%, y contra la hospitalización debida a rotavirus fue del 96%. La vacuna tiene una eficacia de 96% contra la cepa G1P[8] y 88% contra no-G1P[8] (Dennehy, 2008).

Rotarix fue licenciada en México y República Dominicana en el 2004. En Mayo del 2007 fue aceptada en América Latina, Europa, Asia y África. Aún no se aprueba en los Estados Unidos; sin embargo, el fabricante se encuentra en discusión de la fase tardía con la FDA con respecto a la licencia de la vacuna para el mercado de los EE.UU (GlaxoSmithKline, 2007)

El esquema de vacunación son dos dosis dadas a intervalos de al menos 4 semanas, la segunda dosis debe ser administrada antes de las 24 semanas de edad. La vacuna no debe administrarse a niños inmunodeprimidos (incluidos en este grupo niños infectados con VIH) ni tampoco a niños con una historia previa de intususcepción (GlaxoSmithKline, 2007). Deben extremarse las medidas de precaución en los niños que vayan a ser vacunados y que convivan con personas inmunodeprimidas, por la posibilidad de transmisión del virus vacunal. La vacunación debe posponerse en el caso de que el sujeto presente fiebre o vómitos en el momento de la vacunación. La lactancia materna puede reducir la respuesta inmunitaria a monovalente, sin embargo no existen evidencias clínicas que demuestren una reducción de la protección (Pachón *et al*, 2006).

La vacuna monovalente puede administrarse concomitantemente con cualquiera de las siguientes vacunas monovalentes o combinadas incluidas las vacunas hexavalentes (DTPa-HBV-IPV/Hib)]; DTPw, DTPa, Hib, IPV, HBV. No obstante, no se han presentado resultados de la administración concomitante con la vacuna de meningitis C (Pachón *et al*, 2006).

Con respecto a las reacciones adversas observadas en los distintos ensayos clínicos, tanto si la vacuna era administrada sola o co-administrada con las vacunas del calendario vacunal, la incidencia de diarrea, vómitos, pérdida de apetito, fiebre e irritabilidad no resultó diferente en el grupo que recibió la dosis y el grupo placebo. Tampoco se encontró un incremento en la incidencia o severidad de estas reacciones tras ser administrada la segunda dosis (Angel *et al*, 2006).

1.17.2. Vacuna Pentavalente RotaTeq

Actualmente la reasociación de rotavirus humano-animal para el uso como vacunas incluía ambos genes VP7 ó VP4. Inicialmente VP7 era considerada como el antígeno más importante para la inducción de protección, por consiguiente la reasociación de rotavirus humano-animal para el uso en vacunas como RRV-TV incluía solo el gen VP7 humano para proveer respuesta inmune. Posteriormente, VP4 también fue considerada como inductora de protección. (Dennehy, 2008)

RotaTeq es una vacuna atenuada pentavalente que contiene cepas re asociadas de RV humano y bovino. Cuatro cepas de rotavirus humano expresadas en la proteína VP7 (G1, G2, G3 y G4) y la proteína de atadura P7[5] de RV bovino de la cepa WC3. La quinta cepa expresada en la proteína de atadura es P1A[8] de RV humano y la cápside externa conteniendo G6 de RV bovino. (Dennehy, 2008) Figura 1.12

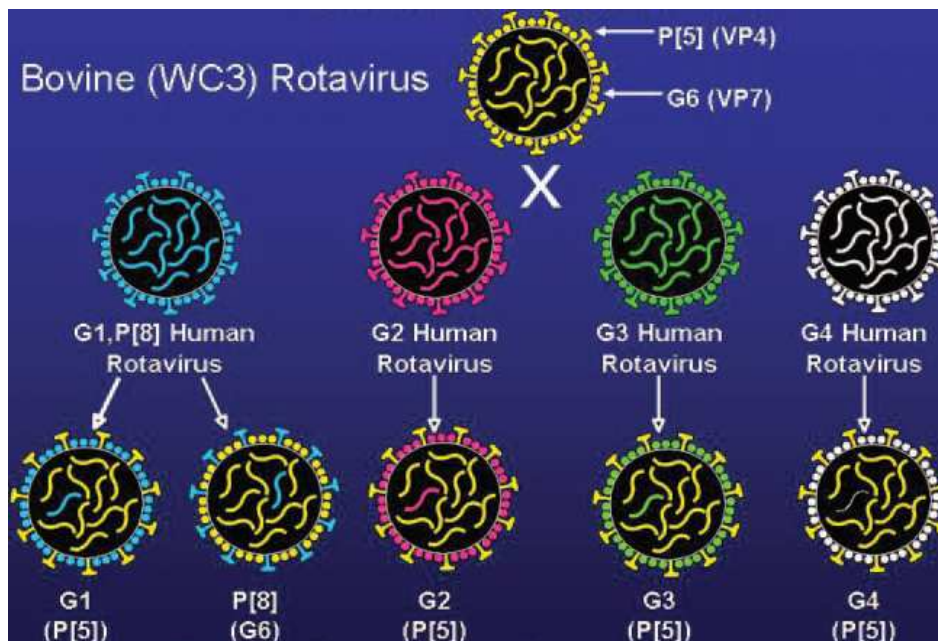


Figura 1.12 Gráfica de la reasociación cepas de RV humano y bovino incluidas en la vacuna pentavalente RotaTeq. Fuente: (Dennehy, 2008)

La vacuna es producida por la Compañía Farmacéutica Merck Research Co, fue probada en 356 sitios del mundo durante 2001-2004; formaron parte del estudio los siguientes países; Bélgica, Costa Rica, Finlandia, Alemania, Guatemala, Italia, Jamaica, México, Puerto Rico, Suiza, Taiwán y Estados Unidos, más del 80% de los sujetos pertenecían a Estados Unidos y Finlandia. El ensayo incluyó más de 70000 niños y fue diseñada principalmente para evaluar la seguridad de la vacuna con respecto a la intususcepción pero también para evaluar la inmunidad y eficacia de la vacuna con respecto a la severidad de la enfermedad y al número de hospitalizaciones por gastroenteritis viral. El riesgo de intususcepción fue evaluado 42 días después de la primera dosis en la fase III del ensayo. Seis casos de intususcepción fueron observados en el grupo RotaTeq, comparado con los 5 casos de intususcepción en el grupo placebo. Los datos no sugirieron un aumento en el riesgo de intususcepción por la vacuna relacionados con el grupo placebo. No se confirmaron casos de intususcepción antes de los 42 días, periodo en el cual se encontró el riesgo más alto para la vacuna RRV-TV previamente autorizada. (Pachón *et al*, 2006; Angel *et al*, 2006 & Dennehy, 2008)

RotaTeq demostró aumentar el título de IgA en suero, el cual fue un referente de la inmunogenicidad de la vacuna, también indicó ser eficaz previniendo gastroenteritis de rotavirus de cualquier severidad causada predominantemente por el serotipo G1 (75% eficacia) y G2 (63% eficacia). Había una tendencia hacia la protección de serotipos restantes, (83% de eficacia para G3, 48% de eficacia para G4, y 65% eficacia para G9) (PATH, 2006).

Aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU (FDA) en Febrero del 2006., es una vacuna de virus vivos presentada en un tubo pre-cargado. Cada dosis está constituida en un volumen de 2 mL y la mínima potencia por dosis de cada uno de los reasociados es 2.2×10^6 unidades infecciosas (IU) para G1, 2.8×10^6 IU para G2, 2.2×10^6 IU para G3, 2.0×10^6 IU para G4 y 2.3×10^6 IU para P8. La administración es por vía oral. La vacuna tiene un periodo de validez de 2 años almacenada entre 2-8° C (Pachón *et al*, 2006).

El esquema de vacunación son tres dosis dadas a intervalos de al menos 4 semanas, con la primera dosis administrada entre las 6 y 12 semanas de edad. La vacuna no debe administrarse a niños inmunodeprimidos y deben extremarse las medidas de precaución en los niños que convivan con personas inmunodeprimidas, por la posibilidad de transmisión del virus vacunal. La vacuna no está indicada para niños que tengan hipersensibilidad a cualquiera de los componentes de la vacuna. Los niños que tras recibir la primera dosis de vacuna desarrollen una sintomatología sugestiva de hipersensibilidad no deben recibir más dosis de RotaTeq. Tampoco debe ser administrada a niños con una enfermedad aguda febril, ni a niños mayores de 12 semanas ya que no hay datos suficientes que avalen la seguridad de la vacuna después de la primera dosis (Franco, *et al* 2006).

Al analizar los datos, la gran mayoría de casos correspondieron al serotipo G1 y por lo tanto, no es muy sorprendente que la eficacia estimada para G1 estuviera muy cercana a la eficacia calculada para todos los casos de gastroenteritis independientemente del serotipo encontrado. Consiguientemente, aunque la indicación

es la prevención de gastroenteritis causadas por los serotipos G1P1[8], G2P[4], G3P1[8], G4P1[8] y G9P1[8], únicamente puede afirmarse que existe eficacia frente al serotipo G1 puesto que para el resto de serotipos no se aportan casos suficientes que puedan justificar la misma (Merck, 2006).

La eficacia para las diarreas graves producidas por RV fue del 85%, llegando a ser del 100% en los casos más severos. 91% para G1, 86% para G3, 100% para G9. Se observó un 86% de eficacia contra hospitalizaciones por gastroenteritis de RV y el 42% de reducción global de hospitalización por todas las causas de diarrea. La eficacia es del 90% para la diarrea grave en general y 70% para todas las diarreas por rotavirus (Sociedad Argentina de Pediatría, 2003).

Tabla 1.6 Comparación entre vacunas licenciadas.

ROTARIX	ROTATEQ
<ul style="list-style-type: none"> • Vacuna monovalente G1[P8] • Virus vivos atenuados humanos antigénica de 5 virus humana – bovina • 2 dosis. • Eficacia contra cualquier forma de diarrea 73 a 90%. • Eficacia contra gastroenteritis por rotavirus grave 85%. • Virus que se excreta en las heces. • Respuesta inmunoglobulinas IgA sérica y en heces. 	<ul style="list-style-type: none"> • Vacuna pentavalente P8, G1, G2,G3,G4. • Virus atenuados genética recombinante. • 3 dosis. • Eficacia contra cualquier forma de diarrea 74%. • Eficacia contra gastroenteritis por rotavirus grave 98%. • Excreción en las heces del 6,8%. • Respuesta inmunoglobulinas IgA sérica y en heces 94% de respuesta y 83,8% incremento de 3 veces los niveles de IgA después de al menos la primera dosis.

Fuente: Tamayo *et al*, 2007

1.18. Situación en otros países

Con respecto a la vacuna monovalente, además de la de la autorización europea, se han obtenido otras 33 licencias en todo el mundo (16 de ellas en países Latinoamericanos incluyendo Brasil; Filipinas y Singapur son los primeros países asiáticos en conseguir la autorización). Recientemente, Brasil, Panamá y Venezuela han incluido la vacuna frente a rotavirus en sus calendarios de vacunación nacionales al igual que hizo México en el año 2005. (Glass *et al*, 2006) En Ecuador esta vacuna se la administra desde hace 6 años.

Con respecto a RotaTeq, además de la de la autorización europea, ha sido autorizada su comercialización en los Estados Unidos por la American Food and Drug Administration (FDA). Asimismo la compañía ha presentado en más de 50 países del mundo las correspondientes solicitudes de licencia. (Pachón *et al*, 2006)

Evaluando la acción de las vacunas que se encuentran en el mercado, se ha realizado un gran progreso en el campo virológico. No obstante, el desarrollo de nuevas vacunas que complementen los desafíos actuales, mejoraría la calidad de vida y ayudaría a disminuir la mortalidad en países en vías de desarrollo; sin embargo no son suficientes los conocimientos acerca de los mecanismos de patogénesis del rotavirus. (Angel *et al*, 2007)

Por otra parte, se están estudiando estrategias alternativas de nuevas vacunas para rotavirus, como inmunizaciones parenterales y parenteral-mucosal (mixtas) en monos y cerdos, y vacunas intra-rectales en ratones. Probablemente, estas estrategias eviten o disminuyan el riesgo de intususpección en niños en periodo neonatal (Ho *et al*, 2007).

Como desafío futuro se puede pensar en el desarrollo de vacunas químicamente definidas, ya que se podría entender el funcionamiento de las células T las cuales confieren protección ante este virus. Estimulando así la inmunidad de la mucosa intestinal y linfocitaria. (Parez, 2007)

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Participantes

La presente investigación fue realizada dentro de las instalaciones del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Médicas; se contó con el uso de las instalaciones, equipos y la dotación de materiales y reactivos necesarios para el desarrollo del estudio; se contó con la participación de: Dr. Enrique Terán, Dr. Juan Arbiza como colaboradores científicos, adicionalmente se tuvo la colaboración de diferentes casas e institutos de salud pública.

3.1.1. Instituciones

Centro de Biomedicina, Universidad Central del Ecuador, Quito- Ecuador.

Hospital “Enrique Garcés”, Quito- Ecuador.

Hospital de las “Fuerzas Armadas”, Quito- Ecuador.

Hospital de Especialidades “Eugenio Espejo”, Quito- Ecuador.

Instituto de Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”, Quito- Ecuador.

Hospital Materno Infantil “Patronato San José”, Quito- Ecuador.

Hospital de “Los Valles”, Quito- Ecuador.

Hospital “Alfredo Domínguez”, Santo Domingo de los Tsáchilas- Ecuador.

Laboratorio Certificado “NetLab”, Quito- Ecuador.

3.2. Zona de Estudio

3.2.1. Trabajo de Campo

Dada la alta concurrencia y diferente procedencia de pacientes a cada una de las instituciones participantes, se han podido recolectar muestras de heces diarreicas de niños de 0 a 5 años de diversas provincias del Ecuador, abarcando así las regiones costa, sierra y oriente. El periodo de recolección de muestras se efectuó desde Enero del 2008 a Marzo del 2010.

3.2.2. Trabajo de laboratorio

El almacenamiento de las muestras de heces, aislamiento de su RNA y proceso de amplificación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Biomedicina, Universidad Central del Ecuador, Sodiro N14-121 e Iquique, Quito, provincia de Pichincha, Ecuador.

3.3. Periodo de tiempo de Investigación

Las muestras han sido recolectadas desde Enero del 2008 hasta Marzo del 2010. Todas las muestras han sido extraídas sus ácidos nucleicos y corridas por electroforesis, y de un total de 168 muestras, 62 han sido procesadas por RT-PCR, tomando un tiempo de un año para la obtención de resultados e interpretación de los mismos.

Fecha de inicio: Julio 2009

Fecha de término: Abril 2010

3.4. Diseño Bioestadístico

Los datos obtenidos, serán ingresados en una hoja electrónica desarrollada en Microsoft Excel, a partir de la cual se procederá a la realización de la estadística descriptiva de las variables cualitativas y cuantitativas.

Para el desarrollo de la estadística inferencial, los datos serán trasladados al paquete para análisis estadístico InStat GraphPad v. 3.05, teniendo planificada la utilización de la prueba t de student para las variables cuantitativas y de Chi cuadrado para las variables cualitativas.

Se propone un estudio de tipo descriptivo, en el cual se incluirán un total de 115 muestras fecales de niños previamente vacunados contra rotavirus, y que presenten la reincidencia de la enfermedad.

3.5. Tamaño de la muestra

Para la determinación de este grupo de estudio, se utilizó la fórmula de tamaño de muestra para la estimación de proporciones poblacionales, tomando en cuenta una precisión del 95% y un poder del 80%

Cuadro 2.1 Fórmula para determinar el tamaño de la muestra

$$n = \frac{N * p * q * z^2}{(N - 1) * e^2 + p * q * z^2}$$

Donde:

N = población ecuatoriana (300000)²

p = proporción sujetos vacunados con rotavirus positivo (8%)

q = 1 – p

z = nivel de confianza (1.96)

e = error máximo (5%)

$$n = \frac{300000 * 0.08 * 0.92 * 1.96^2}{(300000 - 1) * 0.05^2 + 0.08 * 0.92 * 1.96^2}$$

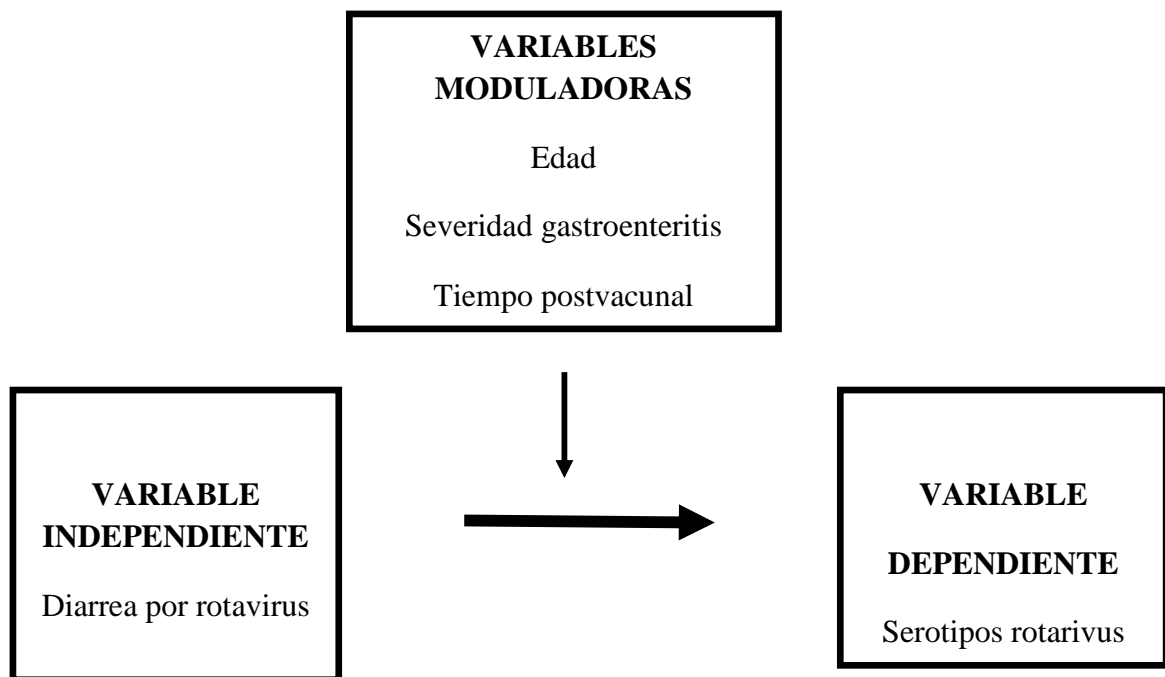
$$n = 115$$

3.6. Hipótesis

Niños menores de 5 años previamente vacunados contra rotavirus, presentan reincidencia de la enfermedad, debido a un serotipo distinto al contenido en la vacuna “Rotarix”.

² Datos obtenidos según revisión bibliográfica proporcionada según experiencia.

3.7. Operacionabilidad de variables



3.8. Procedimientos

El estudio se inició con la información básica del proyecto de investigación y el pedido formal para la recolección y preservación de muestras a los directores de cada institución participante. Las muestras de interés fueron heces diarreicas de niños de 0 a 5 años de edad. Las jefaturas de cada institución participante se encontraban provistas del material de recolección estéril. Las muestras fueron guardadas en una caja etiquetada con el nombre del proyecto y almacenadas a 4°C.

3.8.1. Codificación de los individuos participantes

Los códigos se asignaron en forma ordenada y ascendente, de acuerdo al avance en la recolección de las muestras. El código designado para cada paciente consistió en una numeración arábica de tres dígitos, desde 001 hasta 168.

3.8.2. Conservación y transporte al laboratorio

Las muestras fueron conservadas en refrigeración en el laboratorio de cada institución hasta retirarlas, los viales se transportaron en un contenedor aislante del calor, conteniendo paquetes de gel congelante, con el propósito de garantizar la cadena de frío (4°C) hasta llevarlas al Centro de Biomedicina.

3.8.3. Almacenamiento de las muestras

El almacenamiento de las muestras fue diferenciado. Las muestras sin disolver fueron etiquetadas y colocadas en una caja en orden ascendente, conservándolas a -70°C para posteriores investigaciones. Mientras que para el diagnóstico molecular, se resuspendió las muestras en PBS 1X y se las almacenó a -20°C.

3.9. Extracción de Ácidos Nucléicos

Para la extracción de ácidos nucleicos de las muestras fecales, primero se rotuló el vial con el código del paciente; se suspendió la materia fecal al 15% en PBS, se homogenizó en vortex hasta obtener una solución uniforme, se recolectó 200 µl de la

suspensión en un tubo eppendorf, se agregó 500 µl de Trizol® y 100 µl de Cloroformo, se mezcló por 15 segundos y se dejó 3 min en reposo posteriormente se centrifugó por 15 min a 12000rpm. Se recuperó la fase acuosa en otro tubo (sin recoger interfase) y se agregó 250µl de isopropanol, se mezcló gentilmente y se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó durante 10 minutos a 12000rpm, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol 75%, se realizó una nueva centrifugación durante 2 minutos a 12000rpm, se retiró el sobrenadante y se deshidrató la muestra a 37°C por 10 minutos, se resuspendió en 30 µl de agua estéril o agua DEPC previamente pre calentada a 65°C.

3.10. Electroforesis de la extracción de ácidos nucleicos en gel de Agarosa al 1%

Para la detección del ARN viral de rotavirus se mezcló 8µl de la extracción con 2µl de buffer de carga (Blue Juice, PCR buffer), se sembró la mezcla en un gel de agarosa (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) al 1% junto con un marcador de peso molecular de 100pb (TrackIt™ 100pb DNA Ladder), se realizó la electroforesis (GelXLUltra V-20, Labnet) en buffer TBE 1X a 100V durante 30 minutos. De esta forma se identificó la presencia del ARN genómico con su patrón de migración característico.

3.11. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction para VP7

3.11.1. Primer Round

Se mezcló 5µl de la extracción de ácidos nucleicos con 1µl de la mezcla de primers (Beg+ y End-) cada uno a una concentración de 10µM (IDT) para la amplificación de una región de la proteína VP7 (Cuadro 2.1); se incubó a 97°C por 7min en un termociclador Perkin Elmer 2400; inmediatamente se llevó a hielo por 3 minutos, y se mezcló con 44µl de la Mix que consistía de: 20 mM Buffer PCR 10X Tris-HCl,

1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.1M DTT, 200U/μl SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), 5U/ μl Taq polymerase (Invitrogen) y RNAase OUT (Invitrogen). Las condiciones de reacción fueron: una retrotranscripción a 42°C por 60, seguida de 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 50°C por 1 minuto, y extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 7 minutos (Gouvea *et al*, 2006).

Cuadro 2.1 Secuencias de los primers, posiciones de alineamiento y longitud del fragmento amplificado para la proteína VP7.

Primer	Secuencia	Posición Nucleotídica	Fragmento (pb)
Beg (+)	5'GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G ^{3'}	1 al 28	1062
End (-)	5'GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG ^{3'}	1036 - 1062	

3.11.2. Segundo Round

Luego de realizar la retro-transcripción (primer round) de la proteína VP7, se obtiene un producto amplificado (1062bp), el cual servirá de blanco para la siguiente PCR; se diluye el producto del primer round 1/10, se recolecta 2μl de la dilución en otro tubo PCR estéril y se mezcla con 48μl de la Mix que consiste de: 20 mM Buffer PCR 10X Tris-HCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 5U/ μl Taq polymerase (Invitrogen) y el pool de primers (Cuadro 2.2) cada uno a una concentración de 10μM (IDT). Las condiciones de reacción fueron las mismas del primer round (Gouvea *et al*, 2006).

Cuadro 2.2 Secuencias de los primers de tipificación para los Gtipos, posiciones de alineamiento y longitud del fragmento amplificado.

Primer	Secuencia	Posición Nucleotídica	Fragmento (pb)
9Con1 (+)	5' TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG 3'	37 al 56	
G1 (-)	5' TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG 3'	176 al 195	158
G2 (-)	5' GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT 3'	262 al 281	244
G3 (-)	5' GTC CAG TTG CAG TGT TAG C 3'	484 al 503	466
G4 (-)	5' GGG TCG ATG GAA AAT TCT 3'	423 al 440	403
G5 (-)	5' CAT GTA CTC GTT GTT AGC TC 3'	760 al 779	779
G9 (-)	5' TAT AAA GTC CAT TGC AC 3'	131al 147	110

Una vez realizada la genotipificación para los G-tipos descritos; obteniéndose un producto amplificado en la RT, pero en la PCR no se revela un tipo específico, se procede a correr la muestra por G12. Se conservan todos los parámetros en la Mix para el segundo round, lo que cambia son los primers usados para determinar el genotipo G12 (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3 Secuencias del juego de primers para la tipificación de G12, posiciones de alineamiento y longitud del fragmento amplificado.

Primer	Secuencia	Posición Nucleotídica	Fragmento (pb)
G12 (+)	5' TCG TCA TGC TGC CAT TTA 3'	173-190	175
G12 (-)	5' GTC CAG TCG GGA TCA GTT 3'	327-344	

3.12. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction para VP4

3.12.1. Primer Round

Se mezcló 5µl de la extracción de ácidos nucleicos con 1µl de la mezcla de primers (Con2dg y Con3dg) cada uno a una concentración de 10µM (IDT) para la amplificación de una región de la proteína VP4 (Cuadro 2.4); se incubó a 97°C por 7min en un termociclador Perkin Elmer 2400; inmediatamente se llevó a hielo por 3 minutos, y se mezcló con 44µl de la Mix que consistía de: 20 mM Buffer PCR 10X Tris-HCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.1M DTT, 200U/µl SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), 5U/ µl Taq polymerase (Invitrogen) y RNAase OUT (Invitrogen). Las condiciones de reacción fueron: una retrotranscripción a 42°C por 60, seguida de 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 50°C por 1 minuto, y extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 7 minutos (Gouvea *et al*, 2006).

Cuadro 2.4 Secuencias de los primers, posiciones de alineamiento y longitud del fragmento amplificado para la proteína VP4.

Primer	Secuencia	Posición Nucleotídica	Fragmento (pb)
Con2dg(-)	5' ATT YCN GRC CAY TTA TAH CC ^{3'}	868-887	876
Con3dg (+)	5' TGS YKW SBY TMA TTT ATA GACA ^{3'}	11-32	

3.12.2. Segundo Round

Luego de realizar la retro-transcripción (primer round) de la proteína VP4, se obtiene un producto amplificado (876bp), el cual servirá de blanco para la siguiente PCR; se diluye el producto del primer round 1/10, se recolecta 2µl de la dilución en otro

tubo PCR estéril y se mezcla con 48µl de la Mix que consiste de: 20 mM Buffer PCR 10X Tris-HCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 5U/ µl Taq polymerase (Invitrogen) y el pool de primers (Cuadro 2.5) cada uno a una concentración de 10µM (IDT). Las condiciones de reacción fueron las mismas del primer round (Gouvea *et al*, 2006).

Cuadro 2.5 Secuencias de los primers de tipificación para los P tipos, posiciones de alineamiento y longitud del fragmento amplificado.

Primer	Secuencia	Posición Nucleotídica	Fragmento (pb)
Con3dg(+)	5' TGS YKW SBY TMA TTT ATA GAC A 3'	11-32	
P4(-)	5' CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC 3'	474-494	483
P6 (-)	5' TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA 3'	259-278	267
P8 (-)	5' TCT ACT GGG TTA ACG TGC 3'	339-356	345
P9 (-)	5' TGA GAC ATG CAA TTG GAC 3'	385-402	391
P10 (-)	5' ATC ATA GTT AGT AGT CGG 3'	575-594	583

3.13. Visualización de las amplificaciones

Para la detección de los genotipos amplificados, se mezcló 8µl del producto de la PCR con 2µl de buffer de carga (Blue Juice, PCR buffer), se sembró la mezcla en un gel de agarosa (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) al 1.5% junto con un marcador de peso molecular de 100pb (TrackIt™ 100pb DNA Ladder), se realizó la electroforesis (GelXLUltra V-20, Labnet) en buffer TBE 1X a 100V durante 30 minutos. De esta forma se identificó los G y P tipos.

3.14. Métodos

3.14.1. Genotipificación de RV

La Genotipificación de G y P pueden ser realizados por RT-PCR usando la extracción del ARN viral de heces fecales. Para la Genotipificación de G se amplifica el gen 7 que codifica para VP7 usando primers complementarios a las seis regiones variables que son distintas entre los diferentes G tipos, pero altamente conservadas entre cada G tipo. De igual forma para la Genotipificación de P se usan primers complementarios a las cuatro regiones variables del gen 4 que codifica para VP4, los cuales son altamente conservados en cada P tipo, y distintas entre los diferentes P tipos.

3.14.1.1. Genotipificación del Gen 9 (VP7)

La Genotipificación puede ser realizada directamente a partir del ADNc obtenido después del primer round de RT, donde se amplifica la región entera del gen VP7, y el segundo round es una reacción múltiple que incluye seis diferentes G tipos, con primers específicos para G1, G2, G3, G4, G5 y G9, y el primer común.

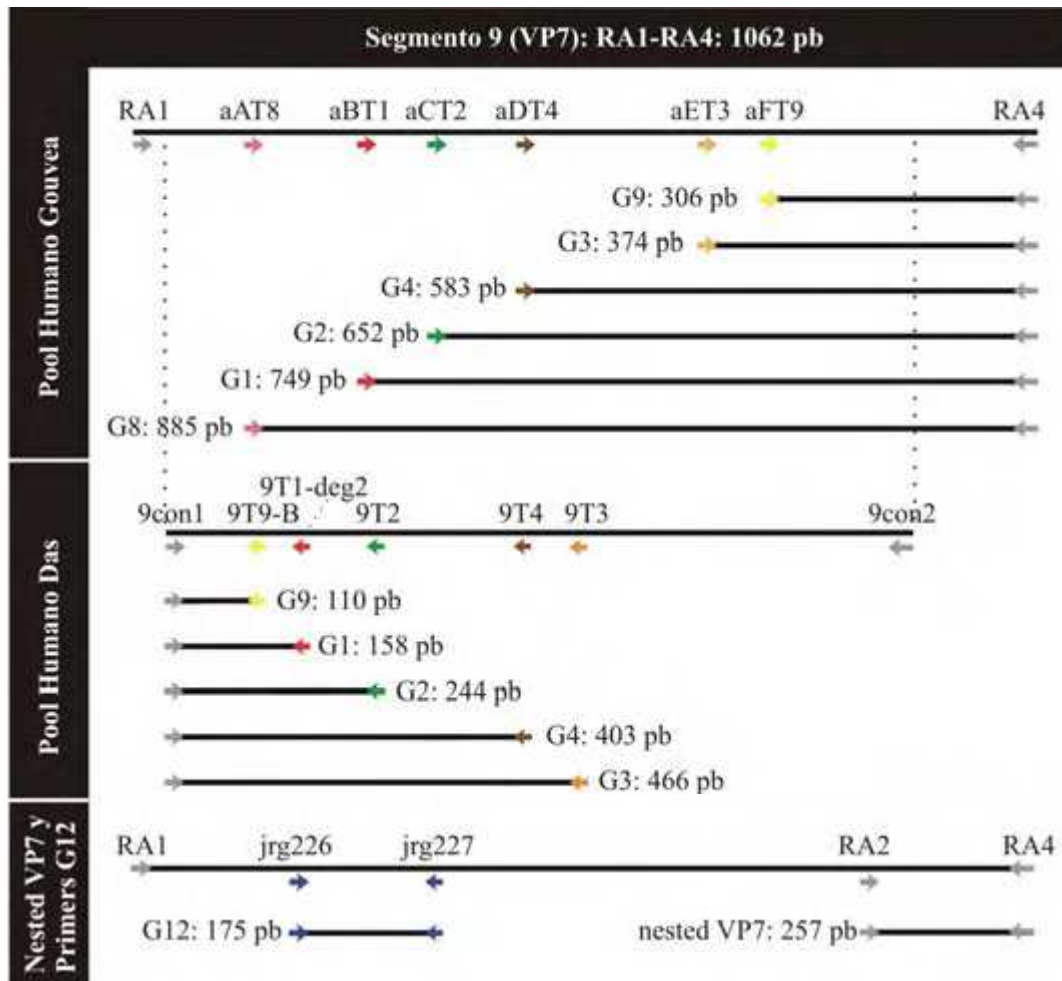


Figura 2.1 Comparación entre los primers para la amplificación y tipificación de VP7 y nested PCRs de Gouvea y HDAs. Para cada amplicón obtenido con cada primer se muestra su tamaño y el tipo al que corresponde (en el caso de la tipificación de G12 y de la nested PCR los primers se muestran juntos pero se emplean en reacciones separadas).

Fuente: Esteban L, 2008

3.14.1.2. Genotipificación del Gen 4 (VP4)

De forma similar a la Genotipificación de VP7, los P tipos pueden ser realizados directamente a partir del ADNc obtenido después del primer round de RT, donde se amplifica un fragmento del gen 4, y el segundo round es una reacción múltiple

que incluye cinco diferentes P tipos, con primers específicos para P4, P6, P8, P9 y P10, y el primer común.

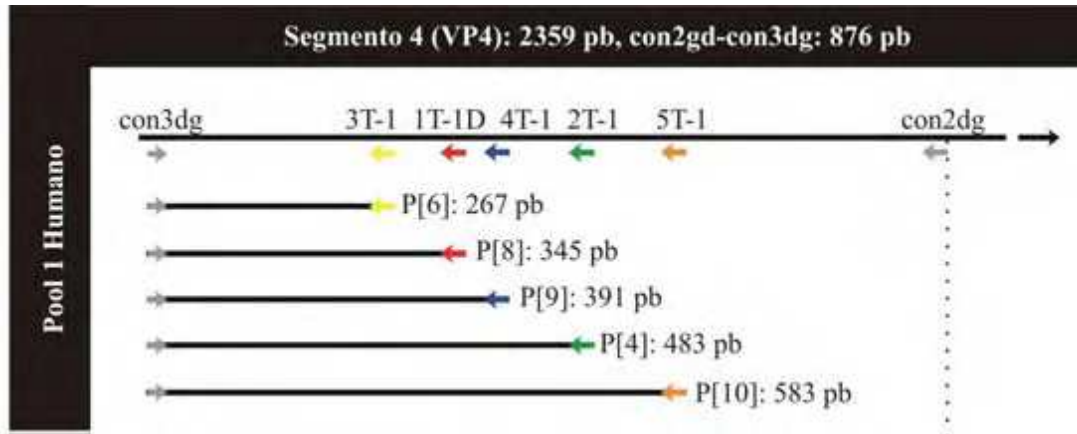


Figura 2.2 Representación de la proteína VP4, mostrando la localización de las regiones consenso: Se muestra el amplicón empleado como sustrato para el secuenciamiento de la región 9con1-9con2 junto con el *pool* de primers usados para la Genotipificación de los P tipos.

Fuente: Esteban L, 2008

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1. Procedencia de los individuos participantes en el estudio

Para llevar a cabo el estudio epidemiológico de rotavirus se partió de un total de 168 pacientes menores de 5 años con diarrea aguda provenientes de 16 diferentes provincias de Ecuador: Bolívar, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Pichincha y Tungurahua (Región Andina), Esmeraldas, Los Ríos, Manabí y Santo Domingo (Región Costa), Napo, Morona Santiago, Orellana, Pastaza y Sucumbíos (Región Amazónica) entre Enero del 2008 a Marzo del 2010. Figura 3.1

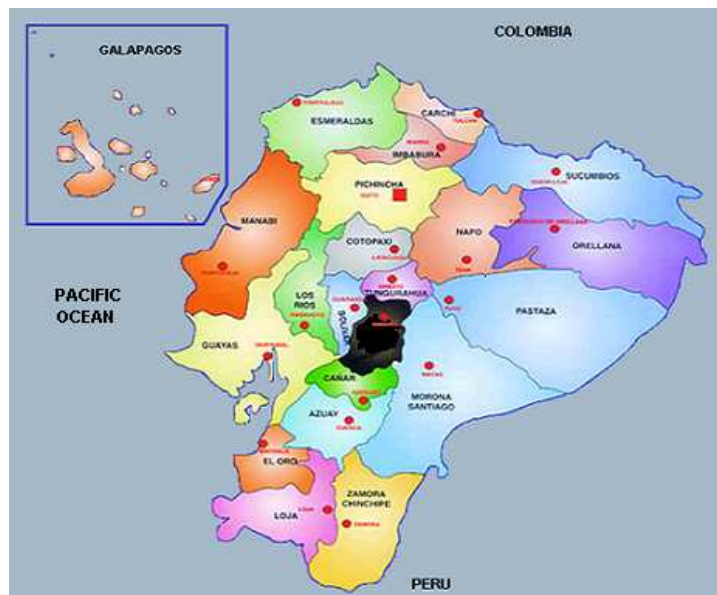


Figura 3.1 Distribución geográfica de la procedencia de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 3.1. Cuadro porcentual de muestras analizadas por electroforesis.

Individuos participantes	
n= 168	
RV positivo	17%
ND	7%
vacías	76%

Tabla 3.2. Análisis de las muestras que no presentan ningún electroferotipo.

Vacías 76%	
n= 128	
128 muestras	97% RV 3% negativas

Tabla 3.3 Origen de las muestras

Individuos participantes			Región		
n= 168					
	No. de casos estudiados	No. de casos genotipificados	Costa	Sierra	Oriente
Instituto de Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”	68	30	2	27	1
Hospital “Enrique Garcés	45	13		13	
Hospital de “Los Valles”	34	11	2	8	1
Hospital “Alfredo Domínguez”	16	6		6	
Hospital de Especialidades “Eugenio Espejo”	2	0			
Hospital Materno Infantil “Patronato San José”	2	0			
Hospital de las “Fuerzas Armadas”	1	1		1	
Total	168	61	61		

Los pacientes participantes fueron 78 mujeres y 90 varones, con un rango de edad de 0 a 60 meses, con una edad promedio de 20 meses. (Tabla 3.2)

Tabla 3.4 Género de los individuos participantes en el estudio

Individuos participantes	
n= 168	
Mujeres	78
Varones	90
Edad promedio	21.6 meses
Rango de edad	0 a 60 meses

3.2. Electroforesis de la extracción de ácidos nucleicos (RNA viral)

El ARN genómico fue extraído de las muestras y sembrado en un gel de agarosa al 1%. Del total, 27 de estas (17%) pudieron ser confirmadas como positivas por medio de electroforesis. (Figura 3.2)

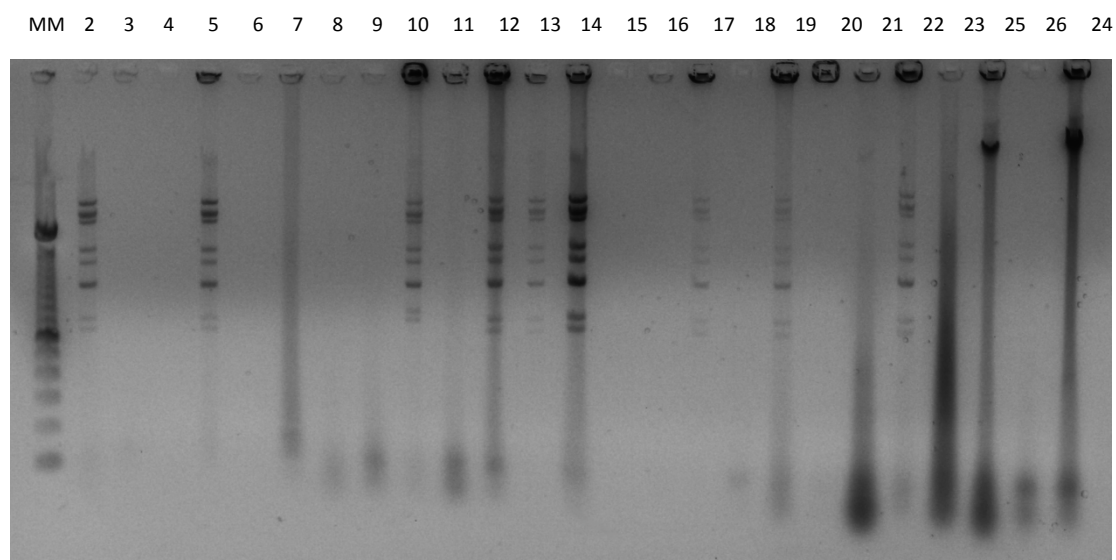


Figura 3.2 Perfiles de Rotavirus en agarosa al 1%. Los clusters característicos de este virus permiten la detección mediante este método. MM: Marcador molecular de 100pb. Electroferotipos cortos: extracciones pertenecientes a los pacientes 2, 5 y 10. Electroferotipos largos: extracciones pertenecientes a los pacientes 12, 13, 14, 17, 19 y 22. Las muestras 24 y 25 no muestran patrón típico de migración de Rotavirus, se las ha catalogado como no determinadas (ND).

La visualización de la extracción de ARN por electroforesis permitió determinar los electroferotipos de las muestras que presentaban una carga viral alta. (Tabla 3.2)

Tabla 3.5 Determinación de electroferotipos según su patrón de migración.

Individuos participantes	
n= 168	
Electroferotipo corto	6
Electroferotipo largo	22
No determinado	12
Vacias	128
Total	168

3.3. Genotipificación de la proteína VP7 por RT-PCR

Se determinó los genotipos de 62 especímenes fecales por la técnica de RT-PCR. Las muestras a incluirse en el estudio de genotipificación fueron las que presentaron un electroferotipo corto o largo (17%), no determinado (7%) y 31 muestras aleatorias (76%).³

³Tamaño de muestra obtenida mediante fórmula utilizada para el cálculo del universo.

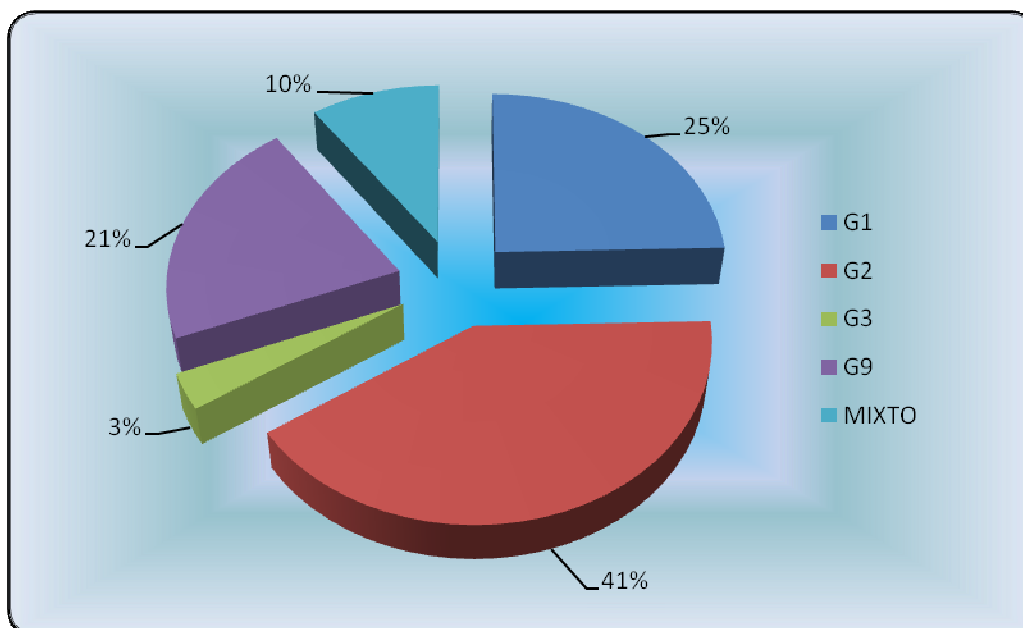


Figura 3.3 Distribución porcentual de serotipos G analizados por RT-PCR. Muestras recolectadas de niños ecuatorianos con cuadro diarreico entre Enero del 2008 a Marzo del 2010.

Las muestras que presentan un serotipo mixto representan una infección mixta, es decir presentan un doble serotipo G. (Tabla 3.3)

Tabla 3.6 Serotipos mixtos para la proteína VP7

Serotipos Mixtos
G1/G2
G2/G3
G3/G5

Tabla 3.7 Porcentaje de patrones electroforéticos según el serotipo

Individuos participantes	
n= 62	
Electroferotipo corto	G2 (100%)
Electroferotipo largo	G1(45.5%) G9 (31.8%)

3.4. Visualización de las amplificaciones para VP7

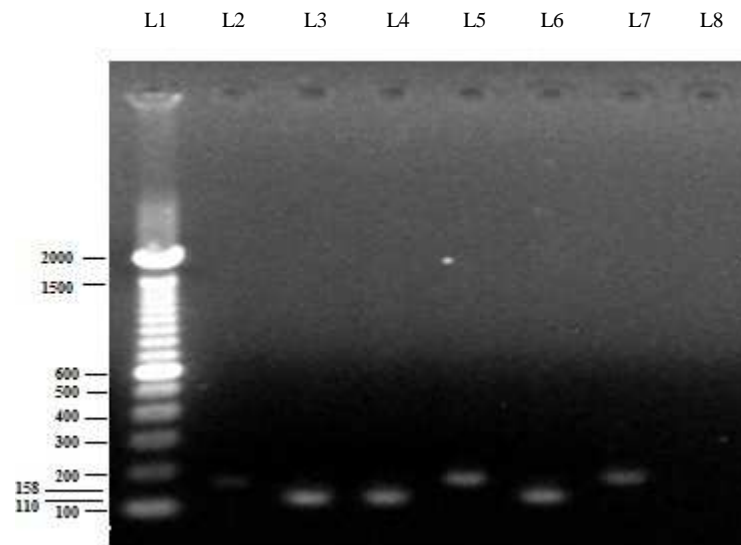


Figura 3.4 Visualización de los productos de amplificación de la PCR para la proteína VP7. L1: Marcador molecular 100pb. L2-L6 productos de amplificación de las muestras 26, 27, 31, 33 y 39 respectivamente. L7: control positivo, L8: control negativo. G1: 26 y 33; G9: 27, 31 y 39.

3.5. Genotipificación de la proteína VP4 por RT-PCR

Se determinó los P tipos correspondientes a las muestras previamente analizadas por RT-PCR para la proteína VP7.

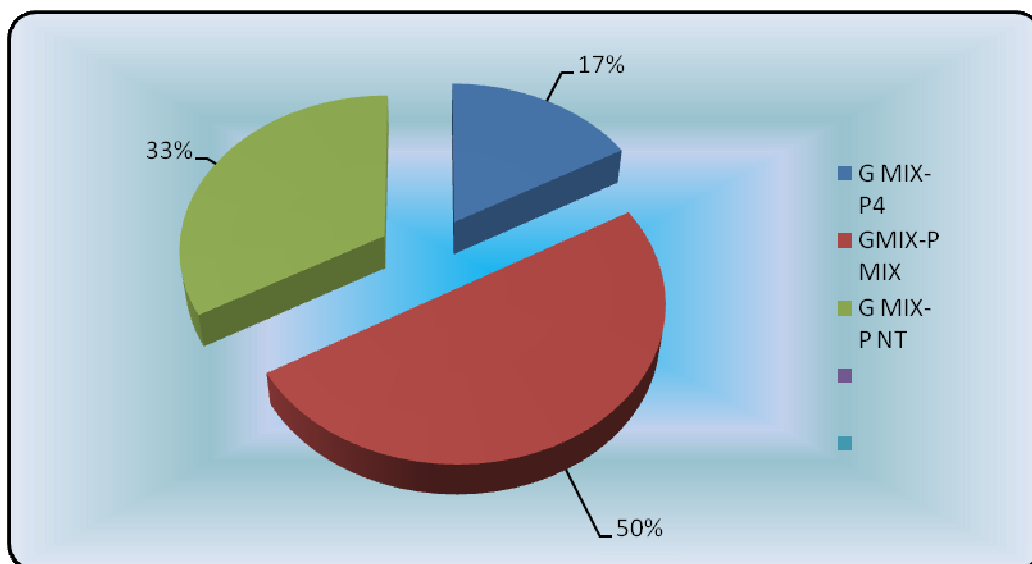


Figura 3.5 Distribución porcentual de serotipos P analizados por RT-PCR. Muestras recolectadas de niños ecuatorianos con cuadro diarreico entre Enero del 2008 a Marzo del 2010.

Las muestras que presentan un serotipo mixto representan una infección mixta, es decir presentan un doble genotipo P. (Tabla 3.4)

Tabla 3.8 Serotipos mixtos para la proteína VP4

Serotipos Mixtos
P4/P6
P4/P8
P4/P9
P4/P10
P6/P8

3.6. Visualización de las amplificaciones para VP4

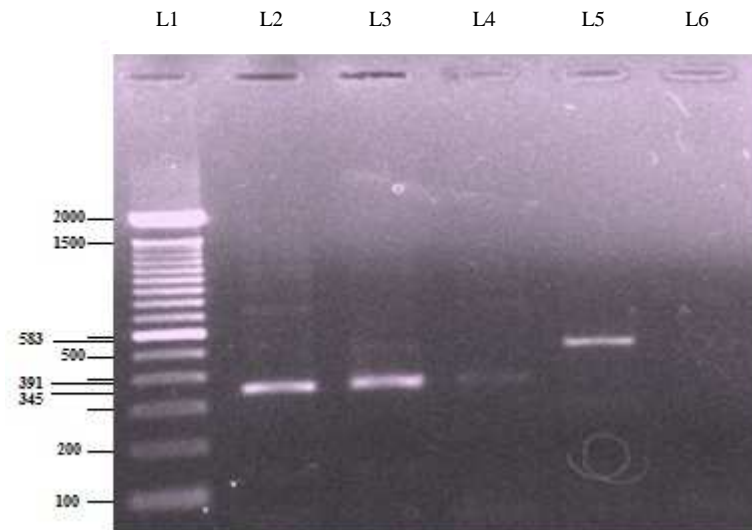


Figura 3.6 Visualización de los productos de amplificación de la PCR para la proteína VP4. L1: Marcador molecular 100pb. L2-L4 productos de amplificación de las muestras 31, 33 y 39 respectivamente. L5: control positivo, L6: control negativo. P8: 31 y 33; P9: 39; Control positivo: P10.

3.7. Genotipificación de las muestras identificadas como ND mediante Electroforesis.

Según la técnica de electroforesis aplicadas a las 168 muestras, se pudo encontrar 12 con una banda aproximadamente a los 5000pb; de estas se tomo tres muestras y se aplicó los protocolos para genotipificación de los G y P tipos; identificándose serotipos y genotipos pertenecientes a rotavirus. (Tabla 3.9).

Tabla 3.9 Identificación serotipos en muestras no pertenecientes a rotavirus.

Electroforesis		
Muestras no determinadas= 12		
Muestras analizadas (3)	Genotipos	identificados
24	G1- 2	P4- 6
25	G1- 2	P4- 10
42	G1	P10

3.8. Prevalencia de los serotipos y genotipos de rotavirus

Un total de 41 muestras (67,2%) tienen una combinación simple G/P, y en 20 muestras (32.8%) se encontró más de una combinación G y/o P (infección mixta).

Tabla 3.10 Distribución de G y P genotipos de rotavirus en niños ecuatorianos. (Enero 2008 a Marzo del 2010)

	P[4]	P[6]	P[8]	P[9]	P[10]	P[4 + 6]	P[4 + 8]	P[4 + 9]	P[4 + 10]	P[6 + 8]	P-NT	Total
G1	2	2	5	2	2	1	1	0	0	0	0	15
G2	14	0	0	1	1	0	0	1	0	0	8	25
G3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
G9	1	1	7	1	0	0	0	0	0	0	3	13
G1 + 2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	4
G2 + 3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G3 + 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
TOTAL	19	3	12	4	4	2	1	1	1	1	13	61

Entre las infecciones simples la combinación predominante es G2P[4] (27%) seguida de G9P[8] (13%); el grupo de combinaciones: G1P[10], G1P[9], G1P[6], G1P[4] con un 4%, y en un menor porcentaje las combinaciones: G9P[9], G9P[6], G9P[4], G3P[4], G2P[10], G2P[9] (2%). Entre los serotipos tipificables en combinación con los genotipos no tipificables se encuentran las combinaciones G2P-NT (15%) y G9P-NT (6%).

3.9. Frecuencia de los serotipos y genotipos de rotavirus

Tomando en cuenta el total de genotipos detectados de los especímenes amplificables y considerando los G y P tipos de manera separada, el mayor G serotipo fue G2 (41%) seguido por G1 (25%) y G9 (21%; Fig. 3.3). Ninguna muestra se mostró como no tipificable para la proteína VP7.

Por otro parte, el genotipo P predominante fue P[4] (31%) seguido por P[8] (20%) y el 21% de las muestras pertenecen a un genotipo P no tipificable. (Fig. 3.5)

3.10. Identificación de combinaciones de rotavirus presentes en la Región Andina

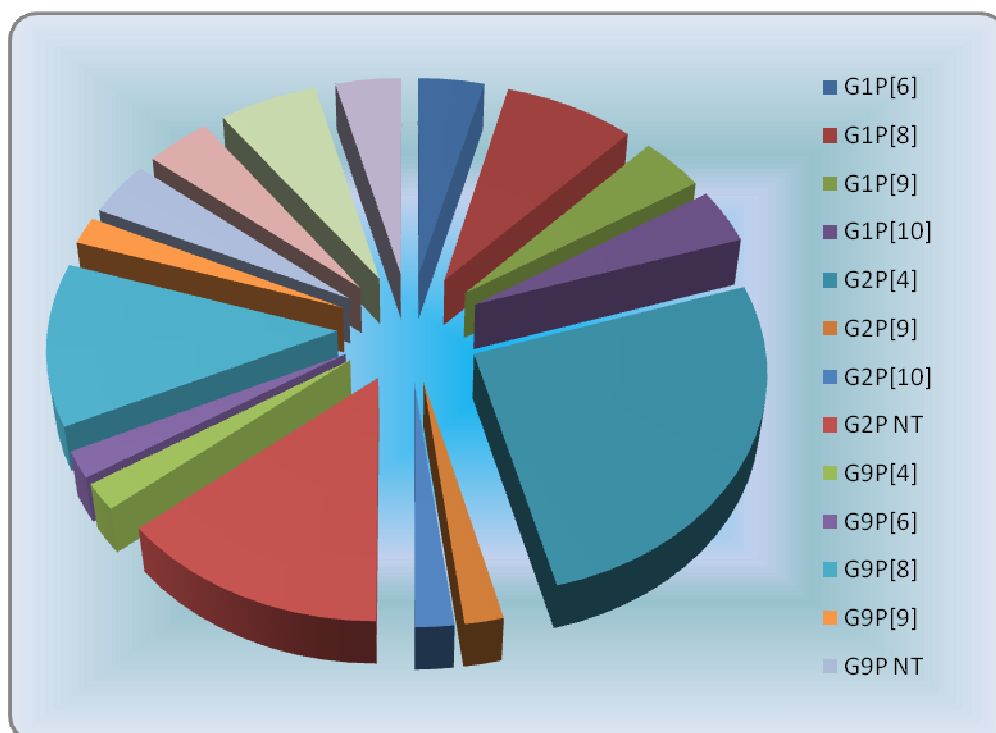


Figura 3.7 Distribución de G y P genotipos de rotavirus en niños ecuatorianos en la Región Andina. (Enero 2008 a Marzo del 2010)

3.11. Identificación de combinaciones de rotavirus presentes en la Región Costa

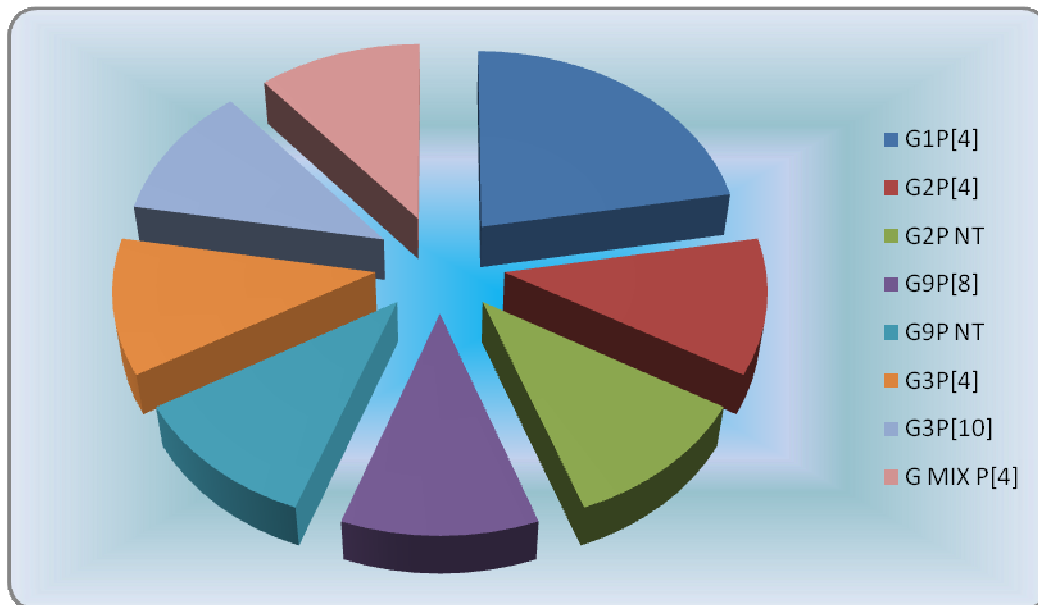


Figura 3.8 Distribución de G y P genotipos de rotavirus en niños ecuatorianos en la Región Costa. (Enero 2008 a Marzo del 2010)

3.12. Identificación de combinaciones de rotavirus presentes en la Región Amazónica

No se puede tener un dato real ya que solo se tienen tres pacientes de esta región.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

A través del presente estudio se identificaron los genotipos de rotavirus circulantes en la población ecuatoriana. Se logró amplificar las regiones conservadas de los genes 9 y 4 de rotavirus. La genotipificación por la técnica de Multiplex semi-Nested PCR (Gouvea *et al*, 2006) ha sido una herramienta ampliamente utilizada en la caracterización de este y otros virus; y mediante ésta, se ha podido estudiar la divergencia del rotavirus tanto en humanos como en animales. Además su especificidad es del 100%, de tal forma, es capaz de identificar la presencia de rotavirus aun cuando éste se encuentre en bajas concentraciones, detectando 1×10^7 partículas por ml, a diferencia de ELISA que detecta 1.4×10^9 partículas por ml (Gutierrez *et al*, 2008)

Los viriones se excretan en grandes cantidades en las heces fecales de pacientes infectados (más de 1×10^{10} partículas virales por gramo de materia fecal) por lo cual se ha podido complementar el análisis de detección aplicando la técnica de electroforesis. Se pudieron confirmar 28 muestras (17%) como positivas, ya que exhibían el genoma viral, directamente de la materia fecal. Cabe destacar que existe una relación entre los patrones electroforéticos con la serotipificación de los G tipos, de tal modo que se evidencia una correlación importante entre los electroferotipos largos con la tipificación de G1 y G9 (45.5% y 31.8% respectivamente), y a todos los G2 les corresponde un electroferotipo corto, esta relación entre G tipo y patrón electroforético no siempre se observa, sin embargo ha sido reportado previamente que los serotipos G2 presentan por lo general un patrón corto de migración, asociado a una UTR 3' de mayor longitud en el segmento 11 (Heiman *et al*, 2006). También se han podido identificar mediante esta técnica 12 muestras (7%) que presentan una banda a más de los 10000pb, sugiriéndose a pensar que son especímenes de ARN, ya que la técnica de extracción de ácidos nucleicos se recoge la parte acuosa en la cual tenemos ARN, se puede sospechar que se trata de un virus gastroenterítico de ARN por ejemplo Norovirus, ya que su genoma es de ARN y pesa 11000 pb, pero esta hipótesis se tendría que confirmar. Se descarta que sea la extracción de ácidos nucleicos de un parásito o bacteria, además que

de ser así sería ADN, lo cual no estamos extrayendo. Sin embargo, a 3 muestras de este grupo se las ha sometido a genotipificación para rotavirus y se las ha podido tipificar para algunas variantes de G tipos y P tipos, ver Tabla 3.9. El 76% restante (128 muestras) no pueden determinarse como positivas mediante esta técnica, sin embargo al 24% de éste grupo (31 muestras) se aplicó la técnica RT-PCR la cual determinó que el 97% de estas eran positivas para RV, y el 3% eran negativas.

De los 168 individuos participantes provenientes de 10 de las 24 provincias del Ecuador, la prevalencia encontrada para infecciones causadas por rotavirus mediante el diagnóstico molecular por RT-PCR fue del 67.2% para combinaciones simples; los genotipos de rotavirus más comunes fueron G2P[4] y G9P[8] con un 40% de predominancia en infecciones simples. Para la proteína VP7 el G tipo con mayor frecuencia fue G2 (41%) y para VP4 el P tipo dominante fue P4 (31%). Grafico 4.1

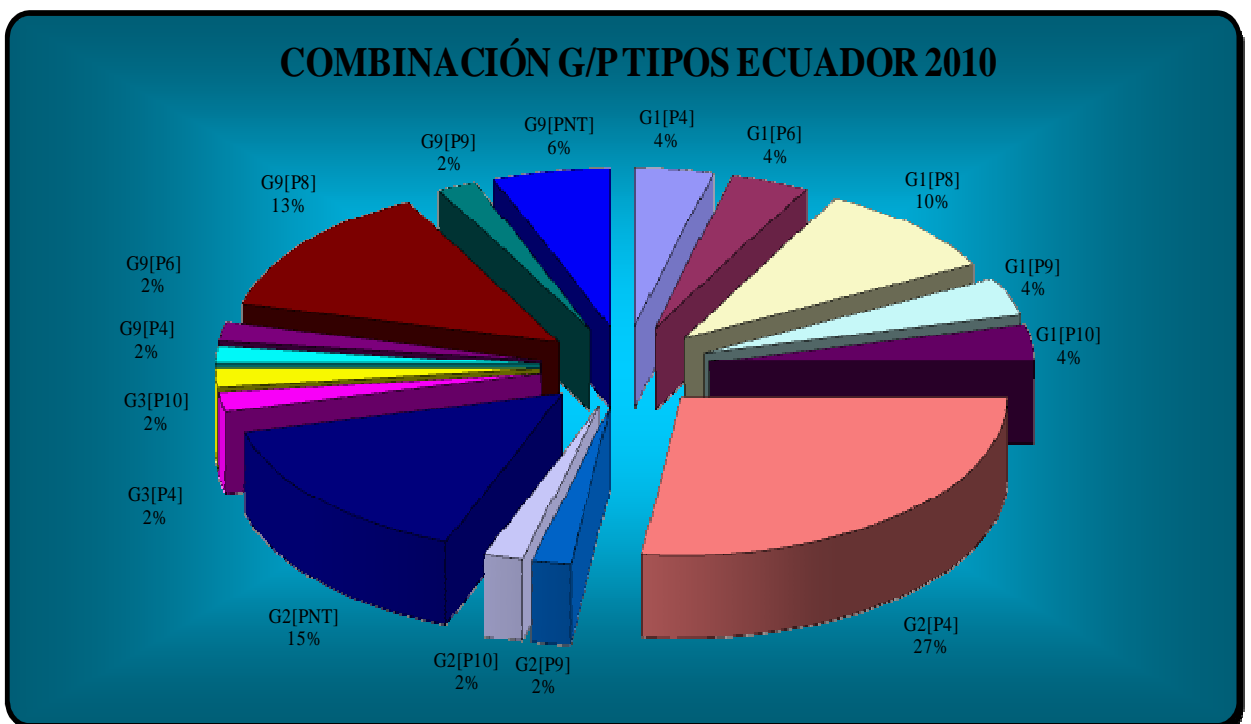


Figura 4.1 Frecuencia de G y P genotipos de rotavirus en niños ecuatorianos. (Enero 2008 a Marzo del 2010)

La combinación G2P[4] es considerada como la segunda más importante a nivel global, después de G1P[8], basado en la revisión más reciente incluyendo los estudios publicados entre 1989 y 2004 (Santos *et al*, 2005). Un estudio en Eslovenia detectó a la cepa G2P[4] como la más abundante entre 2006 y 2007 (Gutierrez *et al*, 2008). El segundo G tipo más frecuente encontrado en este estudio fue G1 (25%) en combinación con P[4], P[6], P[8], P[9] y P[10], siendo la combinación G1P[8] la más frecuente (10%) frente a un 4% de las restantes. Sin embargo la combinación G9P[8] fue la segunda más importante en todo el estudio con una prevalencia del 13%. Se puede apreciar la presencia de la mayoría de G tipos humanos evaluados, sin embargo G4 es el único serotipo no detectado en el estudio.

Para el caso de los P tipos, el genotipo P[4] fue el más frecuente (31%) en combinación con G2 (27%), seguido de P[8] (20%) en combinación con G1 y G9 (10 y 13% respectivamente).

Dada la naturaleza segmentada del genoma de rotavirus, estos pueden reordenarse produciendo infecciones mixtas, una fuente de diversidad viral. Como los genes 9 y 4 son segregados de manera independiente durante el reordenamiento, se pueden establecer diferentes combinaciones mixtas entre los G y P tipos, como se aprecia en los resultados. Se descarta que éstos sean producto de la contaminación cruzada durante el procesamiento de las muestras en el laboratorio, debido a que los protocolos aplicados ya han sido previamente estandarizados y probados. (Gouvea *et al*, 2006); (Naranjo *et al*, 2008); [23], también porque se aplicaron controles internos en cada reacción de PCR para abalizar los resultados. Las infecciones mixtas representan el 15% de las tipificaciones en América Latina (Santos *et al*, 2005), encontrándose en este estudio un porcentaje equivalente (14.75%), entre las infecciones mixtas se encuentran: Ver Tabla 3.6 y 3.8.

Un estudio global incluyó más de 2700 muestras de países y se encontró que el genotipo dominante fue P[8] asociado con G1, G3 o G4, y el genotipo P[4] fue asociado con G2 [24]. En estudios epidemiológicos en diferentes países de América Latina se han

reportado serotipos no comunes; en el caso de Brasil, fueron reportadas las combinaciones G1P[6], G3P[6], G4P[6], y G1P[3]. Siendo la cepa G5P[8] la de mayor frecuencia (13%). En Bangladesh 10% de las cepas fueron combinaciones no comunes como G1P[4] y G4P[4]. En India las cepas no comunes fueron G9P[6], G9P[11] y G10 P[11] siendo el genotipo P[6] el más frecuente (43%) atribuyéndole síntomas de diarrea aguda y casos de hospitalización [25]. En Sur África se reportó la presencia de este genotipo con las mismas implicaciones clínicas [26]. En Eslovenia se reportó casos no comunes como G4P[8], G8P[8] y G12P[8] (Gutierrez *et al*, 2008). En el presente estudio se han reportado genotipos no comunes como G1P[6] y G1P[4]

Se ha obtenido 13 muestras (21.3%) no tipificables para la proteína VP4, encontrándose una mayor asociación de estas con el serotipo G2 (77%). Es decir que se tiene genoma de RV en la muestra pero los primers de tipificación empleados no funcionan en ésta, la pérdida de especificidad de los primers empleados se puede deber a mutaciones puntuales en regiones no variables del gen 4, provocando la pérdida de complementariedad con los primers de tipificación. La posibilidad de introducción de alelos de rotavirus animal en cepas de rotavirus humano produce variantes nucleotídicas generando nuevos genotipos. Se puede deber a esta explicación la no determinación de un genotipo específico para este grupo de muestras.

En los dos estudios de esta clase realizados en el país, se evaluó la prevaencia de los genotipos VP4 y VP7 de rotavirus en niños ecuatorianos en el 2006 y 2007 (Naranjo *et al*, 2008; Bispo, 2008) se reportó la presencia de los genotipos G9P[8] y G2P[4] con un 89.5% de prevalencia, siendo G9 el mayor G tipo encontrado (46.1%) en combinación con P[8]. El panorama cambia un poco 4 años más tarde, ya que la cepa dominante es vez es G2P[4] y el G tipo más frecuente es G2 seguida de G1 y G9; y para los P tipos, el de mayor frecuencia es P[4] seguido de P[8]. Lo cual indica que las cepas se están volviendo más virulentas y los síntomas del paciente se están agravando. Pudiendo atribuirse el efecto a los cambios que da la vacuna y su baja protección ante las cepas ampliamente circulantes en la población ecuatoriana. Actualmente G9 ocupa un papel protagónico en cuanto a la epidemiología de RV y diversos estudios reportan la creciente incidencia de este a nivel mundial, llegando a ser el segundo de mayor

incidencia en el periodo 2001-2008 y alcanzado más de un 20% de prevalencia en América (Wkly, 2008)

La investigación aporta con datos acerca de la prevalencia de diferentes cepas de rotavirus de acuerdo a la variación geográfica, encontrándose que la cepa dominante en la región andina es G2P[4] y G1P[4] tiene mayor prevalencia para la región costa.

Entre las vacunas aplicadas y licenciadas, se encuentran Rotarix y Rotateq. Rotateq®, es un producto pentavalente compuesto por cinco diferentes cepas combinadas entre RV humano y RV bovino, entre estas se encuentran las cepas G1, G2, G3 y G4 para la proteína VP7, y P1A[8] para la proteína VP4. Esta vacuna fue diseñada para proveer protección específica ante serotipo (protección homotípica). En el caso de Rotarix, investigaciones previas indicaron que la cepa G1P1A[8] confería protección contra diarrea aguda causada por cepas G9. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la cepa G2 es la más prevalente, sola y con sus diferentes combinaciones, ya que la cepa G2P[4] es la más frecuente, aludiendo que la vacuna aplicada no genera protección sobre los genotipos circulantes, ya que el 40% de la población no se encuentra protegida. El Ministerio de Salud Pública ha venido aplicando la vacuna Rotarix desde hace seis años, sin realizar un seguimiento de los genotipos circulantes en la población, lo que indica también que están incurriendo en un gasto innecesario.

La diversidad viral de las cepas de rotavirus proporcionan mayores desafíos para las vacunas ya existentes. Antes de aplicar una vacuna a toda la población se debería analizar el costo-beneficio, ya que podría resultar peor el resurgimiento de nuevas cepas más resistentes y con mayores complicaciones clínicas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- El universo de muestras cubre a los niños involucrados en el estudio, es decir, niños ecuatorianos menores de 5 años, vacunados contra rotavirus.
- El estudio fue realizado en su totalidad en Ecuador, con muestras recolectadas de pacientes con gastroenteritis que asistieron a las casas de salud participantes, se realizó un seguimiento de cada paciente y de la evolución de la enfermedad.
- Las extracciones de ácidos nucleicos de especímenes fecales pueden ser guardadas durante largos periodos de tiempo y usadas como blancos, no solo para la detección y amplificación de rotavirus, sino para la detección de otros agentes gastroenteríticos de origen viral como es el caso de picovirnavirus.
- La sensibilidad de la técnica de electroforesis para detección de rotavirus en este análisis fue del 17%, comparada con el 100% de sensibilidad para la técnica de RT-PCR. Por tal motivo, no se puede dar un resultado fidedigno basándose solo en el análisis electroforético, debe realizarse la genotipificación de la muestra aunque no muestre el electroferotipo característico, ya que puede haber una carga viral baja. El 7% de las muestras presenta una sola banda a los 10000pb, por lo que se podría sospechar que es Norovirus, pero esto se debería confirmar realizando un estudio para este virus.
- Entre los genotipos más frecuentes identificados en el estudio se encuentran G2P[4] y G9P[8] con un 40% de predominancia en infecciones simples, y el 74% de los pacientes infectados son menores de 2 años.

- Luego del análisis de las muestras y realizando un análisis de todas las muestras estudiadas, se puede concluir que del total del universo, el 91% corresponde a RV positivo y el 9 % son muestras negativas. Los síntomas presentados por este último pueden atribuirse a una gastroenteritis provocada por bacterias, parásitos o alimentos.
- Aunque solo se ha estudiado la genotipificación para los genes 4 y 7, este procedimiento también puede ser aplicado cualquier otro gen de rotavirus siempre y cuando se usen primers específicos para el segmento a ser amplificado, pudiendo de esta forma investigar secuencias virales específicas, marcadores asociados con virulencia, especies de origen, la habilidad para crecer entre otras.
- Las muestras que no pudieron ser tipificadas para la proteína VP4, y que no pertenecen a ningún genotipo pueden tener una explicación de una transmisión zoonótica ya que puede ser un genotipo no aislado en humanos pero que puede circular en diversas especies animales, adquiriendo una mayor complejidad y trascendencia que podría complicar el control de la enfermedad, esto solo se puede esclarecer corriendo a estas muestras con primers específicos para animales, determinando de esta forma la procedencia de estas muestras. Se necesitan más investigaciones para establecer un resultado contundente a cerca de las mismas.
- La detección eficaz para gastroenteritis provocadas por virus constituye un importante análisis en las pruebas de laboratorio, ya que provee de un diagnóstico definitivo en cuanto a la infección en curso, de esta forma se puede definir el tratamiento a emplearse en el paciente, dejando a un lado el empleo de antibióticos innecesarios para este tratamiento.
- El rotavirus es también una importante causa de diarrea nosocomial, se ha visto una alta diseminación de éste dentro de hospitales, guarderías y del mismo hogar ya que

el virus puede sobrevivir en áreas de mayor contacto y resistir a varios factores ambientales como pH, temperatura y humedad. Se ha comprobado que se puede reducir los episodios de infección hospitalaria si se incrementara el lavado de manos y el uso de gel alcohólico (Sociedad Argentina de Pediatría, 2003). Otro reservorio de una amplia variedad de virus lo constituyen el agua de lagos y ríos y fuentes de agua recreacionales (Gutierrez *et al*, 2008).

- La mortalidad por deshidratación constituye la causa más importante de muerte en niños menores de dos años. La alimentación con leche materna durante los primeros años de vida constituye la mayor fuente de anticuerpos y proteínas para el lactante y provee una protección del 50% en los menores de 6 meses contra esta rotavirus, además, si esta enfermedad afectara al niño, la infección puede ser asintomática (Sociedad Argentina de Pediatría, 2003).
- Se ha reportado infecciones de RV en niños mayores y en los adultos los cuales no han presentado síntomas. Durante la recolección de muestras se pudo obtener especímenes pertenecientes a adultos infectados con rotavirus, se espera poder realizar una nueva investigación para determinar los genotipos circulantes en esta población.
- Como demuestran algunos estudios, la prevalencia de los distintos serotipos de rotavirus puede variar de año a año en las mismas regiones del país. Siendo la enfermedad es más prevalente durante los meses más fríos del año en climas templados.
- Con base en la epidemiología estudiada en todos los continentes, y debido a la gran cantidad de muertes a nivel mundial a causa de la gastroenteritis severa infantil causada por rotavirus, la única medida de control sería el uso de una vacuna efectiva.

- La vigilancia post vacunal es de gran importancia ya que de esta forma se puede medir la magnitud de la protección cruzada ante serotipos de rotavirus diferentes, incluyendo serotipos poco frecuentes que están aumentando considerablemente en países en vías de desarrollo como es el caso del serotipo G9 en Asia y África y G8 en diferentes partes de África. El desarrollo e introducción de vacunas de rotavirus para niños en países pobres debe ser prioridad de World Health Organization (WHO)
- La aplicación de programas de inmunización de rotavirus exige de científicos y de personal de salud que evalúen si la vacuna puede o no ser introducida en la población, investigando previamente la predominancia de los genotipos que circulan en el medio.
- Además se debería asegurar que el público este bien informado de los riesgos y beneficios que ofrecen las nuevas vacunas y si estas cubren las necesidades de la población, de tal modo que cada persona decida si desea o no aplicarse la vacuna, independientemente del marketing que se le dé.
- Es de vital importancia seguir la evolución de rotavirus en nuestro país, ya que de esta forma podríamos evaluar la aplicación de futuras vacunas para aportar con fundamentos específicos al control de esta enfermedad

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

- Entre las medidas de desinfección de áreas, se recomienda el uso de una solución de hipoclorito de sodio al 5% seguida de etanol 70%, además se recomienda el uso de glutaraldehído al 2%, solución de yodo-povidona al 10%, hexaclorofeno al 0,75% y la mezcla de alcohol isoprópilico al 70% junto con hexaclorofeno al 0,1%. Todo esto se debe variar en su uso para evitar la resistencia de bacterias. (Sociedad Argentina de Pediatría, 2003)
- Es posible investigar con mayor profundidad las secuencias aminoacídicas, nucleotídicas y la homología entre los diferentes genotipos de RV mediante un análisis filogenético, ya que de esta forma se podría comparar las cepas obtenidas con las circulantes en la región y con las circulantes en otros continentes.. Tal es el alcance de la filogenia que hubiese arrojado datos de la generación de diversidad, principalmente aminoacídica, como el mecanismo de evasión de la respuesta inmune del huésped.
- Además permite una comparación de los patrones de similaridad entre cepas de origen humano y cepas de origen animal, pudiendo dar explicaciones de la transmisión zoonótica al humano. Estudios de este tipo pueden complementar el presente trabajo.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

1. Angel, J.; Franco, M. & Greenberg, H. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Reviews. Microbiology*. Vol 5. p 529-540.
2. Angel, J.; Greenberg, H. Franco, M. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Reviews. Microbiology*. Vol 5. p 529-540
3. Arguelles, M.; Villegas, O.; Castello, A.; Abrami, A.; Ghiringhelli, P.; Semorile, L.; Glikman, G. (1999). VP7 and VP4 Genotyping of Human Group A Rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*. p. 252–259 Vol. 38, No. 1
4. Berois, M.; Libersou, S.; Russi, J.; Arbiza, J. & Cohen, J. (2003). Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996-1999. *J Med Virol*. 71(3): p. 456-62.
5. Bispo, A. (2008). Monitoreo de los serotipos de Rotavirus en la Región. Simposio Subregional de Nuevas Vacunas. Bogotá, Colombia. Extraído 17 Mayo de, 2009, de: www.paho.org
6. Bok, K.; Castagnaro, N.; Borsa, A.; Nates,S.; Fay, O.; Fabri, A.; Grinstein, S.; Miceli,I.; Matson,O.; and Gómez, J. (2001). Surveillance for Rotavirus in Argentina. *Journal of Medical Virology* 65:190±198.

7. Castello, A. (2004). Rotavirus. Extraído 18 Marzo de, 2009, de: http://www.msd.com.ar/msdar/hcp/especialidades/pediatric/_common/hcp/diseases/rotavirus/rotavirus_04.html
8. Castello, A.; Argüelles, M.; Rota, R.; Esteban, L.; Scian, R. & Glikmann, G. (2006). Rotavirus immune responses and vaccine update. *J Clinical Microbiology*. p 2046-2050
9. Chandra, S.; Diwakarla, L. & Palombo, E. (1999). Genetic and antigenic variation of capsid protein VP7 of serotype G1 human rotavirus isolates. *Journal of General Virology*, 80. p 341–344.
10. Cooney, M.; Gorrell, J. & Palombo, E. (2001). Characterisation and phylogenetic analysis of the VP7 proteins of serotype G6 and G8 human rotaviruses. *J. Med. Microbiol.* Vol. 50. p 462-467.
11. Dennehy, P. (2008). Rotavirus Vaccines: an Overview. American Society for Microbiology.
12. Esteban, L. (2008). Genotipificación de rotavirus del grupo A por multiplex RT-PCR
13. Franco, M.; Angel, J.; Greenberg, H. (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. Elsevier. *Vaccine* 24 p 2718-2731
14. Garaicoechea, L.; Bok, K.; Jones, A. Combessies, G.; Fernandez, F.; Parreño, V.; (2006). Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994–2003). *Science Direct. Veterinary Microbiology*.

15. Gentsch, J.R.; Woods, P.; Ramachandran, M.; Das, BK. Leite, JP.; Alfieri, A.; Kumar, R.; Bhan, MK. & Glass, RI. (1996). Review of G and P typing results from a global collection of strains: Implications for vaccine development. *Journal of Infect Diseases* Vol. 174: p 30-36.
16. Glass, R. (2006). New hope for defeating Rotavirus. *American Scientific*. 294(4): 46-55.
17. Glass, R.; Parashar, U.; Bresee, J.; Turcios R.; Fischer, M.; Baoming W.; Jon, J. & Gentsch, R.(2006). Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Viral Gastroenteritis Section, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta*.
18. GlaxoSmithKline. Group of Companies. (2007). Rotarix® Rotavirus vaccine, live attenuated. Australia.
19. GlaxoSmithKline. Package leaflet: Information for the user. p 417311.- 417314
20. GlaxoSmithKline; Merck & Co., Inc.; US Centers for Disease. Control and Prevention.
21. Global networks for surveillance of rotavirus gastroenteritis, 2001-2000. *Wkly Epidemiol Rec*, 2008. 83(47): p. 421-5
22. Gouvea, V.; Glass, R.; Woods, P.; Tanigubhi, K.; Clark, H.; Forrester, B. & Fang, Z. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.*, 28(2). p. 276-82.
23. Gouvea, V.; Lima, R.; Linhares, R.; Clark, F.; Nosawa, C.; Santos, N. (1999). Identification of two lineages (WA-like and F45-like) within the major rotavirus genotype P[8]. *Elsevier. Virus Research* 59. p 141–147.
24. Gray, J. & Desselberger, U. (2008). Rotaviruses Methods and Protocols, *Methods in Molecular Medicine*. Humana Press. p 129-145.

25. Gutierrez, I.; Steyer, A.; Boben, J.; Gruden, K.; Poljsak, M. & Ravnkar, M. (2008). Sensitive Detection of Multiple rotavirus Genotypes with a single reverse transcription- Real – Time Quantitative PCR Assay. *J Clin Microbiol.* Vol. 46, No. 8. p: 2547-2554.
26. Heiman, E.M., et al. (2008). Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J Virol.*, 82(22): p. 11106-16.
27. Ho, A.; Nelson, E. & Walker D. (2007). Rotavirus vaccination for Hong Kong children An economic evaluation from the Hong Kong government perspective. *ADC online.* Hong Kong.
28. Iturriza, G.; Kang, G.; Gray, J. (2004). Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. Elsevier. *Journal of Clinical Virology* 31. p 259–265
29. Khetawat, D.; Dutta, P.; Bhattacharya, S.; Chakrabarti, S. (2002). Distribution of rotavirus VP7 genotypes among children suffering from watery diarrhea in Kolkata, India. Elsevier. *Virus Research* 87 p31–40.
30. Lee, Ch.; Lin, Ch.; Liang, K.; Zao, L, Shih, M. & Hsiao, N. (2001). Genetic characterization of the Rotaviruses Associated With A Nursery Outbreak. *Journal of Medical Virology* 63:311±320.
31. Mascarenhas, J.; Linhares, A.; Gabbay, Y.; Lima, C.; Guerra, F.; Soares, L.; Oliveira, J.; Macedo, O. & Leite, J. (2007). Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and Young children in Belém. Brasil.
32. Merck & CO., INC. (2006). RotaTeq® Vacuna Antirrotavírica Viva Pentavalente por Vía Oral. Whitehouse Station, NJ.

33. Ministerio de salud Pública del Ecuador. Dirección de Control y Mejoramiento de la Salud Pública. Programa ampliado de Inmunizaciones. Plan de Introducción de Vacuna contra el Rotavirus en el Programa Ampliado de Inmunizaciones de MSP. Ecuador. Extraído 25 Abril de, 2009, de: <http://www.opsecu.org/imagenes/uploads/File/PAI%20MSP.pdf>
34. Miren, G.; Cubitt, D.; Steele, D.; Green, J.; Brown, D.; Kang, G.; Desselberger, U. & Gray, J. (2000). Characterisation of Rotavirus G9 Strains Isolated in the UK Between 1995 and 1998. *Journal of Medical Virology* 61:510–517
35. Mori, Y.; Ali Borgan, M.; Ito, N.; Sugiyama, K.; Minamoto, N. (2002). Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from Group A avian rotaviruses. Elsevier. *Virus Research* 89. p 145_/151.
36. Mphalele, M. & Steele, A. (1995). Relative frequency of human rotavirus VP4 (P) genotypes recovered over a ten-year period from South African children with diarrhea. *J Med Virol* 47:1-5
37. Naranjo, A., et al. (2008). Prevalence of VP4 and VP7 genotypes of human Rotavirus in Ecuadorian Children with acute diarrhea. *J Clin Microbiol.* 38(2) p. 1008-1011.
38. Pachón, I.; Martínez, M.; Suárez, B.; Sánchez, A.; Salmerón, F.; Soler, M. & Gómez, M. (2006). Situación epidemiológica de las gastroenteritis producidas por rotavirus. Recomendaciones de la vacunación frente a rotavirus. Extraído 28 Mayo de, 2009, de: <http://www.avpap.org/gtdocencia/rotaviruscav.pdf>
39. Parez, N. (2007). Rotavirus gastroenteritis: Why to back up the development of new vaccines. *Science Direct. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases.*
40. PATH. (2006). PATH Responds to Rotavirus Vaccine Studies Published in the *New England Journal of Medicine.*

41. Pérez, I.; Gonzales, R.; Salinas, B.; Villarroel, M.; Tomat, M. & Yarzabal, J. (2001). Academia Biomedica Digital. Universidad Central de Venezuela, Instituto de Biomedicina
42. Ramírez, R.; Dedreka, M.; Torres, A.; Escobedo, H.; Rascón, Q.; Sequeiros, T. & Erosa de la Vega, R. (2007). Rotavirus y vacunas. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. México. Extraído 23 Mayo de, 2009, de: http://www.uach.mx/extension_y_difusion/synthesis/2008/05/12/rotavirus.pdf
43. Rojas, M.; Ayala, C. & López, S. (2008). Biología Molecular del rotavirus: Una mirada a través de la interferencia del ARN. Departamento de Genética y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología. México. Extraído 23 Marzo de, 2009, de: http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq08v32p149_162_Lopez.pdf
44. Rondon, S. (2006). El peligroso rotavirus...primera causa de diarrea en el niño. Extraído 17 Mayo de, 2009, de: <http://www.drrondonpediatra.com/index.htm>
45. Sambrook, J.; Frisch, E. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: New York
46. Santos, N. & Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *J Med Virol* 15:29- 56
47. Sociedad Argentina de Pediatría. (2006). Gastroenteritis por rotavirus y su prevención. Comité Nacional de Infectología. Argentina.
48. Tamayo, L.; Moreno, L.; & Berti, O. (2007). Rotavirus. Cuaderno de Hospital de Clínicas. Vol.52, No.1. p.97-106. Extraído 28 Mayo de, 2009, de: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156267762007000100017&lng=es&nrm=iso. ISSN 1562-6776.

49. Timenetsky, C.; Santos, N. & Gouvea, V. (1994). Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol* 43: 4064-69.
50. Villena, C. (2003). Tesis: Vigilancia Ambiental Molecular de Rotavirus Grupo A humanos. Facultad de Biología. Departamento de Microbiología. Barcelona.
51. Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire. (2006). Cost effectiveness of rotavirus vaccines and other interventions for diarrhoeal diseases: meeting report 2006. No. 37, vol 81. p 349-356
52. Wilhelmi, I. & Roman, E. (2003). Virus Productores de Gastroenteritis. *Revista Clínica de Microbiología e Infección* Vol. 9. p.247-262.
53. World Health Organization. (2007). Increasing the availability of vaccines.

ANEXO A Buffer TBE 10X

Reactivos

Tris 108 gr

Ácido Bórico 55 gr

EDTA 9.25 gr

Agua destilada

Protocolo

Disolver la cantidad adecuada de los componentes en agua destilada a un 80% del volumen total, ajustar el pH a 8, y aforar a 1000ml. Almacenar a temperatura ambiente (Sambrook Frisch & Maniatis, 1989).

ANEXO B Solución de PBS

Reactivos

8 mM Fosfato ácido de Sódio di hidratado

2 mM Fosfato di ácido de Sódio mono hidratado

0.14 M Cloruro de Sódio

Agua destilada

Protocolo

Disolver la cantidad adecuada de los componentes en agua destilada a un 80% del volumen total, ajustar el pH a 7.4, y aforar a 1000ml. Almacenar a temperatura ambiente (Sambrook Frisch & Maniatis, 1989).

ANEXO C Datos de los individuos participantes, código, edad, procedencia y provincia a la cual pertenece.

CÓDIGO	GÉNERO	EDAD (meses)	PROCEDENCIA⁴	PROVINCIA
001	F	1	LIP	PICHINCHA
002	F	35	LIP	PICHINCHA
003	F	37	LIP	PICHINCHA
004	M	22	LIP	PICHINCHA
005	M	18	LIP	PICHINCHA
006	F	20	LIP	PICHINCHA
007	M	19	LIP	PICHINCHA
008	F	24	LIP	ESMERALDAS
009	M	18	LIP	COTOPAXI
010	M	11	LIP	PICHINCHA
011	F	24	LIP	LOJA
012	M	14	LIP	PICHINCHA
013	M	34	LIP	PICHINCHA
014	M	26	LIP	PICHINCHA
015	M	24	LIP	PICHINCHA
016	F	16	LIP	PICHINCHA
017	F	17	LIP	COTOPAXI
018	F	16	LIP	COTOPAXI
019	F	24	LIP	PICHINCHA
020	F	19	LIP	PICHINCHA

⁴ Institución participante donde se realizó la toma de muestras. LIP: Instituto de Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”; HEG: Hospital “Enrique Garcés”; HFA: Hospital de las “Fuerzas Armadas”; HEE: Hospital de Especialidades “Eugenio Espejo”; HPSJ: Hospital Materno Infantil “Patronato San José”; HAD: Hospital “Alfredo Domínguez”; HDLV: Hospital de “Los Valles”

021	F	24	LIP	LOJA
022	F	35	LIP	PICHINCHA
023	F	12	LIP	COTOPAXI
024	M	9	LIP	PICHINCHA
025	M	27	LIP	PICHINCHA
026	M	30	LIP	PICHINCHA
027	F	27	LIP	PICHINCHA
028	M	43	LIP	PICHINCHA
029	F	30	LIP	PICHINCHA
030	F	18	LIP	PICHINCHA
031	M	9	LIP	PICHINCHA
032	M	16	LIP	PICHINCHA
033	M	24	LIP	PICHINCHA
034	F	1	LIP	PICHINCHA
035	F	6	LIP	LOS RIOS
036	M	34	LIP	PICHINCHA
037	F	32	LIP	PICHINCHA
038	M	15	LIP	PICHINCHA
039	F	36	LIP	PICHINCHA
040	F	39	LIP	SANTO DOMINGO
041	M	14	LIP	PICHINCHA
042	F	2	LIP	PICHINCHA
043	M	25	LIP	PICHINCHA
044	F	5	HEG	PICHINCHA
045	F	12	HEG	PICHINCHA
046	F	4	LIP	PICHINCHA
047	M	4	LIP	PICHINCHA
048	M	4	LIP	IMBABURA
049	M	8	LIP	IMBABURA
050	M	3	LIP	PICHINCHA
051	M	24	LIP	PICHINCHA
052	M	4	LIP	MORONA SANTIAGO
053	F	2	LIP	PICHINCHA
054	F	10	LIP	PICHINCHA
055	F	3	LIP	MORONA SANTIAGO
056	F	36	HPSJ	PICHINCHA
057	M	4	LIP	PICHINCHA
058	M	6	LIP	PICHINCHA
059	M	6	LIP	ESMERALDAS
060	M	60	LIP	PICHINCHA
061	F	3	LIP	BOLIVAR
062	M	4	LIP	PICHINCHA
063	M	6	LIP	ESMERALDAS

064	M	3	LIP	PICHINCHA
065	M	8	LIP	CHIMBORAZO
066	M	4	LIP	COTOPAXI
067	F	9	HEE	PASTAZA
068	F	60	HEE	CHIMBORAZO
069	F	12	HEG	PICHINCHA
070	F	1	HEG	PICHINCHA
071	F	36	HEG	PICHINCHA
072	F	12	HEG	PICHINCHA
073	F	48	HEG	PICHINCHA
074	F	12	HEG	PICHINCHA
075	M	60	HEG	PICHINCHA
076	F	12	HEG	PICHINCHA
077	M	7	HEG	PICHINCHA
078	M	60	HEG	PICHINCHA
079	M	24	HEG	PICHINCHA
080	M	12	HEG	PICHINCHA
081	F	36	HEG	PICHINCHA
082	F	48	HEG	PICHINCHA
083	F	24	HFA	TUNGURAHUA
084	M	24	HEG	PICHINCHA
085	F	8	HEG	PICHINCHA
086	F	7	HEG	PICHINCHA
087	F	24	HEG	PICHINCHA
088	M	9	HEG	PICHINCHA
089	M	12	HEG	PICHINCHA
090	F	60	HEG	PICHINCHA
091	M	48	HEG	PICHINCHA
092	M	8	HPSJ	LOS RIOS
093	M	5	HEG	PICHINCHA
094	M	36	HEG	PICHINCHA
095	M	48	HEG	PICHINCHA
096	F	60	HEG	PICHINCHA
097	F	60	HEG	PICHINCHA
098	F	12	HEG	PICHINCHA
099	M	12	HEG	PICHINCHA
100	M	24	HEG	PICHINCHA
101	M	60	HEG	PICHINCHA
102	M	36	HEG	PICHINCHA
103	F	6	HEG	PICHINCHA
104	F	48	HEG	PICHINCHA
105	M	1	HEG	PICHINCHA
106	M	11	HAD	SANTO DOMINGO

107	M	6	HAD	SANTO DOMINGO
108	M	9	HAD	SANTO DOMINGO
109	F	12	HAD	SANTO DOMINGO
110	M	36	HAD	SANTO DOMINGO
111	F	24	HAD	SANTO DOMINGO
112	M	3	HAD	SANTO DOMINGO
113	M	1	HAD	SANTO DOMINGO
114	F	12	HAD	SANTO DOMINGO
115	F	24	HAD	SANTO DOMINGO
116	M	8	HAD	SANTO DOMINGO
117	F	24	HAD	SANTO DOMINGO
118	M	36	HAD	SANTO DOMINGO
119	M	36	HAD	SANTO DOMINGO
120	M	6	HAD	SANTO DOMINGO
121	M	24	HAD	SANTO DOMINGO
122	M	3	LIP	PICHINCHA
123	M	7	LIP	PICHINCHA
124	M	1	LIP	SUCUMBIOS
125	F	24	LIP	PICHINCHA
126	M	9	LIP	PICHINCHA
127	M	1	HEG	PICHINCHA
128	F	1	HEG	PICHINCHA
129	F	1	HEG	PICHINCHA
130	F	5	HEG	PICHINCHA
131	F	48	HEG	PICHINCHA
132	M	60	HEG	PICHINCHA
133	F	1	HEG	PICHINCHA
134	M	60	HEG	PICHINCHA
135	F	24	HDLV	PICHINCHA
136	M	12	HDLV	PICHINCHA
137	F	11	HDLV	PICHINCHA
138	M	36	HDLV	MANABÍ
139	M	36	HDLV	PICHINCHA
140	F	6	HDLV	PICHINCHA
141	M	60	HDLV	PICHINCHA
142	M	12	HDLV	CHIMBORAZO
143	M	12	HDLV	PICHINCHA
144	M	9	HDLV	ORELLANA
145	F	60	HDLV	PICHINCHA
146	M	60	HDLV	PICHINCHA
147	M	6	HDLV	PICHINCHA
148	M	12	HDLV	PICHINCHA
149	F	12	HDLV	PICHINCHA

150	F	48	HDLV	PICHINCHA
151	M	24	HDLV	PICHINCHA
152	M	36	HDLV	PICHINCHA
153	M	24	HDLV	PICHINCHA
154	M	36	HDLV	TUNGURAHUA
155	F	36	HDLV	PICHINCHA
156	F	12	HDLV	PICHINCHA
157	F	36	HDLV	PICHINCHA
158	F	24	HDLV	PICHINCHA
159	F	24	HDLV	PICHINCHA
160	M	24	HDLV	PICHINCHA
161	F	24	HDLV	PICHINCHA
162	F	24	HDLV	PICHINCHA
163	M	24	HDLV	NAPO
164	F	12	HDLV	PICHINCHA
165	M	24	HDLV	PICHINCHA
166	M	12	HDLV	LOJA
167	F	48	HDLV	PICHINCHA
168	M	36	HDLV	PICHINCHA

ANEXO D Datos de los individuos participantes, código, edad, provincia a la cual pertenece, electroferotipo de la muestra y genotipificación de rotavirus por el método Nested RT-PCR.

Código	Género	Edad (meses)	Provincia	Electroferotipo	Genotipificación	
					Nested RT-PCR G Tipos	P Tipos
002	F	35	PICHINCHA	LARGO	1	8
004	M	22	PICHINCHA		1,2	NT
005	M	18	PICHINCHA	LARGO	1	4,8
007	M	19	PICHINCHA		negativo	negativo
010	M	11	PICHINCHA	CORTO	2	4
012	M	14	PICHINCHA	LARGO	1	9
013	M	34	PICHINCHA	LARGO	1	6
014	M	26	PICHINCHA	LARGO	9	8
017	F	17	COTOPAXI	LARGO	9	8
018	F	16	COTOPAXI		2	4
019	F	24	PICHINCHA	LARGO	9	6
022	F	35	PICHINCHA	LARGO	1	6
024	M	9	PICHINCHA	ND	1,2	4,6
025	M	27	PICHINCHA	ND	1,2	4,10
026	M	30	PICHINCHA		1	4,6
027	F	27	PICHINCHA	LARGO	9	8
031	M	9	PICHINCHA	LARGO	9	8
033	M	24	PICHINCHA	LARGO	1	8
035	F	6	LOS RIOS		9	8
038	M	15	PICHINCHA		1,2	NT
039	F	36	PICHINCHA	LARGO	9	9
042	F	2	PICHINCHA	ND	1	10
044	F	5	PICHINCHA		9	4
051	M	24	PICHINCHA	LARGO	9	8
054	F	10	PICHINCHA	LARGO	1	8
059	M	6	ESMERALDAS	LARGO	1	4
061	F	3	BOLIVAR	CORTO	2	4
062	M	4	PICHINCHA	CORTO	2	4
065	M	8	CHIMBORAZO	LARGO	1	9
070	F	1	PICHINCHA		9	NT
074	F	12	PICHINCHA	LARGO	2	9
075	M	60	PICHINCHA		2	NT
078	M	60	PICHINCHA	LARGO	2	4
079	M	24	PICHINCHA		2	NT

080	M	12	PICHINCHA		2	4
083	F	24	TUNGURAHUA		2	NT
088	M	9	PICHINCHA		2	NT
093	M	5	PICHINCHA		2	NT
099	M	12	PICHINCHA		2	NT
105	M	1	PICHINCHA		9	NT
106	M	11	SANTO DOMINGO	CORTO	2	4
108	M	9	SANTO DOMINGO		9	NT
111	F	24	SANTO DOMINGO	LARGO	3	4
114	F	12	SANTO DOMINGO		3	10
117	F	24	SANTO DOMINGO	CORTO	2,3	4
120	M	6	SANTO DOMINGO		2	NT
122	M	3	PICHINCHA	CORTO	2	4
124	M	1	SUCUMBIOS	LARGO	1	8
126	M	9	PICHINCHA		2	10
129	F	1	PICHINCHA		1	10
134	M	60	PICHINCHA		2	NT
138	M	36	MANABÍ		1	4
139	M	36	PICHINCHA		2	4,9
141	M	60	PICHINCHA		2	4
143	M	12	PICHINCHA		2	4
144	M	9	ORELLANA	LARGO	2	4
146	M	60	PICHINCHA		2	4
148	M	12	PICHINCHA		2	4
151	M	24	PICHINCHA		2	4
152	M	36	PICHINCHA		1	8
156	F	12	PICHINCHA		9	8
161	F	24	PICHINCHA	LARGO	3,5	6,8