



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

***GENOTIPIFICACIÓN DE ROTAVIRUS PARA LOS  
TIPOS G y P EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS  
EN LA CIUDAD DE LOJA DURANTE LOS PERIODOS:  
JULIO - OCTUBRE 2005 Y FEBRERO - MAYO 2008***

Previo a la obtención del Título de  
Bioquímico Farmacéutico

**Autores:**

- ❖ Jeimmy Carina Ruiz Ramón.
- ❖ Diana Gabriela Villacis Villa.

**Director:**

Bq. Janeth Simaluiza

**Co – Director:**

Bq. Paulina Arévalo

**Loja - Ecuador  
2009**

Bq.

Janneth Simaluiza

***DIRECTORA DE TESIS***

**C E R T I F I C A:**

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por las alumnas Jeimmy Carina Ruiz Ramón y Diana Gabriela Villacís Villa, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, Enero del 2008

---

Bq. Janneth Simaluiza

**DIRECTORA DE TESIS**

## **AUTORIA**

Los conceptos, ideas y resultados vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de absoluta responsabilidad de sus autores.

Jeimmy Carina Ruiz Ramón

Diana Gabriela Villacís Villa

## **DEDICATORIA**

Tras el esfuerzo, sacrificio y desvelo, es justo que dedique este trabajo primeramente a un amigo que nunca falla Dios y le agradezco por darme la oportunidad de vivir. A mis padres Jorge y Teresa por brindarme todo el amor, comprensión y apoyo que siempre he necesitado, a mis hermanas Magaly ,Patty, Andrea, Leidy y María Agusta, por todo su cariño, y confianza que siempre han depositado en mi, a mis compañeros de curso especialmente a Anita Córdova, Karla Chamba. Finalmente a mi mejor amiga, Antonia Jiménez, por su apoyo y su lealtad.

***Jeimmy Carina***

Quiero dedicar este trabajo a mi Padre Dios, quien ha sido mi fuerza y sabiduría para seguir adelante. A mis padres Alberto y Diana, cuyo sacrificio y trabajo han sido un ejemplo en mi vida, para nunca desistir y siempre luchar por mis sueños. A mis hermanos, Carlos y Rebeca, por su apoyo y tierno Amor. Mi dedicatoria especial a Mis Abuelitos Belisario y Clarita y a mi Padrino Iván, quienes me han apoyado en todos los momentos de mi vida enseñándome el sentido del perdón y la humildad. A toda mi Gran Familia, que siempre ha confiado y creído en mí. Así también, a mis compañeros y amigos, por sus palabras de aliento. Finalmente, a mi compañera de tesis Jeimmy, ya que sin su esfuerzo y trabajo, no hubiera sido posible culminar este sueño.

***Diana Gabriela***

## **AGRADECIMIENTO**

Grandes sentimientos de gratitud y estima a la Bq. Janneth Simaluiza por su colaboración, a la Bq. Paulina Arévalo, por su sabia y generosa orientación en la dirección del presente trabajo, por su paciencia y por su constancia cuando mas la necesitamos, a todos los docentes de la escuela de Bioquímica y Farmacia por que con su paciencia y sus saberes supieron sembrar en nosotros grandes bases para el futuro.

A todos y cada uno del personal del Centro de Biología Celular y Molecular de la UTPL, de manera especial, a la Dra. Paula Torres, Bq. Gabriela Cevallos, Andrea González y Doris Macas; porque nos enseñaron el significado de la verdadera amistad y que la constancia vence cualquier obstáculo.

A los directivos del Hospital Regional “Isidro Ayora” y del Policlínico Maternidad Municipal, en especial al personal de las áreas del laboratorio clínico de ambas casas de salud, por su grata y desinteresada cooperación en la realización del presente trabajo de investigación.

## **CESIÓN DE DERECHOS**

Jeimmy Carina Ruiz Ramón y Diana Gabriela Villacis Villa, declaramos ser autoras del presente trabajo, eximiendo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaramos conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigadores, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través o con el apoyo financiero, académico o institucional de la Universidad”.

---

Jeimmy Ruiz

**Autora de Tesis**

---

Diana Villacís

**Autora de Tesis**

---

Bq. Farm. Janneth Simaluiza

**Directora de Tesis**

## INDICE DE CONTENIDOS

PÁG.

**RESÚMEN.....** ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

**ABSTRACT.....** ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

**OBJETIVOS.....** ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

**INTRODUCCIÓN.....** ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE ROTAVIRUS... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DE LA GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.3 ROTAVIRUS..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.3.1 ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.3.2 GENOMA VIRAL Y ELECTROFEROTIPOS ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.3.3 CLASIFICACIÓN ... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.3.3.1 GRUPOS Y SUBGRUPOS..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.3.3.2 GENOTIPOS / SEROTIPOS ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.4 PATOGENIA..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.4.1 INGRESO AL ENTEROCITO. .... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.4.2 FUSIÓN ENDOSOMA - LISOSOMA .. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

1.4.3	REPLICACIÓN .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
1.4.4	LISIS CELULAR ....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
1.5	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE ROTAVIRUS...	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
1.6	VACUNA CONTRA ROTAVIRUS.....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
2.1	ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA.....	19
2.2	MÉTODOS .....	20
	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
3.1	CASOS POSITIVOS DE ROTAVIRUS EN LOS 2 AÑOS DE ESTUDIO.....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.2</b>
3.2	PREVALENCIA DE CASOS DE ROTAVIRUS POR EDAD EN LOS DOS AÑOS DE ESTUDIO.....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.3</b>
3.3	PREVALENCIA DE CASOS DE ROTAVIRUS POR MESES DE ESTUDIO .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.4</b>
3.4	TIPOS DE ELECTROFEROTIPOS CIRCULANTES EN EL AÑO 2008 .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.5</b>
3.5	FRECUENCIA DE GENOTIPOS .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.6</b>
3.5.1	G - TIPO .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.6</b>
3.5.2	G – TIPO POR AÑO DE ESTUDIO .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.7</b>
3.5.3	P – TIPO.....	28



3.5.4 GENOTIPOS G Y P. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.6</b>	
5.1 CONCLUSIONES..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.6	
5.2 RECOMENDACIONES.....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.7	
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>45</b>
FORMULARIO DE INFORME DE CASO DE DIARREA .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.6
KIT INMUNOCROMATOGRÁFICO “ROTACHECK” .	47
EXTRACCION DE ARN POR EL METODO DEL TRIZOL.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.8
ELECTROFORESIS .....	49
GENOTIPIFICACION.....	51

## RESÚMEN

Rotavirus es reconocido como el principal agente causal de gastroenteritis severa en niños menores de cinco años; se estima que anualmente mueren 610.000 infantes por este agente viral en todo el mundo. Son virus icosaédricos, que pertenecen a la familia *Reoviridae*, constituidos por 3 cápsides proteicas que protegen su genoma formado de ARN (ácido ribonucleico) de doble cadena; en base a las propiedades de la cápside externa (VP7 y VP4)

se han descrito diversos serotipos/genotipos que han sido la base para el desarrollo de nuevas vacunas.

Se analizó las muestras de 726 niños menores de 5 años con diagnóstico de EDA, que acudieron al Hospital Regional “Isidro Ayora” (HRIA) durante Julio – Octubre del 2005 y Febrero – Mayo del 2008; y, al Policlínico Maternidad Municipal (PMM), durante Febrero – Mayo del 2008 de la ciudad de Loja, encontrando una prevalencia del 19,42% de infección por Rotavirus, los niños entre 12-24 meses presentaron mayor susceptibilidad de adquirir el virus: en julio y septiembre del 2005 y marzo del 2008 fueron los meses con mas alto picos de gastroenteritis viral. El análisis electroforético mostró predominio del patrón largo (97%) en el año 2008, con tres distintos patrones de migración. La genotipificación mediante RT – PCR, reveló los siguientes genotipos circulantes: para VP7: G9 (48,2%), G4(23,5%); G1(1,2%); infecciones mixtas (20%) y NT (no tipificables) (7,1%); para VP4: P[6] (36,4%), P[4](6,1%) y NT (57,6%), éstos últimos únicamente tipificados en el año 2008. Estableciendo la combinación G4+9 P[6] como la de mayor porcentaje (21,20%). Estos resultados ratifican, la variabilidad genómica de los Rotavirus.

**Palabras Claves:** rotavirus, electroferotipo, genotipo, serotipo, gastroenteritis.

## ABSTRACT

Rotavirus is known as the principal agent that caused severe gastroenteritis in children less than 5 years old. Every year 610.000 children died by this viral agent in the world. They're icosahedral virus that belong to the family Reoviridae, formed by 3 protein capsids, which protect their genome, formed by RNA in double chain, based in the properties of the external capsid (VP7 y VP), several serotypes/genotypes have been described and they have been the base to the development of new vaccinations

The samples were analyzed in 726 children less than 5 years old with EDA diagnostic, who went to the HRIA during July – October 2005 and February – May 2008, finding prevalence of 19.42% in infection by Rotavirus, the children between 12 – 24 months old showed more susceptibility to acquire the virus; in July, September 2005 and March 2008 were the months with the highest rate in viral gastroenteritis. The electrophoretic analysis showed the predominance in the large pattern (97%) in 2008 with 3 different migration patterns. The genotyping through RT – PCR revealed the following genotypes: for VP7: G9 (48,28%), G4 (23,5%), G1 (1,2%), mixed infections (20%) and NT (7,1%); for VP4: P[6] (36,4%), P[4](6,1%) and NT (57,6%), these last typed in 2008. Establishing the combination G4+9 P[6] as the highest percentage (21,20%). These results ratify the genomic variability of the Rotavirus.

**Key words:** rotavirus, electropherotype, genotype, serotype, gastroenteritis

## **OBJETIVOS**

### **GENERALES:**

- ❖ Identificar el patrón electroforético y los genotipos G y P de rotavirus presentes en las muestras fecales de los niños menores de cinco años tomadas en el Hospital Regional Isidro Ayora y Policlínico Maternidad Municipal de la ciudad de Loja, durante los períodos Julio-Octubre 2005 y Febrero – Mayo 2008.

### **ESPECÍFICOS:**

- ❖ Determinar el número de casos positivos de rotavirus en los dos años de estudio.
- ❖ Identificar el rango de edad susceptible para adquirir Gastroenteritis por Rotavirus.
- ❖ Determinar en qué meses fue más alta la prevalencia de Rotavirus.
- ❖ Determinar el patrón electroforético en muestras tomadas en el período Febrero – Mayo 2008.
- ❖ Determinar y correlacionar los subtipos G y P más frecuentes y de mayor incidencia en las muestras analizadas durante los dos períodos de muestreo.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE ROTAVIRUS

La gastroenteritis aguda o EDA, sigue siendo un grave problema de salud, y una causa muy importante de morbi-mortalidad infantil (niños entre 6 y 24 meses), cuya causa principal son los Rotavirus humanos en todo el mundo (*Delgado et al., 2006; Romero et al., 2007*), que pueden provocar desde una infección asintomática en menores de 3 meses, hasta una diarrea grave con deshidratación que puede ocasionar la muerte (*Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2007*).

Cada año, Rotavirus causa alrededor de 114 millones de episodios de gastroenteritis, 610.000 muertes en niños menores de 5 años, es decir, cada minuto muere un niño en el mundo como consecuencia de EDA (*Román, 2006; Vergara et al., 2007; Espinoza, 2008*). En Latinoamérica se estima entre 75.000 hospitalizaciones y 15.282 muertes anuales, (*OPS, 2003*)

La incidencia de la infección por Rotavirus es similar en los países en desarrollo (India, Sudeste asiático, África, Subsahariana y América Latina) y en los países desarrollados, donde ni la calidad del suministro de agua, ni las condiciones higiénicas y sanitarias han demostrado influir en el control de la infección (*OPS, 2007*). Sin embargo, los niños de países en desarrollo tienen mucha más probabilidad de morir por esta causa, debido a un deficiente acceso a los servicios de salud y terapias de rehidratación,

así como también mayor prevalencia de malnutrición. (*Pachón, 2006*).

Las características clínicas de la diarrea por Rotavirus son inespecíficas, por lo tanto la confirmación de la infección en niños es mediante el diagnóstico etiológico en el laboratorio a partir de muestras fecales (*García, 2007*).

En Ecuador, durante el período de 1978 - 1980 se realizó un estudio en pacientes ingresados al hospital de la Junta de Beneficencia de Guayaquil, donde se determinó que los casos y porcentajes de diarreas con identificación de Rotavirus ocurrían durante la época de verano caracterizada por menor temperatura y temporada seca o menos lluviosa (*OPS, 2003*). En el año 2007, el Ministerio de Salud Pública (MSP) del Ecuador, en un estudio en los hospitales pediátricos de las ciudades de: Guayaquil, Quito, Manta y Cuenca, estableció que el 40.8% de EDA era causada por los Rotavirus, justificando así la necesidad e importancia de implementar un programa de vacunación contra Rotavirus en nuestro país (*MSP, 2007*).

Esta situación no es ajena a nuestra ciudad, ya que en los años 2006, 2007, 2008, aportes investigativos por parte de estudiantes de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), demostraron que el Rotavirus era la primera causa de Gastroenteritis en nuestra ciudad, con un pico alto de incidencia en los meses fríos y lluviosos (*Cevallos, 2006; Luzuriaga y Gordillo, 2007*;

*González y Macas, 2008*). Por lo tanto, toda esta problemática de Salud Mundial y Local, despertó en nosotras el interés de realizar un estudio a nivel molecular, que complementen los trabajos antes mencionados, ya que no existen investigaciones de esta índole en nuestra ciudad y muy pocos a nivel nacional.

El desarrollo de una vacuna efectiva para combatir la gastroenteritis producida por Rotavirus, ha sido un tema de prioridad mundial. Las proteínas más importantes desde el punto de vista inmunológico y por lo tanto para el desarrollo de vacunas son las estructurales VP4, VP6, VP7 y la no estructural NSP4 (enterotoxina viral) (*Castello, 2006*). Los estudios de genotipificación de los genes VP7 y VP4 han revelado información acerca de la diversidad genética de las cepas de Rotavirus. Estudios realizados en Brasil, Venezuela, India e Israel han demostrado la prevalencia de genotipos diferentes a los descritos en otras partes del mundo, estos resultados podrían tener importantes implicaciones en las campañas de vacunación, por lo que la vacuna y una mayor comprensión de las variaciones que presentan en la naturaleza son importantes para la efectividad de la misma. (*OPS, 2008; Amarilla, et al, 2005*).

Los resultados emitidos por este trabajo de investigación, permitirá conocer los electroferotipos y genotipos circulantes en nuestra provincia, sirviendo de apoyo al Ministerio de Salud Pública y a las organizaciones mundiales para que pongan más atención a la situación epidemiológica producida

por Rotavirus. Además, a través del conocimiento e información que aporte esta investigación, se podrá entender y evaluar la respuesta inmune específica de la vacuna actualmente implementada, en la protección contra la infección sintomática por este agente viral en nuestro país.

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA DE LA GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS

**Gastroenteritis** se define como la inflamación de la mucosa del estómago y el intestino que puede estar originada, por múltiples causas (*Frecuencia del Área de la Salud de Badagoz, 2008*), siendo el 90% de los casos por agentes infecciosos (virus, bacterias, parásitos) y un 10% por causas no infecciosas (alergias alimentarias, inmunodeficiencias e intolerancias) (*Pérez et al., 2007; Navarro y Jaen, 2004*), cuya manifestación clínica principal es la diarrea (*Albert de la Torre y Roa, 2007*).

Según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), diarrea es la expulsión de tres o más deposiciones líquidas con o sin sangre en 24 horas que adopten la forma del recipiente que la contiene (*Sagaro, 2007*). En Ecuador, se ha reportado 450.963 casos de diarrea (*MSP, 2008*), ocupando el segundo lugar de enfermedades infecciosas. En nuestra ciudad, el número de casos es 18.884, siendo la tercera provincia de la Sierra con un alto índice de EDA (*MSP, 2006*).



La gastroenteritis por Rotavirus se presenta principalmente entre los 6 y los 24 meses de edad (*Cáceres, et al., 2004*).

El período de incubación es de 24 a 72 horas. La enfermedad se caracteriza por vómitos y diarrea acuosa que dura de 3 a 8 días (*Delgado, 2006*).

Según *Cáceres et al., 2006* el Rotavirus se presenta con una variación biestacional, con un primer pico en los meses entre Febrero y Mayo y un segundo pico entre Septiembre y Noviembre.

La principal ruta de transmisión del rotavirus es la vía fecal - oral, aunque también se ha especulado que se transmite por el contacto persona a persona o con el contacto con superficies contaminadas. El virus es capaz de sobrevivir horas en las manos, permanecer de 1 a 10 días en superficies secas, y ser estable e infeccioso en heces humanas hasta por una semana, las cuales suelen contener 100 billones de partículas virales por mililitro. (*Arias et al., 2002 y Pérez et al., 2005*).

## **1.3 ROTAVIRUS**

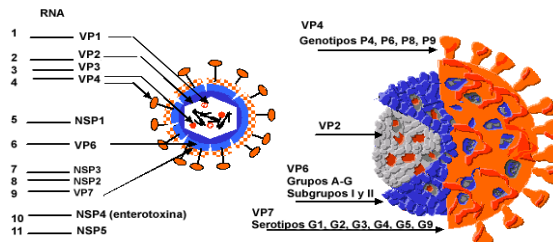
### **1.3.1 Estructura y Morfología**

Este virus fue descubierto por la Dra. Ruth Bishop, en 1973 en Australia (*Sociedad Argentina de Pediatría, 2006*), al ser observados, mediante microscopía electrónica en las biopsias de la

mucosa intestinal en pacientes afectados de gastroenteritis. Su típico aspecto de rueda, dio lugar a su denominación de Rotavirus (*latin rota = rueda*) (Delgado et al., 2006). Los Rotavirus integran uno de los nueve géneros dentro de la familia Reoviridae, sus miembros comparten una morfología de virión esférica, de estructura icosaédrica, con un diámetro de 75nm, tiene tres cubiertas proteicas (cápside), sin envoltura lipídica (Castello, 2006; Alvarez y Liván, 2008).

La cápside externa, constituida por las proteínas estructurales VP7 y VP4; la cápside intermedia, formada por la proteína VP6, y la cápside interna (nucleocápside) constituida por VP2, que protege el genoma vírico, que codifican 6 proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y 5 proteínas no estructurales (NSP1- NSP5) (Sociedad Argentina de Pediatría, 2006).

**Fig. 1:** Estructura y Clasificación del Rotavirus



Fuente: MSP 2007

Existen tres tipos de partículas virales con diferentes características estructurales: 1) TLP (Triple – Layered Particle), partícula completa que contiene las tres capas proteicas,

la cual es infecciosa ya que la presencia de la capa externa le permite unirse y penetrar a su célula huésped; 2) DLP (Doble Layered Particle), partícula que contiene dos capas proteicas, no infecciosa pero transcripcionalmente activa; y, 3) Nucleocápside, partícula que contiene una sola capa de proteínas, que tienen la actividad de replicar el genoma viral (*Samaniego, 2007*).

### **1.3.2 Genoma Viral y Electroferotipos**

El Rotavirus posee un genoma constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena, sus segmentos varían de tamaño aproximadamente desde 660bp del gen más pequeño hasta aproximadamente 3300bp para el gen más grande (*Amarilla et al., 2005*), cuyos segmentos tienen una dinámica a través de la técnica de electroforesis en un gel de poliacrilamida (PAGE) el cual produce un patrón de migración característico llamado electroferotipo (*Sulbarán et al., 2002*).

Los segmentos del genoma de Rotavirus del grupo A, se ordenan en cuatro clusters de acuerdo a su tamaño: el cluster I incluye los segmentos 1 al 4, el cluster II los segmentos 5 y 6, el III los segmentos 7, 8 y 9 y el IV los segmentos 10 y 11. Dependiendo de la movilidad de los 11 segmentos pueden presentarse dos patrones de migración denominados: largo y corto. En humanos las cepas con patrón corto usualmente corresponden al subgrupo I y las del patrón largo al subgrupo II (*Amarilla et al., 2005*).

### **1.3.3 Clasificación**

Los Rotavirus están clasificados en grupos, subgrupos y serotipos/genotipos de acuerdo a propiedades de las proteínas de la cápside: VP4, VP6 y VP7 (*Pachón, 2006; Romero et al, 2007*).

#### 1.3.3.1 Grupos y Subgrupos

Utilizando fundamentalmente las características inmunogénicas de la proteína VP6 se han identificado 7 grupos antigénicos (A, B, C, D, E, F y G). Los virus del grupo A, B y C son los que producen infecciones habituales en el ser humano. (*Comité Nacional de Infectología de Argentina, 2006*). D, E, F y G, hasta el momento sólo se han detectado en animales (*O' Ryan, 2005*). El rotavirus del grupo A es el mejor caracterizado, dentro de este grupo pueden diferenciarse 4 subgrupos por la presencia o ausencia de distintos tipos de epítopes inmunoreactivos frente a determinados anticuerpos monoclonales (I, II, I+II y nol, noll) (*Castello, 2006*).

#### 1.3.3.2 Genotipos / Serotipos

Las proteínas de la cubierta externa (VP7 y VP4) 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 (*Pachón, 2006*).

- ❖ **VP7**, es una glicoproteína, que determina la especificidad del serotipo específico G, que conforma la cápside

externa (O'Ryan, 2005). Es la segunda proteína más abundante del virión, codificada por los segmentos 7, 8 o 9 dependiendo de la cepa de Rotavirus que se analice (Matthijssens et al., 2006). Esta proteína es altamente inmunogénica y es muy buena inductora de anticuerpos neutralizantes (Infante et al., 2007).

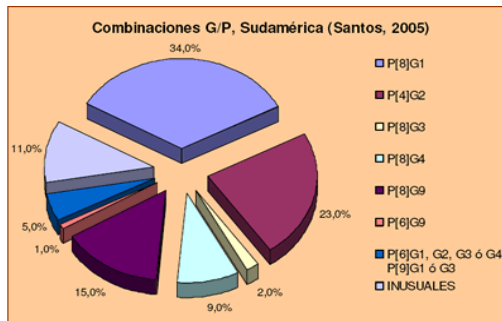
- ❖ **VP4**, es llamada de tipo P por ser sensible a las proteasas, a su vez, es una proteína codificada por el gen 4, que determina su genotipo para P. Está presente en forma de 60 espículas aproximadamente alrededor de la superficie del virus. Las propiedades de esta proteína son determinantes del rango de huésped, virulencia, tropismo e inducción de inmunidad protectora (Infante et al., 2007).

Existen 15 genotipos G y 20 genotipos P, de los cuales 10 (G) y 12 (P), se conoce que infectan a humanos (Endara, 2007). Para G se observa una perfecta correlación entre serotipo y genotipo, por lo que se puede hablar de G(1) (serotipo) o G[1] (genotipo) indistintamente (Urbina et al., 2007). Sin embargo, para el serotipo P no se observa esa correlación, por tanto, para referirnos a genotipo P, numeramos de 1 a 20 en corchetes, por ejemplo P[4] (Pachón, 2006).

Los genes que codifican los antígenos G y P se agregan independientemente, lo que permite observar varias combinaciones. Cuatro

cepas predominan en todo el mundo, incluyendo Latinoamérica: G1P[8], responsable por la mayoría de las infecciones; G2P[4], G3P[8] y G4P[8]. Además de estas cuatro, se han descrito otras con el serotipo/genotipo G5, G8 y G9, éste último podrá ser considerado el quinto genotipo de importancia mundial. (OPS, 2007).

**Fig. 2:** Genotipos circulantes en América Latina.



Fuente: Laird et. al. 2003; Castello et. al., 2004; Urbina et. al., 2004; Parra et. al. 2005; reportes de países, 2005 – 2006.

Dos o más serotipos pueden co-circular en una misma ciudad, cambiando de un año a otro, probablemente en relación al status de seroprotección contra serotipos específicos al introducirse un nuevo serotipo/genotipo. (O’Ryan, 2005). Cuando se encuentra genotipos pocos comunes se le atribuye al fenómeno del **reassortment** o reordenamiento, que significa que dos virus pueden intercambiar material genético, variando pero no mutando, es decir, la coincidencia en la misma célula de virus G1P[8] y G2P[4] puede dar lugar a la aparición de cepas

G1P[4] y G2P[8], pero no, por ejemplo a G1P[6] o G3P[4]. Esta tendencia a la variación espontánea se traduce en un cambio frecuente en las cifras de incidencia de los distintos genotipos, pero por ahora no se han visto cambios en la gravedad de la enfermedad o en el comportamiento del virus (Urbina et al., 2007).

## 1.4 PATOGENIA

**1.4.1 Ingreso al Enterocito:** puede darse por 2 mecanismos: (Arias y Torres, 2001).

- ❖ Endocitosis: VP4 reconoce un receptor de membrana (el cual aún no ha sido determinado) en los enterocitos humanos.
- ❖ Penetración Directa: el virus ingresa a través de la membrana con su cápside interna y el core, el VP7 se queda localizado en la membrana

### 1.4.2 Fusión Endosoma - Lisosoma

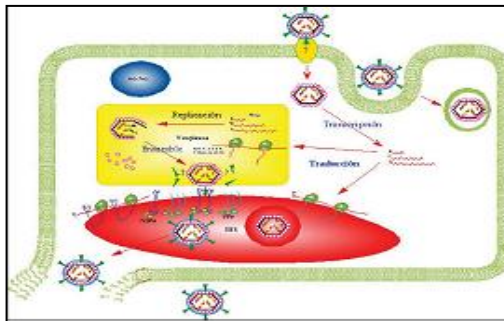
Al ingresar por Endocitosis se forman los endosomas conteniendo a los virus, éstos se fusionan con los lisosomas, vertiendo sus enzimas proteolítica, causando hidrólisis de VP6, dejando libre en el citoplasma al core viral (Samaniego, 2007).

### 1.4.3 Replicación

Es necesario que se active la ARN polimerasa viral (VP1), esta va a producir ARNm

mensajeros, los cuales van a realizar copias de cada uno de los 11 segmentos del ARN viral. A las 8 horas se forma el VIROPLASMA en citoplasma, el cual esta conformado por las proteínas sintetizadas y los ARN virales. Dentro de las proteínas no estructurales NSP1 y NSP3 se van a acumular en el citoesqueleto y van a servir para el ensamblaje del PRECORE, a esta estructura se une la VP2 en el viroplasma con intervención de la NSP2 y la NSP5 formándose el CORE (Villena, 1999). Al mismo tiempo ocurre replicación del ARN y ensamblaje del VP6. El VP7 se constituirá conjuntamente con el VP4, en la cápside externa del Rotavirus completando de esta manera su maduración (López y Arias, 2001)

**Fig. 3:** Replicación de los Rotavirus



Fuente: MSP 2007

#### 1.4.4 Lisis Celular

El ciclo de replicación termina cuando el virus es liberado al lumen intestinal por lisis



celular. Se ha podido observar que habría un incremento en la permeabilidad al calcio (*Villena, 1999*).

## **1.5 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE ROTAVIRUS**

Las pruebas de diagnóstico rápido se basan en tres técnicas inmunológicas: aglutinación con látex, ELISA e inmunocromatografía. Se trata de pruebas cualitativas que detectan los antígenos VP6 del rotavirus del serogrupo A en muestras fecales (*García, 2007*). Sin embargo, las cepas también pueden ser caracterizadas mediante geles de poliacrilamida (PAGE), o reacciones en cadena de polimerasas de la transcriptasa reversa (RT – PCR) (*Bonilla y Mosquera, 2007*).

## **1.6 VACUNA CONTRA ROTAVIRUS**

Se cree que la vacuna es la forma más eficaz y económica de detener el Rotavirus (*Rotavirus Vaccine Program, 2006*).

En el 2006, dos vacunas contra el Rotavirus mostraron ser seguras y efectivas en los niños: Rotarix™ y Rotateq™, ambas con licencia en varios países, después de haber sido analizadas en pruebas de fase 3 en alrededor de 70.000 niños (*Romero et al., 2007*).

Tabla 1: Características y diferencias entre Vacunas.

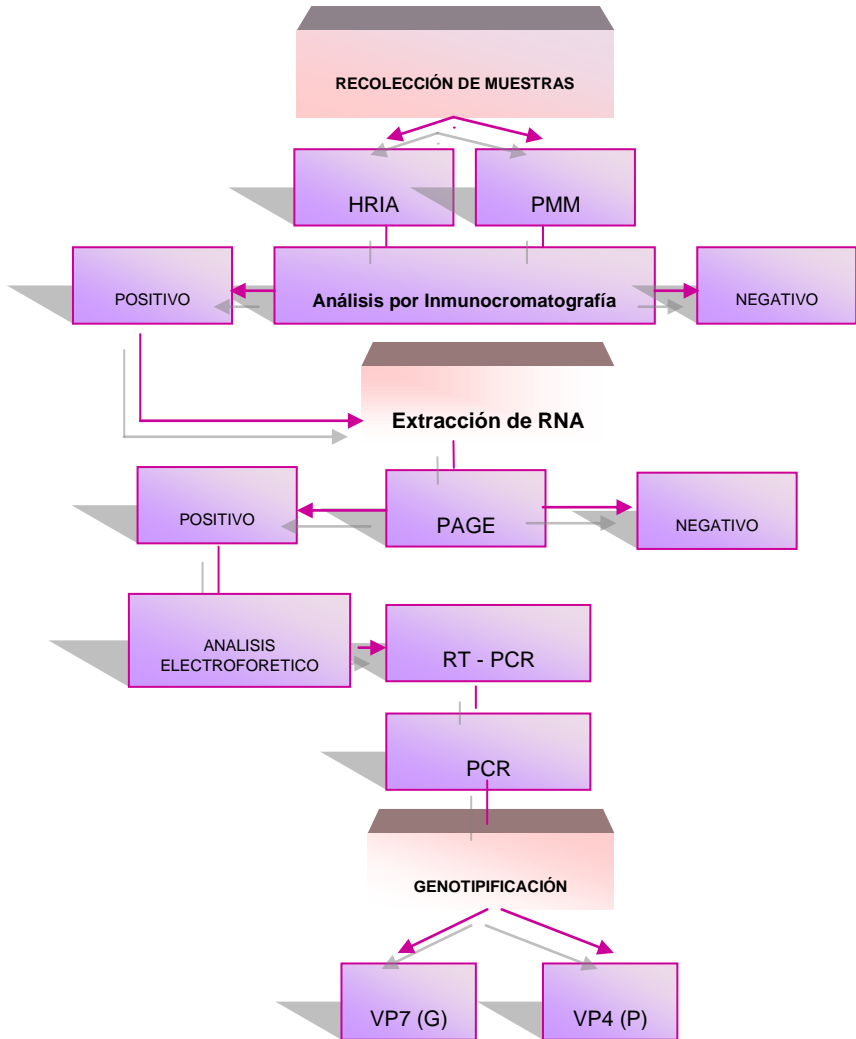
	<b>ROTARIX (GSK)</b>	<b>ROTATEQ (MERCK)</b>
<b>Tipo de Vacuna</b>	Monovalente	Pentavalente
<b>Cepa de Origen</b>	RIX4414 (Humana)	Bovino (WC3) – Humana
<b>Genotipo</b>	G1 P1A [8]	G1, G2, G3, G4, y P 1[8]
<b>Dosis</b>	2	3
<b>Edad</b>	2 y 4 meses	1, 3 y 5 meses

*Fuente: Las Autoras*

Brasil, Panamá y Venezuela incluyeron la vacuna contra el Rotavirus en sus calendarios nacionales de vacunación, Ecuador es el sexto país de América Latina en introducir Rotarix dentro de su programa de inmunización masiva y el primero en hacerlo a través del fondo rotatorio de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (Calero, 2008).

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA



## 2.2 METODOS

Se analizó las muestras de 726 niños menores de 5 años con diagnóstico de EDA, que acudieron al Hospital Regional Isidro Ayora (HRIA) durante los meses de Julio – Octubre del 2005 y Febrero – Mayo del 2008; y, al Policlínico Maternidad Municipal (PMM), durante Febrero – Mayo del 2008 (*Anexo 1*).

Del total de muestras tomadas, el 19,42 % (141) resultaron Rotavirus positivo mediante la prueba de Inmunocromatografía “Rotachek” (*Anexo 2*).

La extracción viral y genotipificación, se llevó a cabo en el área de Biomédica del Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM). Se utilizó la metodología para el diagnóstico de Rotavirus grupo A de la Universidad Nacional de Costa Rica.

Es importante mencionar que el presente proyecto de tesis es una continuación de un trabajo anterior, donde se realizó la determinación de electroferotipos circulantes en la ciudad de Loja, por lo tanto las muestras tomadas en el Hospital Regional “Isidro Ayora” durante el período Julio – Octubre 2005, se encontraban en suspensiones fecales, a diferencia de las muestras tomadas en el período Febrero – Mayo 2008, de las cuales se extrajo directamente el ARN viral.

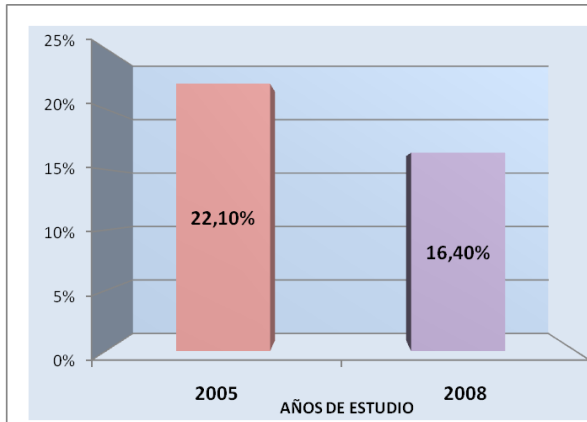
El ARN viral fue extraído por el método de Trizol (*Anexo 3*). Para las muestras del 2008, los

productos de extracción, se analizaron por electroforesis en PAGE, con tinción de nitrato de plata, para determinar su patrón electroforético. (*Anexo 4*).

Todas las muestras positivas 60,28 % (85) en PAGE, se genotipificaron para G y P, mediante la técnica de RT - PCR, PCR y NESTED - PCR (*Anexo 5*). Se analizó los productos en agarosa al 2%. Para el análisis estadístico se utilizó el programa EPI-INFO.

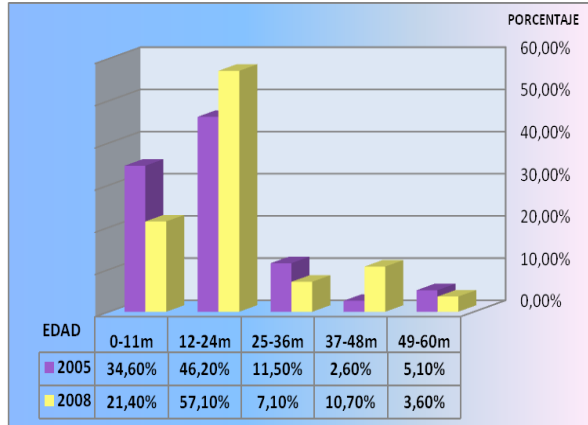
## RESULTADOS

### 3.1 CASOS POSITIVOS DE ROTAVIRUS EN LOS 2 AÑOS DE ESTUDIO



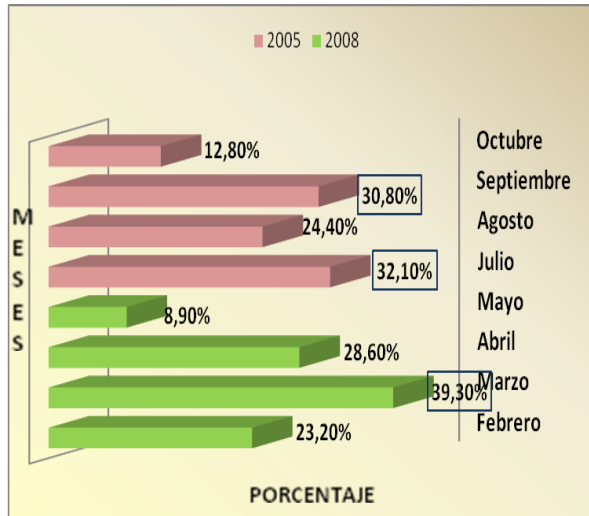
En el año 2005, de un total de 385 muestras se encontró el 22.1% de casos positivos para Rotavirus; mientras que en el año 2008, fue del 16.4% de un total de 341 pacientes. La diferencia de porcentaje entre los dos años (5.7%) no es significativa ( $p > 0.05$ ).

### 3.2 PREVALENCIA DE CASOS DE ROTAVIRUS POR EDAD EN LOS DOS AÑOS DE ESTUDIO



En nuestro estudio se determinó que los niños entre 12 – 24 meses de edad presentaron una alta incidencia de gastroenteritis por Rotavirus. Comparando los dos períodos de estudio se estableció que no existe variación significativa ( $p > 0.05$ ) en el porcentaje de cada uno de los intervalos de edad.

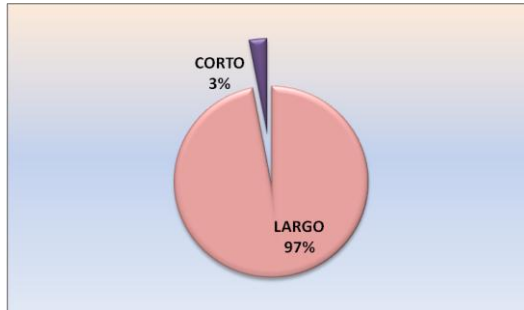
### 3.3 PREVALENCIA DE CASOS DE ROTAVIRUS POR MESES DE ESTUDIO



Los picos de prevalencia más altos para Rotavirus se dieron en los meses de Julio (32,10%) y Septiembre (30,8%) del 2005; y en marzo (39,3%) del 2008.

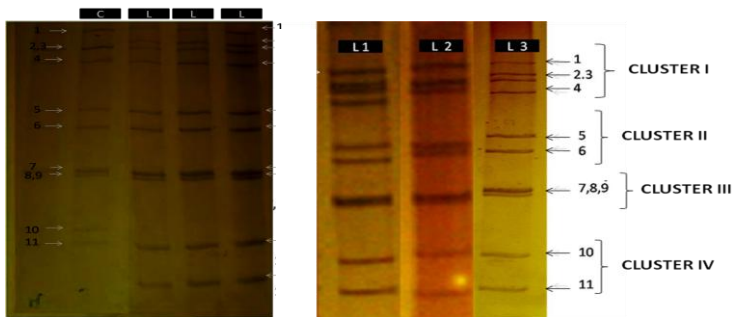


### 3.4 TIPOS DE ELECTROFEROTIPOS CIRCULANTES EN EL AÑO 2008



En el año 2008, se determinó que el tipo de electroferotipo circulante es de tipo largo (97%), dentro del cual, se observaron 3 patrones de migración diferentes en el Cluster I y III (Fig. 4).

**Fig. 4:** Electroforesis en PAGE

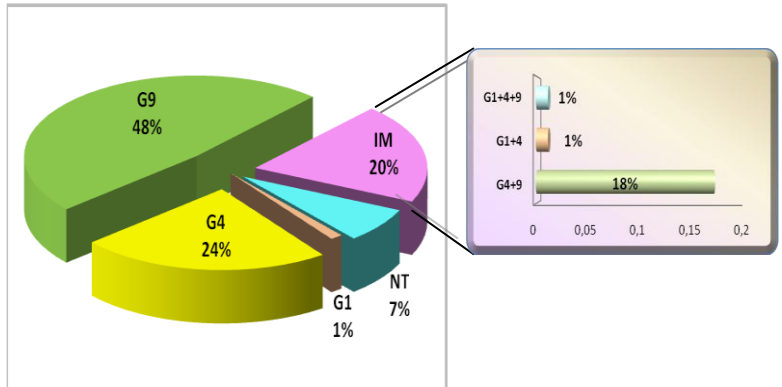


a) C: electroferotipo corto, L: electroferotipo largo.

b) Diferencias en la movilidad de los segmentos de los Cluster I y III, en los patrones Largos de Rotavirus: L1, L2 y L3

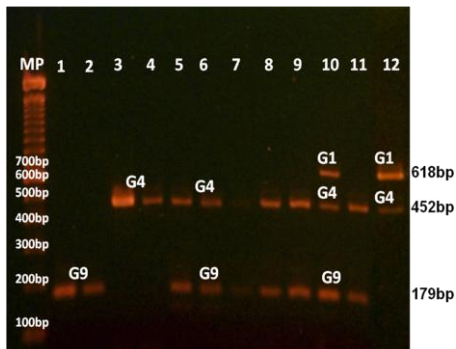
### 3.5 FRECUENCIA DE GENOTIPOS

#### 3.5.1 G - Tipo



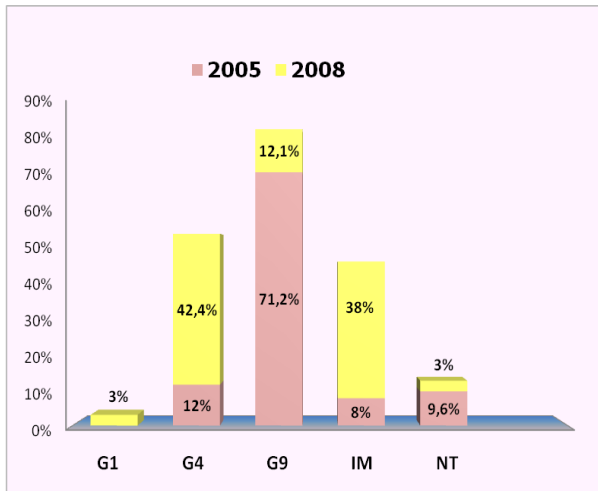
De 85 muestras positivas en PAGE, se pudieron tipificar 79 (92,9%). En los dos años de estudio se determinó que G[9] es el genotipo de mayor frecuencia con un 48%, seguido de G[4] con un 24%.

Fig. 5: Nested – PCR de VP7



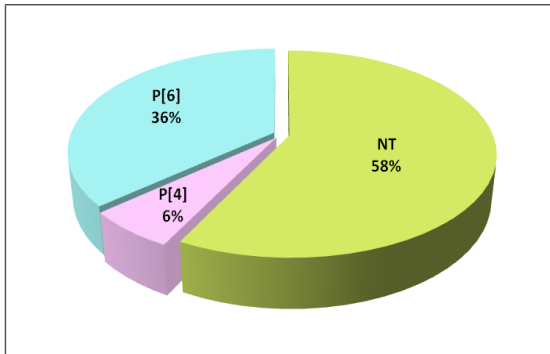
MP, marcador de peso molecular de 100bp. 1 y 2 genotipo G9 (179bp); 3 y 4 genotipo G4 (452bp), 4-12 Infecciones Mixtas

### 3.5.2 G – Tipo por Año de Estudio



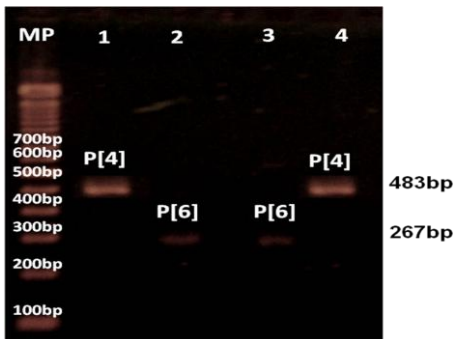
En el año 2005, G9 es el genotipo predominante (71.2%); mientras que en el 2008 es G4 (42.4%). La diferencia de Genotipos encontrada no es significativa para los dos años ( $p > 0.05$ ).

### 3.5.3 P – Tipo



Para este genotipo sólo se pudieron tipificar 14 muestras (42,4%) de 33, las mismas que corresponden al año 2008. Se encontró dos genotipos para P: P[6] en un porcentaje del 36%, y P[4] en un 6%.

**Fig. 6:** Nested – PCR de VP4



MP, marcador de peso molecular de 100bp.  
1 y 4 genotipo P[4] (483bp); 2 y 3 genotipo P[6] (267bp).

### 3.5.4 Genotipos G y P

AÑO	2005	2008		
GENOTIPO	P?	P?	P[4]	P[6]
<b>G1</b>	-	3%	-	-
<b>G4</b>	12%	30%	6,10%	6,10%
<b>G9</b>	71,20%	9,10%	-	3%
<b>G1+4</b>	-	-	-	3%
<b>G4+9</b>	7,70%	12,10 %	0%	<b>21,20%</b>
<b>G1+4+9</b>	-	-	-	3%

La genotipificación para G y P sólo fue posible en el año 2008, encontrando en un 21,2% la combinación G4+9P [6].

## DISCUSIÓN

El presente estudio tiene como finalidad determinar el patrón electroforético y los genotipos G y P circulantes de Rotavirus en niños menores de cinco años en la ciudad de Loja, en los períodos 2005 y 2008.

En nuestra investigación, la prevalencia de diarrea rotaviral durante los años de estudio 2005 y 2008 representa el 19,42%; a nivel local en el año 2007 se estableció el 34.88% de enfermedad por este agente viral (*Gordillo, Luzuriaga, 2007*); y en nuestro país se encontró el 23.4%; de gastroenteritis por Rotavirus (*Endara et al., 2007*) Datos que son similares a los encontrados en estudios en: Latinoamérica del 16% al 52% (*Kane et al., 2004*); Bolivia el 19% (*Romero, 2007*); Honduras el 51% (*Matamoros y Aguilar, 2007*); y en España el 22% (*Muñoz et al., 2008*). Ratificando así, que el mayor agente causal de gastroenteritis es el Rotavirus.

Es importante mencionar, que el número de casos positivos de Rotavirus en el período 2005 (22.1%) es mayor al encontrado en el período 2008 (16.4%), la prueba estadística ( $p > 0.05$ ), nos indica que no existe una diferencia significativa en el porcentaje de casos en los dos años. Por tanto la diferencia del 5.7%, no se le podría atribuir a que en el último año, ya se contaba con el programa de inmunización contra el Rotavirus (Rotarix), por parte del Ministerio de Salud Pública. Sin embargo, en otras publicaciones se menciona que la vacuna

Rotarix, reduce los casos de gastroenteritis en un 42% (Uribe et al, 2007). O'Ryan, 2005, indica que la eficacia al primer año de la vacuna en dos estudios de campo (Finlandia y Latinoamérica) demostró protección global contra diarrea por Rotavirus de 70 y 73 % y contra diarrea grave de 86 y 90%. Esto no pone en duda la validez de Rotarix, posiblemente se debe, a que en nuestro país esta vacuna, sólo se la administra a niños de 0 – 6 meses de edad, por tanto, infantes mayores, presentan mayor susceptibilidad de ha adquirir la enfermedad. También, a la variabilidad de genotipos que se presentaron en un año (2005), con respecto al siguiente año en esta investigación (2008).

El rango de edad de mayor susceptibilidad para adquirir la enfermedad rotaviral fue entre 12 a 24 meses (50.7%) probablemente esta situación se presenta, porque los niños menores a esta edad tienen defensas maternas y ya son vacunados, mientras que los niños mayores a este intervalo, adquieren inmunidad luego de una primera infección; que concuerdan con otros estudios, donde el mayor porcentaje de hospitalización por diarrea y de infección por rotavirus se encontró entre los 6 y los 23 meses de edad (Coluchi 2002; Cáceres et al., 2004; Armero et al., 2004; Vergara et al., 2007).

En cuanto, a la relación entre presencia de Rotavirus con el factor estacional, se determinó que en el mes de julio del 2005 (32.1%), septiembre (30,8%) y marzo del 2008 (39.3%), hubo una mayor presencia de casos de Rotavirus, considerando que éstos dos meses, son fríos y lluviosos, sumado a esto es necesario

considerar que nuestra ciudad y país no tiene estaciones climáticas definidas. Según Cáceres *et al.*, 2006 el Rotavirus se presenta con una variación biestacional, con un primer pico en los meses entre Febrero y Mayo y un segundo pico entre Septiembre y Noviembre. A diferencia, que en Asunción (Paraguay), Córdoba (Argentina) y Minas Geráis (Brasil) se observa una alta incidencia de la infección por Rotavirus durante los meses más fríos y secos del año (Romero *et al.*, 2007).

Dentro del estudio del patrón electroforético, trabajos anteriores demuestran predominio del patrón largo de más del 80% (Sulbarán, 2002; Urbina, *et al.*, 2004; Amarilla *et al.*, 2005), en nuestra ciudad, Cevallos, 2006 encontró similares resultados (96.08%), concordando con nuestro trabajo, donde el 97% corresponde a electroferotipos de patrón largo. Es importante indicar que existe diferencia en cuanto a la presencia del patrón electroforético corto, ya que éste predomina en pacientes adultos, y muy escasamente en niños.

Se identificaron 3 patrones distintos de migración en los electroferotipos largos, en los Cluster I y III. Similares hallazgos se encontraron en Paraguay, Venezuela y Colombia con 3, 4, y 8 patrones distintos de corrida respectivamente (Rojas *et al.*, 2003; Urbina *et al.*, 2004; Amarilla *et al.*, 2005). La posible explicación para esta diversidad, es por la variedad de cepas de Rotavirus que circulan en la población, posiblemente existiendo mutaciones puntuales del genoma de ARN, formación de reasociaciones genéticas, introducción de Rotavirus animal en poblaciones



humanas, rearrreglos del genoma o una combinación de diversos mecanismos (Roja et al., 2003).

En el año 2005, el genotipo G, con mayor frecuencia fue G9% (62.3%). En Ecuador, del 2003 al 2006, se encontró G9 en un 72% (Endara et al., 2007). La Organización Panamericana de la Salud en el 2007, indica que G9 se encuentra como el 5to genotipo emergente a nivel mundial. Similares resultados emitieron otras investigaciones en las que G9, no predominó, pero se mostró como un nuevo genotipo circulante (Steyer et al., 2005; Rahman et al, 2005, Urbina et al, 2004). En España, en el año 2005 este genotipo presento un porcentaje del 57.7% (Marugan et al., 2006), similar al encontrado por Sánchez et al, 2006, en un 50.5%. En Brasil se determinó el 89.2%, 85.3% y 74,5%, en los años de 1999, 2000 y 2002 respectivamente (Santos et al, 2005). A diferencia, en el año 2008, nuestro estudio estableció que G4 fue el genotipo de mayor porcentaje (25.9%). Una alta prevalencia de este genotipo fue reportado en Uruguay, Nicaragua, Costa Rica y Chile (Parra et al., 2004; Salvado et al., 2006; Vergara et al., 2007). Importante, mencionar que G1, que es el genotipo de más alto índice a nivel mundial, en nuestro trabajo se presenta con un mínimo porcentaje (1.3%), posiblemente a que la vacuna implementada en nuestro país, presenta Genotipo G1P(8).

En el año 2005, G9 aparece en mayor porcentaje que en el año 2008. Fischer et al., 2004 menciona que la vacuna confiere protección contra Rotavirus causada por G9; un estudio en Latinoamérica determinó que Rotarix es efectiva

en un 83% contra diarrea grave producida por serotipos no G1 en su mayoría P1A[8]G9 (*O'Ryan, 2005*). Este hecho, también puede darse, ya que G9 tiene la característica de aparecer y reaparece en distintos períodos de tiempo y lugar (*Armah et al., 2003; Santos et al., 2005; Steyer et al., 2005*). Es significativo, destacar que en nuestro estudio G9 aparece asociado en alto porcentaje con G4, lo cual posiblemente se deba a un mecanismo de evolución del virus, o que se ha introducido una nueva cepa animal en reasociación con cepas humanas (co – infección), en otros países se han encontrado resultados similares como en Colombia (21.1%); Venezuela (11.7%) y Brasil (21%) (*Urbina et al., 2004; Castello et al, 2004; Gentsch et al., 2006*).

En nuestro trabajo de investigación, para P se pudo genotipificar el 42.4% de las muestras recogidas en el 2008, encontrando P[6] (36.4%) y P[4] (6.1%), dato que concuerda con los estudios realizados en Georgia, donde P[6] fue el genotipo más frecuente seguido por P[4], además encontrando P[9] como un genotipo inusual (*Fischer et al., 2000*). Sin embargo, no se desconoce que para P existen hasta 25 genotipos por tanto, es posible que los genotipos circulantes en estos pacientes, no estuvieran contemplados en nuestro pool de primers. Esto se puede evidenciar en otros estudios, donde se han encontrado P[11] en 40 muestras y P[4] en una sola (*Iturriza et al., 2004*); así también P[1] y P[2] (*Rodríguez et al., 2000*); P[12] y P[7] (*Van der Heide et al., 2005*); P[25] (*Rahman et al., 2005*); P[11] y P[14] (*Santos et al., 2008*).

La combinación de genotipos G4+9 P[6] fue la de mayor porcentaje 21.20%, estos datos difieren con otras publicaciones (*Araujo et al., 2001; Kasule et al., 2003; Nahed et al., 2003; Hong et al., 2007; Santos et al., 2008; Gagliardi, et al., 2008*), ratificando una vez mas, la variabilidad de cepas en todas las áreas geográficas.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 CONCLUSIONES

- ❖ Rotavirus, continua siendo, el mayor agente causal de gastroenteritis en niños menores de cinco años.
- ❖ La edad, de mayor susceptibilidad, esta comprendida entre los 12 – 24 meses de edad.
- ❖ Los picos más altos de gastroenteritis por Rotavirus, se dan en los meses fríos de nuestra ciudad.
- ❖ El patrón electroforético largo, es predominante, mostrando éste variabilidad en la migración de sus segmentos genómicos.
- ❖ Los genotipos encontrados G4, G9 y P[6], están dentro de los más frecuentes a nivel mundial, demostrando así, que factores geográficos, climáticos, migratorios y de tiempo influyen en la reaparición y combinación de éstos.
- ❖ La combinación G4+9 P[6], ratifica la variabilidad genética de los rotavirus.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- ❖ Es importante que los programas de inmunización contra Rotavirus, se extiendan a más lugares y lleguen a más niños, sólo así se evidenciara minoría en los números de casos de enfermedad causada por este agente viral.
- ❖ Para evaluar la eficacia de la vacuna (Rotarix), así como también, conocer los mecanismos de evolución de este virus, como su transmisión, es necesario realizar más investigaciones, ampliando el tiempo y las áreas demográficas.
- ❖ Para conocer la diversidad de genotipos circulantes, es necesario ampliar el número de primers utilizados en investigaciones.
- ❖ Aunque PCR, es una técnica molecular muy utilizada y efectiva, tiene ciertas limitaciones, por ello se recomienda utilizar metodologías más avanzadas como: PCR probe Hybridization, PCR – Elisa o Microarray hybridization.
- ❖ Recomendamos, como continuación de este proyecto, secuenciar, para conocimiento del origen y tipo de las cepas circulantes.

- ❖ Es importante establecer, relaciones entre la presencia o no de ciertos genotipos y electroferotipos con factores climáticos, manifestaciones clínicas y edad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Albert de la Torre La Roa Francia M, 2007. Gastroenteritis Aguda. Guía\_ABE\_GEA V 1.1.
2. Alvarez B, Liván M, 2008. Función de la estructura secundaria del RNA mensajero en la replicación del genoma del rotavirus
3. Amarilla A , Fariña N ,Russomando G , Parra GI , 2005. Electroferotipos cortos de rotavirus detectados en adultos con diarrea en Paraguay. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud V(3), n (1).
4. Araujo I, Fialo A, Assias m, Rocho M , Galvao M, Cruz M, Ferreira B, Leite J,2001. Rotavirus genotypes P(4)G9, P(6)G9 and P(8)G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio Janeiro , Brazil. Journal Clinical Microbiology 39,1999-2001.
5. Arias C, Torres D, 2001, Fisiopatología de la Infección por Rotavirus. Sistema de Bibliotecas. 4(1): 21 – 27.
6. Arias F, Guerrero I, Méndez E, Zárate S, López T, Espinosa R, Romero P, 2002.Molecular Biology of rotavirus cell entry. Archives Medical Research, 33 (4) pp. 356-361.
7. Armah G, Steele A, Fred N, Mathew D, et al., 2003. Changing Patterns of Rotavirus Genotypes in Ghana: Emergence of Human Rotavirus G9 as a Major Cause of Diarrhea in Children. London. Journal Clinical Microbiology, p. 2317 – 2322.
8. Armero J, Clara W, Turcios R, Chacón R, Valencia D, Sandoval R, et al,2004 .Brote vigilancia y estimaciones de la carga de la enfermedad 2000-2002. Pediatr Infect Dis 23: 14-8.
9. Bonilla M y Mosquera M, 2007. Seguimiento de la Presencia de Rotavirus A en un proceso de Compostaje realizado a partir de Residuos Orgánicos Domiciliarios y contenido Ruminal. Tesis.
10. Buesa J, López P, Rodríguez J. Diagnóstico de las Infecciones Viricas Gastrointestinales. CCS.
11. Cáceres D, Peláez D, Sierra N, Estrada E, Sánchez L, 2004. La carga de la enfermedad por rotavirus en niños menores de cinco años. Revista Panamá Salud Publica 2006; 20 (1):9–21.
12. Cáceres D, Peláez D, Sierra N, Estrada E, Sánchez L, 2004. La carga de la enfermedad por rotavirus en niños

- menores de cinco años. Rev Panam Salud Publica 20(1):9–21.
13. Castello A, 2006. Importancia de los rotavirus como causantes de enfermedades diarreicas. Documento del Comité Nacional de Infectología. Sociedad Argentina de Pediatría. julio 2006.
  14. Castello A, Jiang B, Glass R, Glikmann G, Gentsch J, 2004 . Rotavirus G and P genotype prevalence in Argentina 1999-2003: detection of P[9]G12 strains. 23rd Annual Meeting of the American Society for Virology. July 2004, Montreal, Canada.
  15. Cevallos G, 2005. Identificación de patrón electroforético de rotavirus por page y tinción de plata, en niños menores de cinco años en el hospital regional "Isidro Ayora", Loja-Ecuador. Durante el periodo julio-octubre 2005.
  16. Ciro A, Castillo C. Unidad de Inmunización, Reunión regional sobre la implementación de la vigilancia epidemiológica de Rotavirus. Organización Panamericana de la Salud 2003,1-37.
  17. Coluchi N, Munford J, Manzur C, Vazquez M, Marmol M and Ruez L, 2002. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. J. Clin. Microbiol., 40: 1709 – 1714.
  18. Comité Nacional de Infectología. Gastroenteritis por rotavirus y su prevención, Argentina, 2006. Subcomisiones y comités Arch Argent Pediatr 2006; 104(6):554-559 / 554.
  19. Cosenza G, Leal I, Grijalva Ma.C, et al. 2007. Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus. Organización Panamericana de la Salud 2:1-33.
  20. Delgado A, Gastroenteritis aguda por Rotavirus, 2006. Hospital de Basurto. Bilbao.
  21. Delgado M, Hernán C, Calvache A, Ríos A, Mosquera C, Salas Ingrid, 2006. Conocimientos maternos sobre signos de peligro en diarrea aguda en el marco de la estrategia AIEPI Colombia Médica Vol. 37 N° 4.
  22. Endara P, Truaba G Solberg O, Et al, 2007. Symptomatic and Subclinical infection with rotavirus P(8)G9. Emerging Infection Diseases v(13)
  23. Fischer TK, Ashley D, Kerin T, Reynolds-Hedmann E, Gentsch J, Widdowson MA et al, 2000. Rotavirus



- Antigenemia in Patients with Acute Gastroenteritis 192:915-919.
24. Gagliardi J, Carvalho A, Linhares A, 2008. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience A review. Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, V 108:8, 745 – 753.
  25. García L, Ortega G.2007. Pruebas para la detección rápida del rotavirus. Guía ABE
  26. Gentsch J, Laird A, Bielfelt B y col,2006. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains. Implications for rotavirus vaccine programs 192, S 146-159.
  27. Georges A, Steele A, Binka F, Esona M, Asmah R, Anto F, Brown D, Green J, Et al., 2003, Changing patterns of Rotavirus Genotypes in Ghana: Emergence of human rotavirus G9 as a Major cause of diarrhea in children.. Journal of clinical microbiology 2317-2322.
  28. Gerencia del Área de la Salud de Badajoz, 2008. Gastroenteritis.
  29. González A, Macas D, 2008. Etiología de la enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños menores de 5 años durante el periodo febrero junio 2008 , en la ciudad de Loja 2008.
  30. Hong S, Lee S, Lee S, Kang, J, Lee J, Kim J, Et al. 2007. Characterization of a G11,P[4] Strain of Human Rotavirus Isolated in South Korea. Journal of clinical microbiology 3759–3761
  31. Infantes R, Goughd F, Torres A, Escobedo H, Cruz Q, Cendón T, Et al, 2007. Rotavirus y vacunas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
  32. Iturriza-Gomara M, Desselberger U, Gray J, 2004 . Molecular epidemiology of rotaviruses: genetic mechanisms associated with diversity. Viral gastroenteritis amsterdam elsevier science 317–344.
  33. Kane EM, Turcius RM, Arvay ML, Garcia S, Bresee JS, Glass RI, 2004. The epidemiology of rotavirus in Latin América. Anticipating rotavirus vaccines. Rev Panam Salud Pública 16(6):371-377.
  34. Kasule M, Sebunya T, Gashe B, Armah G and Steele E, 2003. Detection and characterization of human rotavirus among children with diarrhoea in Botswana. Tropical Medicine and International Health 8, 1137–1142.
  35. López S y Arias C, 2001. RNA silencing of rotavirus gene expression. Virus Research 102, pp. 43-51.

36. Luzuriaga M, Gordillo V, 2007. Etiología de la enfermedad diarreica aguda (EDA en niños menores de cinco años durante el periodo febrero-junio 2008, en la ciudad de Loja.
37. Marugan J, Fernández M, Blázquez H, Rodríguez P, Lázaro C, Varas R, Neiraarcilla M, Sánchez A, 2006. Rotavirus G9 es la principal causa de diarrea aguda en niños ingresados menores de 5 años. Boletín de la sociedad de pediatría de Asturias, Castilla y León 46: 204-209
38. Matamoros M y Aguilar H, 2007. Caracterización de la Mortalidad asociada a la epidemia de Rotavirus durante los meses de enero-abril del año 2007 en el Hospital Escuela Honduras.
39. Matthijnssens J, Rahman G, Graeet M, Attonui H, Et al., 2006. Recommendations for the classification of group A rotavirus using 11 genomic RNA segment. Arch Virol 253, 1621-1629.
40. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Plan de Introducción de Vacuna contra el Rotavirus en el Programa Ampliado de Inmunizaciones de MSP Ecuador. Dirección de control y mejoramiento de la salud pública Programa ampliado de inmunización, 2006.
41. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Protocolo para la Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria Centinela de Diarreas Causadas por Rotavirus y para Invaginación Intestinal. Ecuador: julio 2007.
42. Ministerio de Salud Pública, 2008. Experiencia de una vigilancia de rotavirus por el Ecuador. Caracas 2008.
43. Mota F, Gutiérrez C, Contreras S, et al., 2001. Pronóstico de la Diarrea por Rotavirus. Salud Pública México 43: 524 – 528.
44. Muñoz E, Bretón R, Rodríguez A, et al., 2008. Gastroenteritis aguda infecciosa en urgencias de un hospital urbano. Anales de Pediatría V 68, 432-438.
45. Nahed M. Abdel-Haq, Robert A. Thomas, Basim I. Asmar, Viera Zacharova,<sup>3</sup> and William D. Lyman<sup>1</sup>, 2003. Increased Prevalence of G1P[4] Genotype among Children with Rotavirus-Associated Gastroenteritis in Metropolitan Detroit. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. p. 2680–2682
46. Navarro D, Jaen D, 2004. VI Encuentro RED DE SOCIEDADES CIENTÍFICAS
47. O’Ryan M, Prado V, Pickering L, 2005. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. Semin Pediatr Infect Dis 16: 125-36.

48. Organización Panamericana de Salud- OMS: Vigilancia Epidemiológica de Diarreas causadas por Rotavirus -Guía práctica- Publicación Científica y Técnica n° 623, enero 2007.
49. Pachón I, Martínez M, Suarez B, 2006. Situación epidemiológica de las gastroenteritis producidas por rotavirus. Documento de Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones en junio de 2006.
50. Pan American Health Organization, 2008. Monitoreo de los serotipos de Rotavirus. Región Simposio Subregional de Nuevas Vacunas Bogotá, Colombia: febrero 2008.
51. Parra G, Bok K, Martinez M, Gomez J, 2004. Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. *J. Gen. Virol.* 85:1713-1716.
52. Pérez J, Vargas P, Isa P, López C ,Arias F,2005. Rotavirus Vaccine Early introduction in Latin America-Risks and Benefits, *Journal of virology*, 37 (1) pp. 1-10.
53. Rahman M, Matthijnsens J, Nahar S, Podder G, Sack D, Azim T, M Van Ranst, 2005. Characterization of a Novel P[25],G11 Human Group A Rotavirus. *Journal Clin Microbiology* 43:3208–3212.
54. Rodriguez A, Velasco A, ramirez J,Mayen A, Melo E, Díaz B, Olivera H, Garcia H, 2000. VP4-VP7 genotyping by reverse transcription-PCR of human in Mexico children with acute diarrhea. *Journal clinical microbiology* 30(10) 3876-3878.
55. Rojas Y, Bastardo J. Jesús W, Sulbaran M, 2003. Prevalencia de rotavirus y su relación con factores climáticos en Cumaná, Venezuela. *Kassmera* 31(1) ,20-28.
56. Romero C, Madani N, Halvorsen K, Iñiguez V, 2007. Enfermedades diarreicas agudas asociadas a rotavirus. *Arch Pediatr Uruguay* 78(2), 170-178.
57. Sagaro M, 2007. Diarrea Persistente. *Colombia Médica.* V 38.
58. Samaniego H, 2007. Clonación sobre expresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de Rotavirus en *E. coli*. Tesis.
59. Sánchez A, Montero V, Moreno S, Sole M, Colomina J, Iturriza-Gomara M, et al,2006. Human Rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children. Spain. *Emerg Infect Dis* 12 (10),1536-41.
60. Santos N , and Hoshino Y, 2005. Global distribution of rotavirus

serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15:29-56.

61. Steyer A, Polisak M, Barlic D, Bufon T, Marin J, 2005. The emergence of rotavirus G9 in hospital children in Slovenia. *J.clin.virol.*33:7-11
62. Sulbarán, 2002
63. Urbina D, Rodríguez JG, Arzuza O, Parra E, Young G, Castro R et al, 2004. G and P rotavirus genotypes circulating among children of the northern Colombia coast. *Int Microbiol* 7; 103-120.
64. Van der Heide, Koopmans M, Shekary n, Houwers C, Duynhoven Van Y, Poel van DEr W, 2005. Molecular Characterization of human and animal group A Rotavirus in the Netherlands. *Journal of clinical microbiology* 669-675.
65. Vergara R, Navarrete M, Núñez E, et al. 2007. Impacto de gastroenteritis severa por rotavirus en niños chilenos menores de 3 años de edad. *Rev Méd Chile* 135, 975-981.
66. Villena C, El-Senousy WM, Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:3919–23. Cosenza G, Leal I, Grijalva Ma.C, et al. 2007. Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus. *Organización Panamericana de la Salud* 2:1-33.

# ANEXOS

## Anexo 1

### FORMULARIO DE INFORME DE CASO DE DIARREA

Hospital informante \_\_\_\_\_ expediente medico: \_\_\_\_\_

Fecha de inicio \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_(día /mes/año)

#### Información del paciente

Apellido: \_\_\_\_\_ Nombre: \_\_\_\_\_  
Direccion: \_\_\_\_\_ Ciudad \_\_\_\_\_  
Edad: (meses) \_\_\_\_\_ Fecha de  
nacimiento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_(dia/mes/año)  
Sexo: \_\_\_\_\_

#### Información clínica

Temperatura: \_\_\_\_\_ °C  
Vomito: (Si/No) N° de episodios /24 cada vez q comia  
Diarrea: (Si/No) N° de episodios /24 h  
duracion(dias) \_\_\_\_\_

#### Resultados

Fecha de alta o muerte del paciente \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### Información del laboratorio

Fecha de toma de la muestra de heces  
\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_(día/mes/año)  
Se identifico parásitos en heces? \_\_\_\_\_(Si/No) cuales  
Resultado de coproparasitología:  
Presencia de PMN: \_\_\_\_\_

#### Respecto la Rotavirus

Se identifico rotavirus (Si/No)  
Método utilizado \_\_\_\_\_

#### Persona encargada:

Nombre \_\_\_\_\_  
fecha del informe: -----(dia/mes/año)

## Anexo 2

### KIT INMUNOCROMATOGRÁFICO “ROTACHECK”

Se tomó una pequeña porción de la muestra de heces, y se diluyó en el tubo provisto en el kit. A continuación se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se colocó 6 gotas en el Cassette (espacio A). Luego de 15 minutos, se observó los resultados. Rotavirus positivo si en el espacio B y C se marcaban dos rayas color rosa; y, Rotavirus negativo y se observaba una sola raya color rosa en el espacio C, que era el de control.

**Fig. 7:** Test de Inmuncromatografía para Rotavirus



Se etiquetó adecuadamente todas las muestras positivas, y se procedió a congelarlas. Éstas muestras fueron trasladadas al Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM), de la Universidad Técnica Particular de Loja para estudio del patrón electroforético y su Genotipificación.

### Anexo 3

#### EXTRACCION DE ARN POR EL METODO DE TRIZOL

- ❖ Todos los reactivos deben estar bien fríos.
- ❖ Diluimos la muestra en 250ul de PBS.
- ❖ Colocamos 400ul de trizol.
- ❖ Agitamos en el vortex e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
- ❖ Agregamos 125ul de cloroformo frio.
- ❖ Agitamos en el vortex e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
- ❖ Centrifugamos a 4 °C y a 1200 rpm durante 15min.
- ❖ Transferimos la fase superior acuosa a un tubo limpio conteniendo 5ul de portador.
- ❖ Precipitamos el ARN con 250ul de alcohol isopropilico.
- ❖ Incubamos a temperatura ambiente durante 10 min.
- ❖ Centrifugamos a 4°C y a 1200R rpm durante 10min.
- ❖ Decantamos el sobrenadante.
- ❖ Lavamos el pellet de ARN con 500ul de etanol frio al 75 %.
- ❖ Incubamos a temperatura durante 2-4 min.
- ❖ Centrifugamos a 4°C a 1000 rpm durante 5 min.
- ❖ Re suspendemos el ARN en 25-35ul de DEPC .
- ❖ En caso de no observar pellet diluir en 8ul de agua DEPC. Guardar a -20°C (Invitrogen).



## Anexo 4

### ELECTROFORESIS

#### Preparación de vidrios

- ❖ Lavamos los vidrios (agua y jabón).
- ❖ Armamos la estructura de los vidrios y comprobamos con agua si está bien sellada (vidrios + cinta plástica + espaciadores + ganchos).

#### Preparación de geles

- ❖ Para 30ml de gel, colocar 7 ml de Acrilamida: Bis (30:0,8%).(Invitrogen).
- ❖ Añadimos 11.58ml de Tris HCl 1.5M pH 8.8 (Invitrogen).
- ❖ Añadimos 11.25ml de agua destilada dds.
- ❖ Mezclamos por 10 minutos
- ❖ Colocamos 300ul de PSA 20% (Promega).
- ❖ Colocamos 30ul de TEMED (Invitrogen).
- ❖ Vaciamos la solución a la estructura de vidrio.
- ❖ Colocamos la peineta y esperar completa polimerización, aproximadamente 2 horas.
- ❖ Mezclamos 7ul de azul broma fenol + 7ul de ARN.
- ❖ Cargamos en cada pocillo.
- ❖ Llenamos la cámara de electroforesis con el Buffer de Corrida (12g Tris-Base (Invitrogen); 57,68g Glicina H<sub>2</sub>O dd c.s.p. 1000ml; pH 8.5) (Invitrogen).
- ❖ Corremos las muestras con las siguientes condiciones: 30 V; 300mA; 18 horas en frío.

## TINCIÓN DE PLATA

- ❖ Colocamos el gel por 5 min en Solución fijadora (15 ml de Ácido Acético (J.T.Baker) en 150 ml de agua destilada).
- ❖ Lavamos el gel con abundante agua destilada
- ❖ Colocamos en solución de nitrato de plata (Promega) (0.3 gr en 150 ml de agua destilada) por 10 min.
- ❖ Lavamos con abundante agua.
- ❖ Colocamos solución reveladora (1,5 gr de NaOH y 450 ul de formaldehido en 150ml de agua destilada) por 10 min. (Invitrogen)(J.T Baker).
- ❖ Lavamos con abundante agua.
- ❖ Pasamos el gel a acetatos, dejar secar.
- ❖ Tomamos la respectiva foto.

## Anexo 5

### GENOTIPIFICACIÓN

Se genotipifico para los tipos G y P, todas las muestras de extracción de ARN que resultaron positivas en PAGE.

#### Primers:

La posición de nucleótidos y secuencia de primers que se utilizó para los Genotipos G fueron los siguientes: **VP7 – F** (nt 51-71) ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC; **VP7 – R** (nt 914 – 932) AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC, 881bp; **G1** (nt 314 – 335) CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G, 618 bp; **G2** (nt 411 – 435) CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G, 521 bp; **G3** (nt 250 – 269) ACG AAC TCA ACA CGA GAG G, 682 bp; **G4** (nt 480 – 499) CGT TTC TGG TGA GGA GTT G, 754 bp; **G8** (nt 178 – 198) GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG, 754 bp; **G9** (nt 757 – 776) CTT GAT GTG ACT AY<sup>a1</sup>A AAA AC, 179 bp; **G10** (nt 666 -687) ATG TCA GAC TAC AR<sup>b</sup>A TAC TGG, 266bp.

Para los Genotipos P se usó los siguientes primers: **Con - 3** (nt 11 – 32) TGG CTT CGC

---

<sup>1</sup> Y<sup>a</sup>= C o T

CAT TTT ATA GAC A, 876 bp; **Con – 2** (nt 868 – 887) ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC.

**P4** (nt 474 – 494) CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC, 483 bp; **P6** (nt 259 – 278) TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA, 265 bp; **P8** (nt 339 – 356) TCT ACT GGR<sup>b2</sup> TTR<sup>b</sup> ACN<sup>c</sup>TGC, 345 bp; **P9** (nt 385 – 402) TGA GAC ATG CAA TTG GAC 391; **P10** (nt 575 – 594) ATC ATA GTT AGT AGT CGG, 583 bp.

### RT – PCR

1. Preparamos la solución antisense: para G<sup>3</sup>: 1ul de VP7-F, 5ul de agua libre de nucleasas); para P<sup>4</sup>: 1ul de Con, 5ul de agua libre de nucleasas.
2. Añadimos 6ul de la mezcla antisense a un tubo de PCR.
3. Agregamos 5ul de la muestra de ARN.
4. Desnaturalizamos a 97°C por 5 minutos.
5. Rápidamente colocamos el tubo en hielo por 2 minutos.

### RT - MIX

---

<sup>2</sup> R<sup>b</sup>=AOR G

N<sup>c</sup>= A,G,C OR T

<sup>3</sup> Los reactivos para Genotipos G son de la Casa Comercial Fermentas.

<sup>4</sup> Los reactivos para Genotipos P son de la Casa Comercial Promega.

1. Preparamos la solución: 4ul de Buffer 5X, 2 ul de DNTPs (10mM), 0.5ul de inhibidor de RNAsas, 1.5ul de agua libre de nucleasas.
2. Incubamos a 37°C el RT - mix por 5 minutos.
3. Añadimos 8ul de RT mix a cada tubo.
4. Añadimos 1ul de Reverso Transcriptasa a cada tubo.
5. Corremos el programa: 42°C por 60 minutos, 94°C por 5 minutos, 4°C por 2 minutos.

### PCR

1. Preparamos la solución: 25ul de 2X PCR Master Mix (50unit/ml de Taq DNA Polymerasa, 400uM dATP, 400uM dGTP, 400uM dCTP, 400uM dTTP, 3mM Cl<sub>2</sub>Mg), 0,5ul de primer VP7-R o Con 2 (20 pmol/ul), 19,5 agua).
2. Alicuotamos 45ul de la mezcla en n tubo de PCR 200ul.
3. Añadimos 5ul al tubo anterior.
4. Corremos el programa 35 ciclos(94°C por 1 minuto,42°C por 1 minuto, 72°C por 1 min, extensión de 72°C por 7 minutos , 4 °C, ∞ ).

### GENOTIPIFICACIÓN:

1. Preparamos la solución: 25ul de PCR Master Mix (50unit/ml de Taq DNA Polymerasa, 400uM dATP, 400uM dGTP, 400uM dCTP, 400uM dTTP, 3mM Cl<sub>2</sub>Mg); 1ul de VP7-R o Con 3 (10 pmol/ul); 4ul de pool de primers para VP7 o VP4 (10pmo/ul); 18ul de agua libre de nucleasas).

2. Colocamos 45ul de la mezcla en un tubo de PCR.
3. Añadimos 5ul de producto de PCR a la mezcla.
4. Corremos el programa: 35 ciclos (94°C por 1 minuto, 42°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, extensión de 72°C por 7 minutos , 4 °C, ∞ ).
5. Identificamos el producto (5ul de producto y 3ul de azul de bromo fenol) en geles de agarosa al 2%, con las siguientes condiciones: 190V, 300mA, 25 minutos).
6. Revelamos con bromuro de etidio por 20 minutos y lavamos con agua por 10 minutos.
7. Tomamos la foto respectiva.