

50
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

DIAGNOSTICO DE LA INFECCION POR ROTAVIRUS
EN DOS HOSPITALES PEDIATRICOS.
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO, D.F. (H.I.M.)
Y HOSPITAL DEL NIÑO POBLANO, PUEBLA (H.I.P.)

T E S I S

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

RAMON CUAUHTEMOC PALMERIN JUAREZ

ASESORES: Q.F.B. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ.
Q.F.B. JOSE ERNESTO RAMIREZ GONZALEZ.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

270122



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



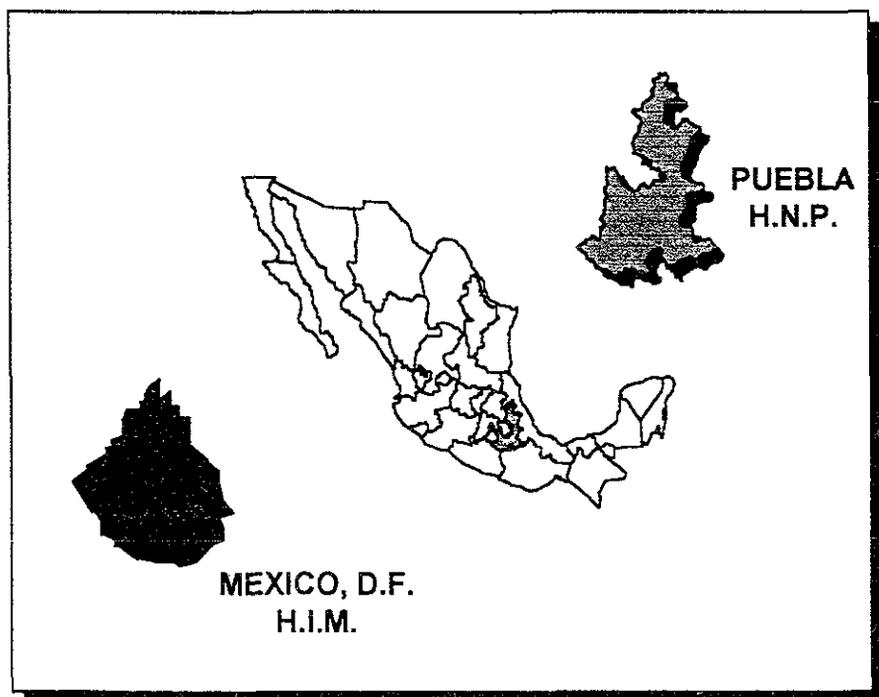
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**DIAGNOSTICO DE LA INFECCION POR
ROTAVIRUS EN DOS HOSPITALES PEDIATRICOS.
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO, D.F. (H.I.M.) Y
HOSPITAL DEL NIÑO POBLANO, PUEBLA (H.N.P.)**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Diagnóstico de la infección por Rotavirus en dos Hospitales Pediátricos.
Hospital Infantil de México, D.F. (H.I.M.) y el Hospital del Niño
Poblanco, Puebla (H.N.P.)
que presenta el pasante: Ramón Cuauhtémoc Palmerín Juárez
con número de cuenta: 9056976-2 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcallí, Edo. de Méx., a 23 de Septiembre de 1998

PRESIDENTE	M.V.Z. Gilberto Ochoa Uribe	
VOCAL	M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez	
SECRETARIO	Q.F.B. Ana Laura Vázquez Martínez	
PRIMER SUPLENTE	Q.B.P. Judith Martínez Zamitiz	
SEGUNDO SUPLENTE	en C. Sofia González Gallardo	

AGRADECIMIENTOS

A ti señor, que me has permitido tener una vida llena de satisfacciones, de aliscentes y de salud; te agradezco con todo mi amor.

*A mis padres, **Ramón y Reyna** les debo todo lo que hasta ahora he logrado, por su apoyo incondicional y respeto; espero darles mas y mejores satisfacciones que esta. Los amo Ramón.*

*A mis hermanos, **Patricia y Ricardo**, sin ustedes mis logros hubieran costado aún mas trabajo, gracias por su respaldo y comprensión.*

***Alejandra**, contigo he compartido momentos alegres y desafortunados de mi vida; no tengo palabras para decirte lo agradecido y enamorado que estoy de tí. Mil gracias.*

*A mis amigos, por su compañía y respaldo en las buenas y en las malas, **Lauro, Juan Carlos, Victor, Enrique, Jesús, Antonio, Javier, Homero.***

*A mis compañeros, con quienes compartí momentos inmejorables, **Daniel, Israel, Gerardo, Ernesto, Victor, Antonio y Fernando**, les agradezco su amistad.*

A la FESC y a mis profesores, quienes me guiaron durante mi formación profesional.

*Al laboratorio de Rotavirus por su apoyo y amistad para la realización de este trabajo; **Herlinda, Elvira, Benita, Araceli, Lizbeth, Phatima, Ernesto, Martin, Donjhonson y Angel.** Gracias.*

*Hoy tenemos que dar las gracias.
Gracias a quien nos permite seguir.
Disfrutar de un nuevo día.
Gracias por la alegría y la tristeza.
El optimismo y el pesimismo.
Por que podemos estar contentos o enojados.
Por el poder de discernir y de elegir.
Por que en nosotros consiste y sólo en nosotros.
Encontrar los aliseientes.
Ser felices debe ser nuestra meta.
Y luchar contra quienes se opongan.
Para un seño adusto una sonrisa.
Quitar la careta y descubrir la verdadera cara de la
gente.
Enseñar a quien no sepa.
Que la felicidad es gratis.
Que no hay riqueza que valga.
Si es pobre de corazón.
Que la pobreza vive.
Mientras no nace el amor.
Gracias por la vida.
Y por lo que con ella venga.
Gracias a ti como te llames señor.
Que de cualquier forma eres el mismo.*

Hector Lama

INDICE

Resumen	
Glosario	1
1. Antecedentes	3
1.1 Introducción	3
1.2 Características Generales de los Rotavirus	6
1.2.1 Morfología y Genoma	6
1.3 Clasificación	10
1.4 Proteínas Virales	13
1.5 Patogénesis	16
1.6 Epidemiología	17
1.7 Diagnóstico	21
1.7.1 Microscopía Electrónica	21
1.7.2 Inmunomicroscopía Electrónica	22
1.7.3 Inmunoensayo Enzimático (ELISA)	23
1.7.4 Electroforesis	23
1.7.5 Aglutinación en Látex	24
1.7.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
1.8 Sintomatología Clínica	25
1.9 Inmunidad	27
1.10 Tratamiento y Prevención	28
2. Objetivos	30
2.1 Objetivo General	30
2.2 Objetivos Particulares	30
3. Justificación	31

4. Material y Métodos	32
4.1 Material	32
4.2 Material Biológico	33
4.3 Reactivos	33
4.4 Metodología	34
4.4.1 Rotaforesis	34
4.4.2 Diversidad de electroferotipos	38
5. Resultados	41
6. Análisis de Resultados	52
7. Conclusiones	57
8. Bibliografía	59

RESUMEN

En este estudio se analizaron muestras fecales procedentes de dos Hospitales pediátricos, el Hospital Infantil de México, D.F. (H.I.M.) y el Hospital del Niño Poblano, Puebla (H.N.P.) para el diagnóstico de la infección por Rotavirus humanos en el período de Diciembre de 1994 a Diciembre de 1995 en una población infantil menor de cinco años de edad que presentaron diarrea aguda.

Se analizaron un total de 258 muestras diarreicas enviadas de el H.I.M. de las cuales 153 (59%) fueron positivas a Rotavirus por la técnica de Rotaforesis. De las muestras positivas a Rotavirus se realizó un análisis de los patrones electroforéticos revelando que de 139 (91%) presentaron un perfil electroforético "largo" y solamente 14 (9%) mostraron un perfil electroforético "corto".

La infección por los Rotavirus se observó con mayor frecuencia en el sexo masculino (65%) que en el sexo femenino (35%) y el intervalo de edad más afectado fue el de 7 a 12 meses que correspondió al 38.56% de los casos totales, presentando vómito con un 83%, diarrea acuosa con un 87% y fiebre con un 57%.

Mientras que de el H.N.P. se analizaron un total de 333 muestras fecales de las cuales 131 (39%) resultaron ser positivas a Rotavirus por la técnica de Rotaforesis. De las muestras positivas a

Rotavirus también se realizó un análisis de los patrones electroforéticos revelando que 117 (89%) presentaron un perfil electroforético "largo" y solamente 14 (11%) mostraron un perfil electroforético "corto".

La infección por Rotavirus se observó con una mayor frecuencia en el sexo masculino (60%) que en el sexo femenino y el intervalo de edad más afectado fue el de 7 a 12 meses con un 34.35% de los casos totales, presentando vómito con un 78%, diarrea acuosa con un 87% y fiebre con un 63%.

Posteriormente a 100 muestras fecales positivas (50 del H.I.M. y 50 del H.N.P.) se les realiza el análisis de la diversidad de los patrones electroforéticos mediante la técnica de PAGE al 10%, donde se observó que el patrón electroforético que predominó en ambos hospitales fue el denominado E1 con un 58% en el Hospital Infantil de México y 64% en el Hospital del Niño Poblano.

GLOSARIO

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AgNO ₃	Nitrato de Plata
CsCl ₂	Cloruro de Cesio
°C	Grados Centigrados
D	Daltons
DNA	Acido Desoxiribonucleico
DIA	Diarrea Infecciosa Aguda
D.F.	Distrito Federal
dsRNA	Acido Ribonucleico de Doble Cadena
E.U.A.	Estados Unidos de América
EDTA	Acido Etilendiamino Tetracético
EGTA	Acido Guanidil Tetracético
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Inmunoensayo Enzimatico
H.I.M.	Hospital Infantil de México
H.N.P.	Hospital del Niño Poblano
hrs	Horas
IME	Inmunomicroscopía Electrónica
KDa	Kilodaltons
Kpb	Kilopares de Bases
ME	Microscopía Electrónica
min	Minutos

ml	Mililitros
μ l	Microlitros
nm	Nanómetros
NS	Proteína No-Estructural
NaOH	Hidroxido de Sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PM	Peso Molecular
pH	Potencial Hidrógeno
PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida
pg	Picogramos
RVH	Rotavirus Humano
RNA	Acido Ribonucléico
RT-PCR	Transcriptasa Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por Minuto
SA11	Rotavirus de Simio
TEMED	Tetrametilenendiamina
Temp.	Temperatura
VP	Proteína Viral

1. ANTECEDENTES

1.1 INTRODUCCION

Los Rotavirus humanos (RVH) se detectaron por primera vez en 1973 en Australia por Bishop y colaboradores mediante la técnica de microscopía electrónica (ME) a partir biopsias duodenales de niños con diarrea aguda.¹

Aunque los RVH fueron descubiertos en ese año, debería tomarse en consideración que en 1963, Adams y Kraft, utilizando la microscopía electrónica, describieron partículas del virus en intestino de ratón infante, las cuales son similares a las observadas por Bishop y colaboradores. También en ese mismo año, Malherbe y colaboradores reportaron el aislamiento de un virus de 70nm designado SA11 (Simian Agent). Por otra parte en 1969 Mebus y colaboradores demostraron la presencia de partículas de 70 nm en muestras diarréicas de cabras.¹

Posteriormente en 1974, Middleton y colaboradores reportaron la presencia de partículas virales que median aproximadamente de 65 a 75 nm de diámetro en biopsias duodenales de niños con diarrea infecciosa aguda (DIA). Estas partículas fueron llamadas "*Rotavirus*", nombre derivado del latín *Rota* que significa rueda, debido a que estos virus presentaban la apariencia de una rueda de bicicleta.^{1,3}

El conocimiento acerca de este virus ha aumentado enormemente ya que ha sido objeto de numerosos estudios

Bioquímicos, Clínicos y Epidemiológicos, donde se ha demostrado que es el principal agente etiológico viral de la DIA.³

La DIA es una enfermedad muy común que se presenta en forma endémica o epidémica y afecta a sujetos de todos los grupos de edad.³

Después de la vía respiratoria, la ruta fecal-oral es la segunda en importancia en la transmisión de agentes y es por ésta por la cual se transmiten las enteritis virales.^{1,6}

Los Rotavirus son los principales agentes virales productores de gastroenteritis aguda en niños menores de tres años en todo el mundo. Inicialmente, fueron agentes asociados con gastroenteritis en animales.

Desde la aparición de estos virus causantes de la gastroenteritis, se han desarrollado ensayos sensibles y específicos para la detección de antígenos, anticuerpos ó ácidos nucleicos virales. La aplicación de estos ensayos en estudios de Diagnóstico y Epidemiología, ha demostrado ampliamente la importancia que tienen estos virus como agentes productores de diarrea.²

Los Rotavirus producen del 35-65% de diarreas severas en infantes menores de 3 años de edad y son una de las principales causas de morbilidad humana en todo el mundo y de mortalidad infantil en los países en desarrollo de Asia, África y Latino América, donde estudios realizados han demostrado que hay de 5 a 10 millones de muertes anualmente.² En un estudio realizado en los EUA, 1 millón de infantes menores de los cinco años de edad presentaron una diarrea severa provocada por la infección de Rotavirus; del número de

infantes infectados se obtuvo como resultado que más de 20 000 infantes tuvieron que ser hospitalizados y registrándose 150 muertes anualmente. Por otra parte, datos estimativos en países en desarrollo, reportan alrededor de 18 millones de casos de diarrea severa, o moderada de los cuales presentan más de 870 000 muertes anuales en infantes menores de los 5 años de edad.^{2,8}

Los Rotavirus del grupo A son los principales agentes productores de diarrea, a los que siguen en importancia los Adenovirus entéricos, responsables de 7% al 17% de los casos de diarrea infantil.

También producen gastroenteritis los Astrovirus, los Calicivirus, los Rotavirus no pertenecientes al grupo A y otros virus pequeños de estructura esférica, cuyo prototipo es el virus de Norwalk.^{1,3,4}

El Instituto de Recursos Mundiales calculó que entre 1988-1989 la mortalidad infantil en los países subdesarrollados fue de 14 millones de casos. De éstos, la diarrea infecciosa aguda causó 5 millones de muertes, lo que corresponde al 35.7% de todas las defunciones.³

La organización Mundial de la Salud reveló que en México en el año de 1989, hubo 34 764 000 casos de diarrea infecciosa aguda en la población infantil de cinco años de edad o menores. Dicha población se calculaba en ese año es 11 588 000 sujetos, lo que indica que cada niño presentó 3 casos de diarrea infecciosa aguda por año en promedio.¹⁰

Además de la gran importancia y magnitud de la mortalidad infantil por diarrea infecciosa aguda, existe la secuela de la desnutrición en los niños de esos países. Por lo tanto la diarrea

infecciosa aguda también disminuye la salud y por ende la esperanza de vida de los habitantes de los países subdesarrollados y en desarrollo.^{5,10}

1.2 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS ROTAVIRUS

1.2.1 MORFOLOGIA Y GENOMA

Al microscopio electrónico estas partículas virales presentan una morfología icosaédrica. La partícula viral completa mide 70nm de diámetro, como se muestra en la figura 1.⁷

En el interior de la partícula viral se encuentra el genoma, el cual está constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), cubiertos por una doble cápside proteíca: a) una cápside externa que está constituida por dos proteínas que son VP7 con un peso molecular de 37 kDa y VP4 con un peso molecular de 66 kDa, responsables de la adsorción y penetración del virus a su célula huésped. Ambas proteínas están relacionadas con la producción de anticuerpos de neutralización y especificidad de serotipo. b) una cápside interna que está constituida por una proteína que es VP6 donde residen principalmente los determinantes antigénicos de grupo y subgrupo, su peso molecular es de 38 kDa.^{1,6,9,16} Cuando pierde la cápside externa la partícula mide 55nm de diámetro; cuando pierde la cápside interna mide 37nm de diámetro quedando solamente el centro que encierra al genoma viral.¹³

El RNA genómico viral puede aislarse y purificarse de las partículas virales y fraccionarse por electroforesis en geles de poliacrilamida, observándose las 11 bandas de RNA características del virus.^{15,16,20} El patrón electroforético del genoma comprende de cuatro segmentos dsRNA de alto peso molecular (segmentos 1-4, con un PM de 2.3 a 3.3 kpb), cinco segmentos de mediano peso molecular (segmentos 5-9, con un PM de 1 a 1.5 kpb), y dos segmentos de menor peso molecular (segmentos 10 y 11, con un PM de 0.6 a 0.7 kpb). El peso molecular estimado de los 11 segmentos es 11×10^6 a 14×10^6 Daltons. Cada segmento de RNA codifica cuando menos para una proteína.^{9,15} Figura 1.1

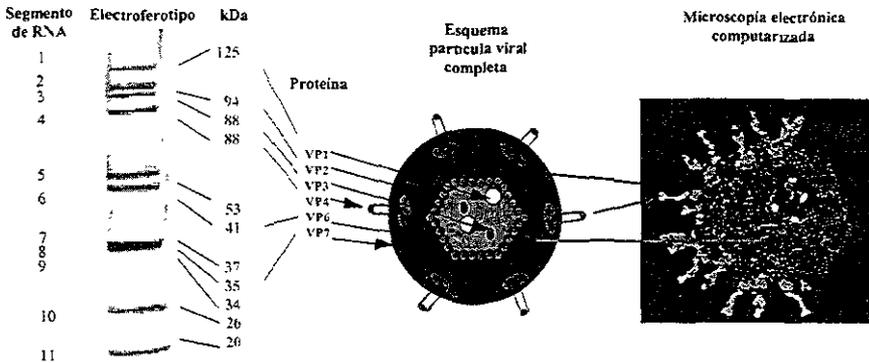


Figura 1.1 Representación de los 11 segmentos de RNA

Los Rotavirus no tienen envoltura lipídica y poseen propiedad hemaglutinante, la cual puede perderse, junto con la capacidad

infectante, por congelamiento y descongelamiento de las partículas virales.^{6,11}

Los Rotavirus morfológicamente se parecen a los Reovirus y los Orbivirus, pero se diferencian debido a que los Reovirus y Orbivirus contienen solamente 10 segmentos de RNA y antigénicamente los Rotavirus son distintos por fijación de complemento e Inmunomicroscopía electrónica.^{1,11}

El cultivo del virus in vitro es facilitado con un tratamiento con enzimas proteolíticas, el cual aumenta la infectividad al dividir un dímero de la cápside externa VP4. La infectividad puede perderse si el virus es tratado con agentes quelantes como es el EDTA y EGTA, debido a que este tipo de agentes quelantes remueven la cápside externa y por lo tanto pierde infectividad.^{12,14}

La infectividad del Rotavirus es resistente a la extracción con fluorocarbono y expuesto a éter, cloroformo o deoxicolato. Tratamiento con cloroformo reduce la infectividad y destruye la actividad hemaglutinante. El sodio dodecil sulfato al 0.1% inactiva la infectividad, pero expuesto a detergentes no iónicos puede aumentar la infectividad.^{14,18}

La infectividad es estable a pH de 3 a 9 en menos de 15 min. Los Rotavirus humanos y bovinos retienen la infectividad por meses a 4°C, pero la actividad hemaglutinante es perdida rápidamente a 45°C.^{18,21}

La infectividad del virus puede ser inactivada por desinfectantes como los fenoles, formalina, cloruro y beta-propiolactona. El etanol al

95% es el desinfectante más efectivo, ejerce estos efectos removiendo la cápside externa.²¹

Después de 5 minutos de incubación a 50°C la cepa SA11 (rotavirus de simio) pierde el 80% de infectividad y después de 30 minutos el 99%. La incubación con tripsina incrementa la infectividad de SA11 y es necesario para la infección de Rotavirus humano en cultivo celular.^{12,22}

Existe un incremento en la infectividad viral utilizando enzimas proteolíticas como la tripsina, pancreatina o elastina; a pH de 3 a 9. Debajo de pH 3.0 o por encima de pH 9, la cápside externa de Rotavirus humano se remueve pero la partícula no se desintegra. Si los Rotavirus se exponen a un buffer ácido (pH de 2.0) o a un ácido estomacal (pH de 1.8 ó 2.1), estos son rápidamente inactivados.^{12,14,18}

La cápside externa y la cápside interna pueden ser separadas por centrifugación en gradientes de CsCl₂, donde las partículas tienen distintas densidades y valores de sedimentación. La cápside externa tiene una densidad de 1.38g\cm³ en CsCl₂ y un coeficiente de sedimentación de 520-530 S en; mientras que la cápside interna tiene una densidad de 1.36g\cm en CsCl₂ y un coeficiente de sedimentación de 380-400 S y el centro de la partícula tiene una densidad de 1.44g\cm³ en CsCl₂ y un coeficiente de sedimentación de 280 S.¹⁷

1.3 CLASIFICACION

Los Rotavirus son clasificados dentro de la familia Reoviridae; otros géneros que integran esta familia son: Reovirus, Orbivirus, Phytoreovirus y Fijivirus.

Los Rotavirus han sido clasificados en grupos, subgrupos, serotipos y electroferotipos.⁸

Los Rotavirus se han clasificado en grupos representados por las letras del alfabeto de la A a la G, con base en las características antigénicas presentes en la VP6. Los grupos de la A a la C se han encontrado en humanos y en animales, mientras que los grupos de la D a la G han sido encontrados únicamente en animales. El grupo A es el que se ha asociado comúnmente a la DIA (95%), tanto en niños como en animales. El grupo B ha sido asociado con epidemias de diarrea severa en adultos en China. El grupo C ha sido esporádicamente reportado como causante de diarrea en niños.^{1,8}

Para clasificar a los Rotavirus del grupo A en subgrupos, se utilizan en la actualidad anticuerpos monoclonales que detectan el determinante antigénico que se encuentra en la proteína VP6. Son reconocidos hasta ahora dos subgrupos de Rotavirus. Diversos autores mencionan que algunas cepas de Rotavirus no reaccionan con los monoclonales o que reaccionan para las dos. Este hallazgo puede sugerir la presencia de más de dos subgrupos como ha sido mencionado por Zisis desde 1980.^{1,17} Los subgrupos caracterizados hasta ahora son llamados I y II.

La clasificación en serotipos de Rotavirus esta basada en los determinantes antigénicos presentes en la VP7 y VP4. La presencia de más de un serotipo, fue sugerida desde 1978. En 1983 y 1984 se demostró la existencia de 4 serotipos (numerados con los cuatro primeros números arábigos), pero actualmente se mencionan 10 nuevos serotipos aislados en humanos y en animales.^{15,17}

Los serotipos de Rotavirus aislados de humanos, hasta el momento son nueve: (serotipos del 1-4, 8,9, 12-14) y los serotipos aislados de animales son cinco: (serotipo 5, 6, 7, 10, 11).^{5,17}

Aunque el serotipo y el subgrupo son definidos por proteínas codificadas por distintos genes, y por lo tanto pueden segregarse independientemente, se encuentran reportes en la literatura que indica una relación entre el subgrupo I y los serotipos 2 y 8 y el subgrupo II con los serotipos 1, 3, 4 y 9.^{19,23,25}

Una manera de clasificar a las cepas de Rotavirus es por la migración de sus segmentos de RNA en un gel de poliacrilamida por medio de una electroforesis, de aquí se ha definido dos tipos principales de electroferotipos: patrón corto y patrón largo.²⁶ La diferencia entre un patrón electroforético "largo" y un "corto", es de que el patrón "corto" los segmentos 10 y 11 del RNA poseen un peso molecular más grande que los segmentos 10 y 11 del patrón "largo" y migran a una menor distancia.²⁴

Podemos mencionar que casi todos los Rotavirus del grupo A, de patrón electroforético "corto" pertenecen al subgrupo I, y los de patrón "largo" pertenecen al subgrupo II. Sin embargo se ha reportado

casos de Rotavirus con serotipo 2 que pertenecen al subgrupo II pero con patrón electroforético “corto”.⁶

Se ha reportado la presencia de patrones electroforéticos super “cortos” donde los segmentos 10 y 11 presentan pesos moleculares distintos a los patrones “cortos” y una migración más corta de lo usual, así como también cepas con patrón electroforético super “largo” con una migración mayor a los “largos”.²⁴

En resumen podemos mencionar que existen 6 grupos de Rotavirus, denominados por letras de la A a la G, que los Rotavirus del grupo A se dividen en subgrupos I y II, donde el electroferotipo de patrón “corto” esta relacionado con el subgrupo I y los serotipos 2 y 8, mientras que el electroferotipo de patrón “largo” esta relacionado con el subgrupo II y los serotipos 1,3,4 y 9.^{1,15,27}

Estudios en Rotavirus humanos y animales revelaron que:

- a) cepas de serotipo 1, 2, 8 y 9 pertenecen solamente a humanos;
- b) cepas de serotipo 4 incluye humanos y cerdos;
- c) cepas de serotipo 3 incluye humanos, monos, perros, gatos, caballos, cerdos, ratones y conejos;
- d) cepas de serotipo 5 incluye a caballos y cerdos, mientras que cepas de serotipo 6 y 7 incluye solamente a cabras y pájaros.³⁰

Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de los Rotavirus

GRUPO	SUBGRUPO	SEROTIPO	PATRON ELECTROFORETICO	ESPECIE HOSPEDERA
A	II	G1, G4, G9	LARGO	HUMANO
	I	G2	CORTO	HUMANO
	II	G3	LARGO	HUMANO
	I	G3	LARGO	ANIMAL
	I	G6	LARGO	BOVINO
	I	G10	LARGO	BOVINO
	I	G5	LARGO	PORCINO, EQUINO
	I	G11	LARGO	PORCINO
	NO DETERMINADO	G7	LARGO	AVES

1.4 PROTEINAS VIRALES

Los segmentos de RNA del genoma viral codifican para: a) proteínas estructurales, las cuales forman parte de las partículas virales. b) proteínas no estructurales, estas sólo se presentan en células infectadas. Seis de los segmentos del genoma codifican para proteínas estructurales y los otros cinco segmentos codifican para las proteínas no estructurales.^{6,7}

La nomenclatura para las proteínas estructurales es VP seguido por un número de acuerdo a su peso molecular por ejemplo VP1 tiene

un peso molecular de 125 Kd y VP7 tiene un peso molecular de 37Kd.²⁸

Las proteínas estructurales son seis, denominadas VP7, VP4, VP6, VP3, VP2 y VP1.

VP7 es una proteína glicosilada y es codificada por los segmentos 7, 8 ó 9 dependiendo de la cepa viral; se encuentra en el exterior de la partícula viral y es la segunda proteína más abundante del virión, induce anticuerpos neutralizantes que definen el serotipo de las cepas virales. VP7 es responsable de la unión del virus a la célula hospedera y tiene un peso molecular de 37Kd.^{29,32} VP4 es codificada por el segmento 4 del genoma viral, se conoce como la hemaglutinina y es cortada en el intestino por la acción de la tripsina en VP5 y VP8 resultando un aumento en la infectividad viral y penetración del virus a las células. VP4 induce anticuerpos neutralizantes. Su peso molecular es de 88Kd. Esta propiedad de VP4 tiene una gran importancia en la Biología de los Rotavirus.^{31,33,36}

VP6 es codificada por el segmento 6 del genoma viral y es la más abundante en la cápside interna. Su peso molecular es de 38Kd, contiene el antígeno de grupo común de grupo A y los de subgrupo. Tiene un papel muy importante en la estructura de la partícula viral, ya que mantiene la conformación y organización del centro. Es la proteína que más frecuentemente se utiliza para el diagnóstico de los Rotavirus ya que posee el determinante antigénico común presente en todos los Rotavirus del grupo A.^{17,34}

VP3 es codificada por el segmento 3 del genoma viral, su peso molecular es de 98Kd y funciona como una guanidiltransferasa.³⁴

VP2 es codificada por el segmento 2 del genoma viral, su peso molecular es de 102Kd. Su función es la de reclutar al RNA de doble cadena para el ensamblaje viral, por lo que juega un papel importante en la morfogénesis viral.^{17,34}

VP1 es codificada por el segmento 1 del genoma viral, su peso molecular es de 125Kd. VP1 presenta cierto grado de homología con algunas enzimas como las RNA polimerasas virales por lo que se supone que la VP1 puede ser la RNA polimerasa.^{15,34}

Las proteínas no estructurales son cinco, denominadas NS53, NS35, NS34, NS28 y NS26.

NS53 es un producto del segmento 5 del genoma viral. Esta proteína es detectada en células infectadas pero no en la partícula del virus. La cinética en la síntesis del polipeptido en células infectadas muestran que NS53 es detectable predominantemente después de la infección; la síntesis de esta proteína es aparentemente controlada por que los niveles son bajos en relación a las otras proteínas existentes. Sin embargo, no se conoce el mecanismo que regula la síntesis de esta proteína en las células infectadas.³⁷

NS35 es codificada por el segmento 7, 8 ó 9 del genoma viral dependiendo de la cepa del virus. Esta se encuentra en lisados de células infectadas, parece ser poco inmunogénica.³⁵

NS34 es codificada por el segmento 7 del genoma viral. Es una proteína ácida, ha sido detectada en los ácidos nucleicos previamente marcados (RNA ó DNA) por Western blot. También ha sido encontrada en lisados de células infectadas y contiene actividad de replicasa asociada con la NS53 in vitro.³⁸

NS28 es codificada por el segmento 10 del genoma viral. Su peso molecular es de 20Kd y está glicosilada. Esta proteína se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico con un fragmento que sobresale al citoplasma, en el cual se fijan las partículas subvirales para que al ser internalizadas continúen la morfogénesis de las partículas virales.³⁹

NS26 es codificada por el segmento 11 del genoma viral. Su peso molecular es de 26Kd. Esta proteína fue catalogada como una proteína estructural, ya que en una electroforesis se movía con las proteínas estructurales de bajo peso.³⁷

La gran mayoría de investigaciones han demostrado la función que realizan las proteínas estructurales. Sin embargo, la información acerca de las proteínas no estructurales (NS) es limitada. Como en otros virus, es posible que estas proteínas juegan un papel importante en la replicación viral.^{37,39}

1.5 PATOGENESIS

Los Rotavirus son transmitidos por la vía fecal-oral. El agua y los alimentos contaminados también son una fuente de infección. Se ha detectado antígeno de Rotavirus en secreciones respiratorias de niños con neumonía y se han aislado de la orofaringe de niños con problemas de vías respiratoria alta, antes de iniciar el cuadro diarreico, lo que hace suponer la posibilidad de transmisión por medio de partículas en aerosoles y esto explicaría en parte el aumento de la

diarrea infecciosa aguda causada por Rotavirus en los meses fríos, semejante a las infecciones respiratorias.^{15,17}

El periodo de incubación de la infección por Rotavirus es de 24 a 72 horas, presentándose en un inicio vómito abrupto como síntoma principal acompañado de diarrea acuosa, la cual persiste por 5 a 8 días y la mayoría de los pacientes presentan fiebre.^{6,17}

En humanos se excretan alrededor de 10^{10} partículas virales por gramo de heces y aunque la dosis infecciosa no ha sido determinada, por datos obtenidos en estudios realizados en animales se reporta que en cantidades mínimas de heces hay suficiente cantidad de virus para transmitir la infección.^{1,5}

En estudios realizados de biopsias en mucosa de infantes hospitalizados por infección con Rotavirus, se han identificado las siguientes lesiones: acortamiento y atrofia en las vellosidades intestinales, desprendimiento prematuro e infiltración de células mononucleares en lámina propia, distensión de las cisternas del retículo endoplásmico, hinchazón o aumento mitocondrial.^{13,50}

1.6 EPIDEMIOLOGIA

Los Rotavirus han sido detectados en más del 50% de los lactantes hospitalizados por diarrea infecciosa aguda, durante los meses de otoño e invierno en los países de clima templado, y este aumento de frecuencia disminuye notablemente en las otras estaciones del año. En los países donde el clima es subtropical o

tropical las infecciones ocurren durante todo el año o presentan una distribución irregular.⁴³

La frecuencia de diarrea infecciosa aguda causada por Rotavirus, varía de región a región y de país a país, como se puede observar en el cuadro siguiente.³ Cuadro 2

Cuadro 2.-Frecuencia de la infección por rotavirus en diferentes países.³

PAIS	PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
Finlandia	49 %
Inglaterra	44.5 %
Australia	42 %
Costa Rica	34.5 %
Bangladesh	32.1 %
EEUU	32 %
Japón	31 %
Thailandia	29 %
Trinidad-Tobago	23.3 %
Calcuta India	22 %
Chile	21.1 %
Africa	13.8 %
Brasil	10.8 %

En México la frecuencia de aislamiento de los Rotavirus también varía de un estado de la República a otro como se observa en el cuadro siguiente.^{10,40}

Cuadro 3.- Frecuencia de la infección por rotavirus en diferentes entidades del país.¹⁰

ESTADO	PORCENTAJE
Yucatán	32 %
Distrito Federal	25 %
Puebla	22 %
Guerrero	22.6 %
San Luis Potosí	13.8 %
Veracruz	10.1 %

Los estudios que se han realizado en países desarrollados y en desarrollo los Rotavirus son los agentes etiológicos más frecuentes causantes de gastroenteritis en infantes menores de 2 años de edad en todo el mundo. Aunque la gastroenteritis se presenta con alta frecuencia en los países desarrollados, la enfermedad tiene una baja mortalidad en esos países. Anualmente en los Estados Unidos en el grupo de 1 a 4 años de edad se estima 1 millón de casos de diarrea severa y 150 muertes. La alta morbilidad pero baja mortalidad se puede atribuir al efectivo remplazamiento de los fluidos y electrolitos perdidos durante la infección. Por otra parte, en un análisis realizado en infantes menores de 5 años de edad en países subdesarrollados se estimó que de los 125 millones de casos analizados, cerca de 18 millones de estos fueron considerados severos y 873 000 infantes de 1-4 años de edad mueren cada año a causa de los Rotavirus.^{2,5,41}

En un estudio realizado durante un periodo de 8 años (enero 1974 - julio 1982), el 34.5% de 1537 infantes admitidos en un hospital en Washington D.C. fueron positivos a la infección por Rotavirus. Por otra parte en dos estudios similares, uno en Australia y otro en el Reino Unido, el 52% de los infantes con diarrea presentaron infección por este agente.¹⁵

En un estudio que incluye 6 352 pacientes tratados en el Centro Médico en Bangladesh en un período de un año, Rotavirus fue el patógeno más frecuentemente detectado en niños menores de 2 años de edad, con el 46% de infección. El siguiente agente mas importante fue *Escherichia coli* con un 28%. Por arriba de los dos años edad los agentes bacteriales fueron más frecuentes que Rotavirus.⁴⁴

En un análisis realizado en un hospital en Cairo, Egipto, se demostró que de 145 infantes menores de 18 meses de edad con diarrea infecciosa aguda, el 34% se debió a la infección por rotavirus.

En un estudio realizado en Brasil durante un periodo de 30 meses se reportó una mortalidad del 14% en niños durante los primeros 5 años de vida; siendo los principales patógenos involucrados *Escherichia coli* Enterotoxigénica y Rotavirus, con un 21% y 19% respectivamente.⁸

Diversos trabajos realizados a nivel mundial revelan que el serotipo 1 se encuentra con mayor frecuencia, sin embargo, en un estudio realizado en Mérida, Yucatán, México, se encontró con más frecuencia el serotipo 4.⁴⁰

En Australia, se reportó durante un periodo de 11 años, al serotipo 1 con mayor frecuencia en infantes hospitalizados con

gastroenteritis. Una distribución similar de serotipos 1 predominó en países como Venezuela, Italia y La República Central Africana.¹⁹

1.7 DIAGNOSTICO

Las manifestaciones clínicas por sí mismas no son suficientes para llegar a un diagnóstico etiológico de la diarrea infecciosa aguda por Rotavirus, ya que estas son semejantes a las presentadas por las infecciones bacterianas. El diagnóstico requiere la detección del virus.²⁶

Actualmente se utilizan las siguientes técnicas para el diagnóstico de los Rotavirus:

Microscopía Electrónica (ME)

Inmunomicroscopía Electrónica (IME)

Inmunoensayo Enzimático (ELISA)

Electroforesis del RNA viral en geles de poliacrilamida
(ROTAFORESIS)

Aglutinación en Látex

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

1.7.1 Microscopía Electrónica: Inicialmente, la visualización directa de material por microscopía electrónica se utilizó para la detección de Rotavirus. Esta tiene la ventaja de presentar una alta especificidad, rapidez y eficiencia. En general es de utilidad en casos en que no se tenga un alto número de muestras, y nos permite diagnosticar brotes en tiempos muy cortos. La eficiencia de la ME se

basa en que se encuentran de 10^7 a 10^9 partículas virales por ml de heces, lo que implica gran facilidad para la observación microscópica. Además, la morfología de este virus es muy característica y no se puede presentar confusión con otros agentes y además de que se pueden detectar otros virus simultáneamente. La microscopía electrónica continua siendo muy importante en el diagnóstico de enfermedades causadas por rotavirus y se utiliza frecuentemente cuando existen discrepancias con otras técnicas.^{1,15,42}

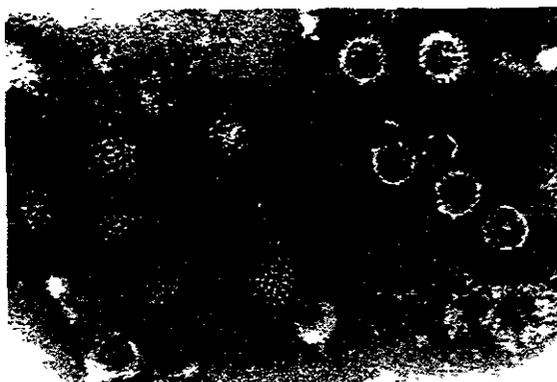


Figura 1.2 Microscopía electrónica

1.7.2 Inmunomicroscopía Electrónica: Es una variante del método anterior pero con el uso de anticuerpos que inducen la aglutinación de partículas virales. Se utiliza cuando se desea tipificar a los Rotavirus pero es indispensable disponer de los anticuerpos monoclonales específicos correspondientes para que pueden diferenciarse grupos, subgrupos y serotipos.^{1,15}

1.7.3 Inmunoensayo Enzimático (ELISA): Se basa en la detección de antígeno viral específico empleando inmunoensayos. Es la técnica más utilizada en el diagnóstico clínico, ya que es fácil de realizar, reporta buena sensibilidad y especificidad; se puede individualizar o procesar gran cantidad de muestras y en la actualidad es económica.⁴⁵

Comercialmente se encuentran disponibles los ELISA para detectar los Rotavirus del grupo A. De acceso experimental puede conseguirse ELISA que permita identificar los subgrupos (I o II) y los serotipos, estos emplean anticuerpos monoclonales y se usan casi exclusivamente en estudios específicos epidemiológicos o de control de poblaciones vacunadas.^{10,47}

1.7.4 Electroforesis de RNA viral en geles de poliacrilamida (ROTAFORESIS): Esta metodología se basa en la detección directa del RNA viral a partir de materia fecal; la cual es depositada en un gel de poliacrilamida y después de someterla al paso de corriente y posterior tinción con nitrato de plata se visualiza un patrón electroforético de 11 segmentos de RNA característico del genoma de los Rotavirus.^{9,20,26}

El patrón de migración depende de la cepa, por lo tanto existen variaciones ligeras entre cada muestra analizada, pero se presentan dos patrones generales definidos por la mayor o menor migración de los segmentos 10 y 11 de RNA denominados "cortos" y "largos". Existe un ensayo, desarrollado en México por el Dr. Emilio Espejo y colaboradores que permite realizar esta técnica en laboratorios con un

mínimo de equipamiento especial; esta técnica se ha llamado ROTAFORESIS.^{1,17}

1.7.5 Aglutinación en Látex: Es una prueba cualitativa para la detección directa de antígeno de Rotavirus en muestras fecales humanas, esto permite la detección de los Rotavirus del grupo A en un tiempo de 10 minutos. En este procedimiento se aplica el principio de aglutinación en látex, estas partículas son mezcladas con una suspensión fecal contiene antígeno de Rotavirus ocurre una reacción de aglutinación macroscópicamente visible.^{1,15}

1.7.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa: Se basa en la amplificación del material genético, DNA, para su posterior análisis y se ha convertido en una herramienta indispensable tanto en la investigación básica como en el diagnóstico.⁴⁶

La técnica de PCR ha tenido un impacto muy grande en el diagnóstico y tipificación debido a que tiene gran sensibilidad (puede detectar hasta 2pg de RNA viral), además de que permite tener resultados en unas cuantas horas.

La tipificación de Rotavirus se realiza mediante una RT-PCR (transcripción reversa de RNA a cDNA) a partir de materia fecal realizando una extracción de RNA viral y utilizando oligonucleótidos específicos para grupo (A, B y C) y para serotipo (1-4, 8 y 9) del segmento 9 (ó segmento 8) que codifica para VP7.^{46,49}

1.8 SINTOMATOLOGIA CLINICA

Los aspectos clínicos de la infección por Rotavirus varían según las condiciones nutricionales y la edad de los pacientes. El periodo de incubación es corto, de 24 a 72 horas y la eliminación de partículas virales se produce de uno a siete días después de la infección, sin embargo, se han reportado casos donde la eliminación de estas se prolonga hasta 13 días después de finalizar el cuadro clínico.⁴⁸

La enfermedad se inicia con un brusco ataque de diarrea que puede o no asociarse con vómito e hipertermia. Algunos estudios realizados en pacientes hospitalizados reportan que el vómito es un hallazgo constante e inclusive puede ser el primer síntoma en aparecer. Aproximadamente entre el 80% al 90% de los pacientes presentan vómito y fiebre no mayor de 39°C.^{1,48}

Las heces son acuosas, por lo común no contienen sangre o leucocitos. El periodo de la enfermedad es de tres a nueve días. La complicación clínica más frecuente es la deshidratación, que cuando no es tratada a tiempo puede ocasionar la muerte. También ocurren infecciones por Rotavirus en los adultos pero por lo general es asintomática y cuando se presentan datos clínicos, éstos son leves.¹⁰

La infección por Rotavirus produce un espectro de respuestas que varía de infección subclínica, ligera diarrea, a una severa y ocasional fatal deshidratación.^{10,50}

Los niños menores de tres meses y los adultos se infectan, pero frecuentemente esas infecciones son asintomáticas o muy leves. Los síntomas más graves se presentan en niños de 6 a 24 meses,

presentándose en forma más leve conforme el niño aumenta de edad.⁵⁰

Este cambio en patogenicidad, puede deberse a la presencia de anticuerpos formados contra diferentes serotipos y que proporcionan protección cruzada, así como el hecho de que a mayor edad del paciente, las células epiteliales intestinales están más maduras.

La desnutrición juega un papel muy importante para incrementar la severidad de las manifestaciones clínicas en humanos durante la infección de Rotavirus.^{1,15,17}

En un estudio en infantes en el Hospital National Medical Center de Washington, D.C., se realizó una comparación entre 78 pacientes hospitalizados con Rotavirus y 72 pacientes hospitalizados con una diarrea que puede no ser asociado con Rotavirus. La mayoría de ambos pacientes presentaron una temperatura de aproximadamente 38°C. El grupo de pacientes infectados con Rotavirus presentó mayor frecuencia en síntomas como vómito y deshidratación en comparación con el otro grupo. La duración de vómito fue más largo en RV positivo que en el RV negativo (2.6 días y 0.9 días respectivamente). En diarrea (5 días y 2.6 días respectivamente). Estos estudios revelan la alta frecuencia de vómito y deshidratación asociada con enfermedad rotaviral.^{2,6}

1.9 INMUNIDAD

La infección por Rotavirus induce una respuesta inmune homotípica y heterotípica que se asocia a protección cruzada. Se ha demostrado que las infecciones neonatales por Rotavirus no confieren inmunidad contra reinfecciones con otras cepas, pero si protegen contra el desarrollo de diarrea severa. Existe información que indica que la protección contra la diarrea está mediada principalmente por anticuerpos neutralizantes presentes en el lumen del intestino y que los anticuerpos séricos tienen poca influencia.⁵⁰

Posiblemente, un alto nivel de anticuerpos contra Rotavirus adquiridos transplacentariamente pueden ser responsables de la relativa resistencia a la enfermedad durante la infección neonatal, sin embargo, debe de ser totalmente comprobado.¹⁷

La infección de Rotavirus en neonatos no permite que se presente una protección en una reinfección, pero esta induce una parcial resistencia a la enfermedad durante la reinfección. Estos hallazgos son de importancia para el desarrollo de una inmunoprolifaxis efectiva para la enfermedad por estos agentes.⁵⁰

En dos estudios realizados con neonatos quienes fueron alimentados de leche materna y otros fueron alimentados de leche de fórmula, se observó que los neonatos alimentados de leche materna presentaron una parcial resistencia a la infección por los Rotavirus durante la infancia en comparación a los que fueron alimentados con leche de fórmula. También se observó que los neonatos quienes fueron alimentados de leche materna liberaron menor cantidad del

virus que los neonatos quienes fueron alimentados con leche de formula.¹³

1.10 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

No hay tratamientos específicos para las gastroenteritis virales, aunque la identificación de los virus involucrados, que puede realizarse rápidamente, evita el tratamiento antibacteriano con antibióticos, el cultivo bacteriológico que puede tomar de dos a tres días o los exámenes coproparasitológicos y pueden establecerse medidas de control adecuadas para evitar su transmisión.¹⁷

La forma de tratar a la diarrea infecciosa aguda por Rotavirus es reemplazando líquidos y electrolitos por vía oral y en caso de intolerancia oral la vía de administración debe ser intravenosa. Se debe de continuar con la alimentación en forma normal y no indicar el ayuno.

En la terapia de la rehidratación oral para la gastroenteritis las soluciones que se utilizan contienen glucosa o sacarosa. La sacarosa puede ser empleada como sustituto de la glucosa pero sigue siendo preferible la glucosa.^{3,26}

Para disminuir la morbilidad de la diarrea infecciosa aguda causada por patógenos intestinales, se debe de brindar una infraestructura adecuada para una mayor higiene de la comunidad como son: agua potable, eliminación adecuada de las excretas y sobre todo una buena higiene personal. Sin embargo, esta utopía es más difícil de lograr que una vacuna y es por esta razón que en los

últimos años se han realizado varios estudios de campo evaluando la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de varias vacunas orales para la prevención de la diarrea por Rotavirus.³

El propósito de una vacuna para los Rotavirus debería ser la de prevenir la gastroenteritis severa durante los primeros dos años de vida de los infantes siendo el periodo más crítico de la enfermedad. Evidencias considerables de estudios en animales indican que la inmunidad local intestinal juega el papel importante en resistencia a la infección por Rotavirus. Estas observaciones sugieren que para que sea efectiva la vacuna, depende de gran manera, la capacidad de la misma para estimular anticuerpos intestinales de tipo IgA y otras formas de inmunidad local.⁵¹

A la fecha se han desarrollado vacunas con cepas animales de rotavirus atenuados tales como la NCDV (RIT4237) y WC3 de bovinos, y la cepa RRV de mono rhesus. Estas vacunas han sido efectivas en algunas ocasiones pero en otras han resultado moderadamente efectivas. Esta variabilidad puede deberse a que las vacunas son monovalentes y no protegen contra los 4 serotipos epidemiológicamente más importantes. Por lo tanto, se ha desarrollado una modificación a estas vacunas incorporando el gen que codifica para la cápside externa VP7 de cepas humanas por medio de ingeniería genética. Estas vacunas están siendo actualmente evaluadas en diferentes localidades.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Análisis de la infección por Rotavirus en niños con gastroenteritis aguda de dos hospitales pediátricos (Hospital Infantil de México, D.F. y Hospital del Niño Poblano, Puebla).

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Diagnóstico de Rotavirus por la técnica de Rotaforesis en niños con gastroenteritis aguda de dos hospitales pediátricos.
- Análisis de los electroferotipos que se presentan con mayor frecuencia en las muestras positivas a Rotavirus.
- Analizar la diversidad de los electroferotipos.
- Correlacionar la infección por Rotavirus y algunas características clínicas.

3. JUSTIFICACION

La gastroenteritis provocada por rotavirus es una enfermedad muy común que se presenta en forma endémica ó epidémica y afecta a sujetos de todos los grupos de edad, principalmente niños menores de 3 años. En los adultos frecuentemente la infección es asintomatica o se presenta levemente.

Acercas de la frecuencia real de la infección por agente en nuestro país se conoce muy poco, por lo que es de gran importancia realizar estudios encaminados a conocer el panorama epidemiológico que presentan los rotavirus.

En este trabajo se realizará el diagnóstico de la infección por rotavirus por la técnica de rotaforesis, la determinación de los patrones electroforéticos así como el análisis de la diversidad de electroferotipos que se encuentran en dos entidades de la República Mexicana (Hospital Infantil de México y Hospital del Niño Poblano).

La aplicación de técnicas tales como la Rotaforesis y PAGE al 10% son herramientas útiles en el laboratorio para el diagnóstico, determinando análisis de los patrones electroforéticos.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 MATERIAL

- Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- Aplicadores de madera.
- Pipetas Pasteur.
- Juegos de vidrios de 7.5 x 6.5 cm.
- Separadores de teflón.
- Pinzas.
- Peines de 9 pozos.
- Bulbos de hule.
- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 ml.
- Guantes desechables.
- Perillas reguladoras de tres salidas.
- Gradillas.
- Papel parafilm.
- Papel egapake.
- Placas de plástico de 96 pozos.
- Micropipetas de 100 μ l.
- Micropipetas multicanal de 200 μ l.
- Vasos de precipitado de 25, 50 y 100 ml.
- Puntas de 200 μ l.
- Ultracentrifuga clínica.
- Agitador vortex GENIE-2 VWR.

- Cámara vertical para electroforesis BIO-RAD.
- Cámara horizontal para electroforesis 20 x 10 cm.
- Fuente de poder de 200 V. BIO-RAD.
- Espectrofotometro.
- Estufa.
- Refrigerador.

4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Materia fecal (extracción del RNA viral positivo).

4.3 REACTIVOS

- Solución "A" 5X (Mercaptoetanol, SDS, EDTA, TRIS).
- Solución "B" (Fenol).
- Solución "C" 10X (Xilene cianol).
- Solución "D" 10X (Tris-base, glicina, agua destilada estéril).
- Solución "E" 10X (Etanol, Formaldehído).
- Solución "F" 100X (Nitrato de plata).
- Solución "G" 125X (Formaldehído, NaOH).
- Acido Acético Glacial al 0.1%.
- Bis-acrilamida.
- Persulfato de Amonio al 2%.
- Tetrametilenendiamina (TEMED).
- Solución de Tris (pH 8.8).
- Agarosa al 1%.

- Agua destilada estéril.

4.4 METODOLOGIA

4.4.1 ROTAFORESIS

En una técnica que se basa en la detección directa del RNA viral a partir de muestras de heces, sometidas a un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida y posteriormente teñidas con Nitrato de Plata.

La técnica consiste en los siguientes pasos:

A. Extracción del RNA viral.

A.1. Se coloca en un tubo eppendorf 200 μ l de materia fecal. (Si las heces son de consistencia sólida, se coloca 1gr de la muestra en 200 μ l de solución salina fisiológica y mezclar con vortex).

A.2. Se centrifuga a 5 000 rpm durante 15 minutos.

A.3. Se separa el sobrenadante y se coloca en un tubo hasta su utilización.

A.4. Colocar 200 μ l del sobrenadante y añadir 200 μ l de la solución "A".

A.5. Mezclar la solución anterior y agregar 200 μ l de la solución "B".

A.6. Mezclar, agregar 200 μ l de cloroformo y volver a mezclar en un agitador vortex.

A.7. Centrifugar a 7 500 rpm durante 15 minutos.

A.8. Se toma el sobrenadante pasandolo a otro tubo y almacenarlo a 4° C.

B. Preparación del gel de poliacrilamida al 5%.

B.1. Se lavan los dos vidrios con etanol y se secan perfectamente.

B.2. Colocar los separadores de teflón y el peine entre los vidrios.

B.3. Sellar con agarosa tres lados de los vidrios y colocar 1 pinza por cada lado de los vidrios que se sello.

B.4. En un vaso de precipitado de 50 ml colocar las siguientes soluciones: 1.32 ml de Bis-Acrilamida, 2 ml de solución de Tris a pH 8.8, 4.56 ml de agua destilada estéril, 480 μ l de Persulfato de Amonio al 2% y 10 μ l de TEMED.

B.5. Se mezcla suavemente y posteriormente se llena el espacio que hay entre los vidrios. (El llenado tiene que ser rápidamente por que se corre el riesgo de que se polimerize la solución antes de terminar de llenar el espacio).

B.6. Una vez polimerizada la solución se saca el peine de entre los vidrios y se procede a secar los pozos con un papel absorbente hasta que queden perfectamente secos, quedando listo el gel para poder colocar la muestra dentro de los pozos.

B.7. Posteriormente se funde la solución "C" en un horno de microondas o en baño de agua hirviente. Se adiciona una gota de la solución "C" a un tubo que contenga 80 μ l de la muestra problema.

B.8. Se coloca la muestra en los pozos del gel, una vez gelificado el gel y los pozos, se desprende el separador inferior quitando tambien las pinzas.

C. Corrimiento Electroforético.

C.1. Se coloca en la cámara de electroforesis 250 ml de la solución "D" y posteriormente el gel de tal manera que los pozos queden hacia el polo negativo de la cámara.

C.2. Se conectan los electrodos a la fuente de poder y esta se pone a 40 V aumentandola a 60 V; el corrimiento es de 2 hrs. aproximadamente hasta que todo el colorante haya salido del gel.

C.3. Se coloca un refrigerante debajo de la cámara de electroforesis para evitar que el gel pierda consistencia por el calentamiento del mismo corrimiento electroforético.

D. Tinción del Gel.

D.1. Se retira el gel de los vidrios y se hace un pequeño corte en la parte inferior del primer carril.

D.2. Se coloca el gel en la solución "E" durante 30 minutos.

D.3. Se retira la solución anterior y se adiciona la solución "F" durante 30 minutos.

D.4. Se retira la solución "F" y se hacen dos lavados rápidamente con agua destilada estéril.

D.5. Adicionar la solución "G" y agitar levemente hasta la observación de los segmentos ó bandas en el carril de la muestra del control positivo.

D.6. Retirar la solución "G" y detener la reacción con una solución de Ac. Acético Glacial al 1%. Durante toda la técnica se utilizan guantes desechables.

4.4.2 DETERMINACION DE LA DIVERSIDAD DE ELECTROFEROTIPOS

La diversidad de elctroferotipos se refiere a las diferencias que se presenta en la migración de los 11 segmentos de dsRNA de cepas virales con un mismo patrón electroforético.

La determinación de la diversidad se realizó mediante la técnica de PAGE al 10%, la cual presenta el mismo fundamento que la Rotaforesis solo que el corrimiento electroforético se realiza verticalmente en una cámara Mini Protean II de BIO-RAD durante 14 horas y con una concentración de poliacrilamida del 10%.

Procedimiento:

A.- Extracción del RNA viral.

Se utilizaron los mismos extractos obtenidos en la Rotaforesis.

B. Preparación del gel de poliacrilamida al 10%.

B.1. Se lavan los dos vidrios con etanol y se secan perfectamente.

B.2. Colocar los separadores de teflón y el peine entre los vidrios.

B.3. Montar los vidrios en el soporte de la cámara BIO-RAD procurando que quede perfectamente sellado para evitar que la solución de monómeros se derrame.

B.4. En un vaso de precipitado de 50 ml colocar las siguientes soluciones: 2.7 ml de Bis-Acrilamida, 2 ml de solución de Tris a pH 8.8, 3.2 ml de agua destilada estéril, 480 μ l de Persulfato de Amonio al 2% y 10 μ l de TEMED.

B.5. - B.7. Igual que en la Rotaforesis.

B.8. Se coloca la muestra en los pozos del gel, una vez gelificado el gel y los pozos se realiza el corrimiento electroforético.

C. Corrimiento Electroforético.

C.1. Se coloca en la cámara de BiO-RAD 750 ml de la solución "D" y posteriormente el gel en el soporte que contiene los electrodos.

C.2. Se conectan los electrodos a la fuente de poder aplicando una corriente de 100 V; el corrimiento es de 14 hrs. aproximadamente en refrigeración.

D. Tinción del Gel.

Se realiza de la misma manera que en la rotaforesis.

5. RESULTADOS

Se trabajaron 258 muestras de materia fecal del Hospital Infantil de México para el diagnóstico de Rotavirus por la técnica de Rotaforesis, de las cuales 153 fueron positivas (59%) y 105 fueron negativas (41%), en el periodo de un año (Diciembre de 1994 a Diciembre de 1995). Cuadro 5.1 y Gráfica 5.1.

En el Hospital del Niño Poblano se trabajaron 333 muestras de las cuales 131 fueron positivas (39%) y 202 fueron negativas (61%), en el periodo de un año (Diciembre de 1994 a Diciembre de 1995). Cuadro 5.1 y Gráfica 5.1.

Se realizó el diagnóstico de Rotavirus a lo largo de todo el año y se determinó la frecuencia mensual del número de casos positivos en ambos hospitales como se muestra en el cuadro 5.2 y gráfica 5.2.

En la determinación del patrón electroforético de Rotavirus, mediante PAGE al 10% en cámara BIO-RAD, se observaron los patrones "largos" en un 89 y 91% y los patrones "cortos" en un 9 y 10% en ambos Hospitales. Cuadro 5.3 y gráfica 5.3.

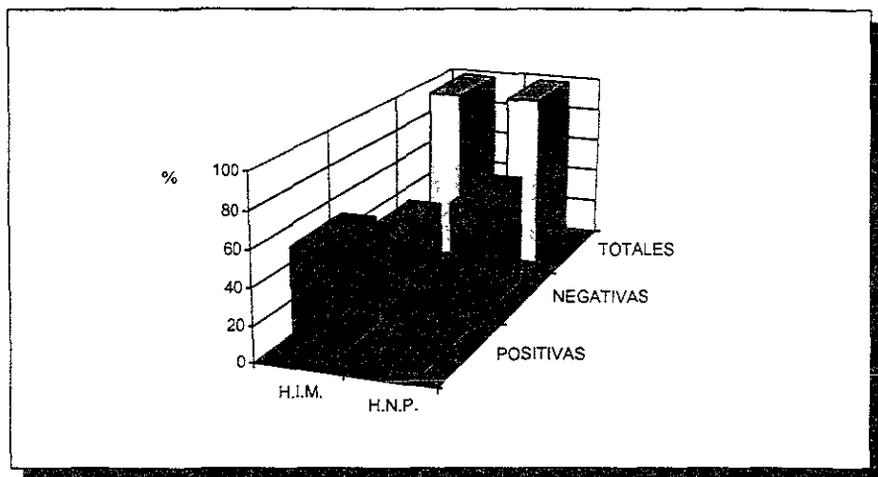
El sexo masculino fue el más afectado con 100 casos (65 %) en comparación con el femenino el cuál presentó 53 casos (35%) para el HIM. Para el HNP el sexo más afectado fue el masculino con 79 casos (60.3%) y 52 del femenino (39.7%). Cuadro 5.4 y gráfica 5.4.

El grupo de edad de 7 a 12 meses de edad coincidió ser el más afectado en los dos hospitales. En el HIM los grupos de edad de 0 a 6 y 13 a 18 meses de edad ocuparon el segundo y tercer lugar respectivamente. Por otra parte, en el HNP los grupos de edad de 13 a 18 y 0 a 6 meses de edad ocuparon el segundo y tercer lugar respectivamente. Cuadro 5.5 y gráfica 5.5.

Los resultados obtenidos de las encuestas nos permite destacar un análisis de las principales características clínicas, tales como fiebre, vómito, consistencia de la muestra, que presentaron los pacientes durante el periodo de estudio. Los resultados se resumen en el cuadro 5.6 y gráfica 5.6.

Se realizó el análisis de la diversidad de los patrones electroforéticos en 100 muestras (50 del HIM y 50 del HNP) las cuales se escogieron aleatoriamente. Se encontraron un total de 13 electroferotipos que en nuestro estudio denominados arbitrariamente del E1 al E13 para este estudio. El patrón electroforético que predominó durante todo el estudio en ambos hospitales fue el E1 con un 58% y 64% respectivamente, cuadro 5.7. La diferencia entre todos los electroferotipos se mostró principalmente en el tercer bloque (segmentos 7,8,9), además de también presentar diferencias en los otros tres bloques. En las figuras 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4 se presentan la circulación de los 13 electroferotipos.

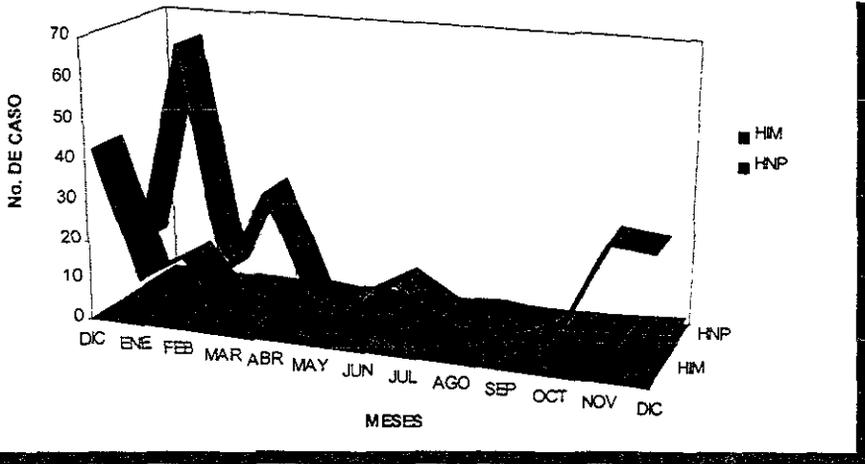
	No. DE CASOS EN EL H.I.M.	%	No. DE CASOS EN EL H.N.P.	%
MUESTRAS POSITIVAS	153	59	131	39
MUESTRAS NEGATIVAS	105	41	202	61
MUESTRAS TOTALES	258	100	333	100



Cuadro 5.1 y gráfica 5.1.- Diagnóstico de infección por rotavirus en el HIM y HNP, diciembre 1994-diciembre 1995.

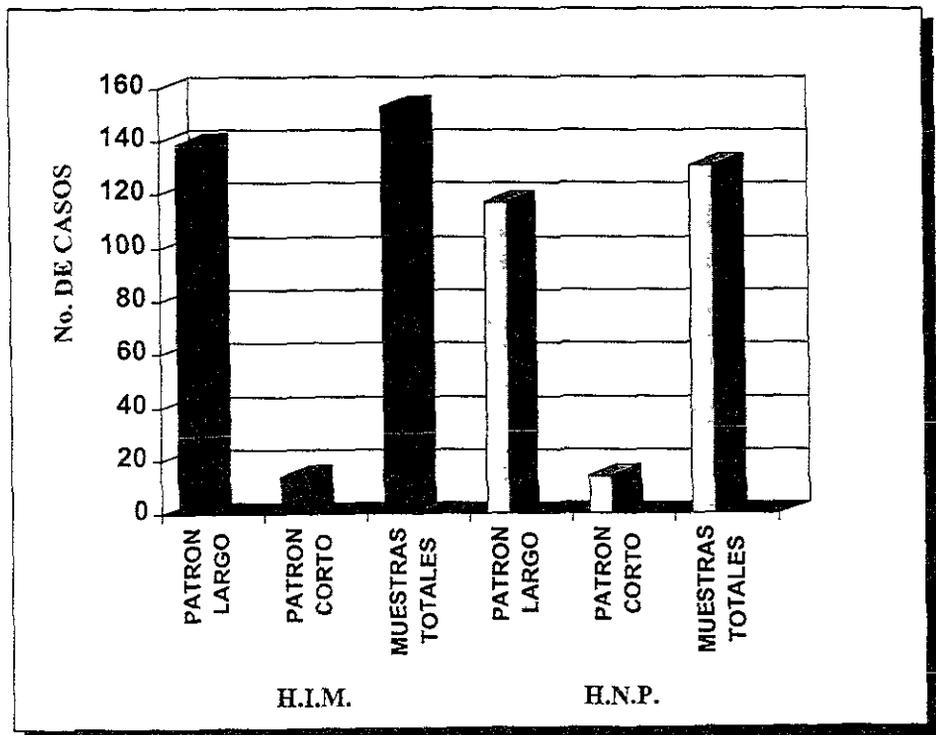
AÑO	MES	MUESTRAS POSITIVAS ENEL H.I.M.	MUESTRAS POSITIVAS ENEL H.N.P.
1994	DICIEMBRE	42	12
1995	ENERO	10	64
1995	FEBRERO	17	6
1995	MARZO	4	28
1995	ABRIL	2	2
1995	MAYO	1	1
1995	JUNIO	3	8
1995	JULIO	1	1
1995	AGOSTO	2	2
1995	SEPTIEMBRE	2	1
1995	OCTUBRE	8	1
1995	NOVIEMBRE	31	2
1995	DICIEMBRE	30	3

Cuadro 5.2. Frecuencia mensual de los casos positivos a rotavirus, en el HIM y HNP, diciembre 1994-diciembre 1995.



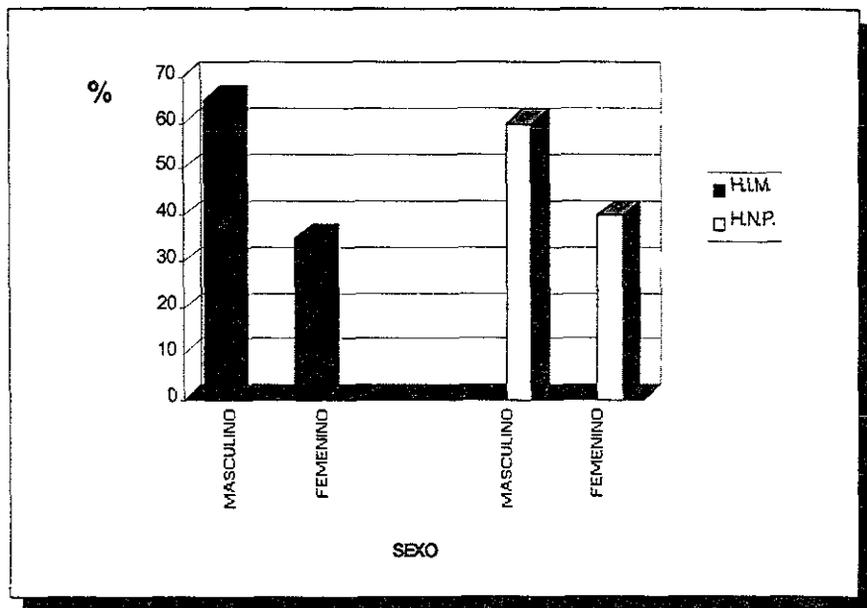
Gráfica 5.2. Frecuencia mensual de los casos positivos a rotavirus, en el HIM y HNP, diciembre 1994-diciembre 1995.

	MUESTRAS POSITIVAS	PATRON LARGO	PATRON CORTO
H.I.M.	153	139	14
	100%	91%	9%
H.N.P.	131	117	14
	100%	89%	11%



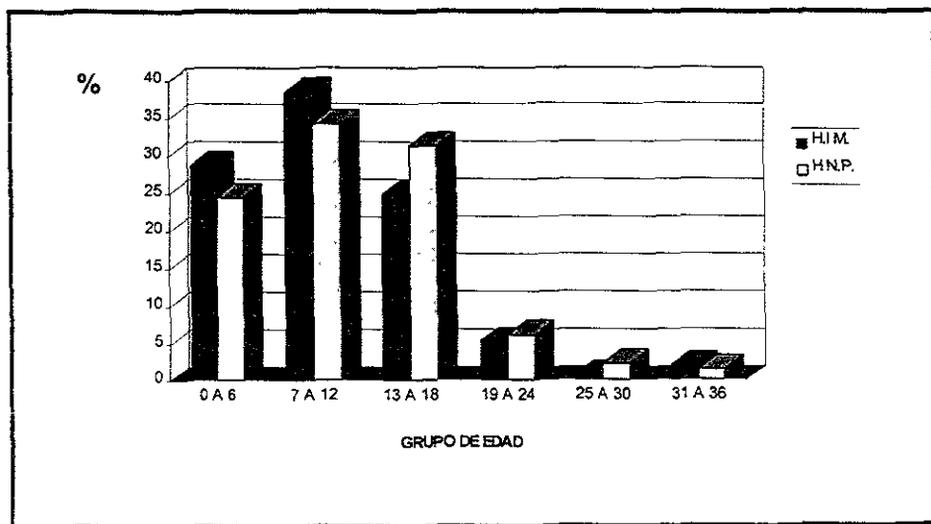
Cuadro 5.3 y gráfica 5.3. Frecuencia de los patrones electroforéticos en el HIM y HNP, diciembre 1994-diciembre 1995.

SEXO	FRECUENCIA EN EL H.I.M.	%	FRECUENCIA EN EL H.N.P.	%
MASCULINO	100	65	79	60
FEMENINO	53	35	52	40



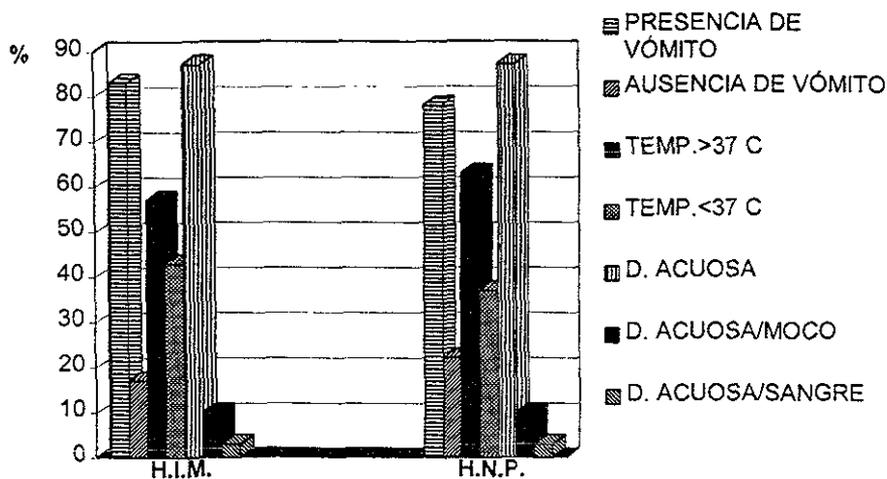
Cuadro 5.4 y gráfica 5.4. Prevalencia del sexo en los casos positivos a rotavirus en el HIM y HNP, diciembre 1994-diciembre 1995.

GRUPO DE EDAD (MESES)	H.I.M.		H.N.P.	
	FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%
0 a 6	44	28.75	32	24.42
7 a 12	59	38.56	45	34.35
13 a 18	38	24.83	41	31.29
19 a 24	8	5.22	8	6.10
25 a 30	1	0.65	3	2.29
31 a 36	3	1.96	2	1.52



Cuadro 5.5 y gráfica 5.5.- Frecuencia de casos positivos a Rotavirus en diferentes grupos de edad en el HIM y HNP, diciembre 1994-diciembre 1995.

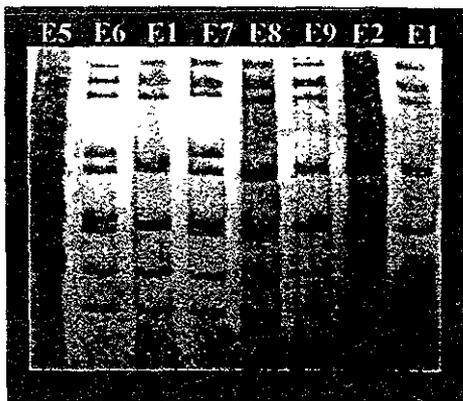
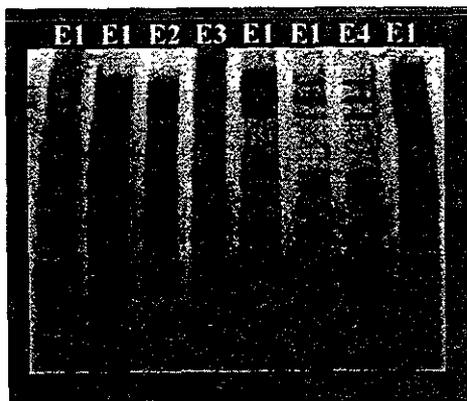
HOSPITALES	MUESTRAS POSITIVAS	PRESENCIA DE VÓMITO	AUSENCIA DE VOMITO	TEMP > 37 C	TEMP. < 37 C	DIARREA ACUOSA	DIARREA A. /MOCO	DIARREA A./SANGRE
H.I.M.	153 (100%)	83%	26%	57%	43%	87%	10%	3%
H.N.P.	131 (100%)	78%	22%	63%	37%	87%	10%	3%



Cuadro 5.6 y gráfica 5.6. Análisis de la sintomatología clínica de los pacientes infectados por rotavirus en el HIM y HNP, diciembre 1994-diciembre 1995.

P.E.	H.I.M.	%	H.N.P.	%
E1	29	58	32	64
E2	4	8	8	16
E3	0	0	3	6
E4	6	12	2	4
E5	1	2	1	2
E6	0	0	1	2
E7	0	0	1	2
E8	0	0	1	2
E9	0	0	1	2
E10	1	2	0	0
E11	3	6	0	0
E12	5	10	0	0
E13	1	2	0	0
TOTAL	50	100	50	100

Cuadro 5.7. Análisis de la diversidad de electroferotipos.



Figuras 5.1 y 5.2. Geles de poliacrilamida al 10% teñidos con nitrato de plata. Diversidad de electroferotipos del Hospital Infantil de México.



Figuras 5.3 y 5.4. Geles de poliacrilamida al 10% teñidos con nitrato de plata. Diversidad de electroferotipos del Hospital del Niño Poblano.

6. ANALISIS DE RESULTADOS

Se determinó la infección por Rotavirus en 591 muestras fecales; procedentes del Hospital Infantil de México (258 muestras) y del Hospital del Niño Poblano (333 muestras). Se obtuvieron resultados positivos en 153 y 131 muestras respectivamente, correspondiendo al 59 y 39%. De acuerdo con lo que marca la literatura, en este trabajo se obtuvieron los porcentajes esperados los cuales se encuentran dentro de los rangos que marcan otros trabajos realizados.

En México la frecuencia de aislamiento de Rotavirus también varía de un estado de la República a otro; como se observó en éste trabajo en el cual la mayor frecuencia se presentó en el H.I.M. que en el H.N.P.

La recolección de las muestras fué durante el periodo: Diciembre de 1994 a Diciembre de 1995; en el H.I.M. el mes de Diciembre de ambos años y Noviembre del 95 se observó el mayor número de casos, mientras que para el H.N.P. fueron: Diciembre del 94, Enero y Marzo del 95. Se observa que en los meses donde se presentaron el mayor número de casos fueron los meses fríos o invernales.

Se sabe que la transmisión del virus es por vía fecal-oral por lo que el agua y los alimentos son una fuente de infección importante, se ha detectado Ag de Rotavirus en secreciones respiratorias de niños

con neumonía antes de iniciar el cuadro diarreico, lo que hace suponer la posibilidad de transmisión por medio de partículas en aerosoles y esto explicaría en parte el aumento de la diarrea infecciosa aguda causada por los Rotavirus en los meses fríos semejantes a los meses de mayor incidencia por las infecciones respiratorias.

En los países donde el clima es subtropical ó tropical, las infecciones ocurren durante todo el año o presentan una distribución irregular.

Se ha reportado que el 50% ó más de casos detectados por Rotavirus en los lactantes hospitalizados por diarrea infecciosa aguda ha sido durante los meses de Otoño e Invierno; en los países de clima templado y éste aumento de frecuencia disminuye notablemente en las otras estaciones del año.

Por medio de la electroforesis en geles de poliacrilamida, los 11 segmentos de RNA de los Rotavirus puede ser separados de acuerdo a sus diferentes pesos moleculares. Cuando existe mayor peso molecular del segmento 11 se dice que el electroferotipo pertenece al patrón "corto" y cuando es de menor peso molecular del segmento 11 pertenece al patrón electroforético "largo"; es decir a mayor peso moléculas el segmento 11 migrara menor distancia en el gel y cuando sea de menor peso moléculas el segmento 11 migrara mayor distancia en el gel.

Los subgrupos caracterizados hasta ahora son llamados I y II. Podemos mencionar que casi todos los Rotavirus del grupo A, de patrón electroforético "corto" pertenecen al subgrupo I y dentro de este subgrupo a los serotipos 2, 8; y los de patrón "largo" pertenecen al subgrupo II y dentro de este subgrupo a los serotipos 1, 3, 4, 9.

El patrón electroforético "largo" se presentó para el H.I.M. en 139 muestras (91%), y para el H.N.P. en 117 (89%), éste tipo de patrón corresponde al subgrupo II; el patrón electroforético "corto" se obtuvo en menor porcentaje para los dos hospitales (H.I.M. y H.N.P.) fueron 14 muestras que representaron el 9 y el 11% respectivamente; las cuales se clasifican dentro del subgrupo I.

En ambos hospitales el sexo más afectado fue el masculino correspondiendo al 65% (H.I.M.) y 60% (H.N.P.), mientras que el sexo femenino presentó el 35% y el 40% respectivamente. En otros trabajos realizados no se ha reportado ha que se deba esta diferencia.

La enfermedad producida por la infección con Rotavirus varía según la edad del hospedero y sus condiciones nutricionales. La frecuencia de la infección con manifestaciones clínicas es baja en niños de 1 a 6 meses de edad, después aumenta considerablemente la frecuencia de 6 meses a 3 años de edad y disminuye de nuevo en los niños mayores de 3 años.

En el presente trabajo el grupo de edad de 7 a 12 meses de edad coincidió ser el más afectado en los dos hospitales. En el H.I.M. representó 59 casos (38.56%), ocupando el segundo lugar el grupo de 0 a 6 meses con 44 casos (28.75%), seguido del tercer lugar el grupo de 13 a 18 meses con 38 casos (24.83%). Para el H.N.P. el primer grupo representó 45 casos (34.35%), el segundo grupo fue el de 13 a 18 meses con 41 casos (31.29%) y por último el grupo de 0 a 6 meses con 32 casos (24.42%).

Generalmente la enfermedad se inicia con un brusco ataque de diarrea que puede asociarse con vómito e hipertermia; aproximadamente entre el 83 y 78% de los pacientes presentaron vómito y fiebre no mayor de 39°C. La materia fecal es acuosa, por lo común no contiene sangre o leucocitos. La complicación clínica más frecuente es la deshidratación; los pacientes en el H.I.M. y H.N.P. presentaron de promedio de 10 y 12 evacuaciones por día respectivamente, en algunos pacientes llegaron a presentar hasta 40 evacuaciones diarias.

La sintomatología presentada en los 153 pacientes positivos a la infección de Rotavirus en el H.I.M. fue la siguiente: 127 casos (83%) tuvo vómito; 124 casos (87%) presentó diarrea aguda, de este porcentaje 14 (10%) presentó moco y 4 (3%) con sangre.

De los 153 pacientes, 87 (57%) presentaron temperatura superior a los 37°C los restantes 66 pacientes (43%) no presentó una temperatura tan elevada.

En el H.N.P. los 131 pacientes positivos a Rotavirus presentaron la siguiente sintomatología: 102 pacientes (78%) padecieron vómito, 114 personas (87%) tuvieron diarrea aguda, de estos 13 (10%) presentó moco y 4 (3%) con sangre.

En 82 de los pacientes (63%) tuvieron temperatura mayor de 37°C, los 49 pacientes restantes (37%) no supero esta temperatura.

En análisis realizado de la diversidad de electroferotipos reveló la circulación de 13 patrones diferentes lo cual nos indica la gran diversidad que existe en la circulación de cepas con patrón electroforético diferente, sin embargo, cabe mencionar que el patrón E1 (60%) fue el que predominó en ambos hospitales y posiblemente se trate de una misma cepa, no obstante es necesario realizar la tipificación de estas cepas debido a que pueden existir cepas que presenten el mismo serotipo y ser de patrón electroforético diferente y por el contrario, cepas con el mismo electroferotipo pero que pertenezcan a serotipos diferentes.

7. CONCLUSIONES

Los resultados en cuanto a la infección de los Rotavirus fueron los esperados como marca la literatura (del 35-50% de positividad) en el H.I.M. con un 59% y en el H.N.P. en un 41% en relación a las muestras totales.

La técnica de Rotaforesis resulto ser un método de alta confiabilidad para el diagnóstico de los Rotavirus a partir de muestras de materia fecal, mostrando una alta especificidad y sensibilidad además de ser una técnica muy económica que se realiza en poco tiempo.

En este estudio mediante la técnica de PAGE se observo la presencia de patrón electroforético "largo" en la mayoría de los casos, correlacionando generalmente con el subgrupo II y mostrando la posible circulación de los serotipos 1, 3, y 4 que son los que presentan una mayor frecuencia en estudios epidemiológicos anteriormente realizados.

En cuanto a la diversidad de los electroferotipos podemos concluir que la circulación de cepas con patrón electroforético diferente se esta presentando en nuestro país obteniendo una gran diversidad de electroferotipos debido a la heterogeneidad que presentan las cepas de rotavirus. Sería de gran interés realizar un estudio correlacionando la diversidad de los electroferotipos con la

circulación de los serotipos con la finalidad de conocer parámetro molecular útil en la epidemiología de estos agentes.

Las manifestaciones clínicas presentadas en la infección por los Rotavirus no son suficientes para llegar a un diagnóstico etiológico de la diarrea infecciosa aguda ya que estas son semejantes a las presentadas por las infecciones bacterianas. En este trabajo se observó que la infección predominó en el sexo masculino y observándose la presencia de vómito y temperatura mayor a los 37°C en los dos hospitales.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- K. Estes Mary. Rotaviruses and Their Replication. En: Fields B.N. Knipe D.M., Chanok R.M. et al. Fundamental Virology. Philadelphia: Raven Publishers 1996; 2: 731-761.
- 2.- Ho Mei-Shang, Glass Roger I., Pinsky Paul F., Anderson Larry J. Rotavirus As a Cause of Diarrheal Morbidity and Mortality in the United States. The Journal of Infectious Diseases. Vol.158,No. 5. p.112-1116, November 1988.
- 3.- Gouvea Vera, F. Arias Carlos and López Susana. Aspectos Generales de Rotavirus. Reiews Biomed. Vol. 4, No. 3. p.129-140. Sept. 1993.
- 4.- Perea P. J., Araiza J., Campos J. y col. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Barcelona, España. Ediciones Doyma. Vol. 2. p. 881-884. 1992.
- 5.- Padilla Noriega Luis, F. Arias Carlos, López Susana, Puerto Fernando, Snodgrass David R., Taniguchi Koki and Greenberg Harry B. Diversity of Rotavirus Serotypes in Mexican Infants with Gastroenteritis. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 28, No. 6. p.1114-1118. June 1990.

- 6.- Puerto Solis M., Puerto F., González M.R. and Polanco G.G. Aspectos Generales de los Rotavirus. *Rev. Biomed* 1993; 4: 129-140.
- 7.- Shaw A.L., Rothnagel R., Chen D. et al. Three Dimensional Visualization of the Rotavirus Hemagglutinin Structure. *Cell* 1993; 74:693-701.
- 8.- Pereira H.G., Linhares A.C., Candeias J.A.N. y Glass R.I. Vigilancia de los Virus de la Gastroenteritis en los Laboratorios del Brasil. *Bol. of Sanit Panam.* 116(1), p. 27-36, 1994.
- 9.- Herring A.J., Inglis N.F., Snodgrass D.R., Ojeh C.K. and Menzies J.D. Rapid Diagnosis of Rotavirus Infection by Direct Detection of Viral Nucleic Acid in silver-stained Polyacrylamide Gels. *Journal Clinical Microbiology.* 1982; 16: 473-477.
- 10.- Valdespino Gómez J., García García M., Del Rio Zolezzi A., Giono Cerézo S., Salcedo Alvarez R., y Sepulveda Amor J. Epidemiology and Etiology of Infectious Diarrheas. The Case of México. *Reviews Latinoam. Microbiol.* 1994. Oct-Dec; 36 (4): 307-324.
- 11.- I.D. Anthony, Bullivant S., Dayal S., Bellamy A.R., and Berriman J.A. 1991. Rotavirus Spike Structure and Polypeptide Composition. *Journal Virol.* 65:4334-4340.

- 12.- F. Arias Carlos, Romero Pedro, Alvarez Virginia and López Susana. Trypsin Activation Pathway of Rotavirus Infectivity. *Journal of Virology*. Sept. 1996, p. 5832-5839.
- 13.- H. Holmes Ian, J. Ruck Brian, F. Bishop Ruth and Davidson Geoffrey P. Infantile Enteritis Viruses: Morphogenesis and Morphology. *Journal of Virology*. Vol. 16, No. 4. p. 937-943. Oct. 1975.
- 14.- Weiss Celeste and Clark H. Fred. Rapid Inactivation of Rotaviruses by Exposure to Acid Buffer or Acid Gastric Juice. *Journal General of Virology*. Vol. 66, No. 12. p. 2725-2730. Dec. 1985.
- 15.- Z. Kapikian Albert and M. Chanock Robert. Rotaviruses. In B.N. Fields et al. *Virology*. Raven Press, New York. 1996. p1657-1708.
- 16.- F. Arias Carlos, López Susana, and T. Espejo Romilío. Gene Protein Products of SA11 Simian Rotavirus Genome. *Journal of Virology*. Vol. 41, No.1. Jan. 1982. p. 42-50.
- 17.- Kolb Estes Mary and Cohen Jean. Rotavirus Gene Structure and Function. *Microbiological Reviews*. Vol.53, No.4. p. 410-449. December 1989.

- 18.- Kolb Estes Mary, Y. Graham David, M. Smith Eric and Gerba Charles P. Rotavirus Stability and Inactivation. *Journal General of Virology*. Vol. 43, No. 2. p. 403-409. May. 1979.
- 19.- Georges Courbot M.C., Beraud A.M., Beards G.M., Campbell A.D., González J.P., Georges A. J. and Flewett T. H. Subgroups, Serotypes, and Electrophoretotypes of Rotavirus Isolated from Children in Bangui, Central African Republic. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 26, No. 4. p.668-671. April 1988.
- 20.- J.C. Nicolas, Pothier P, et al. Survey of Human Rotavirus Propagation as Studied by Electrophoresis of Genomic RNA. *Journal Infect Dis* 1984;149:688-693.
- 21.- M.M. Elias. Separation and Infectivity of Two Particle Types of Human Rotavirus. *Journal General of Virology*. Vol. 37, No. 1. p.191-194. Oct.1977.
- 22.- T. Espejo Romilio, López Susana and F. Arias Carlos. Structural Polypeptides of Simian Rotavirus SA11 and the Effect of Trypsin. *Journal of Virology*. Vol. 37, No. 1, p. 156-160. Jan. 1981.
- 23.- K. Das Bimal, R. Gentsch Jon, Hoshino Yasutaka, Ishida Shin Ichi, Nakagomi Osamu, Bhan M. K., Kumar Ramesh, and I. Glass Roger. Characterization of the G Serotype and Genogroup of New

Delhi Newborn Rotavirus Strain 116E. *Virology* 1993. November; 197 (1): 99-107.

24.- López S., Padilla Noriega L. y Arias Carlos F. Correlación entre Serotipo y Electroferotipo de Rotavirus Aislados en Dos Poblaciones de México. *Bol Med Hosp. Infant Méx.* 1993; 50:736-740.

25.- B.G. Rasool Nassar, Y. Green Kim, and Z. Kapikian Albert. Serotype Analysis of Rotaviruses from Different Locations in Malaysia. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 31, No. 7 p. 1815-1819 July 1993.

26.- Soler Claudin Carmen. Rotavirus. En: Giono Cerezo Silvia, Escobar Gutiérrez Alejandro y Valdespino Gómez José Luis. Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiologicos. p. 157-168. Mexico 1994.

27.- Bingman F., Unicomb L.E., Guantli T. and col. Cultivation and Characterization of Novel Human Group A Rotavirus with Long RNA Electropherotypes, Subgroup II Specificities, and Serotipe 2 VP7 Genes. *Journal Clin Microbiol* 1991; 29:2224-2227.

28.- A. McCrae Malcolm, McCorquodale J.G. Molecular Biology of Rotaviruses. V. Terminal Structure of Viral RNA Species. *Virology*. 1983; 126:204-212.

- 29.- Hoshino Yasutaka, Nishikawa Kazuo, A. Benfield David, and Gorziglia Mario. Mapping of Antigenic Sites Involved in Serotype Cross Reactive Neutralization on Group A Rotavirus Outercapsid Glycoprotein VP7. *Virology*. 1994. Feb 15; 199 (1): 233-237.
- 30.- Gouvea Vera and Brantly Mark. Is Rotavirus a Population of Reassortants. *Trends in Microbiology*. Vol. 3, No. 4. p.159-162. April 1995.
- 31.- Duncan Steele Andrew, Garcia Dorys, Sears Johnna, Gerna Giuseppe, Nakagomi Osamu, and Flores Jorge. Distribution of VP4 Gene Alleles in Human Rotaviruses by Using Probes to the Hyperdivergent Region of the VP4 Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 31, No. 7. p. 1735-1740. July 1993.
- 32.- W. Both Gerald, J. Lockett Linda, Janardhana Vijayalakshmi, J. Edwards Stirling, Richard Bellamy A., L. Graham Frank, Prevec Ludvik, and E. Andrew Marion. Protective Immunity to Rotavirus Induced Diarrhoea Is Passively Transferred to Newborn Mice from Naive Dams Vaccinated with a Single Dose of a Recombinant Adenovirus Expressing Rotavirus VP7sc. *Virology*. 1993. April; 193 (2): 940-950.
- 33.- J. Dunn Stephen, W. Burns John, L. Cross Tonja, T. Vo Phuoc, L. Ward Richard, Bremont Michel, and B. Greenberg Harry. Comparison

of VP4 and VP7 of Five Murine Rotavirus Strains. *Virology* 1994. Sept; 203 (2): 250-259.

34.- Yin Fang Zhao, Y. Glass Roger, Penaranga Maria, Dong Hong, S. Monroe Stephan, Gouvea Vera and Hung Tao. Purification and Characterization of Adult Diarrhea Rotavirus: Identification of Viral Structural Proteins. *Journal of Virology*. Vol. 63, No. 5. p. 2191-2197. May. 1989.

35.- Bass D.M., Mackow E.R. and Greenberg H.B. NS35 and Not VP7 is the Soluble Rotavirus Protein Which Binds to Target Cells. *Journal of Virology* 1990; 64:322-330.

36.- Gerna Giuseppe, Sears Johnna, Hoshino Yasutaka, Duncan Steele A., Nakagomi Osamu, Sarasini Antonella, and Flores Jorge. Identification of a New VP4 Serotype of Human Rotaviruses. *Virology*. 1994. April; 200 (1): 66-71.

37.- Hua Jian, Chen Xia, and T. Patton John. Deletion Mapping of the Rotavirus Metalloprotein NS53 (NSP1): the Conserved Cysteine Rich Region Is Essential for Virus Specific RNA Binding. *Journal of Virology*. Vol. 68, No.6. p. 3990-4000. June 1994.

38.- N.M. Mattion, Cohen J., Aponte C. and Estes M.K. Characterization of Oligomerization Domain and RNA-binding

Properties and Rotavirus No Estructural Protein NS34. *Virology*. 1992; 190: 68-83.

39.- Maass and Atkinson P.H. Rotavirus proteins VP7, NS28 and VP4 Form Oligomeric Structures. *Journal of Virology*. 1990; 64: 2632-2641.

40.- F.I. Puerto, Polanco Marín G.G., Solís R. Puerto y col. Diarrea Infantil Aguda por Rotavirus en una Población Pediátrica de Mérida Yucatán, México. *Bol Med Hosp Infant Méx*. 1989; 46: 171-173.

41.- A. Morag, Y. Abed, B. Schoub, and A. Lifshitz. Enteric Viral Infections in Gaza Children Incidence and Associated Factors and Phenomena. *Isr. Journal Med. Sci.* 1995. Jan; 31 (1): 49-53.

42.- Hammond G.W., Ahluwalia G.S., Barker F.G. Horsman G., Hazelton P.R. Comparison of Direct and Indirect Enzyme Immunoassays with Direct Ultracentrifugation Before Electron microscopy for Detection of Rotaviruses. *J Clin Microbiol* 1982; 16:53-59.

43.- LeBaron C.W., Lew J., Glass R., Weber J.M., Ruíz Palacios G.M. Annual Rotavirus Epidemic Patterns in North America. *JAMA* 1990; 264: 983-988.

- 44.- Bern C., Unicomb L., Gentsch J.R. et al. Rotavirus Diarrhea in Bangladesh Children: Correlation of Disease Severity with Serotypes. *Journal Clinical Microbiology*. 1992; 30: 3234-3238.
- 45.- Hernández López Jorge, Santos Argumedo Leopoldo. Aspectos Relevantes del Inmunoanálisis Enzimático (ELISA). *Infectología*. No. 2. Pags. 52-56. Febrero 1985.
- 46.- Gouvea Vera and Y. Glass Roger. Polymerase Chain Reaction Detection and Typing of Rotaviruses in Fecal Specimens. *Journal Clinical Microbiology*. 28:276-282. May. 1990.
- 47.- S. Coulson Barbara. Typing on Human Rotavirus VP4 by an Enzyme Immunoassay Using Monoclonal Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 31, No. 1. p. 1-8. Jan. 1993.
- 48.- Brown D.W.G., Mathan M.M., Mathew M., Martin R., Beards G.M., and Mathan V. I. 1988. Rotavirus Epidemiology. *Journal Clinical Microbiology*. 26: 2410-2414.
- 49.- Gouvea Vera, I. Glass Roger, Woods Patricia, Taniguchi Koki, Fred Clark, Forrester Barbara and Yin Fang Zhao. Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid from Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.28, No. 2. 276-282. Feb. 1990.

50.- N. Fukuhara, O. Yoshie, S. Kitaoka, T. Konno, and N. Ishida. Evidence for Endocytosis Independent Infection by Human Rotavirus. Archives of Virology. Vol. 97, No. 1-2. p.93-100. 1987.

51.- Hoshino Yasutaka and Z. Kapikian Albert. Rotavirus Vaccine Development for the Prevention of Severe Diarrhea in Infants and Young Children. Trends in Microbiology. Vol. 2, No. 7. p. 242-249. July, 1994.