



EL SABER DE MIS HIJOS
HARA MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE NOROVIRUS DE NIÑOS CON GASTROENTERITIS”

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO BIOLÓGO CLÍNICO

PRESENTA

MICHEL FERNANDO CEJUDO FLORES

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE NOROVIRUS DE NIÑOS CON GASTROENTERITIS"

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Para Obtener el Título de:

QUIMICO BIOLÓGO CLÍNICO

Presenta:

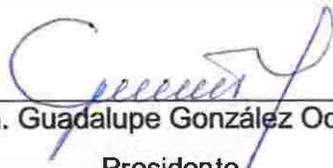
MICHEL FERNANDO CEJUDO FLORES

NAVOJOA, SONORA

MARZO 2017

APROBACIÓN

Los miembros del jurado asignados para revisar la tesis profesional de Michel Fernando Cejudo Flores han encontrado satisfactorio el trabajo y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.



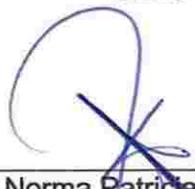
Dra. Guadalupe González Ochoa
Presidente



Dra. Lilian Karem Flores Méndez
Secretario



MC. Ramona Icedo García
Vocal

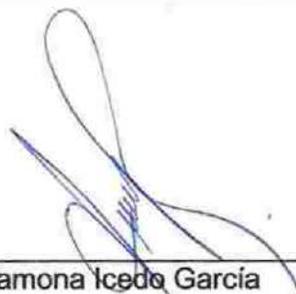


Dra. Norma Patricia Adán Bante
Suplente

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite y se agradece las citas breves del material contenido en este trabajo de tesis profesional sin permiso especial de los autores, siempre y cuando se le del crédito correspondiente a los autores y a la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en este trabajo, deberá dar los créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis profesional.



MC. Ramona Icedo García
Jefe de Departamento de Ciencias Químico
Biológicas y Agropecuarias

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por brindarme de la más grande bendición que es mi familia por acompañarme en cada paso, por ayudarme a cumplir esta meta de mi vida.

A mi **madre y abuela** por apoyarme en cada decisión que he tomado y aconsejarme a cada momento, por su amor sin-condiciones y sin barreras.

A mi alma mater la **UNIVERSIDAD DE SONORA**, que me brindo de conocimientos y de sus espacios, siendo mi segunda casa en estos últimos 5 años.

A mi maestra y asesora **Dra. Guadalupe González Ochoa** por apoyarme y confiar en mí.

A mi jurado de tesis, **Dra. Lilian Karem Flores Mendoza, MC. Ramona Icedo García, Dra. Norma Patricia Adán Bante.**

A mis maestros **Martin Gustavo Echeverría Jacobo y Ximena Felipe Ortega Fonseca.**

A mi novia **Melisa Solís Plata** por ser una excelente compañera, brindarme su apoyo y su cariño.

A mis amigos **Armando Avilés, Ricardo Romero, Guadalupe Quintero, Servando cantú.**
Por ser parte de mi formación y estar presentes en los momentos buenos y los no tan buenos.

DEDICATORIA

A **MARIA LUZ CEJUDO FLORES** y **MARIA HERMEREGILDA FLORES ANTELO** por ayudarme a ser mejor persona día con día e inculcarme que no existe mayor satisfacción que poder servir y ayudar a nuestros seres queridos.

A mis hermanos **MANUEL CEJUDO** y **ABRAHAM CEJUDO** por ser los mejores hermanos más que eso mis mejores amigos, enseñándome que no existe mayor riqueza que la familia.

CONTENIDO

APROBACIÓN	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURA	viii
OBJETIVOS	ix
Objetivo General	ix
Objetivos Específicos	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Gastroenteritis en Niños	2
Norovirus	3
Estructura y Clasificación	4
Ciclo Replicativo	8
Epidemiología	10
MATERIAL Y MÉTODO	12
Área de Estudio y Muestreo	12
Extracción de Acidos Nucleicos	12
Síntesis de cDNA	12
Amplificación del Gen de la Cápside de Norovirus	13
Secuenciación	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
CONCLUSIÓN	22
BIBLIOGRAFIA	23

LISTA DE FIGURA

Figura		Página
1	Partículas de Norovirus obtenidas de filtrados de heces y visualizadas por inmunoelectro microscopia.....	5
2	Esquema representativo del genoma y proteínas de <i>Calicivirus</i> (Norovirus).....	7
3	Esquema del genoma y ciclo de vida de Norovirus humano.....	8
4	Distribución de los genotipos circulantes de Norovirus humano en diferentes países de América Latina.	11
5	a) Amplificación del segmento de 380 pb correspondiente al genogrupo GI de Norovirus. b) Amplificación del segmento de 340 pb correspondiente al genogrupo Gli de Norovirus.....	16
6	Alineación de secuencias parciales del ORF2 del gen Norovirus genogrupo GI.....	18
7	Alineación de secuencias parciales del ORF2 del gen norovirus genogrupo Gii.....	19
8	Análisis molecular filogenético del genogrupo GI.8 de norovirus.....	20
9	Análisis molecular filogenético del genogrupo GI.4 de norovirus.....	21

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la secuencia del gen VP1 de cepas circulantes de norovirus detectadas en niños menores de cinco años con gastroenteritis durante agosto 2012 a agosto 2013.

Objetivos Específicos

1. Determinar la presencia de norovirus en niños con gastroenteritis en la región sur de sonora.
2. Identificar los genotipos correspondientes a norovirus detectados durante el periodo de estudio.
3. Analizar la secuencia nucleotídica de los genes asociados a la clasificación genotípica de norovirus.

RESUMEN

La mayoría de las enfermedades gastrointestinales son de etiología infecciosa, de éstas el 70% son causadas por agentes virales. Norovirus es el agente causante de gastroenteritis más frecuente después de rotavirus. Este virus ha sido asociado a más de 200,000 muertes en países en vías de desarrollo. Existen 6 genogrupos de los cuales 2 genogrupos afectan a humanos GI y GII, siendo GII el genogrupo con mayor incidencia y patogenicidad al cual se ha clasificado en 23 genotipos, siendo el genotipo GII.4 el de mayor circulación a nivel mundial y es el causante de los brotes más severos de gastroenteritis por Norovirus. En el presente estudio se analizaron 179 muestras de heces de niños con gastroenteritis atendidos en el Hospital General de Navojoa y el Hospital del Niño y la Mujer de Cd. Obregón, de Agosto del 2012 a Agosto del 2013. De las muestras analizadas 8 (4.46%) resultaron positivas para Norovirus, de éstas 2 (25%) resultaron genogrupo GI y 6 (75%) genogrupo GII. En el análisis de las secuencias de una de las cepas de Norovirus genogrupo GI se observó una homología del 98% con cepas de Norovirus GI.8 la cual a nuestro conocimiento no se ha reportado previamente en México. Por su parte, el análisis de dos de las cepas de Norovirus GII reveló una homología de 98-99% con cepas de Norovirus GII.4 de variante antigenica Sydney 2012. Estos resultados indican la variabilidad de cepas predominantes de Norovirus GII.4 y la presencia de cepas emergentes como GI.8 en el área de estudio. Debido a los resultados encontrados en esta investigación se sugiere que se continúe y se amplié el número de muestras en la región, estado y en el país para determinar incidencia y variabilidad genética de éste virus.

INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis es una afección asociada a procesos no inflamatorios en intestino delgado e inflamatorios a nivel de colon (Steiner y Guerrant, 2010). Entre los síntomas que comúnmente se presentan están diarrea, vómito y fiebre (Hostetler, 2004).

Las enfermedades gastrointestinales son un problema mundial, primordialmente en países en vías de desarrollo, en donde los índices de mortalidad son elevados. En Asia, África y Latinoamérica, se estima que aproximadamente el 50% de niños menores de 5 años fallece a causa de la gastroenteritis aguda. En la mayoría de los casos, los factores socioeconómicos y nutricionales influyen mucho en la mortandad infantil por gastroenteritis (Martínez, 2008).

En México, la salud pública se ve afectada por las enfermedades gastrointestinales, las cuales representan una de las principales causas de consulta médica, el Instituto Mexicano del Seguro Social, brindó 2 millones 188 consultas por enfermedades gastrointestinales, solo en 2008, y en 2003, un estudio gubernamental reportó 4,556 decesos causados por infecciones intestinales (Hernández, 2011).

La principal causa de gastroenteritis es de etiología infecciosa, los agentes causantes de gastroenteritis son: bacterias, virus y parásitos. La etiología viral en las gastroenteritis representa el 70% de las infecciones gastrointestinales, entre los virus relacionados con esta patología se encuentran Norovirus, Rotavirus, Sapovirus, Adenovirus entérico y Astrovirus, siendo Norovirus el patógeno viral causante de gastroenteritis más importantes después de rotavirus, el cual es causante de más de 200,000 muertes al año en países en vías de desarrollo (Lindesmith y col., 2011).

Por lo tanto en el presente trabajo se observó la prevalencia de cepas circulantes de norovirus en la población infantil que acude al Hospital General de Navojoa y al Hospital del Niño y la Mujer de ciudad de Obregón Sonora.

ANTECEDENTES

Gastroenteritis en Niños

La gastroenteritis infecciosa se relaciona con procesos no inflamatorios en la parte superior del intestino delgado o inflamatorios en colon (Hoestetler, 2004; Steiner y Guerrant, 2010). Entre los agentes infecciosos que se asocian comúnmente a la gastroenteritis están bacterias, virus y parásitos (Steiner y Guerrant, 2010). El síntoma más común de la gastroenteritis es la diarrea, esta puede definirse como el aumento de líquido en heces y una frecuencia mayor del número de evacuaciones al día (Fauci, 1998).

Los niños y los recién nacidos son los más susceptibles a padecer o adquirir una gastroenteritis aguda. Los menores de 5 años tienen una mayor probabilidad a adquirir infecciones causadas por la inmadurez de su sistema inmunológico; las células B aún no están completamente desarrolladas y no reaccionan de la misma forma que en la adultez, la IgA aumenta con la edad y esta actúa de forma eficaz a las infecciones intestinales (Roy y col., 1995).

Las enfermedades gastrointestinales son una importante causa de morbilidad y mortalidad niños menores de 5 años, se estima una mortalidad de niños por diarrea de 760,000 niños a nivel mundial (OMS, 2013). En 2008 en México, el seguro social brindó 2, 000,188 consultas por enfermedades gastrointestinales (Hernández y col., 2011). De igual forma Hernández y colaboradores en 2011, evidenciaron que las enfermedades gastrointestinales son la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años.

Estudios realizados entre 1993 y 2004 demostraron que los niños con bajo peso están en mayor riesgo mortalidad por enfermedades diarreicas. Así mismo, se confirmó que la desnutrición es un factor crítico en la progresión de la diarrea hacia la muerte (Fontanine, 2006; Boshi-Pinto, 2009). En infantes con diarrea, la deshidratación es el síntoma más severo, esto se relaciona a la fisiología del menor debido a que las mucosas intestinales son más permeables al agua que en los adultos (Nwachuku y col., 2006). La gastroenteritis se adquiere por consumir agua o alimentos contaminados o por el contacto directo con personas infectadas, las infecciones provocadas por bacteria y parásitos forman la decimocuarta parte

de las gastroenteritis infecciosas en México (Hernández y col., 2011). Los microorganismos causantes de gastroenteritis infecciosa no viral son *E. coli* diarreagénicas, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Giardialamblia* y *Entamoeba histolytica*. Estos microorganismos pueden provocar cambios inflamatorios y destructivos en la mucosa del colon, por invasión directa o mediante la producción de citotoxinas. Por otro lado, el 70% de los casos de gastroenteritis se asocia a virus. Entre los virus causantes de gastroenteritis se encuentran: rotavirus, norovirus, saporovirus, adenovirus entérico y astrovirus (Elliott y col., 2007).

Norovirus

Las personas infectadas con Norovirus comienzan con los síntomas después de 1 a 2 días de haber sido infectados. La vía de transmisión es oral-fecal y los síntomas más comunes en personas infectadas son: vómitos, diarrea, dolor de cabeza, náuseas, calambres abdominales, escalofríos, mialgias y cerca de la mitad de los casos presenta fiebre de bajo grado (38.3°C – 38.8°C) (Bellido y García, 2007). Los pacientes infectados presentan evacuaciones de heces fecales moderadas y en fase líquida, no se observa sangre ni moco. En la mayoría de casos estos síntomas son autolimitados, en algunos casos aparecen de manera intermitente, en ocasiones la infección es asintomática, aunque es claro que el vómito es el síntoma más común de la gastroenteritis por norovirus, los síntomas persistirán en periodos de 48 a 72 horas. En la gastroenteritis aguda los Norovirus ha sido asociados a sintomatologías como convulsiones, encefalopatía, hemorragias intestinales y enterocolitis necrosante (Atmar y Estes, 2006).

En 1968 el Centros de Control y prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) investigó un brote de gastroenteritis del 50% de la población escolar en la primaria de Norwalk en Estados Unidos (Adler y Zickl, 1969); en ese tiempo, el agente etiológico no fue identificado. Investigaciones posteriores realizadas por microscopia inmuno-electrónica en búsqueda del patógeno, identificaron partículas virales (figura 1) que fueron descritas como virus estructurados, redondos y pequeños (Kapikian y col., 1972.). Con el inicio de los diagnósticos de PCR en la década de 1990, estos ensayos de biología molecular se han convertido en el estándar de oro para el diagnóstico para detección de Norovirus (Pringle y col., 2015).

Norovirus afecta a personas de todas las edades, en un principio se creía que este solo afectaba a niños de edad escolar y adultos mayores, en la actualidad se sabe que afecta todo tipo de población incluyendo a niños menores de 3 años. Norovirus es el segundo agente infeccioso en causar hospitalizaciones por gastroenteritis después de rotavirus, se estima que causa 23 millones de infecciones anualmente en Estados Unidos (Atmar y Estes, 2006). Norovirus se caracteriza por la capacidad de causar gastroenteritis aún al infectar con muy bajas concentraciones, de 10 a 1000 partículas virales son suficientes para causar la enfermedad. La mayor incidencia de casos de gastroenteritis por norovirus se reporta en los centros de salud y hospitales (62-64%). El resto de los casos se asocia con infecciones adquiridas en restaurantes e instalaciones de eventos (15-20%), y en guarderías y escuelas (5-6%) (Pringle y col., 2015).

Estructura y Clasificación

Norovirus pertenece a la familia *Caliciviridae*, misma que comprende cinco géneros en los que se incluyen *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Nebovirus*, y *Vesivirus*, son virus pequeños, no envueltos, amorfos con un diámetro de 38 nm (Figura 1), cuyo genoma es de RNA de cadena sencilla en sentido (ssRNA) (Atmar y Estés, 2006). Los géneros norovirus y sapovirus, pueden generar infecciones entéricas tanto en animales como en humanos. El genoma de Norovirus posee una longitud de 7.4-7.7 kb, el cual esta flanqueado en el extremo 5' y 3' por regiones no traducibles (UTR, por sus siglas en inglés), las cuales usualmente son cortas, la UTR 5' tiene 5 nts de longitud y la UTR 3' 48 nts, además estas regiones contienen estructuras secundarias de RNA evolutivamente conservadas, y juegan un papel importante en la replicación, traducción y patogénesis del virus. La proteína viral (VPg) se encuentra unida al genoma de forma covalente al extremo 5', esta proteína cumple la función de la caperuza (Cap), que es característica de los mRNA eucarióticos; por su parte, el extremo 3' se encuentra poliadenilado (Fig. 2) (Gutiérrez-Escolano y col., 2000; Thome y Goodfellow, 2014; Robilotti y col., 2015).

El genoma de norovirus se encuentra organizado en tres marcos abiertos de lectura, denominados "ORF" (*Open Reading Frame*, por siglas en inglés), ORF1, ORF2 y ORF3, que codifican para 8 proteínas virales. El ORF1 codifica para una poliproteína que es procesada postraduccionalmente por la proteasa viral (3C) (Figura 2), dando lugar a 6 proteínas no estructurales, donde se incluyen: p48 (proteína N-Terminal), NTPasa, p22 (proteína 3A-like),

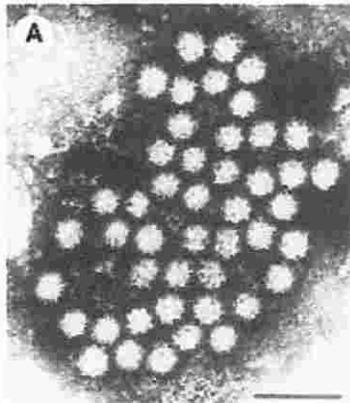


Figura 1. Partículas de Norovirus obtenidas de filtrados de heces y visualizadas por inmunoelectro microscopia (Green, 2013).

VPg, RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y la proteasa viral, las cuales están implicadas en la replicación del virus (Atmar, 2010; Thorne y Goodfellow, 2014). El ORF2 codifica para la proteína VP1, la cual resulta ser la proteína más abundante, y su función principal es dar lugar a la cápside; el ORF3 codifica para la proteína estructural minoritaria, VP2 (Hardy, 2005), aunque se desconoce la utilidad específica de VP2, se sospecha que su función es otorgar estabilidad y homogeneidad a la cápside del virión, además de funcionar encapsulando el material genético, con repulsión electrostática por su carga negativa. (Sosnovtsev *et al.*, 2005).

La cápside de un virión se compone de 90 dímeros de VP1, ensamblados con simetría icosaédrica; VP1 puede dividirse en dos dominios, el dominio Shell (S) que es un dominio conservado, y el dominio saliente (P) el cual es una región altamente variable, este dominio da lugar a protuberancias con forma de arco. A su vez, el dominio P es dividido en dos sub-dominios, P1 y P2, el sub-dominio P2 es la región más hipervariable, y al ser la parte más expuesta en la superficie de la cápside, se sospecha que contiene sitios antigénicos y enlaces de receptor involucrados en el reconocimiento celular; existe evidencia de que el sub-dominio P2 interactúa con los antígenos del histo-grupo sanguíneo (HGBAs, por sus siglas en inglés) ya que funcionan como receptores o co-receptores en la célula huésped y se necesitan para

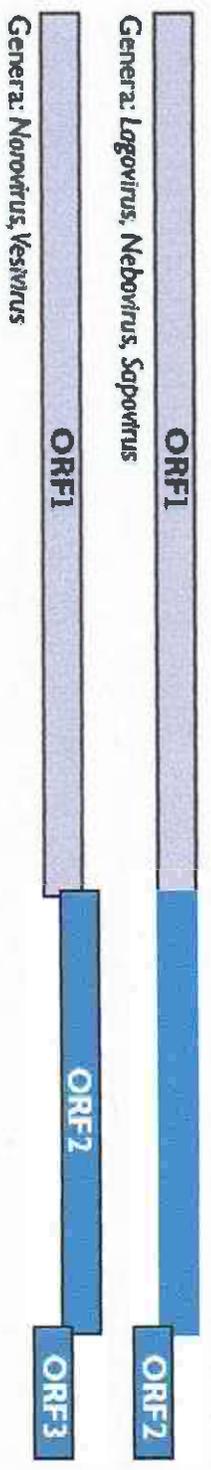
que se lleve a cabo la infección (Atmar, 2006; Zheng y col., 2006; Karts, 2010; Robilotti y col., 2015; de Graaf y col., 2016).

Por otro lado, Norovirus se ha clasificado en base a la secuencia de VP1 en seis genogrupos (GI-GVI) y aproximadamente 40 genotipos, los grupos GI, GII y GIV son los que pueden afectar al ser humano. Por otro lado, la clasificación de norovirus también se basa en las diferencias de la proteína RdRp (polimerasa o genotipo P).

A Genome Organization



B Reading Frame Usage



C Gene Order and Cleavage Sites

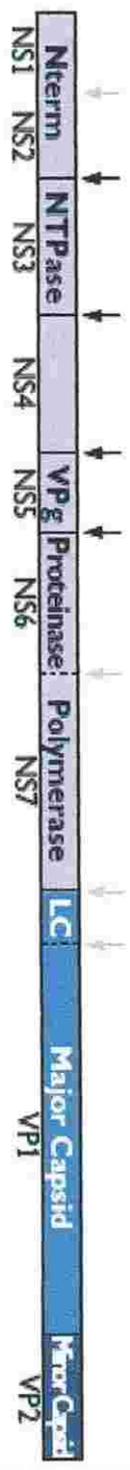


Figura 2. Esquema representativo del genoma y las proteinas de Calicivirus (Norovirus) (Green, 2013).

Ciclo Replicativo

Norovirus interacciona y entran a la célula (pueden ser diferentes tipos de células) y se libera el RNA genómico (Tabla 1). La traducción se realiza con la maquinaria celular del huésped. Algunas proteínas virales interaccionan con proteínas celulares para establecer sitios de replicación, mientras que otras proteínas funcionan como enzimas que participan en la replicación. Una vez que se ha sintetizado el genoma viral de RNA de cadena sencilla en sentido, éste es covalente unido a VPg (Cap) y empaquetado en los viriones que posteriormente serán liberados de las células lisadas (Figura 3). El ciclo de replicación de la familia de calicivirus (norovirus) es muy rápido, la nueva progenie viral puede ser liberada en cuestión de horas después de la infección (Graaf, 2016).

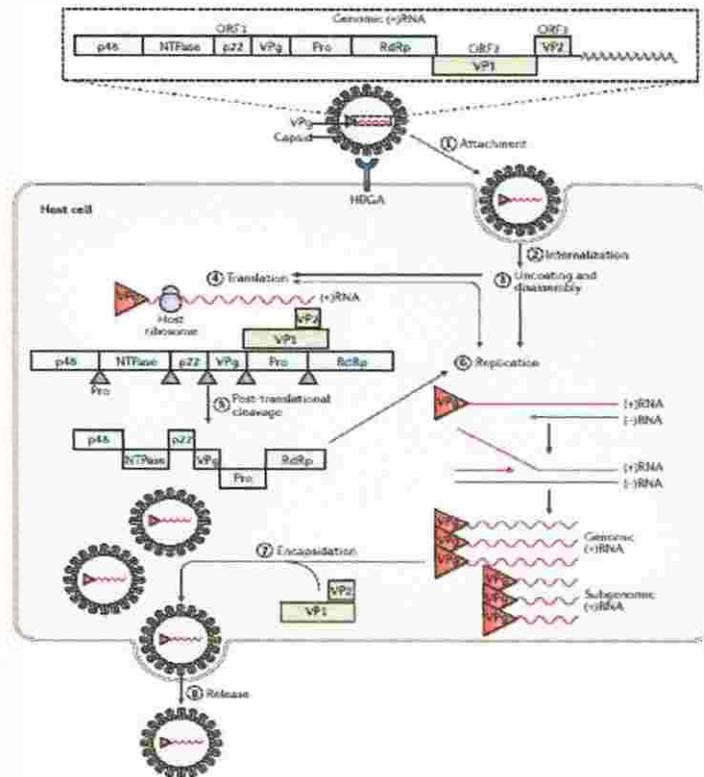
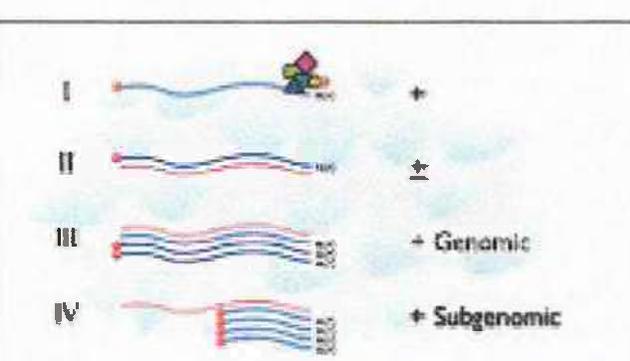


Figura 3. Esquema del genoma y ciclo de vida de Norovirus humano (Graaf, 2016).

Tabla 1. Etapas del ciclo replicativo de Norovirus (Green, 2013)

Etapas del ciclo de replicación	Descripción
<p>I) Entrada</p> 	<p>Receptor</p> <p>Antígenos del histo-grupo sanguíneo (HGBAs)</p>
<p>II) Liberación del genoma</p> 	<p>Rol del pH</p> <p>Dependiendo de la cepa y del pH bajo o elevado.</p>
<p>III) Traducción</p> 	<p>Dependiente de VPg</p> <p>I. El RNA de cadena sencilla en sentido y unido a VPg está disponible para iniciar la traducción. II. 5'-VPg interactúa con factores de traducción celular. III. Las unidades ribosomales se ensamblan para la traducción. IV. La poliproteína es traducida y procesada proteolíticamente.</p>
<p>IV) Replicación del RNA</p> 	<p>Replicación asociada a membrana</p> <p>I) La RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y otras proteínas forman el complejo de replicación en el extremo 3' del genoma. II) Se genera una copia del genoma en antisentido y este es el molde para la síntesis de dos cadenas cortas de RNA en sentido. III) La cadena completa de RNA en sentido sirve para la traducción de proteínas no estructurales o como genoma para la progenie viral. IV) El RNA subgenómico en sentido sirve como molde para la traducción de proteínas estructurales VP1 y VP2.</p>
<p>V) Maduración de partículas virales</p> 	<p>Morfogénesis del virión</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ensamble de las proteínas VP1 y VP2 - Empaquetamiento del genoma unido a VPg
<p>VI) Liberación</p> 	<p>Lisis Celular</p>

Epidemiología

El genogrupo (GII) de Norovirus es el predominante en humanos y se le ha clasificado en 23 genotipos, el genogrupo GI.4 es el de mayor incidencia a nivel mundial y el causante de los brotes más severos de gastroenteritis por Norovirus (Figura 4). Seguido de GI.4, están los genogrupos GI y GIV (Wang y col., 2012; Kroneman y col., 2013; Chan y col., 2015; Parra y Green, 2015). El genotipo GI.4 es dividido en cepas o variantes; se han encontrado un número adicional de variantes del genotipo GI.4, las cuales se consideran emergentes y se relacionan con gastroenteritis aguda. Desde mediados de 1990, las variantes de GI.4 han causado a nivel mundial el 62-80% de los brotes de gastroenteritis; entre las variantes identificadas se encuentran: US 1995/96 (1996), Farmington Hills (2002), Hunter (2004), 2006b (2007-2008), New Orleans (2009-2012) y Sydney (2012). Existen otras variantes, solo que estas se asocian a epidemias localizadas (Bull *et al.*, 2007; Edén *et al.*, 2013; Kroneman y col., 2013). En México entre las principales cepas que se encuentran en circulación están GI.1, GI.3, GI.5, GI.7, GI.14, GII.1, GII.2, GI.4, GII.7 y GII.17 (Bull *et al.*, 2007; Atmar y col., 2011; da Silva Poló y col., 2016).

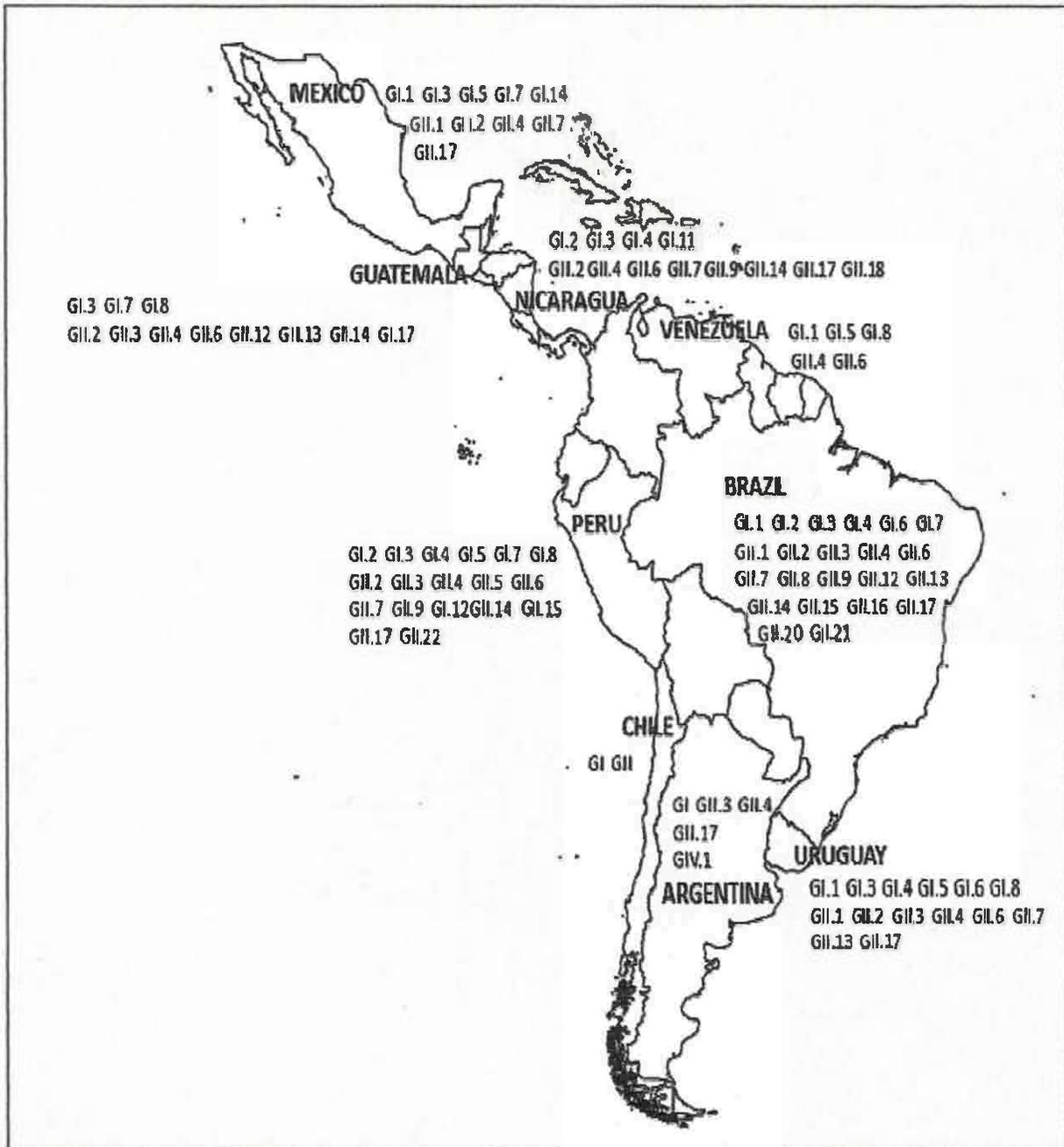


Figura 4. Distribución de los genotipos circulantes de norovirus humano en diferentes países de América Latina (da Silva Poló y col., 2016).

MATERIAL Y MÉTODO

Área de Estudio y Muestreo

Las muestras de heces fecales se obtuvieron de niños con gastroenteritis atendidos en el Hospital General de Navojoa y el Hospital del Niño y la Mujer en Cd. Obregón, Sonora. Para el transporte de las muestras no se utilizaron preservadores, una vez en el laboratorio se refrigeraron a 4°C hasta su uso y posteriormente se almacenaron en un congelador a -20°C.

Para el criterio de inclusión se consideró la edad del menor, no mayor de 5 años, presentar 3 o más episodios diarreicos en un tiempo no mayor de 24 h, vómito, fiebre o uno de estos síntomas mencionados. Como criterios de exclusión se consideró que la gastroenteritis fuera de origen bacteriano o parasitario y que el infante tuviera más de 5 años. Las muestras obtenidas de niños con gastroenteritis se transportaron al laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

Extracción de Ácidos Nucleicos

De muestras recolectadas se realizó una suspensión de heces al 20% en buffer de fosfatos (PBS), y posteriormente se realizó una extracción de RNA utilizando el kit comercial QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit 50 (QIAGEN, Germany) de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

Síntesis de cDNA

El RNA viral de las muestras se sometió a una retro-transcripción, con el fin de obtener cDNA. A continuación se describe las condiciones de dicho procedimiento: se utilizó un oligonucleótido externo a 1µM, norovirus G1SKR para el genotipo 1 y G2SKR para el genotipo 2, respectivamente. Para la primera parte de la reacción de retrotranscripción, en un tubo de 0.2 µl se adicionó un 1-µl del oligonucleótido externo y 2 µl de RNA purificado para un volumen parcial de 3µl, una vez realizada la primera mezcla, se colocó en el termociclador (ProFlex PCR System, AppliedBiosystems) a 95°C por 5 min, posteriormente se incubó en hielo. La segunda reacción se realizó utilizando 2µl de Buffer M-MLV RT 5X (PROMEGA®), 1.3 µl de MgCl₂ (25 mM), 3.2 µl de dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y 2 U de RT M-MLV (*MoloneyMurineLeukemia Virus Reverse Transcriptase*, PROMEGA®) para un volumen de 7µl. El contenido de la mezcla dos, se adicionó al volumen parcial de la mezcla uno, dando así un volumen final de 10 µl, una vez

homogenizadas las mezclas, se llevó nuevamente al termociclador para continuar con la síntesis de cDNA en un ciclo de 42°C por 60 min, seguido de 10 min a 72°C. Una vez obtenido el cDNA, se almacenó a -20°C hasta su uso.

Amplificación del Gen de la Cápside de Norovirus

Una vez que se obtuvo el cDNA, se sometió a una PCR con la finalidad de amplificar la región de la cápside, para esto se realizó una mezcla con un volumen final de 12.5 µl, utilizando PCR Master Mix (2x) (50 U/µl de *Taq* polimerasa DNA, 400 µM de dATP, 400 µM de dGTP, 400 µM de Dctp, 400 µM de dTTP, 3 mM MgCl₂) (PROMEGA®) y oligonucleótidos específicos a 25 µM para G1 y Gii respectivamente (Tabla 2), posteriormente se colocó en el termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de 3 etapas a 94°C por 1- min, 55°C por 30 seg y 72°C por 1- min, finalmente un ciclo de 72°C por 7 min, estas condiciones fueron modificadas con referencia a las propuestas por Kojima *et al.*, (2002). Tras una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en buffer tris acetato EDTA (TAE) a 100 volts durante 35 min y tinción con bromuro de etidio, el producto de PCR obtenido se visualizó en exposición a luz ultravioleta en el transiluminador (Bio-ImagingSystemsMiniBis Pro),

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos y tamaño de segmento esperado en la amplificación del gen de la cápside de Norovirus.

Oligonucleótido	Genogrupo	Polaridad	Secuencia 5'-3'	pb
G1SKF	G1	(+)	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	330
G1SKR		(-)	CCAACCCARCCATTRTACA	
COG1F	G1	(+)	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	380
G1SKR		(-)	CCAACCCARCCATTRTACA	
G2SKF	G2	(+)	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	340
G2SKR		(-)	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	
COG2F	G2	(+)	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	390
G2SKR		(-)	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	

Purificación del Producto de PCR

Para realizar la purificación del producto de PCR de Norovirus se utilizó el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la purificación, a las muestras se les realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer tris acetato EDTA (TAE) a 100 volts durante 35 min, teñido con bromuro de etidio, en exposición a luz ultravioleta en el transluminador (Bio-ImagingSystemsMiniBis Pro), con el fin de confirmar la purificación del DNA.

Secuenciación

Una vez realizada la purificación del producto de PCR, se procedió medir la concentración de DNA, para ello se utilizó el NANODROP 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) con una absorbancia de 260/280 nm. La secuenciación se realizó directamente del producto de PCR purificado y cuantificado, de acuerdo con las instrucciones de la solicitud de secuenciación, con un volumen final de 16 µl, en un tubo eppendorf de 0.2 µl se agregó 120 ng del DNA purificado, mezclado con 10 pmol del oligonucleótido correspondiente (sentido y anti-sentido). Dicha mezcla fue enviada a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, donde se secuenció en base al método de sanger (IBT, Cuernavaca, Morelos) El análisis de secuencia se realizó utilizando el programa MEGA 6.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total, en el presente estudio se analizaron 179 muestras de heces de niños con gastroenteritis atendidos en el Hospital General de Navojoa y en el Hospital del niño y la mujer de Agosto de 2012 a Agosto de 2013. De las muestras analizadas 8 (4.46%) resultaron positivas para Norovirus. La edad de los niños fue de 6 a 29 meses y los pacientes son de ambos sexos, presentaron sintomatologías comunes de gastroenteritis tales como diarrea, vomito, temperatura, deshidratación. La mayoría de estos pacientes se encontraban hospitalizados (Tabla 3).

Tabla 3. Genogrupos de Norovirus y aspectos clínicos de cada caso.

Genogrupo	Edad (meses)	Sexo	Diarrea (días)	Vómito (días)	Temperatura °C	Deshidratación	Atención
G1	14 M	M	1-4	2	37	No	Hospitalizado
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G11	7 M	F	5	2	ND	ND	ND
	6 M	M	6	3	37.1-38.4	leve	Hospitalizado
	12 M	M	1-4	3	39	leve	Hospitalizado
	13 M	M	5	3	37	leve	Supervisada
	29 M	M	1	1	38.3-38.6	No	Hospitalizado
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

*ND: no datos disponibles

El análisis por RT-PCR reveló que 2 (25%) muestras amplificaron un segmento de 380 pb con los primers COG1F/ G1SKR correspondiente al genogrupo GI (Figura 5a) y 6 (75%) amplificaron un segmento de 340 pb con los primers G2SKF/G2SKR correspondiente al genogrupo GII de norovirus (Figura 5b).

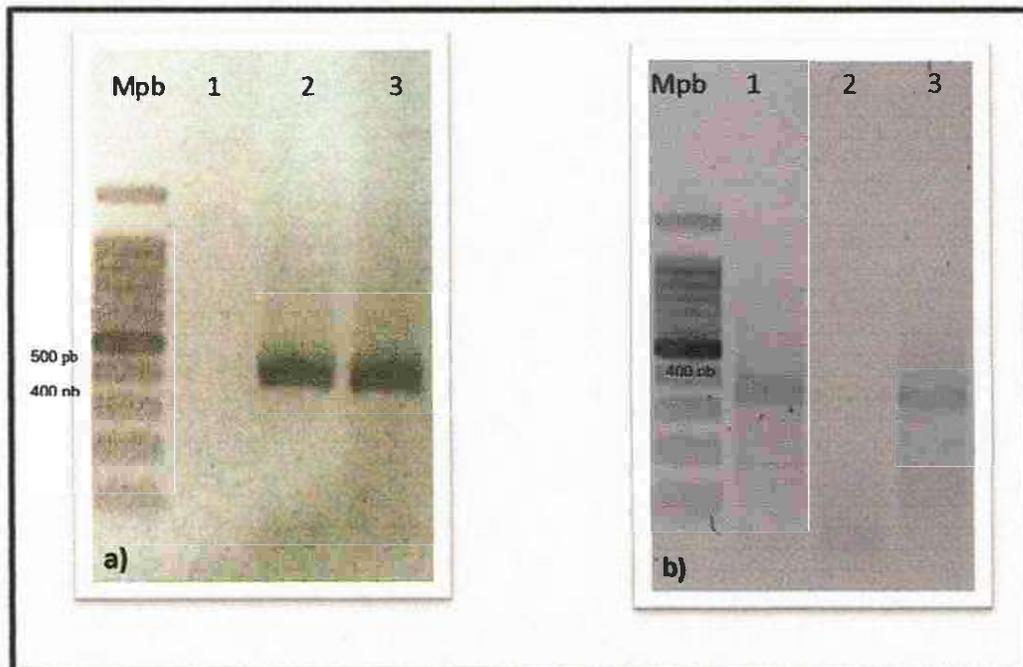


Figura 5. a) Amplificación del segmento de 380 pb correspondiente al genogrupo GI de Norovirus. b) Amplificación del segmento de 340 pb correspondiente al genogrupo GII de Norovirus.

Posteriormente, el producto de PCR de la amplificación del gen de la polimerasa y la cápside de norovirus fue secuenciado por el método de sanger. En el análisis de las secuencias de una de las cepas de norovirus genogrupo GI se observó una homología del 98% con cepas de norovirus GI.8 (Figura 6). Por su parte, el análisis de dos de las cepas de norovirus GII reveló una homología de 98-99% con cepas GII.4 (Figura 7).

El análisis filogenético de las secuencias de los genes de norovirus aislados en este estudio, indicaron que las secuencias correspondientes al genogrupo GI.8 se ubicaron en el mismo grupo de cepas aisladas en Estados Unidos 2016, Brazil 2015 y Japon 2015 (Figura 8). Por su parte, las cepas genogrupo GII.4 aisladas en este estudio, se relacionaron con el cluster correspondiente a cepas de norovirus GII.4 de variante antígenica Sydney2012 (Figura 9).

Los genogrupos de Norovirus que se han reportado previamente en México son GI.1, GI.3, GI.5, GI.14, GII.1, GII.2, GII.4, GII.7 y GII.17 (da Silva Poló, 2016). En el presente estudio se detectaron los genogrupos GI.8 y GII.4 de Norovirus como causantes de gastroenteritis en niños; en su mayoría los datos clínicos de los menores se relacionaron gastroenteritis de leve a moderada. El genogrupo GII.4 se relacionó con cepas Sydney 2012, esta cepa es una de las variantes más reportadas a nivel mundial. Así mismo, las cepas GII.4 se han asociado a la transmisión de persona a persona; mientras que el genogrupo GI.8 que es un genotipo que no se ha reportado previamente en México, se asocia a infecciones adquiridas por consumir alimentos (mariscos) mal cocinados con norovirus (Atmar, 2010).

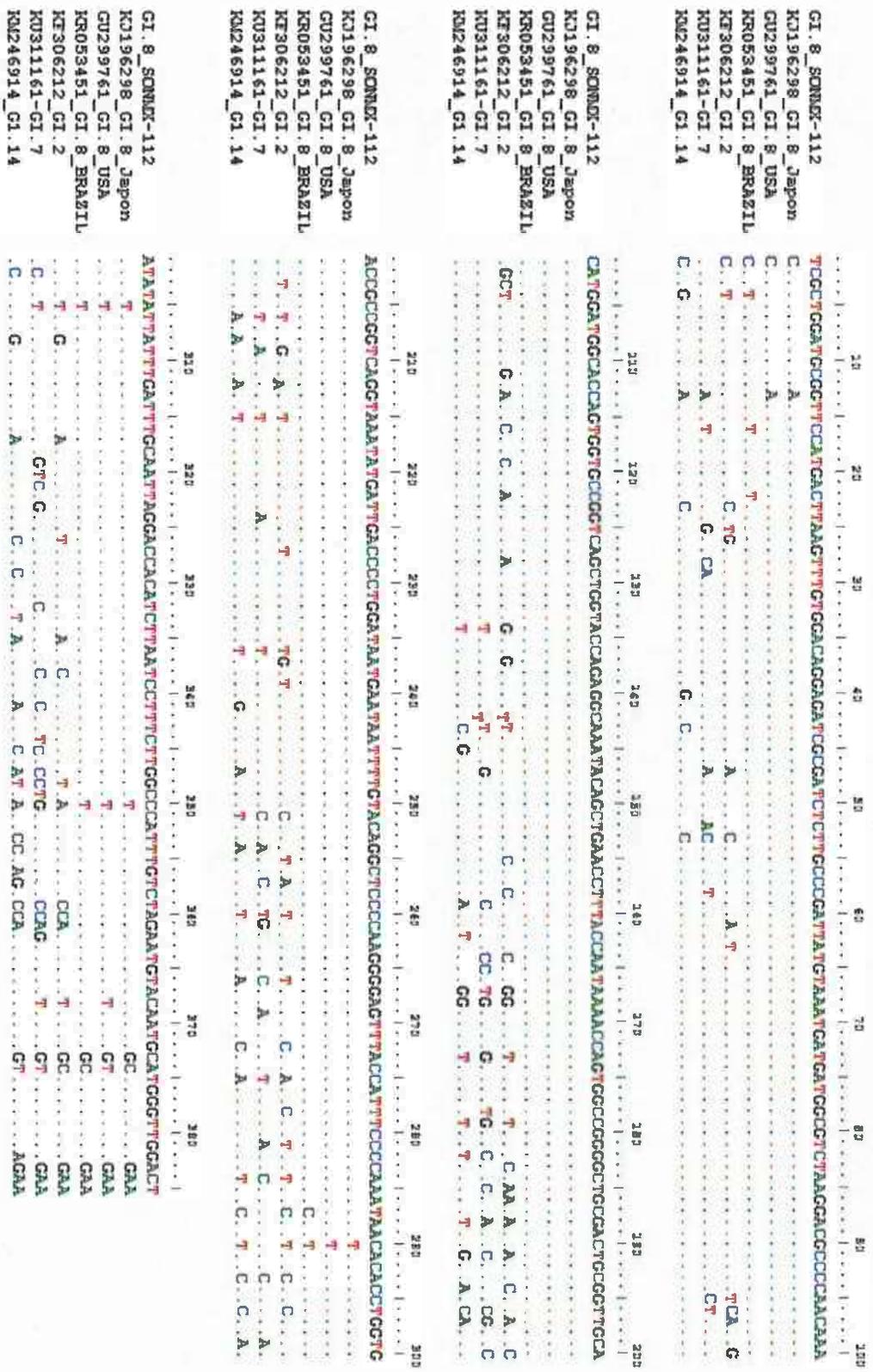


Figura 6. Alineación de secuencias parciales del ORF2 del gen norovirus genogrupo GI.

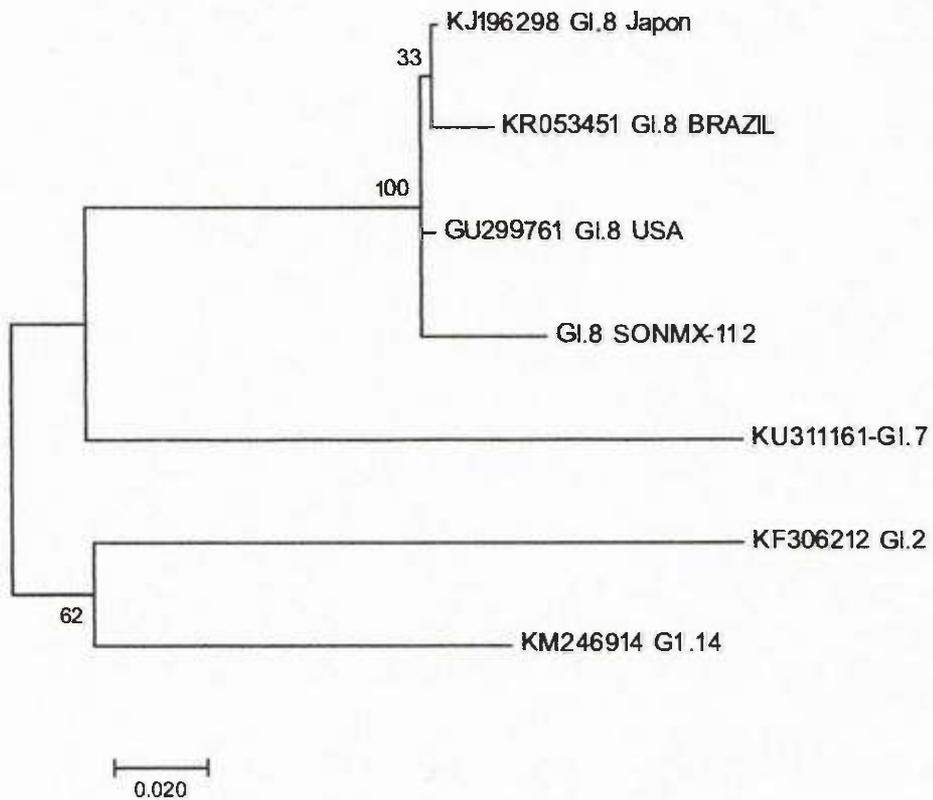


Figura 8. Análisis molecular filogenético del genogrupo GI.8 de norovirus aislado en este estudio y secuencias de referencia reportadas previamente en el GenBank. Se utilizó el método Maximum likelihood en base al modelo Tamura-Nei (1993).

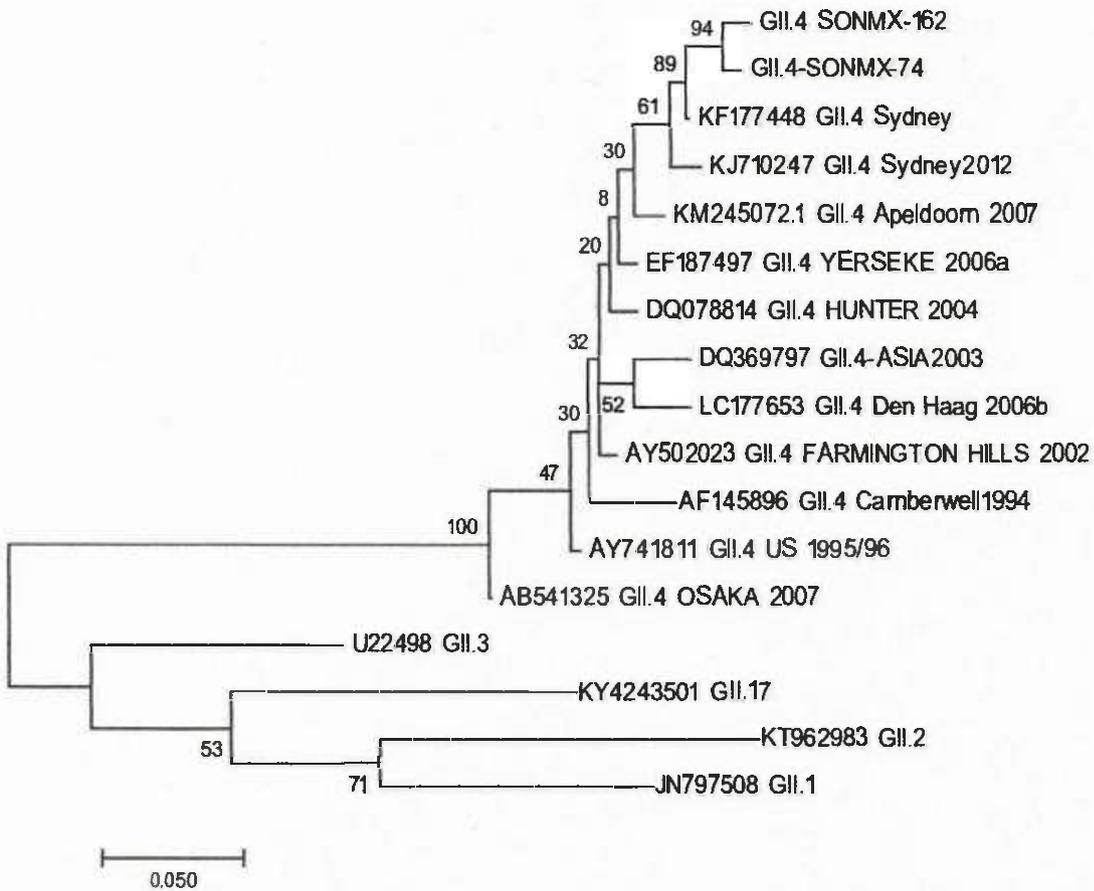


Figura 9. Análisis molecular filogenético del genogrupo GII.4 de norovirus aislados en este estudio y secuencias de referencia reportadas previamente en el GenBank. Se utilizó el método Maximum likelihood en base al modelo Tamura-Nei (1993).

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se encontraron cepas circulantes de norovirus, con una prevalencia mayor en el genogrupo GII (6/8,75%), de igual forma se reportó el genogrupo GI (2/8,25%). En el análisis de secuencia del gen que codifica para la proteína estructural VP1, se identificó en el genogrupo GI, que las 6 muestras pertenecían al genotipo GI.4, relacionada con la cepa sydney 2012 con una homología del 98-99%, la cepa más común reportada a nivel mundial. Lo que indica las mutaciones constante dificultando la síntesis de una probable vacuna efectiva.

Por otra el análisis de secuencias en genogrupo GI, identifico al genotipo GI.8, cepa identificada por primera vez en México, comúnmente relacionada en casos esporádicos, dejando claro la necesidad de más estudios a nivel epidemiológico que nos ayudaran a permitir la caracterización molecular de este tipo de virus. Contribuyendo así a la implementación de estrategias para prevenir este tipo de infecciones causantes de gastroenteritis.

BIBLIOGRAFIA

- Adler, JL, Zickl R. 1969. Winter vomiting disease. *The Journal of infectious diseases*, 119(6), 668-673.
- Atmar RL, Estes MK. 2006. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, 35(2), 275-290.
- Atmar RL. 2011. Noroviruses: state of the art. *Food and environmental virology*, 2(3), 117-126.
- Atmar RL, Neill FH, Le Guyader FS. 2011. Detection of human Caliciviruses in fecal samples by RT-PCR. In: *Diagnostic Virology Protocols* (pp. 39-50). Humana Press. Totowa, NJ, USA.
- Bellido Blasco JB, García AM. 2007. Epidemiología de las gastroenteritis agudas víricas. *Aspectos actuales*, 6.
- Boschi-Pinto C, Lanata CF, Black RE. 2009. The global burden of childhood diarrhea. In *Maternal and Child Health* (pp. 225-243). Springer US.
- Bull RA, Tanaka MM, White PA. 2007. Norovirus recombination. *Journal of General Virology*, 88(12), 3347-3359.
- Chan MC, Leung TF, Chung TW, Kwok AK, Nelson EAS, Lee N, Chan PK. 2015. Virus genotype distribution and virus burden in children and adults hospitalized for norovirus gastroenteritis, 2012–2014, Hong Kong. *Scientific reports*, 5.
- da Silva Poló T, Peiró JR, Mendes LCN, Ludwig LF, de Oliveira-Filho EF, Bucardo F, Mauroy A. 2016. Human norovirus infection in Latin America. *Journal of Clinical Virology*, 78, 111-119.
- de Graaf M, van Beek J, Koopmans MP. 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7), 421-433.

Elliott EJ. 2007. Acute gastroenteritis in children. *BMJ* 334: 35-40.

Fauci AS. 1998. *Harrison's principles of internal medicine* (Vol. 2, pp. 1888-1889). New York: McGraw-hill.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791

Fontaine O, Boschi-Pinto C. 2006 Special Section: Diarrheal Diseases. *Population Bulletin* 61: 10-13.

Gutiérrez-Escolano AL, Brito ZU, del Ángel RM, Jiang X. 2000. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol* 74, 8558–8562.

Green KY. 2013. Caliciviridae: the noroviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R., Roizman, B. (Eds.), *Fields Virology*, sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 582–608.

Hardy ME. 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS microbiology letters*, 253(1), 1-8.

Hernández CC, Aguilera AMG, Castro EG. 2011 Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4), 137.

Hostetler MA, Nakanishi AK, Whiteman PJ. 2004. Gastroenteritis: An Evidence-based Approach To Typical Vomiting, Diarrhea, And Dehydration. *Pediatric Emergency Medicine Practice*, 1(5), 1-19.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of virology*, 10(5), 1075-1081.

Karst SM. 2010. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses*, 2(3), 748-781.

- Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158, 2059–2068.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Lindesmith LC, Donaldson EF, & Baric RS. 2011. Norovirus GII. 4 strain antigenic variation. *Journal of virology*, 85(1), 231-242.
- Nwachuku N, Gerba CP. 2006 Health risks of enteric viral infections in children. *Rev Environ Contam Toxicol* 186: 1-56.
- OMS. 2013. Enfermedades diarreicas.
En:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
- Parra GI, Green KY. 2015. Genome of emerging norovirus GII. 17, United States, 2014. *Emerging infectious diseases*, 21(8), 1477.
- Pringle K, Lopman B, Vega E, Vinje J, Parashar UD, Hall AJ. 2015. Noroviruses: epidemiology, immunity and prospects for prevention. *Future microbiology*, 10(1), 53-67.
- Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. 2015. Norovirus. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 134-164.
- Roy CC, Silverman A. 1995. *Pediatric Clinical Gastroenterology*. (3rd edn), Mosby, St. Louis.
- Steiner TS, Guerrant RL. 2010. Principles and syndromes of enteric infection. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, seventh edition. Philadelphia, Churchill livingstone-Elsevier*, 1335-1352.
- Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Onwudiwe O, Green KY. 2005. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *Journal of virology*, 79(7), 4012-4024.

Svensson L, Desselberger U, Estes MK, Greenberg HB. 2016. *Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press pp.329-354

Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.

Thorne LG, Goodfellow IG. 2014. Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*, 95(2), 278-291.

Wang YH, Zhou DJ, Zhou X, Yang T, Ghosh S, Pang BB, Kobayashi N. 2012. Molecular epidemiology of Noroviruses in children and adults with acute gastroenteritis in Wuhan, China, 2007-2010. *Archives of virology* 157: 2417-2424.

Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. 2014. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *Journal of clinical microbiology*, 52(1), 147-155.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Gless RI, Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346(2), 312-323.