Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

DETECCIÓN DE NOROVIRUS Y DIFERENCIACIÓN DE GENOTIPOS CIRCULANTES EN SONORA MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Por:

Carmen Itzé Enríquez Hernández

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Noviembre del 2014

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Carmen Itzé Enríquez Hernández la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Dra. Verónica Mata Haro
Directora de Tesis

Dr. Jesús Hernández López
Asesor

Dra. Graciela Caire Juvera
Asesora

M. en C. Leticia Félix Valenzuela
Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido durante el posgrado.

Además, agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), por permitirme la estancia para cursar mis estudios de maestría.

Al personal médico y de laboratorio del Hospital Infantil del Estado de Sonora; del Hospital Regional Militar del Estado de Sonora; del Hospital General de zona no. 2 del Instituto Mexicano del Seguro Social y del Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Sonora, que contribuyeron a la realización de este trabajo.

A la Dra. Verónica Mata Haro, por confiar en mí desde un inicio y darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo. Por instruirme y guiarme durante mi estancia en la institución y sobre todo a su infinita paciencia durante la realización de este trabajo.

También doy gracias a los miembros de mi comité: a la M. en C. Leticia Félix Valenzuela, a la Dra. Graciela Caire Juvera y al Dr. Jesús Hernández, por ayudarme y asesorarme durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a todo el equipo del Laboratorio de Inmunología, por ayudarme y sobre todo por su paciencia con este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Anna, Jorge, Marina y Pablo, que a pesar de nuestras personalidades tan diferentes, siempre estuvieron ahí para apoyarme en todo momento.

A Alejandro Molina Chavarría que nos apoyó en el procesamiento y recolección de las muestras.

Un agradecimiento en especial a Lety, por instruirme y guiarme durante la realización de este trabajo, y que pesar de estar ocupada siempre tenía tiempo. Pero sobre todo por tenerme mucha paciencia.

DEDICATORIAS

Le dedico este trabajo primeramente a mis padres, que nunca dejaron de apoyarme. Por su paciencia, comprensión y que siempre han estado ahí en los momentos más duros.

A mi hermano, porque con sus ocurrencias siempre me ha hecho sonreír en los momentos tensos de mi vida.

A Erick, por haber sido mi compañero, mi mejor amigo y mi confidente. Por su paciencia, comprensión y por todo el tiempo que dedicó para apoyarme con la escuela y sobre todo con la vida.

A mis amigos en general, por su apoyo incondicional y por los buenos ratos que siempre me han hecho pasar.

En especial a mi mejor amigo Edgar, donde quiera que te encuentres, toda la vida estarás presente en mi corazón.

CONTENIDO

Página

Lista de figuras……..…….....… ix

Lista de tablas……..……..…..……..... x

Resumen……..…….…. xi

Abstract…….……..…….…… xii

I. Introducción…….…..…….……. 1

II. Antecedentes……..…….…… 3

Características generales de norovirus……..…..…….…….. 3

Proteínas virales…….……..……..…..... 5

Variantes genéticas de norovirus……..……..... 6

Manifestaciones clínicas……..…... 8

Transmisión……..……..……...…. 8

Prevalencia de las principales enfermedades intestinales en México y en Sonora..…..……...……..... 11

Enfermedades intestinales definidas……..……..…….. 13

Enfermedades intestinales no definidas o mal definidas….. 16

Métodos para la identificación y diagnóstico de norovirus……..... 19

III. Hipótesis……...……..…..... 21

IV. Objetivo general…….…….…. 22

V. Objetivos específicos……..…. 23

CONTENIDO (Continuación)

Página

VI. Materiales y métodos……..……..……..……..……..… 24

Cálculo de tamaño de muestra……..……... 24

Recolección de muestras y diseño experimental……..…...…..…..... 24

Manejo de las muestras……..……..…..……... 25

Preparación de las muestras……..……..……. 26

Extracción de RNA viral……..……..……..…. 26

Selección de las muestras e identificación de norovirus mediante RT-PCR convencional y PCR semi-anidado……..... 26

Determinación de los genogrupos de NoV por RT-qPCR……..…..... 28

Secuenciación……..……..……... 29

VII. Resultados y discusión……..…..... 32

Muestreo……..……..…… 32

Detección de NoV mediante RT-PCR convencional……..……..… 35

Determinación de la prevalencia de NoV……. 35

Identificación de genogrupos de NoV mediante RT-qPCR…….. 41

Identificación de muestras positivas a NoV para secuenciación…..… 44

Alineamiento de secuencias……..……..…….. 46

Análisis filogenético para identificación de genotipos de No……...… 46

Consideraciones finales……..……..……..… 51

VIII. Conclusión……..…….. 52

IX. Recomendaciones……..……..…… 53

X. Bibliografía……...…….. 54

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

1. Cristalografía de rayos X de la estructura de la cápside de norovirus…….…... 4

2. Tendencia de casos nuevos de amebiasis intestinal en los Estados Unidos Mexicanos 2000-2011…….....……..….. 15

3. Tendencia de casos nuevos de fiebre tifoidea en los Estados Unidos Mexicanos 2000-2011……..... 15

4. Tendencia de casos nuevos de enfermedades intestinales de etiología conocida en los Estados Unidos Mexicanos de 2011 y 2013…….……...… 16

5. Tendencia de casos nuevos de enfermedades intestinales de etiología desconocida en México y Sonora en los años 2011 y 2013……...……..… 18

6. Región conservada del genoma de norovirus……...……..… 27

7. Región variable del genoma de norovirus……..…….…… 29

8. Periodo de recolección de muestras de Julio de 2013 a Mayo a 2014……..……..… 34

9. Gel representativo de la detección de NoV por PCR semi-anidado……...…. 38

10. Número de muestras positivas a NoV por rango de edades...…. 39

11. Signos clínicos de los pacientes positivos a NoV……..... 40

12. RT-qPCR de controles positivos de NoV GI con sonda VIC……. 42

13. Detección de fragmento de 800 pb para secuenciación…..…..... 45

14. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de NoV de este estudio……..……..... 48

15. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial de los genes *RdRp* y *VP1* (795 pb), de 5 NoV aislados en este estudio…….……..…… 50

LISTA DE TABLAS

Tabla **Página**

1. Número de casos de infecciones intestinales de niños y adultos en México, 2011……..……..…… 12

2. Número de casos de infecciones intestinales de niños y adultos en Sonora, 2011……..……..……... 13

3. Principales infecciones intestinales definidas, en México, 2011.....…. 14

4. Principales enfermedades intestinales definidas o de causa conocida, en Sonora 2011……. 17

5. Formato para la recolección de datos del paciente……..……. 25

6. Primers para RT-PCR convencional y PCR semi-anidado para detección de NoV……..…… 28

7. Primers y sondas para RT-qPCR para diferenciación de los genogrupos de NoV…….….. 29

8. Datos y procedencia de los pacientes que proporcionaron muestras para el estudio……..……..... 33

9. Resultados obtenidos de las muestras individuales por RT-PCR convencional…… 37

10. Identificación de genogrupos de NoV en muestras positivas por RT-qPCR.……..... 43

11. Matriz de identidad entre las cinco secuencias de NoV obtenidas en este trabajo y diez secuencias de referencias previamente publicadas para otros NoV……... 51

RESUMEN

Las enfermedades diarreicas constituyen uno de los problemas de salud más graves en el mundo, y sólo algunos de los agentes causales son identificados. Según datos internacionales, norovirus es uno de los agentes etiológicos más importantes de diarreas en niños y adultos. Sin embargo, en Sonora, no se tienen estadísticas de la presencia de este patógeno. Esto se debe a que no se realiza la búsqueda rutinaria, porque se carece de métodos sensibles y específicos para la detección de norovirus. Este patógeno es genéticamente diverso, y se clasifica en cinco genogrupos (GI-V), de los cuáles GI, GII y GIV, afectan a humanos. El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia y genogrupos de norovirus en niños y adultos con gastroenteritis que acudieron a hospitales de Hermosillo, Sonora. El diseño del estudio fue de tipo transversal. Se recolectaron muestras de heces diarreicas de niños y adultos (n = 100) con síntomas de gastroenteritis viral de cuatro principales hospitales de Hermosillo, Sonora. Además, se llevó a cabo la recolección de los datos demográficos y del historial médico de los pacientes. El trabajo se dividió en tres etapas. En la primera, se llevó a cabo la detección de norovirus por la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa convencional (RT-PCR). En la segunda etapa, la identificación de genogrupos por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) y en la tercera etapa la secuenciación de cepas seleccionadas. Se obtuvieron 77 % de muestras positivas a norovirus. Sin embargo, sólo en el 10 % de las muestras fue posible determinar el genogrupo, y se encontró que GII fue el genogrupo predominante.

Palabras claves: norovirus, enfermedades intestinales, RT-PCR en tiempo real, Sonora.

ABSTRACT

Diarrheic diseases are one of the most serious health problems in the world, and only some of the causal agents are identified. According to international data, norovirus is one of the most important etiological agents of diarrhea in children and adults. However, in Sonora, no statistics are available on the presence of this pathogen as a causal agent, since no routine screening is performed on regular basis, because of lack of sensitive and specific methods for the detection of norovirus. This pathogen is genetically diverse, and is classified in five genogroups (GI-V), of which GI, GII and GIV affect humans. The aim of the study was to determine the prevalence and predominant norovirus genogroups in children and adults with gastroenteritis in hospitals from Hermosillo, Sonora. The study design was cross-sectional. Diarrheic stool samples of children and adults (n = 100) with symptoms of viral gastroenteritis attending four of the major hospitals in Hermosillo, Sonora were collected. Demographic data and medical history of patients were also recorded. The work was divided into three stages. In the first one, a screening for positive samples to norovirus was carried out by conventional *reverse transcription polymerase chain reaction (*RT-PCR) for determination of prevalence. In the second stage, identification of genogroups by real time RT–PCR (RT-qPCR) was performed; and in the third stage, sequencing of selected strains (analysis of phylogenetic tree) was done. The results show 77 % of positive samples for norovirus, the majority of children. It was found that genogroup GII predominates among positive samples.

Key words: norovirus, intestinal diseases, real-time RT-PCR, Sonora.

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a datos internacionales, norovirus (NoV) es uno de los agentes etiológicos más importantes de diarreas en adultos, debido a su prevalencia en países desarrollados. Por ejemplo, NoV es responsable de aproximadamente 21 millones de casos anuales en los Estados Unidos. Sin embargo, en México se tienen pocos datos de la prevalencia de este patógeno ya que no se realiza la detección rutinaria del agente causal. Se presume entonces, que de las estadísticas de infecciones intestinales no clasificadas, un número importante sea a causa de NoV y su prevalencia sea similar a la de estos países desarrollados.

Norovirus es antigénica y genéticamente diverso. Basado en la secuencia completa de genes de la cápside (VP1) se han propuesto cinco genogrupos (GI-V), de los cuales GI, GII y GIV, afectan a los humanos causando gastroenteritis. Se transmite de manera fecal-oral a través de agua y alimentos. Su detección es de gran importancia por su alta infectividad ya que se requieren tan sólo 10 partículas virales para producir una infección. La infección por este patógeno ocurre en todo el año, pero es más común en el invierno. Su período de incubación es corto (48 horas) y la diarrea dura hasta tres días con períodos de vómito explosivo y dolor abdominal.

En particular, NoV es reconocido como la causa más importante de gastroenteritis no bacteriana aguda en los seres humanos de todas las edades. Además, es responsable de al menos el 50 % de todos los brotes de gastroenteritis a nivel mundial; sin embargo, la prevalencia de este agente es raramente registrada por los laboratorios en los países en desarrollo.

Es por esto, que se requiere desarrollar una herramienta diagnóstica eficaz para la identificación de NoV sin perder la sensibilidad. En este sentido, se puede implementar el uso de la tecnología de RT-qPCR, debido a que esta

técnica es más sensible que la RT-PCR convencional, ya que detecta concentraciones más bajas (menor a 5 copias) y su precisión (desviación estándar >2 %). Además, con la RT-qPCR se tiene la posibilidad de incorporar varios fluorocromos, lo que permite la detección de dos diferentes regiones del genoma de NoV, y por lo tanto, en una misma reacción se pueden determinar los genogrupos de importancia en humanos.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se plantea realizar la identificación y caracterización molecular de cepas de NoV en diarreas de niños y adultos en Sonora. Con los resultados obtenidos, se contribuirá con datos epidemiológicos de las cepas de NoV en México y Sonora; información que actualmente se desconoce.

II. ANTECEDENTES

Características Generales de Norovirus

Los virus son los patógenos más comunes que causan gastroenteritis a nivel mundial, en niños y adultos. Entre los más comunes están los adenovirus entéricos, astrovirus, rotavirus, sapovirus y recientemente norovirus (Dennehy, 2011; Eckardt y Baumgart, 2011; Monroe, 2011).

Norovirus pertenece a la familia *Caliciviridae*. Los géneros representativos de este grupo son vesivirus, lagovirus, sapovirus y norovirus. Las características principales de los calicivirus es que son esféricos, pequeños (miden entre 28 y 35 nm), no envueltos y contienen un genoma de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva (Koopmans et al., 2002). Esta familia de virus, es una causa común de diarrea aguda en todo el mundo (Gómez-Santiago et al., 2012). Además, los calicivirus han sido encontrados en la mayoría de los animales domésticos y silvestres, como cerdos, conejos, gallinas y anfibios (Ushijima et al., 2011).

La estructura de los viriones de calicivirus exhibe una simetría icosaédrica. La cápside contiene 90 dímeros de la proteína de cápside que forma una cubierta de la cual salen 90 capsómeros a modo de protuberancias de forma arqueada. Estos capsómeros se encuentran dispuestos de tal manera que forman 32 cavidades que son las que dan la apariencia de cálices en la superficie de la partícula viral. La auto-ordenación de la proteína de la cápside VP1 en pseudo-partículas virales (VLP) es un proceso eficiente que no requiere RNA ni la proteína menor de la cápside (VP2). Esta característica es de gran utilidad, ya que las VLP recombinantes (VLPr) expresadas en el sistema baculovirus se han utilizado como un sustituto de los viriones nativos. La

estructura atómica del VLPr de NoV se ha determinado mediante cristalografía de rayos X, definiendo dos dominios principales en VP1: la cubierta S y la protuberancia P (Figura 1). El dominio S forma la parte interna de la cápside que envuelve al genoma de RNA y mantiene los contactos icosaédricos de la estructura en T = 3, mientras que el dominio P forma las protuberancias de estructura arqueada que surgen de la cubierta y que contienen los dímeros de contacto (Torner-Gràcia, 2008; Wilhelmi et al., 2003).

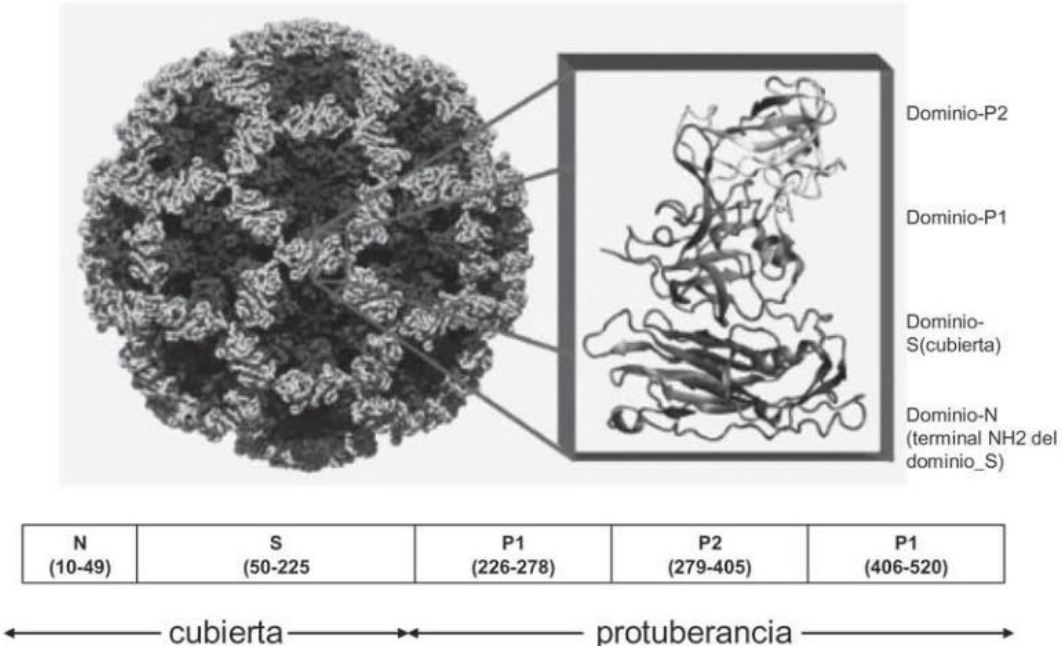


Figura 1. Cristalografía de rayos X de la estructura de la cápside de norovirus. En detalle, se muestra la estructura de las subunidades. Los residuos de los aminoácidos correspondientes a estos dominios se encuentran esquematizados en la parte inferior (Torner-Gràcia, 2008).

Al comparar las secuencias, se observa que el dominio S completo (aminoácidos 1-225) está relativamente conservado. El dominio P unido al S corresponde a la fracción C-terminal de la VP1 y es de naturaleza variable. El dominio P se encuentra dividido en el subdominio P1 formado por la secuencia de aminoácidos 226-278 y 406-520. El subdominio P2 está formado por la secuencia 279–405. Este último corresponde a la región VP1 con mayor

variabilidad secuencial y le confiere especificidad antigénica y de unión a receptores (Lochridge et al., 2005; Tan et al., 2003).

Proteínas Virales

Dentro de las proteínas estructurales en los viriones maduros de calicivirus, se encuentran tres: VP1, VP2 y VPg. La principal proteína estructural es VP1, de aproximadamente 60,000 daltons y se encuentra presente en 180 copias (90 dímeros) por virión. La predominancia de VP1 en la formación de la estructura de la cápside vírica es consistente con su papel como determinante del fenotipo antigénico y en las interacciones del virus con las células huéspedes. Los antígenos claves se encuentran en la proteína principal de la cápside VP1. Además, esta proteína, se ha empleado para investigación y desarrollo de métodos diagnósticos, estudios estructurales, relaciones antigénicas y como candidato potencial para el desarrollo de vacunas, entre otras (Torner-Gràcia, 2008).

La proteína estructural VP2, de 12,000 a 29,000 daltons, es considerada de menor proporción porque sólo está presente en dos copias del virión y su función no está bien definida. Se cree que la presencia de VP2 aumenta la eficiencia de la expresión de VP1 y mejora la estabilidad y maduración de la partícula viral (Bertolotti et al., 2003).

La VPg está unida por enlaces covalentes al RNA genómico de las células infectadas. Su presencia es minoritaria con una o dos copias en el virión y es probable que su función sea como una proteína no estructural durante la replicación (Torner-Gràcia, 2008).

Dentro de las proteínas no estructurales, se han identificado siete, NS1-NS7, algunas con función desconocida. En el caso de NS3, tiene función de nucleótido-trifosfatasa (NTPasa) que hidroliza al NTP. La función de NS5 es de VPg, presente en viriones y complejos de replicación de membrana unida por enlace covalente a RNA. La NS6 tiene función de proteinasa e intermediaria entre el anclaje y la liberación de proteínas expresadas en ORF1, así como en el anclaje de la proteína precursora de la cápside (PreVP1). La NS7 tiene

función de polimerasa dependiente de RNA, interacciona con VPg, PreVP1 y VP2 y se encuentra presente en complejos de replicación de membrana con extremo carboxiterminal en un punto con actividad de anclaje (Prasad et al., 1999; Torner-Gràcia, 2008).

Variantes Genéticas de Norovirus

El género NoV es altamente diverso dentro de la familia *Caliciviridae*. Actualmente, comprende 5 genogrupos: GI, GII, GIII, GIV y GV, en base a su análisis de la secuencia de los genes que codifican para las proteínas polimerasa (RdRp) y de la cápside (VP1). Solo los genogrupos GI, GII y GIV se han detectado en humanos. Estos tres genogrupos pueden subdividirse en 32 genotipos o clusters: 14 genotipos en GI, 17 en GII y 1 en GIV. La nomenclatura del genotipo primeramente se designa al genogrupo al cual pertenece (ya sea GI ó GII), seguido de un punto para separar y posteriormente denominar el clúster del cual se esté tratando. Por ejemplo, NoV GII.2 pertenece al genogrupo II, del genotipo 2. Además, los genotipos suelen denominarse por el nombre del lugar de origen de su identificación. Por ejemplo, los virus Norwalk, Southampton y Desert Shield corresponden a genotipos del genogrupo I (designados GI.1, GI.2 y GI.3, respectivamente), y los virus, Hawaii, Snow Mountain, México y Sydney corresponden a genotipos del genogrupo II (designados GII.1, GII.2, GII.3 y GII.4, respectivamente). La mayoría de los casos clínicos están originados por cepas de los genogrupos I y II (Bellido et. al., 2007; Gómez-Santiago et al., 2012; Torner-Gràcia, 2008; Yu et al., 2014).

Dentro de los genotipos de NoV más infectivos se encuentra GII.4, el cual ha sido la causa predominante de las grandes epidemias de gastroenteritis aguda en muchos países desde mediados de la década de 1990, y el brote de epidemias por GII.4 ha aumentado en los últimos años. En general, se estima que el genotipo GII.4 es el responsable de 60 a 80 % de todos los brotes de gastroenteritis asociados a NoV en todo el mundo (Yu et al., 2014).

Lo anterior se ha visto reflejado a lo largo de la historia. Por ejemplo, en el trabajo de Bok y colaboradores (2009), se reporta que la primer cepa

documentada de NoV GII.4 fue en 1987, en Washington, D.C., cuando se comenzaron a utilizar los métodos moleculares. Sin embargo, en el estudio que realizaron, analizaron por RT-qPCR, muestras de heces de niños entre los años 1974 y 1991 de un hospital infantil de Washington. Encontraron que el genotipo de NoV GII.4 ha estado circulando por más de tres décadas, ya que encontraron estas cepas en muestras desde 1974.

Por otro lado, en el trabajo de Tu y colaboradores (2008), se reportaron seis genotipos diferentes de GII en muestras tomadas en 2006, en Australia y Nueva Zelanda. Encontraron que NoV GII.4 predominó con el 86 % del total de muestras analizadas, siguiéndole GII.3 con el 9 % y GII.12 con el 2 %. Cabe señalar, que este estudio lo dividieron en dos partes: recolectaron y analizaron muestras los primeros seis meses del año 2006, el cual lo denominaron 2006a y después se hizo lo mismo el resto del año, denominándolo 2006b. Como otro hallazgo encontraron dos variantes nuevas de NoV GII.4, una en el primer periodo del estudio (2006a) y la otra variante en el segundo periodo (2006b). Por lo anterior, concluyeron que las gastroenteritis asociadas a NoV iban en aumento a nivel mundial.

Según datos de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en ingles) en Estados Unidos, en el periodo de septiembre de 2013 a mayo de 2014, se registró que 58 % de los brotes de gastroenteritis fueron causados por NoV GII.4, también denominado Sydney. Otros genogrupos en orden de prevalencia fueron GI.3 con el 16 %, y GII.13 con el 5 %. Por lo anterior y dado que NoV es considerado como una de las principales causas de gastroenteritis a nivel mundial, existen apartados especiales en las páginas web de CDC y el Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente de Alemania (RIVM, por sus siglas en alemán) para el estudio y la vigilancia epidemiológica de dicho patógeno denominadas Calicinet (http://www.cdc.gov/norovirus/reporting/calicinet/) y Noronet (http://www.rivm.nl/en/Topics/N/NoroNet), respectivamente.

Se estima que la variabilidad genética de NoV es altamente elevada. Por ello, la detección simultánea de un mismo genotipo en diferentes pacientes

vinculados epidemiológicamente se considera que indica la exposición a una fuente común. Además, para la identificación de NoV por RT-PCR convencional, la mayoría de los cebadores o primers descritos en la literatura amplifican secuencias de la región de la RNA polimerasa viral, la más conservada del genoma. A pesar de varios esfuerzos realizados para desarrollar cebadores universales o degenerados que pudieran detectar todas las cepas de NoV humanos circulantes, esto aún no se ha logrado (Bellido et. al., 2007; Torner-Gràcia, 2008).

Manifestaciones Clínicas

Las infecciones por norovirus ocurren en todo el año aunque es más común en el invierno, es por ello que se le conoce como la “enfermedad de los vómitos invernales”. El período de incubación es corto de 12-48 horas, después de ese tiempo aparecen náuseas, diarrea y vómito explosivo característico. El comienzo de los síntomas puede ser gradual o abrupto. La mayoría de las personas experimenta primero dolores abdominales, con náuseas o sin ellas. También se observan mialgias, astenia y cefaleas ocasionales. Cerca de la mitad de los casos presenta fiebre de bajo grado (38.3 ºC a 38.8 ºC). Las manifestaciones persisten habitualmente entre 48 y 72 horas y remiten sin secuelas (Bellido et. al., 2007; Koopmans y Duizer, 2004).

En general, las heces diarreicas son de una cantidad moderada, con 4 a 8 deposiciones durante 24 horas. No contienen sangre ni moco, y pueden ser acuosas; tampoco se observan leucocitos fecales. La enfermedad normalmente es leve y autolimitante, pero puede llegar a debilitar al paciente (Bellido et al., 2007; Koopmans y Duizer, 2004).

Transmisión

El principal mecanismo de transmisión es el fecal-oral, siendo el contacto directo de persona a persona muy eficiente. Es poco probable que este grupo de virus sea transmitido por vía aérea. Sin embargo, se ha implicado el vómito como vía de transmisión de estos virus. En este caso, la transmisión se

produciría a través de los aerosoles generados durante la emisión del vómito (Kapikian, 1997; Treanor y Dolin, 2005).

Se ha encontrado que la máxima eliminación de NoV es por las heces. Este patógeno, se elimina en los primeros días tras la infección, pero puede continuar incluso después de tres semanas, especialmente en niños pequeños. Además, las personas con inmunodeficiencias pueden eliminar el virus de forma crónica, aunque no se ha comprobado la transmisión de la infección por contacto con un eliminador crónico. Las personas sin síntomas pueden eliminar la misma cantidad de virus que las personas enfermas. Se calcula que aproximadamente el 50 % de las infecciones por norovirus son asintomáticas (Wilhelmi et al., 2003).

La infectividad de NoV se mantiene hasta 3 horas a un pH de 2.7 a temperatura ambiente, con tratamiento con éter al 20 % a 4 ^{o}C o incubando a 60 ^{o}C por 30 minutos. Resiste el tratamiento con hipoclorito de sodio entre 3.75–6.25 g/L (cloro libre residual 0.5 a 1.0 mg/L), concentración habitual en el agua potable y suficiente para inactivar otros virus entéricos. Sin embargo, se inactiva con 10 mg/L de cloro libre, considerada como la concentración para descontaminar agua no potable. NoV es más resistente a la cloración que rotavirus o poliovirus (Torner-Gràcia, 2008). La resistencia de NoV a un pH ácido por un periodo de tiempo prolongado a temperatura ambiente, explica cómo es que sobrevive al paso por el medio ácido del estómago.

Este grupo de virus ha sido frecuentemente identificado como causa de brotes transmitidos a través del agua y los alimentos contaminados a partir de los aportes de los propios manipuladores. El consumo de productos frescos, como frutas y verduras utilizadas para las ensaladas, las carnes mal cocidas o mariscos crudos, son reconocidos como vehículos de transmisión de NoV (Esseili et al., 2012). Este hallazgo también ha sido corroborado en un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, donde se detectaron partículas virales de NoV en vegetales frescos de empacadoras del norte del estado de Sonora. Los resultados mostraron que los vegetales contenían de 10^2 hasta 10^3 copias de RNA/g de NoV. Esto significa que existe el riesgo latente de infección

por NoV tras el consumo de verduras crudas en nuestra región, y de desarrollar gastroenteritis por NoV (Félix-Valenzuela et al., 2012).

Así mismo, en Sonora, los malos hábitos alimenticios de los habitantes inciden directamente en las enfermedades de tipo gastrointestinal. Además, estas enfermedades ocupan el tercer lugar entre las consultas médicas, teniendo prevalencia más alta en mujeres (Duarte, 2012).

El nivel de pobreza, el crecimiento demográfico y los factores de urbanización continuos, han dado lugar a la aparición dominante de la comida conocida como "alimentos de venta callejera" (Sina et al., 2011). La industria de los alimentos vendidos en la calle ofrece comidas baratas listas para consumir a la población de los países en desarrollo, como México (Estrada-García et al., 2002). Sin embargo, poco se sabe acerca del papel de los alimentos en la transmisión de gastroenteritis ocasionadas por norovirus.

En general, los alimentos de venta en la calle son productos ya elaborados listos para vender por los comerciantes ambulantes que se desplazan de un lugar a otro. Debido a su costo relativamente bajo, la comida callejera representa una de las formas más económicas de alimentación entre los trabajadores públicos de bajos salarios, estudiantes y artesanos. Desafortunadamente no hay un estándar higiénico que se respete durante su manipulación o venta (Sina et al., 2011).

La seguridad de los alimentos de venta callejera depende de varios factores, incluyendo la calidad de los diferentes utensilios, las prácticas de higiene durante su manipulación, la conservación y su distribución (Sina et al., 2011). Además, la poca información disponible sobre los vendedores callejeros de alimentos indica que es limitada su educación y casi nulo su conocimiento de las prácticas higiénicas (Arámbulo et al., 1995). Desafortunadamente, estos factores higiénicos son generalmente ignorados en el proceso de venta que conduce a enfermedades tales como la gastroenteritis y las diarreas de origen microbiano (Sina et al., 2011).

Actualmente, NoV es responsable de aproximadamente 21 millones de casos anuales en los Estados Unidos, de los cuales 5.5 millones son

transmitidos por los alimentos (Monroe, 2011). La diversidad de los alimentos ofrecidos en las calles, es inmensa y se origina en la amplia gama de grupos étnicos indígenas foráneos y sus características culturales (Arámbulo et al., 1995). Por ello, las infecciones virales transmitidas por los alimentos y el agua son cada vez más numerosas. Este incremento se debe a las diferentes formas de preparar los alimentos, y debido a su disponibilidad, el consumo es alto. Como resultado, pueden ocurrir grandes brotes debido a la contaminación de los alimentos por una sola persona o en una misma fuente (Koopmans et al., 2002).

La diversidad de la comida de la calle aumenta el riesgo potencial y crea la necesidad de clasificar los tipos de alimentos vendidos en función de su composición. Por ejemplo, los productos de origen animal tienen un contenido elevado de proteína y de humedad, un pH relativamente alto y una cantidad comparativamente grande de ingredientes. Por consiguiente, tienen una mayor manipulación, y debido a ello, son los que entrañan los riesgos más altos de transmisión de infecciones (Arámbulo et al., 1995).

Particularmente, también están implicados aquéllos alimentos que tienen contacto con agua contaminada con NoV y se consumen después de la manipulación sin recibir ningún tratamiento adicional. Por ejemplo, los moluscos bivalvos como las ostras o las almejas, son capaces de filtrar y concentrar los microorganismos del agua contaminada. Además, los NoV son estables dentro de un rango de temperaturas ya que sobreviven a la congelación, la refrigeración y el calentamiento de hasta 60 ^{o}C. De ahí que también se puedan encontrar en hielos elaborados con agua contaminada, como los raspados, o bien que la superficie del mismo hielo se haya contaminado (Cannon et al., 1991; Khan et al., 1994).

Prevalencia de las Principales Enfermedades Intestinales en México y en Sonora

Las enfermedades diarreicas constituyen uno de los problemas de salud más graves en el mundo, afectando principalmente a niños menores de 4 años y

adultos entre 25 y 44 años. En México, sólo se han identificado algunos de los agentes causales. La Secretaría de Salud (SSA) registró 1’108,142 casos en 2011 cuya etiología fue definida y más de 6 millones fueron agrupados como “infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas” (Tabla 1), es decir aquellas donde no fue posible identificar a un patógeno específico. Este grupo de enfermedades no definidas fue la segunda causa de morbilidad en 2011 y de acuerdo a los datos de los últimos 3 años de la misma Secretaría, ha tendido a aumentar (http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver_ejecutiva_2011.pdf).

Tabla 1. Número de casos de infecciones intestinales de niños y adultos en México, 2011 (SUIVE, 2011).

	Población		
Enfermedad	**General**	**Masculina**	**Femenina**
Definidas	1’108,142	463,728	644,414
No definidas	6’026,947	2’705,498	3’321,449
Total	7’135,089	3’169,226	3’965,863

En Sonora, se registraron 180,328 casos de enfermedades intestinales no definidas, pero sólo 17,062 casos fueron clasificados con etiología conocida (Tabla 2). Lo anterior, nos indica que hay 163,266 casos de enfermedades intestinales que podrían ser atribuibles a virus, y que de éstos, posiblemente la mayoría se deban a norovirus (NoV) (http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/ver_ejecutiva_2011.pdf).

Tabla 2. Número de casos de infecciones intestinales de niños y adultos en Sonora, 2011 (SUIVE, 2011).

	Población		
Enfermedad	**General**	**Masculina**	**Femenina**
Definidas	17,062	7,388	9,674
No definidas	180,328	81,885	98,443
Total	197,390	89,273	108,117

En cuanto a la prevalencia de NoV en países desarrollados, se tiene que en Estados Unidos se han registrado 70,000 hospitalizaciones y 800 muertes debido a este patógeno (Monroe, 2011). Además, en 2012, se reportó un aumento del 39 % de los casos en los brotes de enfermedades intestinales por NoV, registrados en el período de septiembre (19 %) a diciembre (58 %). También, en diciembre de 2012, se reportaron en la Unión Europea, 750,000 casos en Reino Unido y 10,000 casos en Alemania a causa de NoV (http://www.cdc.gov/spanish/especialesCDC/Norovirus/).

Las infecciones intestinales representaron la segunda causa de morbilidad en el país en 2011. El Instituto Mexicano del Seguro Social y la Secretaría de Salud reportaron en forma conjunta más del 74.4 % de los casos de dichos padecimientos. También, cabe señalar que la incidencia nacional (4,837.85 casos por cada 100,000 habitantes) se incrementó por tercer año consecutivo, aun cuando fue 7 % menor a lo registrado en el año 2000. Todo esto nos indica que la tendencia no parece mostrar cambios significativos en su comportamiento (SUIVE, 2011).

Enfermedades Intestinales Definidas

Se dice que una infección o enfermedad es definida, cuando se conoce (o define) clínicamente el agente causal biológico que la produce en el ser humano. El número de casos de estas enfermedades se ha ido registrando gracias a las vigilancias epidemiológicas en las distintas instituciones del sector salud.

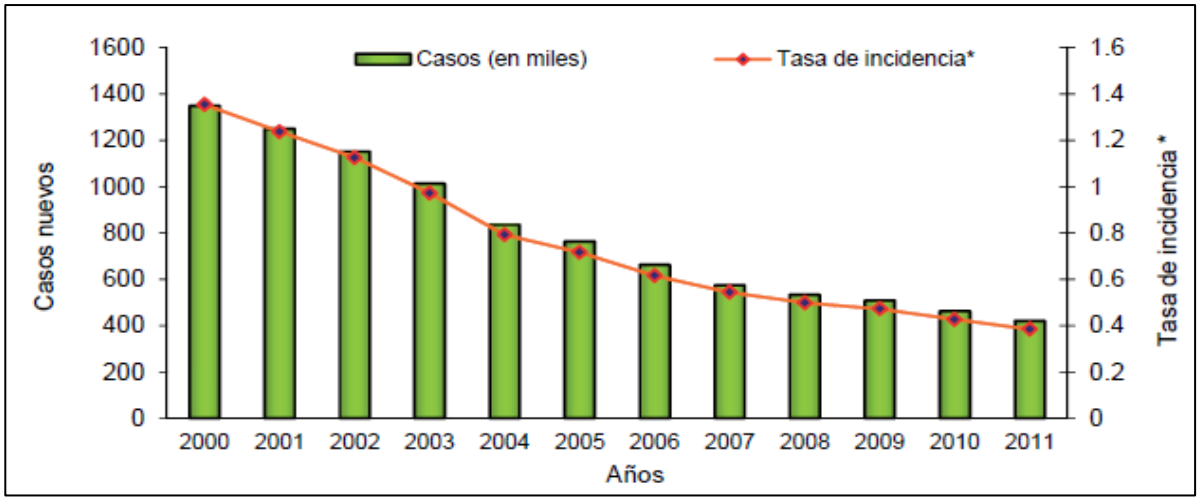
En México, se han identificado pocos agentes causales de las enfermedades intestinales. La Secretaría de Salud registró en 2011, 1’108,142 casos cuya etiología fue definida (Tabla 3). La amebiasis intestinal, por ejemplo, es un padecimiento cuya frecuencia ha ido descendiendo en nuestro país (Figura 2). También se puede observar este descenso en el resto de las infecciones, con excepción de las intoxicaciones alimentarias bacterianas y la fiebre tifoidea, se han mantenido constantes, comparadas con otros años (Figura 3).

Tabla 3. Principales infecciones intestinales definidas, en México, 2011 (SUIVE, 2011).

	Población					
	General		Masculina		Femenina	
Enfermedad	Casos	Incidencia*	Casos	Incidencia*	Casos	Incidencia*
Amebiasis intestinal	419,564	384.15	183,224	341.87	236,340	424.88
Otras helmintiasis	311,230	284.96	136,875	255.39	174,355	313.45
Paratifoidea y otras salmonelosis	122,345	112.02	39,535	73.77	82,810	148.87
Otras por protozoarios	78,531	71.90	35,232	65.74	49,299	77.84
Ascariasis	77,950	71.37	35,080	65.45	42,870	77.07
Fiebre tifoidea	48,055	44.0	13,861	25.86	34,194	61.47
Intoxicación alimentaria bacteriana	44,467	40.71	19,921	37.17	24,546	44.13
Total	1,108,142	981.10	463,728	845.36	644,414	1,121.08

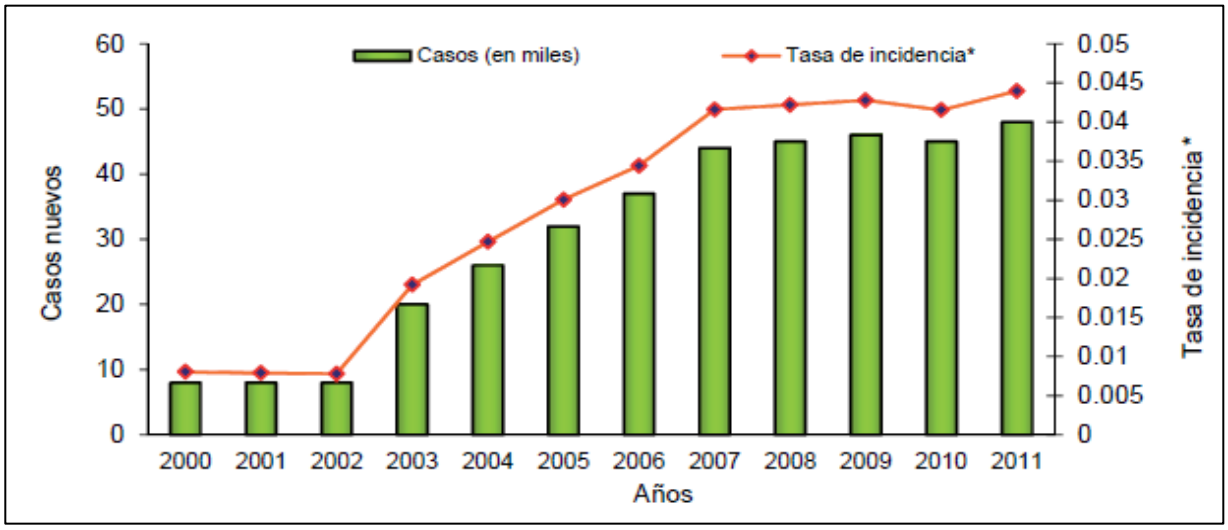
* Tasa de incidencia por 100,000 habitantes

En la Tabla 3, se puede observar que la incidencia es mayor en el grupo femenino que en el masculino en nuestro país. Posiblemente esto se atribuya, a que las mujeres hacen mayor uso de los servicios de salud y acuden con mayor frecuencia a la consulta, principalmente si están en edad reproductiva.



* Tasa de incidencia por 100 habitantes

Figura 2. Tendencia de casos nuevos de amebiasis intestinal en los Estados Unidos Mexicanos 2000-2011 (SUIVE, 2011).



* Tasa de incidencia por 100 habitantes

Figura 3. Tendencia de casos nuevos de fiebre tifoidea en los Estados Unidos Mexicanos 2000-2011(SUIVE, 2011).

En el 2013, se publicaron registros nuevos en el Boletín Epidemiológico en la edición en línea del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). De acuerdo a estos datos, se registraron 6’489,290 casos nuevos de enfermedades infecciosas intestinales en el país, en donde la amebiasis intestinal predomina con 2’251,840 de casos. También cabe señalar, que se agregaron otras enfermedades que no habían sido registradas anteriormente en dicho Boletín (Figura 4). En comparación con los casos totales de enfermedades intestinales del año 2011 (1’108,142), esta cifra va en aumento, por lo que es indispensable tomar medidas para el control de las enfermedades intestinales (SINAVE, 2013).

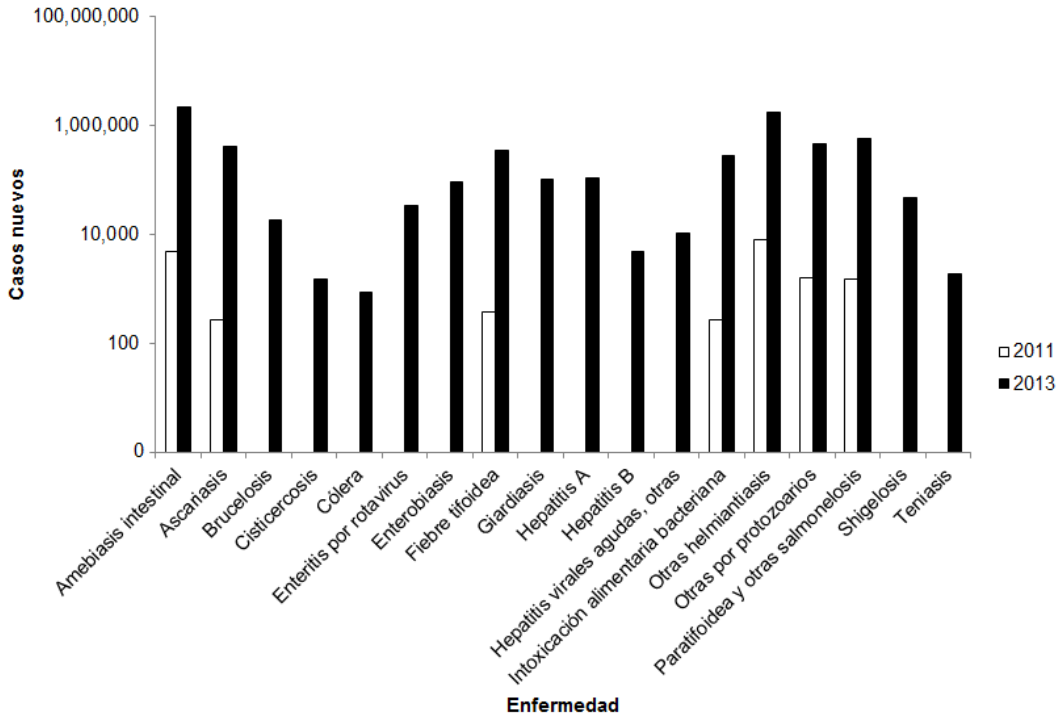


Figura 4. Tendencia de casos nuevos de enfermedades intestinales de etiología conocida en los Estados Unidos Mexicanos de 2011 y 2013. Datos tomados de SUIVE, 2011 y SINAVE, 2013.

Enfermedades Intestinales No Definidas o Mal Definidas

Las enfermedades intestinales clasificadas como mal definidas, son aquellas de etiología desconocida o mal diagnosticadas clínicamente. En estos casos, se desconoce el organismo que produce dicha enfermedad en el ser humano, a

pesar de visualizar los síntomas. Incluso le atribuyen la enfermedad a un organismo de manera errónea. Es entonces cuando se hace un mal diagnóstico y por consecuencia, un mal tratamiento.

En México, de acuerdo a la Secretaría de Salud, en 2011 se registraron más de 5 millones de casos de enfermedades intestinales, clasificadas como “infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas”. En ese mismo año, en Sonora, se registraron 180,328 casos de enfermedades intestinales no definidas, pero sólo 17,062 casos fueron clasificados con etiología conocida (Tabla 4). Lo anterior, nos indica que hay 163,266 casos de enfermedades intestinales que podrían ser atribuibles a virus, y que de éstos, un gran número pueda deberse a NoV. Desafortunadamente, existen pocos datos epidemiológicos reportados de este patógeno (Gómez-Santiago et al., 2012).

Tabla 4. Principales enfermedades intestinales definidas o de causa conocida, en Sonora 2011 (SUIVE, 2011).

	Población					
	General		Masculina		Femenina	
Enfermedad	Casos	Incidencia*	Casos	Incidencia*	Casos	Incidencia*
Amebiasis intestinal	4,825	188.93	2,158	166.72	2,667	211.75
Otras helmintiasis	8,151	319.16	3,588	277.19	4,563	362.28
Paratifoidea y otras salmonelosis	1,519	59.48	440	33.99	1,079	85.67
Otras por protozoarios	1,646	64.45	804	62.11	842	66.85
Ascariasis	264	10.34	125	9.66	139	11.04
Fiebre tifoidea	381	14.92	146	11.28	235	18.66
Intoxicación alimentaria bacteriana	276	10.81	127	9.81	149	11.83
Total	17,062	640.83	7,388	551.50	9,674	731.28

* Tasa de incidencia por 100,000 habitantes

Existen datos publicados en el 2013, en el boletín epidemiológico en línea del SINAVE, donde fueron registrados 36’292,211 casos nuevos de enfermedades intestinales de etiología desconocida en el país. De estos casos sin identificar, 1’069,032 provienen del estado de Sonora, de los cuales sólo se registraron 245,883 casos como enfermedades intestinales de etiología conocida. Comparando estos registros, con los acumulados del año 2011 (Figura 5), el número de casos de enfermedades intestinales sin identificar también va en aumento. Por lo que es de suma importancia implementar medidas de prevención más eficiente y métodos óptimos para el diagnóstico de estas enfermedades.

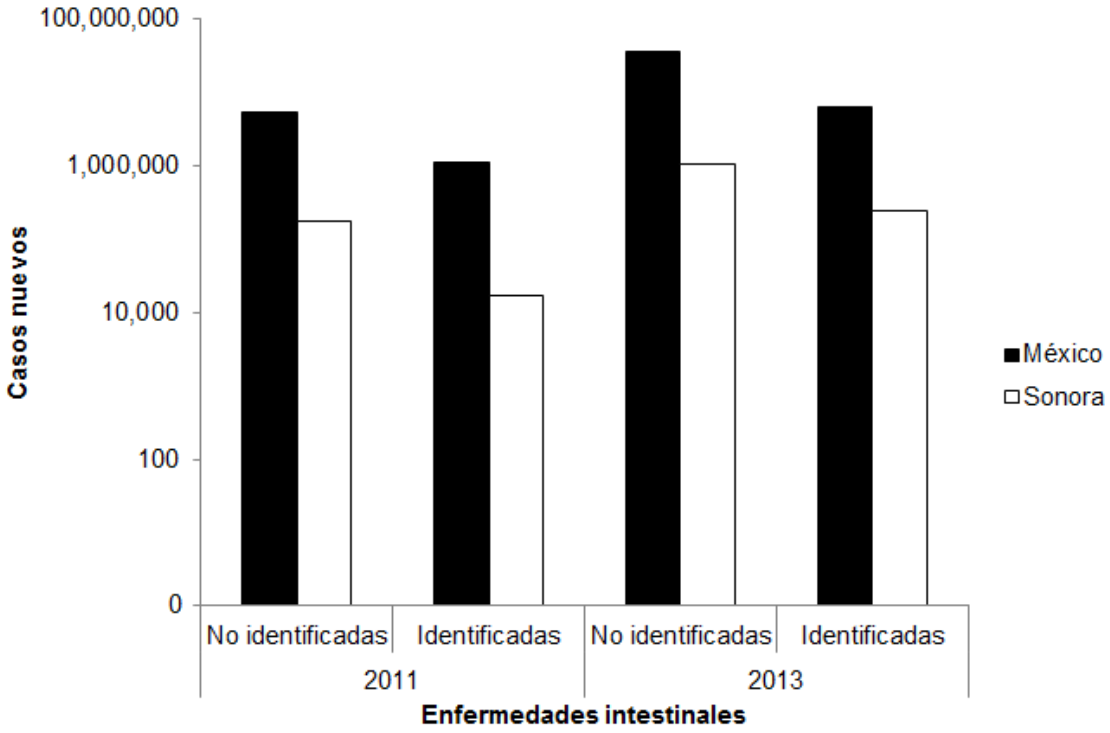


Figura 5. Tendencia de casos nuevos de enfermedades intestinales de etiología desconocida en México y Sonora en los años 2011 y 2013. Datos tomados de SUIVE, 2011 y SINAVE, 2013.

Métodos para la Identificación y Diagnóstico de Norovirus

A pesar de su elevada incidencia, sólo una minoría de los brotes causados por NoV llega a confirmarse mediante pruebas de laboratorio. La levedad de la infección y la dificultad para disponer de procedimientos diagnósticos hacen que esta enfermedad se infravalore. Para el diagnóstico de brotes se recomienda, idealmente, la obtención rápida de muestras de heces líquidas o semisólidas de pacientes en la fase aguda de la enfermedad (48-72 horas tras el inicio) (Bellido et al., 2003).

Existe una variedad de técnicas para detectar norovirus en muestras de heces: microscopía electrónica, aglutinación de látex, inmunoensayos enzimáticos y amplificación por PCR. La diferencias de las prevalencias publicadas de NoV podría deberse en primer lugar a la metodología utilizada. Por ejemplo, el inmunoensayo enzimático de los kit comerciales, es el método más común para el diagnóstico de NoV, ya que ofrece simplicidad y buena especificidad, pero es un método con baja sensibilidad. Un ejemplo de lo anterior, es el método inmunoenzimático ELISA RIDASCREEN, que tiene la ventaja de ser fácil, rápido y de muy buena especificidad (97.5 %), pero su sensibilidad es moderada (60 %) cuando se compara con RT-PCR (98 % de especificidad y 93 % de sensibilidad). Otro método muy utilizado para la rápida identificación de NoV y de otros virus, es la aglutinación de partículas de látex. Este método, aunque tiene una sensibilidad y una especificidad del 90 %, aún siguen siendo bajas en comparación con RT-PCR (Dung et al., 2013; Milián et al., 2010; Ochoa y Velapatiño, 2012; Vila et al., 2009).

Típicamente, la sensibilidad en la detección viral en el material biológico se puede aumentar usando métodos moleculares. Por ejemplo, la RT-PCR, detecta concentraciones muy bajas de carga viral (10^2-10^4 partículas virales por mililitro de heces) en comparación a los inmunoensayos enzimáticos (Dung et al., 2013; Sánz et al., 2008). Además, la implementación de RT-PCR es considerada el estándar de oro para la confirmación de las diarreas por norovirus, ya que permite diagnosticar no sólo casos clínicos de infecciones por

NoV, sino también detectar su presencia en muestras ambientales, agua, alimentos y heces (Alvarado-Ríos y Castillo-Aguilar, 2012; Sánz et al., 2008, Torner-Gràcia, 2008). Sin embargo, la variabilidad genética de estos virus hace difícil el desarrollo de una prueba de amplificación simple y genérica. Por ello, se recomienda efectuar esta diferenciación por técnicas de secuenciación genómica para su confirmación (Logan et al., 2006; Sánz et al., 2008).

Por otra parte, se sabe poco acerca de la caracterización molecular de los calicivirus en todo el país, principalmente NoV (Gómez-Santiago et al., 2012). Debido a lo anterior, existen pocos estudios y datos epidemiológicos sobre las enfermedades intestinales en el noroeste de México, principalmente en Sonora. Este estado, es una población representativa del Noroeste del país, con los índices de diarreas no diagnosticadas más elevados de México (SUIVE, 2011). Por lo anterior, es imprescindible ampliar estudios sobre la incidencia y prevalencia de NoV. Para ello, se requiere de la optimización de un método para la identificación de cepas de este patógeno de importancia en humanos, como una herramienta auxiliar diagnóstico de enfermedades intestinales. Estos padecimientos son una de las principales causas de consultas médicas y mortalidad en Sonora. Con los datos obtenidos, se contribuirá con el conocimiento de la epidemiología de las cepas circulantes de NoV, en México y Sonora.

III. HIPÓTESIS

Existe una alta prevalencia de norovirus en Hermosillo, Sonora similar a la de países desarrollados y el genotipo GII.4 es la cepa predominante.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia y genogrupos de norovirus en niños y adultos con gastroenteritis que acuden a hospitales de Hermosillo, Sonora**.**

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la prevalencia de norovirus en heces diarreicas de niños y adultos que acuden a hospitales en Hermosillo, Sonora mediante RT-PCR convencional.

2. Identificar los genogrupos de los aislados de norovirus obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real.

3. Analizar la secuencia de nucleótidos de las cepas encontradas mediante herramientas bioinformáticas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Cálculo de Tamaño de Muestra

El tamaño de muestra necesario para este estudio, se obtuvo mediante la fórmula utilizada para calcular el tamaño de muestra para estimar una proporción. Dado que la prevalencia de gastroenteritis por NoV en países desarrollados, como Estados Unidos fue de 58 % (según datos de CDC, en el 2012), se utilizó para el cálculo una prevalencia igual o mayor a la de este país, por lo que se manejó una prevalencia esperada de 80 %. Además, se fijó el nivel de confianza al 95 %, con el $\alpha = 0.05$ y el error admitido o precisión fue del 8 %. Se obtuvo un tamaño de muestra de 96 pacientes, pero para fines prácticos de este trabajo, se redondeó a 100 personas.

(1) $$n = \frac{z^2 pq}{B^2}$$

Recolección de Muestras y Diseño Experimental

El diseño es de tipo transversal. Este tipo de estudios se dirigen primordialmente a la frecuencia y distribución de eventos de la salud y enfermedad dentro de una población definida y en un periodo de tiempo. Además, este diseño se utiliza para explorar y generar hipótesis de investigación, así como estimar la prevalencia de algunas enfermedades e identificar posibles factores de riesgo. No involucran el seguimiento del paciente (Hernández y Velasco-Mondragón, 2000).

Se recolectaron muestras de heces de pacientes adultos (de 18 a 60 ó más años de edad) y/o niños y adolescentes (entre 0 y 12 años y entre 13 y 17 años de edad, respectivamente), del sexo masculino o femenino, que asistieron a consulta en el periodo de agosto de 2013–mayo de 2014, en los servicios de

salud de Hermosillo, Sonora. Los criterios de inclusión fueron que los pacientes presentaran diagnóstico clínico de gastroenteritis viral (diarrea explosiva, con o sin vómito; náusea y dolor abdominal). Además, se llevó a cabo la recolección de los datos demográficos y del historial médico de los pacientes de manera escrita, llenado por el médico, para lo cual se utilizó el formulario descrito en la Tabla 5. Las muestras fueron proporcionadas por el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), el Hospital Regional Militar de Hermosillo, Sonora, el Hospital General de zona no. 2 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Centro Médico "Dr. Ignacio Chávez" del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Sonora (ISSSTESON).

Tabla 5. Formato para la recolección de datos del paciente.

CARACTERIZACIÓN DE GENOTIPOS DE NOROVIRUS EN HECES DIARREICAS COLABORACIÓN CON CIAD	
DATOS DEL PACIENTE	
Nombre (iniciales del paciente):	
Edad:	
Sexo:	
DATOS DE SALUD	
Estado nutricional:	
Vómito (Sí/No):	
Inicio de diarrea (Fecha):	
Inicio de otros síntomas(Fecha):	
Presencia de sangre en heces (Sí/No):	
Presencia de mocos en heces (Sí/No):	
DATOS DEMOGRÁFICOS	
Colonia donde habita:	
OBSERVACIONES ADICIONALES	

Manejo de las Muestras

Las muestras de heces fueron recolectadas en recipientes plásticos estériles con tapa de rosca. En caso de pacientes hospitalizados o de infantes donde no fue posible la recolección de heces, se tomaron aproximadamente 1 g de heces mediante un hisopo de dacrón y se almacenaron en el medio de transporte Hanks SIGMA® (solución de $CaCl_2$, $MgSO_4$, KCl, KH_2PO_4, $NaHCO_3$, NaCl, glucosa y rojo de fenol) adicionado con glicerol y antibióticos (penicilina 200

U/mL, estreptomicina 200 µg/mL y anfotericina 10 µg/mL) ajustado a un rango de pH de 7.2–7.6, para garantizar la viabilidad del virus y reducir el crecimiento bacteriano. Todas las muestras obtenidas fueron transportadas en hieleras a temperaturas de refrigeración al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) donde se llevó a cabo el procedimiento experimental. Una vez recibidas las muestras, se procedió a la extracción del RNA viral y se congeló para su uso posterior.

Preparación de las Muestras

Para minimizar el tiempo de identificación de NoV, se hicieron pools mezclando cuatro o cinco muestras de heces. Para ello, se tomó una alícuota de un mL del sobrenadante de cada muestra (tubo con medio de transporte inoculado con las heces), y se agitó suavemente por 15 segundos. En caso de que el medio se observara turbio, se centrifugó a 4, 500 rpm por 30 minutos, antes de hacer el pool y se refrigeró a 4 ^{o}C, para su posterior uso.

Extracción de RNA Viral

Se llevó a cabo la extracción del RNA viral de cada pool de muestras, con el kit comercial QIAamp™ Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se almacenó a -20 °C hasta su uso para RT-PCR convencional.

Selección de las Muestras e Identificación de NoV Mediante RT-PCR Convencional y PCR Semi-anidado

Para la identificación de NoV, se realizó la RT-PCR convencional para cada concentrado de muestras, utilizando el kit comercial OneStep RT-PCR kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los primers específicos para la identificación de NoV que se utilizaron, fueron los descritos en la Tabla 6 (Vinjé et al., 2004). Los primers son afines a la unión ORF1-ORF2. En esta unión, se encuentra el gen RdRp (ORF1) que codifica para la polimerasa dependiente de RNA. Este gen a su vez, está unido al gen

VP1 (ORF2) que codifica para la proteína VP1, que conforma en su mayoría, la cápside del virus. Esta unión, es la región conservada de NoV y sirve para la identificación del patógeno (Figura 6) (Vinjé et al., 2004). Las condiciones que se utilizaron en el termociclador consisten en un ciclo para la transcripción reversa de 50 ^{o}C por 30 min, seguido de un ciclo para la activación de la enzima de 95 ^{o}C por 15 min; 40 ciclos de 94 ^{o}C por 30 segundos para la desnaturalización, para la alineación fue de 45 ^{o}C por un min, para la extensión de 72 ^{o}C por un min y un ciclo para la extensión final de 72 ^{o}C por 10 min. El equipo que se utilizó es MJ Mini™ Personal ThermalCycler (BIO-RAD®, Berkeley, CA, Estados Unidos).

Figura 6. Región conservada del genoma de norovirus. La parte encerrada con una elipse, representa la región para la identificación del patógeno, que abarca de 4,000 pb a 5,500 pb (Donaldson et al., 2010).

Posteriormente, el material genético obtenido de la RT-PCR convencional, se sometió PCR semi-anidado, con los primers Mp 290 y Reg A (Vinjé et al., 2004) descritos en la Tabla 6 y siguiendo las condiciones descritas por León-Félix et al., 2010. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con Biotium GelRed™ (Hayward, CA, Estados Unidos) utilizando como solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA 1X (TAE 1X, Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM.) y el marcador de peso molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Los geles fueron visualizados utilizando el equipo Gel Doc™ (BIO-RAD®, Berkeley, CA, Estados Unidos) con el programa ImageLab™ 2.0. Si la reacción resultaba positiva a NoV (banda de aprox. 316 pb) en algún pool, se procedió a realizar la extracción de RNA viral de cada una de las muestras individuales que conformaron dicho pool, en caso contrario, se procedió a descartarlas.

Tabla 6. Primers para RT-PCR convencional y PCR semi-anidado para detección de NoV (Vinjé et al., 2004).

Primer	Secuencia (5' – 3')	Orientación	Posición	Tamaño de producto (pb)
MJV 12	TAYCAYTATGATGCHGAYTA	+	4553-4572	327
Reg A	CTCRTCATCICCATARAAIGA	-	4859-4879	
Mp 290	GAYTACTCYCSITGGGAYTC	+	4564-4583	316
Reg A	CTCRTCATCICCATARAAIGA	-	4859-4879	

R = A/G, Y = C/T, y I =Inosina.

Determinación de los Genogrupos de NoV por RT-qPCR

Para determinar los genogrupo I y II de NoV, se utilizó RT-qPCR para cada muestra identificada como positiva mediante PCR semi-anidado. Para lo cual se utilizaron los primers específicos para genogrupo I y II descritos en la Tabla 7 (Kageyama et al., 2003). Estos primers son afines al dominio S dentro del ORF2, en donde se encuentra la región genética variable del virus, y por lo tanto, la identificación del genogrupo (Figura 7) (Yu et al., 2014). Para ello, se utilizaron dos sondas TaqMan® marcadas cada una con un fluoróforo diferente para identificar cada genogrupo (VIC para GI y FAM para GII) (Pang et al., 2005); ambas diseñadas por la compañía Integrated DNA Technologies® (Coraville, IA, Estados Unidos). La reacción de RT-qPCR se realizó con kit comercial OneStep RT-PCR kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El equipo utilizado fue el SmartCycler® (Cepheid, Sunnyvale, CA, Estados Unidos), módulo I-CORE™, para análisis de los datos. Las condiciones que se utilizaron en el termociclador consistieron en un ciclo para la transcripción reversa a 50 ^{o}C por 30 min, seguido de 95 ^{o}C por 10 min; 45 ciclos de un min a 95 ^{o}C y un min a 55 ^{o}C. Como controles positivos, se utilizaron cepas donadas por la Dra. Ana Lorena Gutiérrez del Laboratorio de Infectómica y Patogénesis Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Tabla 7. Primers y sondas para RT-qPCR para diferenciación de los genogrupos de NoV (Kageyama et al., 2003).

Genogrupo	Primer	Secuencia (5' – 3')	Orientación	Posición	Tamaño de producto (pb)
GI	RING1 (sonda)	VIC/AGATYGCGRTCYCCTGTCCA/ BHQ	-	5340	85
	COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	+	5291	
	COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	-	5375	
GII	RING2 (sonda)	FAM/TGGGAGGGCGATCGCAATCT/ BHQ	+	5048	98
	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	+	5003	
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	-	5100	

R = A/G, B = C/G/T, Y = C/T y N= A/C/G/T.

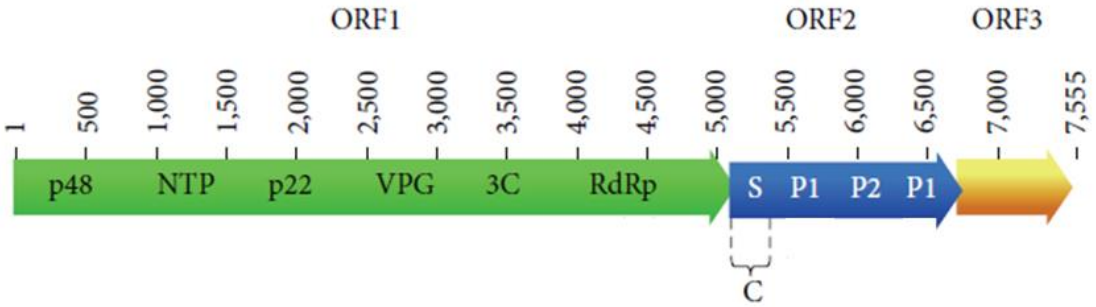


Figura 7. Región variable del genoma de norovirus. La parte denominada con la letra C representa el dominio S, el cuál es la región utilizada para la diferenciación entre genogrupos y abarca de 5,000 pb a 5,500 pb (Yu et al., 2014).

Cabe señalar, que no se llevó a cabo la identificación de NoV genogrupo IV (GIV), dado que no se contaba con el control positivo del mismo. Además, no se tenían los primers y la sonda específicos, para llevar a cabo la estandarización del protocolo, para su identificación mediante RT-PCR y RT-qPCR.

Secuenciación

Para el proceso de secuenciación, los productos de RT-qPCR no son adecuados, ya que son secuencias muy cortas (84 pb para NoV GI y de 97 pb para NoV GII). Por lo tanto, de las 77 muestras positivas a NoV, de manera aleatoria se seleccionaron 16 (muestras 4, 6, 9, 19, 25, 28, 38, 43, 50, 68, 74,

80, 85, 87, 96, 100, además del control positivo donado por la dra, Gutiérrez denominado GM). Para estas muestras, se obtuvieron un fragmento de mayor tamaño (823 pb) con los primers MJV12 (Vinjé et al., 2004) y COG1R (Kageyama et al., 2003), dentro de la unión de ORF1-ORF2, mediante RT-PCR. A partir de estos fragmentos, se anidaron con los primers Mp290 (Vinjé et al., 2004) y COG1R (Kageyama et al., 2003) para obtener un fragmento de aproximadamente 800 pb por RT-PCR. Posteriormente, estos productos de RT-PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2 %. Esta secuencia incluye las regiones para diferenciar NoV GI de NoV GII.

Los productos de RT-PCR fueron purificados con el kit QIAEX® II Gel Extraction kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania) y se enviaron a la University of Arizona Genetics Core (Tucson, Arizona) para realizar su secuenciación, mediante electroforesis capilar con el equipo Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Este método consiste en la creación automatizada de una secuencia a partir de un templado de DNA por medio de la unión de dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos. La fluorescencia es leída por electroforesis y traducida en una secuencia (Doorn et al., 2009). Una vez recibidos los electroferogramas sentido y anti-sentido, se depuraron para obtener las secuencias consenso con el programa Chromas Lite versión 2.1.1 (Technelysium, Pty, Ltd), para su posterior comparación con secuencias de la base de datos de la Herramienta de Búsqueda de Alineaciones Locales Básicas (BLAST, por sus siglas en inglés) proporcionado por el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (Bethesda, MD, Estados Unidos).

Para el alineamiento de las secuencias obtenidas se utilizó el programa BioEdit versión 7.2.5 y para el árbol filogenético se utilizó el programa Mega versión 4.0, mediante el análisis de bootstrap de 1000 réplicas, y generado por el método Neighbor-Joining. Este método, tiene la finalidad de unir las secuencias más cercanas (vecinas) tratando de minimizar la longitud total del árbol (Saitou y Nei, 1987). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el

método de máxima verosimilitud (Tamura et al., 2004) y se encuentran en las unidades de número de sustituciones de bases por sitio. Además, las posiciones con alineaciones vacías y datos faltantes, fueron eliminadas con la comparación de secuencias por pares (opción *pairwise deletion*). Como resultado, se obtuvo una secuencia final de 795 posiciones.

Los números de acceso de GenBank incluidos en el análisis filogenético, de los genes RdRp y VP1 de las cepas de NoV como referencia, fueron los siguientes: AY134748 (GII.2, virus Snow Mountain, Estados Unidos), DQ078829 (GII.4,virus Sydney), GU299761 (GI.8, Estados Unidos), HM635108 (GII.14, Corea del Sur), HM635168 (GII.2, virus Snow Mountain, Corea del Sur), JX846929 (GI.3, virus Desert Shield), KJ196298 (GI.8, Japón), M87661 (GI.1, virus Norwalk), U07611(GII.1, virus Hawaii), U22498 (GII.3, virus México).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestreo

Se recolectaron 100 muestras de heces diarreicas, de las cuales 48 muestras fueron proporcionadas por el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), 27 muestras del Hospital General de zona no. 2 (IMSS), 17 del Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez” (ISSSTESON) y 8 muestras del Hospital Militar Regional de Hermosillo. Del total de muestras, 37 fueron del sexo femenino, 50 muestras del sexo masculino y en 13 muestras no se obtuvo este dato.

En cuanto a la edad de los pacientes, se obtuvieron 62 muestras de pacientes menores de edad (0-17 años), 19 muestras de pacientes mayores de edad (18-60 y más años) y 19 muestras de pacientes en el cual no se obtuvo este dato. Se observó una edad promedio de 12.3 años (Tabla 8). Cabe señalar, que el pico más alto de obtención de muestras fue durante el mes de noviembre con 30 muestras; época que marca el inicio de la temporada de bajas temperaturas (Figura 8). Estos datos concuerdan con la literatura, ya que la gastroenteritis causada por NoV, predomina en la temporada de invierno o en climas fríos.

En la Tabla 8 se puede observar también que, como se esperaba, la mayor parte de los pacientes procedían de Hermosillo con una proporción del 20 %. Sin embargo, aun cuando los hospitales que proporcionaron las muestras se encuentran en Hermosillo, dichos hospitales atienden también pacientes de otras regiones cercanas al municipio, por lo que se pueden observar pacientes de otras regiones. En segundo lugar se encuentra con el 8 % el Poblado Miguel Alemán perteneciente a la zona rural de Hermosillo y en tercer término el municipio de Suaqui Grande con el 7 % (Tabla 8).

Tabla 8. Datos y procedencia de los pacientes que proporcionaron muestras para el estudio.

Identificación Muestra	Hospital	Sexo	Edad (años)	Procedencia	Identificación Muestra	Hospital	Sexo	Edad (años)	Procedencia
1	H	F	2	Suaqui Grande	51	HM	M	1	
2	H	M	13	Imuris	52	H	F	0	Agua Prieta
3	H	F	1	Suaqui Grande	53	H	M	0	Hermosillo
4	H	M	0	Miguel Alemán	54	H	M	0	Miguel Alemán
5	H	M	3	Suaqui Grande	55	H	F	6	Hermosillo
6	H	F	4	Suaqui Grande	56	H	M	0	Hermosillo
7	H	F	1	Hermosillo	57	H	F	1	Hermosillo
8	H	M	0	Miguel Alemán	58	H	M	1	Caborca
9	H	F	8	Suaqui Grande	59	H	M	0	
10	H	M	3	Suaqui Grande	60	H	M	0	Hermosillo
11	H	M	6	Suaqui Grande	61	H	M	0	
12	H	M	2	Hermosillo	62	H	M	0	Hermosillo
13	H	F	1	Miguel Alemán	63	HM	M	31	
14	H	F	0	Agua Prieta	64	HM	M	15	
15	H	F	1	Hermosillo	65	H	M	0	Carbó
16	H	M	1	Miguel Alemán	66	H	M	2	Hermosillo
17	H	M	2	Navojoa	67	H	M	4	Hermosillo
18	H	M	0	Hermosillo	68	H	M	0	Guaymas
19	H	M	0	Miguel Alemán	69	H	F	5	Hermosillo
20	H	M	0	Magdalena	70	IM	F	65	
21	H	M	10	Hermosillo	71	IM	M	36	
22	H	F	0	Hermosillo	72	IM	F	2	
23	H	F	17	Esqueda	73	IM	F	79	
24	I				74	IM	F	10	
25	I				75	IM	F		
26	I	M	62		76	IM	M	1	
27	I	M	53		77	IM	F	95	
28	I	F	32		78	IM	F	39	
29	H	F	0	Hermosillo	79	IM	F	4	
30	H	M	0	Hermosillo	80	IM	M	96	
31	H	M	0	Miguel Alemán	81	IM	F		
32	HM	M	27		82	IM	F		
33	HM	M	8		83	IM	F		
34	I				84	IM	M		
35	I				85	IM	M		
36	I				86	IM	M	2	
37	I	F	50		87	H	M		Carbó
38	I		18		88	H	F	2	Pesqueira
39	I		25		89	H	M	6	Hermosillo
40	I		9		90	H	F	0	Miguel Alemán
41	I		53		91	IM	F		
42	I		4		92	IM	M		
43	I		38		93	IM	M		
44	HM	F	0		94	IM	F	4	
45	H	F	1	Hermosillo	95	IM	F		
46	H	F	1	Hermosillo	96	IM	M		
47	HM	M	0		97	IM	M	3	
48	I		46		98	IM	F	2	
49	I				99	IM	M	0	
50	HM	M	32		100	IM	M	1	

H= Hospital Infantil del Estado de Sonora, I= Centro Médico "Dr. Ignacio Chávez" (ISSSTESON), HM= Hospital Militar Regional de Hermosillo, IM= Hospital General de zona No.2 (IMSS), F= Femenino, M= Masculino.

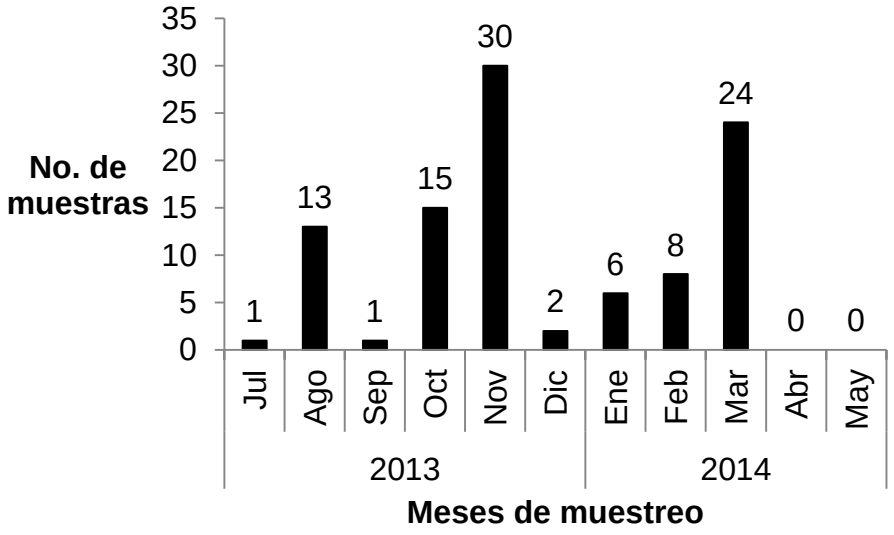


Figura 8. Periodo de recolección de muestras de Julio de 2013 a Mayo de 2014.

También cabe destacar, que los datos recolectados están incompletos, debido a que estos fueron tomados por el mismo personal de los hospitales y debido a la cantidad de pacientes que se atienden, es difícil llevar a cabo la recolección de los datos demográficos de manera completa. Además, el Hospital Militar no proporcionó estos datos debido a que sus códigos de confidencialidad son estrictos para la seguridad y protección de sus derecho-habientes.

Detección de NoV Mediante RT-PCR Convencional

Con las muestras obtenidas, se prepararon 22 pools. A cada pool se le extrajo el RNA, y mediante RT-PCR convencional y PCR semi-anidado dirigido a la región conservada de NoV como se explicó previamente, se obtuvieron los pools positivos. Posteriormente, a las muestras individuales que conformaban un determinado pool positivo para NoV, se les extrajo el RNA viral, para llevar a cabo el mismo procedimiento para identificar cuáles fueron las muestras positivas (Tabla 9). A continuación, se muestra una imagen representativa del producto de PCR semi-anidado de muestras positivas a NoV donde se observa la banda esperada de 316 pb (Figura 9).

Determinación de la Prevalencia de NoV

Del total de 100 muestras, 77 fueron positivas a NoV (77 %) por RT-PCR convencional. Se observó que los niños son los más afectados por el virus, principalmente los menores de uno a cuatro años de edad (32 %) (Figura 6)(Molina, 2014); sin embargo, al conjuntar los datos con los hospitales de procedencia, se observa que la mayoría de las muestras provienen del HIES. De los datos de los pacientes donde se pudo determinar la edad, se observa que los adultos también fueron afectados, dado que se observaron muestras positivas al patógeno (19 %) (Figura 10). Por otra parte, durante el período de recolección de muestras, se presentó un brote de diarrea en habitantes de Suaqui Grande, Sonora, que al analizarlo para NoV, resultaron positivas. Estas muestras, según información proporcionada, provinieron de personas que consumieron alimento ofrecido en un convivio, al que los pacientes asistieron.

Del resto de los pacientes no se tuvo datos de posibles alimentos implicados en la transmisión del virus.

También, cabe señalar que del total de pacientes que contestaron la encuesta (para el caso de desnutrición 48 pacientes), el 19 % de ellos que resultaron positivos a NoV, presentaron un grado de desnutrición (Figura 11). Esta condición, posiblemente se relaciona con el nivel socioeconómico y demográfico, ya que la mayoría de los casos provenían del HIES, el cual es un hospital que atiende pacientes no sólo de Hermosillo, sino de municipios aledaños. De estos casos, algunos provenían de las colonias pertenecientes a la periferia del municipio o de poblaciones rurales. En estos lugares, por lo general, las condiciones de higiene son pobres, debido al difícil acceso al agua potable. Además, el hacinamiento es muy común en este tipo de poblados, y por lo tanto, facilita el contagio del patógeno de persona a persona.

Por otra parte, al relacionar otros signos clínicos de las personas que resultaron positivas a NoV (además de las heces diarreicas), se tiene que del total de pacientes que contestaron la encuesta (para el caso de este dato fueron 52), el 15 % de ellos presentaron vómito. A pesar de que este signo es uno de los principales en personas con gastroenteritis causada por NoV, se presentó en pocas personas, posiblemente debido a que estos pacientes sólo eran portadoras del patógeno y aún no se manifestaba la enfermedad. Por otra parte, de 55 pacientes que llenaron la encuesta, el 15 % presentaron sangre en heces, y de 53 pacientes el 38 % presentaron moco en heces (Figura 11). Cabe destacar, que estos últimos signos son relevantes, ya que no es común que se presenten en personas infectadas por NoV según la literatura. Aunque está reportado que estos dos signos, son muy comunes en una infección intestinal. Por otra parte, en este estudio no se realizó la búsqueda de otros posibles patógenos como causantes de gastroenteritis, por lo que no se debe descartar que existieran co-infecciones. De esta manera, los signos clínicos que no concuerdan con la gastroenteritis típica por NoV podrían haber sido ocasionados por otros patógenos.

Tabla 9. Resultados obtenidos de las muestras individuales por RT-PCR convencional.

Identificación Muestra	NoV (+/-)	Identificación muestra	NoV (+/-)
1	+	51	+
2	+	52	-
3	+	53	-
4	+	54	-
5	+	55	-
6	+	56	-
7	+	57	-
8	-	58	+
9	+	59	+
10	+	60	+
11	-	61	+
12	+	62	+
13	+	63	-
14	-	64	-
15	+	65	-
16	+	66	-
17	-	67	+
18	+	68	+
19	+	69	+
20	-	70	+
21	-	71	+
22	-	72	+
23	-	73	+
24	+	74	+
25	+	75	+
26	+	76	+
27	-	77	+
28	+	78	+
29	+	79	+
30	+	80	+
31	+	81	-
32	-	82	+
33	+	83	+
34	-	84	+
35	+	85	+
36	-	86	+
37	+	87	+
38	+	88	+
39	+	89	+
40	+	90	+
41	+	91	+
42	+	92	+
43	+	93	+
44	+	94	+
45	+	95	+
46	+	96	+
47	+	97	+
48	+	98	+
49	+	99	+
50	+	100	+

+: positivo, -: negativo.

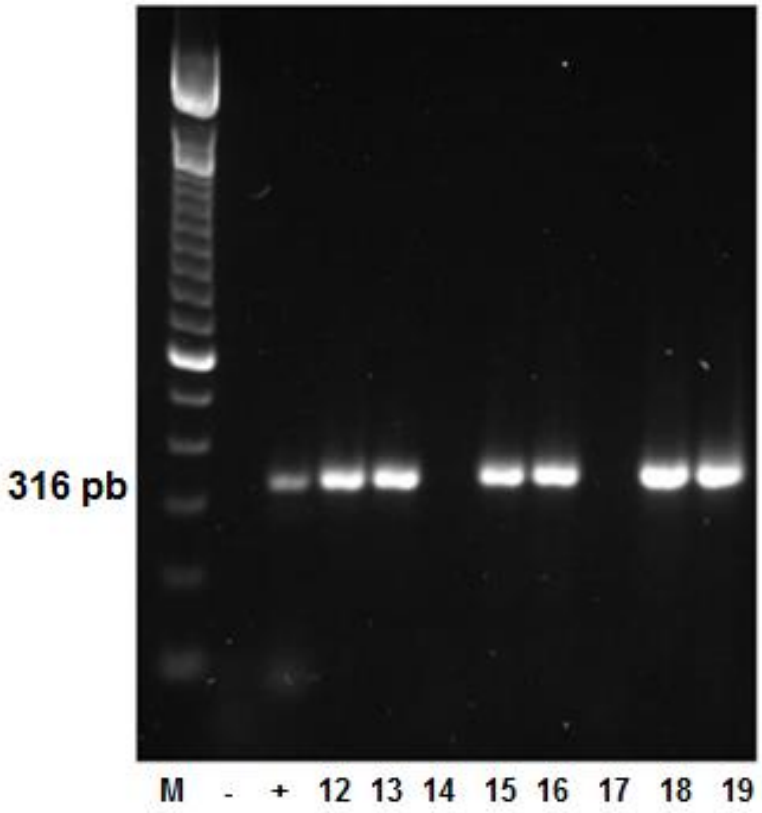


Figura 9. Gel representativo de la detección de NoV por PCR semi-anidado. Se muestra el producto de PCR de 316 pb. Carril M: marcador; carriles: - y +, controles negativo y positivo, respectivamente. Carriles 12–19: muestras de cada paciente, asignadas con el mismo número.

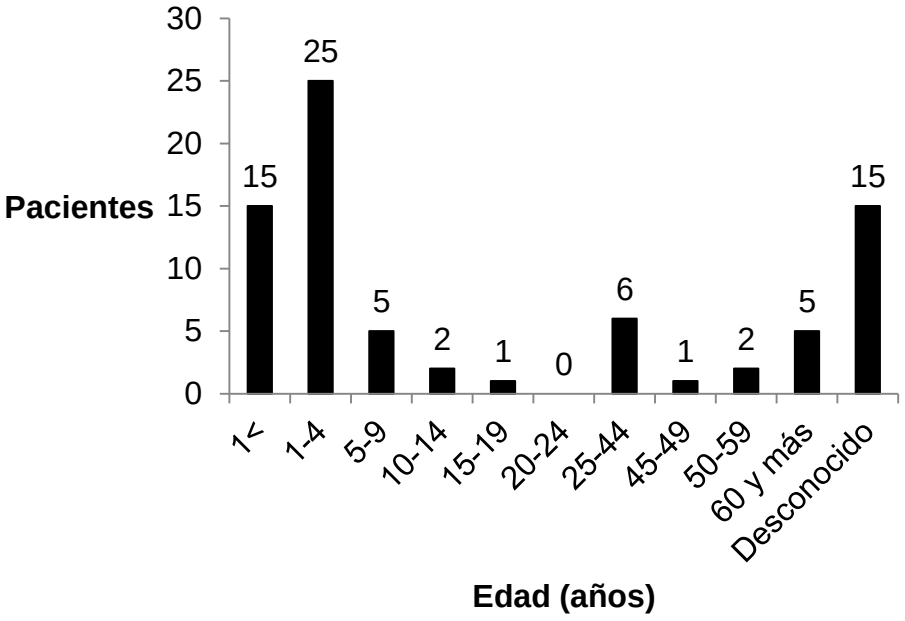
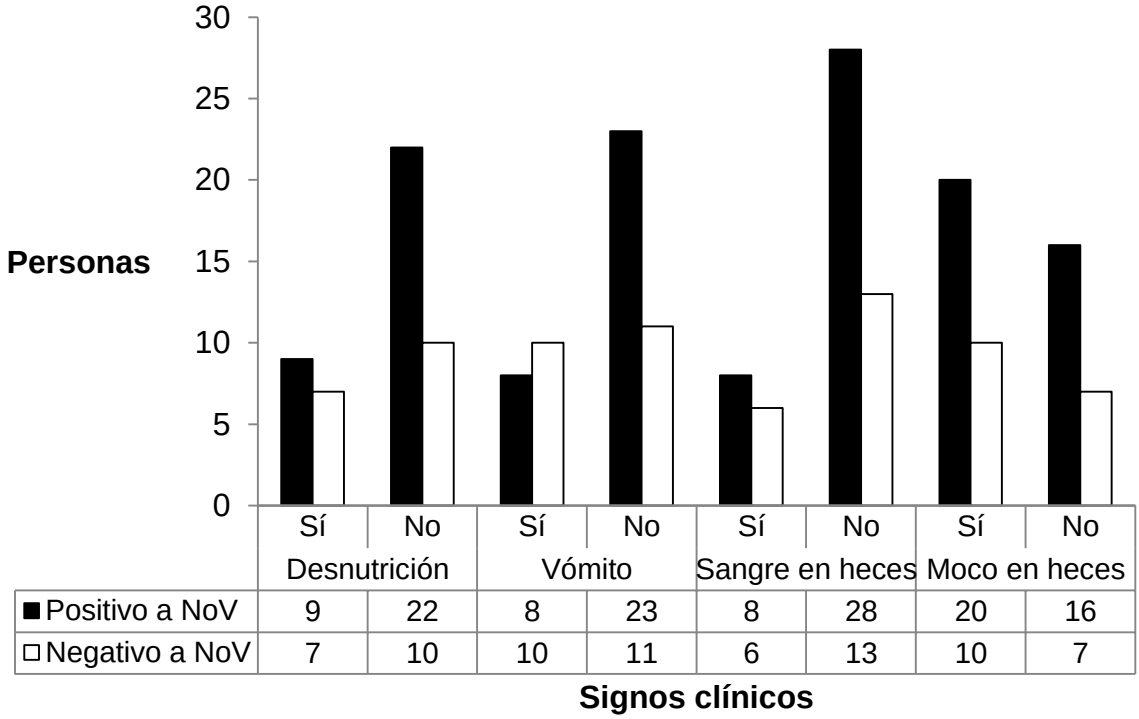


Figura 10. Número de muestras positivas a NoV por rango de edades.



	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
	Desnutrición		Vómito		Sangre en heces		Moco en heces	
■ Positivo a NoV	9	22	8	23	8	28	20	16
□ Negativo a NoV	7	10	10	11	6	13	10	7

Figura 11. Signos clínicos de los pacientes positivos a NoV.

Identificación de Genogrupos de NoV Mediante RT-qPCR

Para la identificación de genogrupos de NoV, se utilizó la técnica de RT-PCR en tiempo real. En esta técnica se utiliza sondas marcadas con fluorocromos como medida de detección. Estas, se hibridan con la secuencia de interés (cDNA), y conforme se van hidrolizando durante el proceso de amplificación del cDNA, emiten fluorescencia a cierta longitud de onda. Es decir, la intensidad de la fluorescencia emitida, es proporcional a la concentración de la secuencia de interés. Esto se ve reflejado como una curva en la gráfica, datos emitidos por el software.

Como se mencionó anteriormente, los resultados de la RT-PCR en tiempo real se basan en la detección y cuantificación de los fluorocromos a lo largo de la reacción de la PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de cDNA en estudio. Para obtener estos resultados, deben ser obtenidos los valores umbral de ciclo (Ct). Previamente, un umbral adecuado debe ser fijado de forma automática (por el software) o manualmente (por el operador). Los valores Ct son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del fluorocromo se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido. Es importante considerar que un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos.

Un ejemplo de lo anterior se muestra en la figura 12, en donde a 45 ciclos se obtiene el producto final. La muestra 4 (M4 GI), dio una curva con una Ct de 25.72, el cual indica que de los 45 ciclos de la amplificación, en el ciclo 25.72 fue donde se comenzó a detectar NoV GI, y por lo tanto la fluorescencia, por lo que la muestra fue positiva para GI. De igual manera se puede apreciar para el transcrito de NoV GI (Trans. GI), sólo que en éste, se observó una Ct de 25.95.

En cuanto al control negativo (C- GI), de manera correcta, no se observó fluorescencia, y por lo tanto, se obtuvo una Ct de cero.

Para el análisis de nuestras muestras, se marcó la sonda para GI con el fluorocromo VIC y la sonda para GII con el fluorocromo FAM, con la intención de que en una misma reacción se pudieran detectar ambos genogrupos y con esto, ahorrar reacciones. Sin embargo, sólo se pudo lograr la detección de manera separada, ya que al hacer la reacción dúplex, no se obtuvieron productos en muestras conocidas positivas. Por esta razón se decidió correr las muestras por separado (Figura 12).

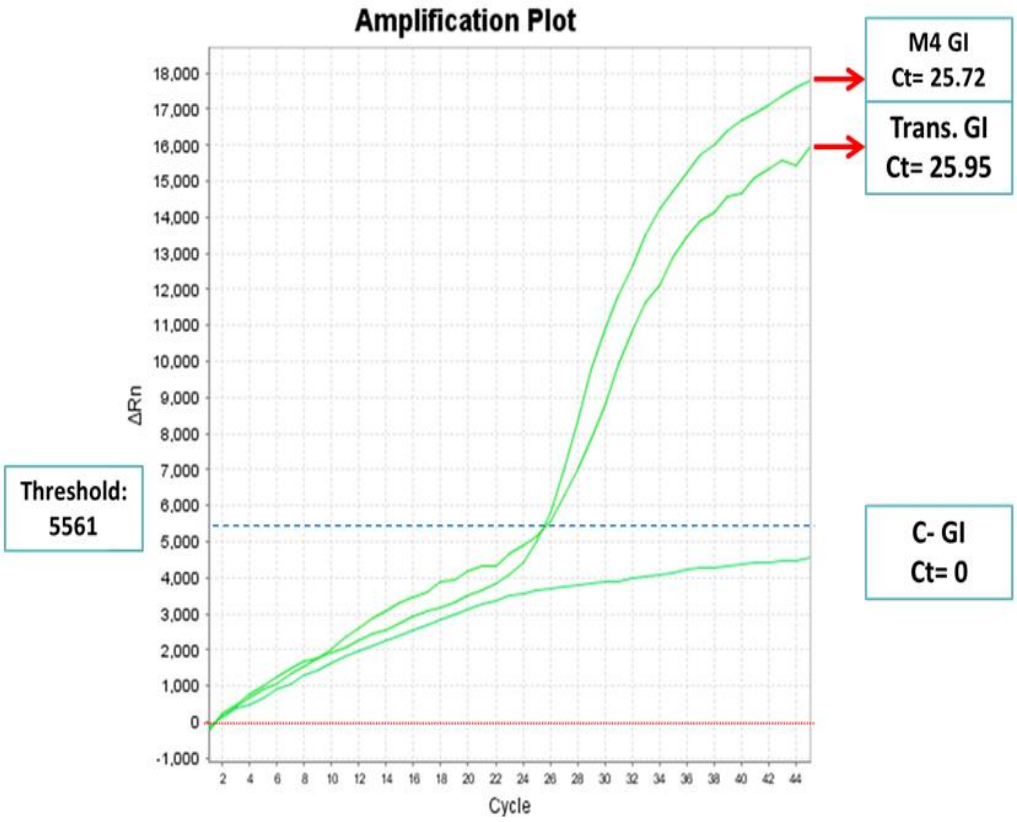


Figura 12. RT-qPCR de controles positivos de NoV GI con sonda VIC. La línea basal está de color rojo, y representa el inicio de la reacción por lo que no se observa fluorescencia. El umbral o *Threshold,* está representado por la línea punteada de color azul, y esta nos indica cuando una muestra es positiva al observarse una curva que cruza este umbral.

Sin embargo, sólo se pudo detectar el genogrupo en 10 muestras, de las 77 positivas a NoV. Tres de ellas fueron genogrupo I (GI) y siete fueron del genogrupo II (GII) (Tabla 10). Estos resultados concuerdan con la literatura, ya que se conoce que NoV GII, es el genogrupo más común que causa gastroenteritis entre las poblaciones a nivel mundial (Yan et al., 2013).

Tabla 10. Identificación de genogrupos de NoV en muestras positivas por RT-qPCR.

Muestras positivas a GI	Muestras positivas a GII
	6
	19
4	28
9	38
25	39
	43
	50

El número representa la identificación de muestra de cada paciente.

Posiblemente, el hecho de haber podido determinar el genogrupo en tan pocas muestras, se deba a que NoV es un patógeno altamente mutagénico, pues se ha reportado que existen heterogeneidades aún en la región conservada del genoma viral. Este hallazgo fue reportado por Vinjé y colaboradores (2000), y encontraron que sólo una homología de 64 % había sido reportada en regiones altamente conservadas dentro de un genogrupo.

Así mismo, Atmar y Estes (2001) reportaron que la homología de nucleótidos podría ser tan baja como de 36 % en la helicasa 2C y hasta de 64 % en la polimerasa 3D entre diferentes genogrupos. De la misma manera, Donaldson y colaboradores (2010), publicaron que dentro de un mismo genotipo, existe un 69 - 97 % de similitud de nucleótidos a nivel genómico. Por otra parte, en las proteínas estructurales como la VP1 son aún más variables, ya que dentro de un mismo genotipo de NoV, difieren hasta en un 40 % en la secuencia de aminoácidos de la cápside. Estas razones hacen difícil el diseño de un solo juego de iniciadores o primers para la detección de NoV.

Otra posible razón de estos resultados, es que el material genético de NoV es RNA de cadena sencilla, el cual es poco estable y corre el riesgo de degradarse durante el tiempo de almacenamiento y disminuir el RNA de interés. Esta condición se puede evitar, realizando la transcripción inversa de manera separada, es decir, realizar la RT-PCR convencional en dos pasos, ya que de esta forma es 100 veces más sensible que la RT-PCR de un solo paso. Este hecho se corroboró, en el trabajo de Pang y colaboradores (2005). Además, almacenar el material genético como DNA, aumentaría la estabilidad y confiabilidad para análisis posteriores.

Identificación de Muestras Positivas a NoV para Secuenciación

Para la secuenciación de las 17 muestras seleccionadas, como ya se mencionó anteriormente, se utilizaron los juegos de primers MJV12-COG1R, para obtener el fragmento mayor (823 pb) y Mp290-COG1R para obtener fragmento anidado del anterior, que genera un producto de 811 pb. Esta secuencia, corresponde a la región ubicada entre los genes *RdRp* y *VP1*. En base a lo anterior, se identificaron cinco muestras aptas para la secuenciación (muestras 4, 6, 28, 43 y 50). Esto se puede apreciar a continuación en la Figura 13.

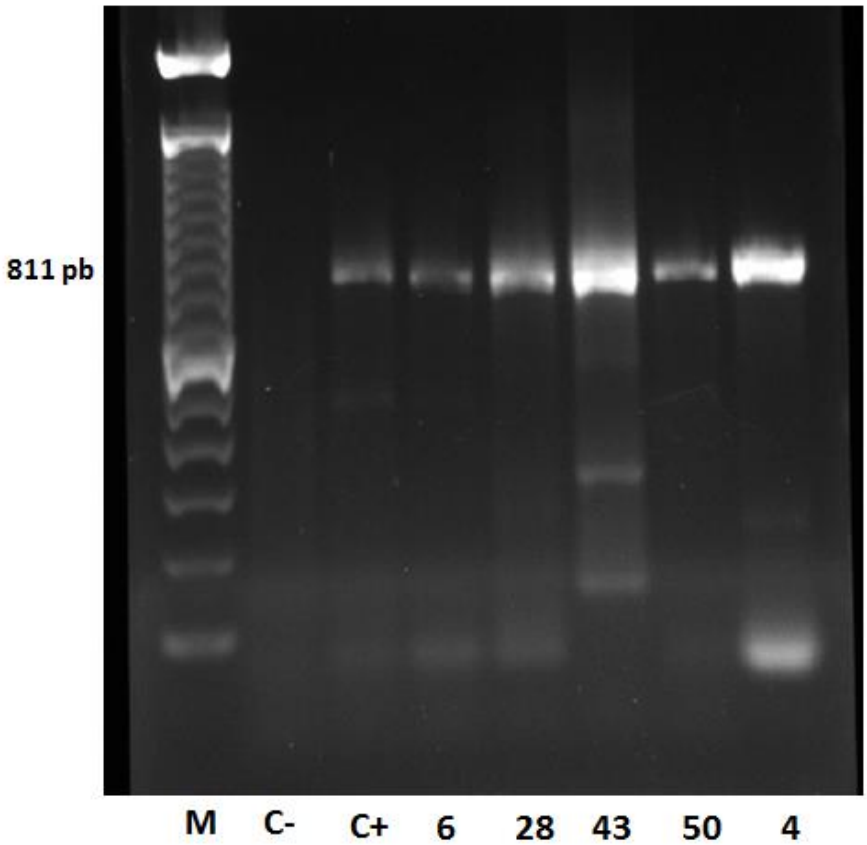


Figura 13. Detección de fragmento de 800 pb para secuenciación. Carril M: marcador; carriles: C- y C+, controles negativo y positivo, respetivamente. Los números presentados al pie del gel, corresponden al número de la muestra.

Alineamiento de Secuencias

Se realizó el alineamiento de las secuencias de las cinco muestras identificadas, y se compararon con 10 secuencias de referencia, disponibles en la base de datos de GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). De acuerdo con la figura 14, se observa varias mutaciones puntuales (arriba del 60 %), lo que hace que exista alta variabilidad genética, incluso dentro de un mismo genogrupo. Este hallazgo, concuerda con la literatura, ya que corrobora que NoV es altamente mutagénico. Además, hace que sea mucho más difícil el diseño de primers para la detección del patógeno, incluso utilizando primers degenerados, como fue el caso de este trabajo.

Por otro lado, esta alta variabilidad genética afecta la secuencia de aminoácidos, y por lo tanto, la estructura de las proteínas de la cápside de NoV. Por ello, afecta el reconocimiento de dicho patógeno por parte del sistema inmune, lo que hace que sea casi imposible el desarrollo de vacunas para la prevención de gastroenteritis, a causa de NoV.

Análisis Filogenético para Identificación de Genotipos de NoV

Para elaborar el árbol filogenético con las cinco muestras identificadas, se utilizaron las 10 secuencias de referencia, disponibles en la base de datos de GenBank. El árbol filogenético reveló dos grupos distintos: genogrupo I y genogrupo II de NoV, basados en los valores de bootstrap de 1,000 réplicas. Un grupo fue formado con cepas representativas de NoV GI, tales como virus Norwalk (GI.1), virus Desert Shield (GI.3) y NoV GI.8. El otro grupo fue formado con cepas de NoV GII, tales como virus Hawaii (GII.1), virus Snow Mountain (GII.2), virus México (GII.3), virus Syndey (GII.4) y NoV GII.14 (Figura 15).

De acuerdo a la Figura 15, observamos altos porcentajes de los valores de bootstrap. Estos porcentajes nos indican que entre más alto sea, más fiable es esa rama, y por lo tanto, más emparentadas están las cepas de NoV aisladas con respecto a las cepas de referencia. Por lo tanto, estas cepas

tienen un porcentaje de identidad alta entre sus secuencias. Por ejemplo, la cepa de la muestra 4, tiene una identidad del 83% con la secuencia de NoV/JP GI.8, y a su vez un valor de bootstrap de 98 (Tabla 11). Esta cepa de referencia a su vez tiene un 99 % de identidad con la cepa de Estados Unidos (NoV/USA) y un valor de bootstrap de 98, y se debe a que pertenecen al mismo genotipo (GI.8). A pesar de que el genotipo NoV GI.1 es una de las cepas más comunes que causan gastroenteritis dentro del genogrupo I, la muestra 4 sólo tiene un 73 % de identidad en su secuencia con este genotipo (Tabla 11).

Por otro lado, la secuencia de NoV aislado de la muestra 6, tiene el 98% de identidad con el genotipo GII.4, lo cual indica que dicha muestra pertenece a este clúster. Cabe señalar, que esta muestra provenía de Suaqui Grande, Sonora, por lo que se puede inferir que de esos pacientes, al menos uno fue positivo a esta cepa.

También, otra muestra relacionada con el genotipo Sydney (GII.4), es la cepa de la muestra 43, ya que ésta presentó una identidad del 89 % de su secuencia con la cepa referenciada (Tabla 11). Estos datos resultan relevantes, ya que el genotipo Sydney es el más común entre los NoV que causan gastroenteritis a nivel mundial y en Estados Unidos. Otra observación, es que ambas muestras provinieron de Hospitales diferentes, además de que una muestra pertenecía a un menor (muestra 6) y la otra a un adulto (muestra 43).

De la misma manera, se observó que la cepa de la muestra 50, tiene el 95 % de identidad con el genotipo Snow Mountain (GII.2). Además, comparada con el 80 % de homología con la cepa de la muestra 6, nos indica que el genotipo aislado en la muestra 50 fue GII.2 (Tabla 11). También, cabe señalar que la cepa de referencia pertenece a Corea del Sur, lo que nos reitera que la diversidad de NoV es amplia, y que este patógeno afecta a los humanos a nivel mundial.

Por el contrario, el análisis filogenético de NoV aislado de la muestra 28 reveló que a pesar de que tiene un 75 % de identidad con las secuencias de las

cepas de referencia de Corea GII.2 y GII.14, su valor de bootstrap es menor al 50 %. Por lo tanto, esta secuencia no presenta similitud con alguna de las cepas utilizadas como referencia (Tabla 11).

```
                          10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
M87661_GI.1        TGGGACTCAACACAAAATAGACAAATTATGACAGAATCCTTCTCCATTATGTCGCGCCTTACGGCCTCACCAGAATTGGCCGAGGTTGTGGCCCAAGATT
JX846929_GI.3      ................C..GG.G..C....TG..G..T...AAT.......GTAAA..C..A...AAC..TTCC.......CA..G.....A..G...C
KJ196298_GI.8      ...........G.....C...G.G.......TG..G......AAT..C....GCAAG..C..A...AAT..CTCC.....T.C...G.....T..G..CC
GU299761_GI.8      ...........G.....C...G.G.......TG..G......AAT..C....GCAAG..C..A...AAT..CTCC.....T.C...G.....T..G..CC
U07611_GTI.1       ..............GC.G...GCCG.AC.AG.T.C.G..C.AGAG..C...GTCAAAT.CT.CC.AGAG...C.C......C....A..T..AG....CC
AY134748_GII.2     ...........C...C.G..GGC.G.GC.AG.T.C.G....GGAA..C...GTAAAAT.CT.AC.AGA....C.T......C.AA...T..AG.G...C
HM635168_GII.2     .....T........GC.G...GCCG..C..G.C.CGG..A.GGAG......GTTAAAT.CT.A..AGA....C..C.A...C.AA.A..T..AG.G...C
U22498_GTI.3       ........C..G..GC.GC.GGC.G.GT..G...C.G.AC.TGAA..C...GT.A.GT.CT.T..TGA....C.GC.A..AC.AA.A..A..TG.....C
DQ078829_GII.4     .....T........C.G...GCCG.GT..G...C.G..C.AGAA..C...GTTAAAT.CT.CT.GGA....C.T......C....G..C..AG....CC
HM635108_GII.14    ...............C.A...GC.G.GT..G.T.C.G.TC.GGAA..A...GTCAAAT.CT.AT.AGA...TC.TC.....C.A..A..C..AG....CC
Muestra 4_GI       ...........T.....C..GG.........TG........TAAT..C....GTAAG..C..A...AAC..CTCTC....T.CC..G..T..T.......
Muestra 6_GII      .....T........C.G...GCCG.GC..G...C.G..C.AGAA..C...GTTAAAT.CT.CT.AGA....C.T.....TC.A..G..C..AG....CC
Muestra 28_GII     ...........C...C.G.....T..CT..GGG.CTG..C.TGAG..A...GTTA.GT.CT.A..TGA...T.........C.AA....AT.TG.....C
Muestra 43_GII     ........G......C.A..GG.TG.GC.AG...C.G.AC.AGAA..C...GTTAAAT.CT.TC.AGA....C.CC....TC....A..T..AG.....C
Muestra 50_GII     .....T........GC.A...GCCG..C..G.C.CGG..A.GGAG..C...GTTAAAT.CT.A..AGA....C..C.A...C.AA.A..T..AG.G...C

                          110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
M87661_GI.1        TGCTAGCACCATCTGAGATGGATGTAGGTGATTATGTCATCAGGGTCAAAGAGGGGCTGCCATCTGGATTCCCATGTACTTCCCAGGTGAACAGCATAAA
JX846929_GI.3      ....CT.C.......A.....C..T..C........G.....T..T.....T..C..A..G..C..C..T.....C..C..A..A........T..C..
KJ196298_GI.8      .A..CT.C.................T...........A.....T..T.....T..T...........C..T.....C..C..A..A..C........T..
GU299761_GI.8      .A..CT.C.................T...........A.....T..T.....T..T...........C..T.....C..C..A..A..C........T..
U07611_GTI.1       .T..TT.C..CAG..T.........G.....C.TCAAG..ATCAA.....C.....T..T..C.....GG.G..C..C..C..G..ATG....TC...C.C
AY134748_GII.2     .C.....C..CAG..T................TCAAA..A.CAA.T..T.....A.....C..G...G.A..C..C..A..A...TG...TTC...CGC
HM635168_GII.2     .AT.GT.G..TAG..TAG.T..C..G..C..C.TCAAA..TTCCA....T..A..AT.A.....G..TG....T..C..C..T..ATG...TTCA..CGC
U22498_GTI.3       ...........AG..T.G.T....AG.....C.TCAAG....CCA.T..C..A..C..A..T.....TG.G..T..C..C..A...CG....TC..CCGC
DQ078829_GII.4     .T..TT.T..TAGC.T.G.......G.....C.TCAAA..ATCAA.....T.....T..C..C.....GG.G..T..C..C.....ATG....TC...CGC
HM635108_GII.14    .CT.GT.C..TAG..T.........G......T.AAG..ATCAA.....C......T.A..C..C..TG.A..T..C..C..A..ATG....TC...TGC
Muestra 4_GI       ....CT.T.......A.....C.....A..C..C..A..A..T.......T..TT......A..C..T.....C..A..A.....T.......C..
Muestra 6_GII      .T..TT.T..TAGC.T.G.......G.....C.TCAAA..ATCAA.....T.....T..C..C.....GG.G..C..C..C.....ATG....TC...CGC
Muestra 28_GII     .C.....C..CAGC.T.G....C..T..C....TCAAG....CCA.A..T..A..TT.A..C......G.G..G..C..A..A..ATG....TCA..TTC
Muestra 43_GII     .C..CT.C..TAG..TA..............C.T.CAA..ATCAA.A.GT........C..C.....GG.G..T..C..C......TG....TC...CGC
Muestra 50_GII     ..T.GT.G..CAG..TTG.T..C..G..C..C.TCAAA..TTCCA....C..A..AT.A.....G..TG....T..C.....T..ATG....TC...CGC

                          210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
M87661_GI.1        TCACTGGATAATTACTCTCTGTGCACTGTCTGAGGCCACTGGTTTATCACCTGATGTGGTGCAATCCATGTCATATTTCTCATTTTATGGTGATGATGAG
JX846929_GI.3      C..T.....CT.A.....A...........A....TT......C.G..T.........A.A..G..ACAA..T..C..T....................A
KJ196298_GI.8      C........C..G..C..A........A..A....T......C.....C........AA.A.....ACAA..C..C.....C..C..C............
GU299761_GI.8      C........C..G..C..A........A..A....T......C.....C........AA.A.....ACAA..C..C.....C..C..C............
U07611_GTI.1       C......C.CC.C.....T........C.....A.T...G.ACC.G..C.....CA.CA.T...G...AT..C.TA.....T..C..............A
AY134748_GII.2     C......C.CC.C..A.....C.....A.....A.T...AAACC.GG.T.....CA.CA.A...G.T.AC..C.TG.....T..C..............A
HM635168_GII.2     A......C.CC.C..CT.A.....C..T..C..A.TT..A.ACC.C..T.....CA.T.....GG...AC..CCTC.....C..C..............A
U22498_GTI.3       C......T.GC.......G.....C..T.....A.TG..A..AC..GGC..C..CA.CA.A...G.T.AT..TATG.A...T..C...............
DQ078829_GII.4     C......C.TC.C...........G..C.....A.T...AAAC..G..C.....CA.CA.A..GG.T.AT..CCTC.....C...................A
HM635108_GII.14    C......C.CC.C..A..A.............A.T...A.A.C.G..C.....CA.CA.C..GG.A.AC..CCTA..T..C..................A
Muestra 4_GI       ...T.....CC.C.....T.....TT........T......CC.CG.T........TC.T..G..ACAA..C..C.....C..C..............A
Muestra 6_GII      C......C.TC.C...........G..C.....A.TT..AAAC..G..C.....CA.CA.A..GG.T.AT..CCTC.....C..C..............A
Muestra 28_GII     C......C...A..A..A.....CA.A..A..AATTT.A..GC.G..G..A........A...A.A.AC..C.G......C..C.....G.........
Muestra 43_GII     C......C.CC.C.....T........C.....A.T...G.ACC.G..C.....CA.TA.C..GG...AC..CCT......C..C..............
Muestra 50_GII     A......C.CC.C..CT.G.....C..T.....A.TT..A.ACC.C..T.....CA.T......G...AC..CCTC.....C..C...............A

                          310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
M87661_GI.1        ATTGTGTCAACTGACATAGATTTTGACCCAGCCCGCCTCACTCAAATTCTCAAGGAATATGGCCTCAAACCAACAAGGCCTGACAAAACAGAAGGACCAA
JX846929_GI.3      ..A..C.....A........A.........AT.AAAT.G..A.....A..G.....G......T.G..G..C.....A...........T..T..C....
KJ196298_GI.8      ..A..C.....A.....T..A...........TAAAT.G..A.....AT.A..A..G.......G.....C........C..T.....T..T..C..C.
GU299761_GI.8      ..A..C.....A.....T..A...........TAAAT.G..A.....AT.A..A..G.......G.....C........C..T.....T..T..C..C.
U07611_GTI.1       ......AGT..A......A.A..G.......AAAAA..G..AGC..AA..G..A..G.....G..G..G.....CC.C........G..T..G.....TC
AY134748_GII.2     ..C..AAGT.........A.A..A.......AGAAA.....AGC..AA.....A.....C..A...........CC.C..G........T........CC
HM635168_GII.2     ......AGC..A..T..TA.A..A.......AAAAG..G..GGGG.AGT.G.GA..................C..TC.T..A..T.....T..G..C..CC
U22498_GTI.3       ..A...AGT.........A.A..G.......AGAAA..G...GC..AA.....A..G..C...........C..TC....C........C.....G..GC
DQ078829_GII.4     .....TAGT..A..T...A.G..G.......AGAAAT.G..AGC..AA...........C..G..G........CC.C...........T.....G..CC
HM635108_GII.14    ..A...AGC..A.....CA.A..A.......AGAAAT.G..AAC..AAT.G........C..G..A........CC.T.......................CT
Muestra 4_GI       .....C..C..A..TG.T..G.....TT..AA.AAAT.A..A..GG.G..............T........C..T.....A........T..T..G..T.
Muestra 6_GII      .....TAGC..A..T...A.G..G..T....AGAAAT.G..GGC..AA...........C..G..G........CC.C.....T.....T........CC
Muestra 28_GII     ..A..CAGC.......TA.G..A..T..CATGAAAT.A...A.C.AGT.G.....G.....A..G.TT..G.....A..A.....G.....G..G...C
Muestra 43_GII     ......AGC..A......A.G..G.......AGAAG..G..AGC..AA........G..C..G..G........CC.T..C........T........CC
Muestra 50_GII     ......AGT..A..T..CA.A..A.......AAAAGT.G..GGGG.AGT.G.GA.................C..TC.T...........T..G..T..CT
```

Figura 14. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de NoV de este estudio.

```
                         410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
M87661_GI.1      TACAAGTGAGGAAAAATGTGGATGGACTGGTCTTCTTGCGGCGCACCATTTCCCGTGATGCGGCAGGGTTCCAAGGCAGGTTAGATAGGGCTTCGATTGA
JX846929_GI.3    .TATT..T...C.GC.G..A.....TT....T...C.C.....T.....C..TAAA..C..CATT..A.A...G..AC.AC.C..CC.CAA...C..C..
KJ196298_GI.8    .TAT...C...C..C.G........T.........C.T..T.....A.....GAAG..C..TATT....A......TC.AC.T..CC.CAAC..C.....
GU299761_GI.8    .TAT...C...C..C.G........T.........C.T..T.....A.....GAAG..C..TATT....A......TC.AC.T..CC.CAAC..C.....
U07611_GII.1     .GATCA.TTCTG.GG..C.......TT.AAC...TC.....A.A..TG.AA........C.A..T..T.GGTTT..T.AA.....ACA.AGC..A..ACT
AY134748_GII.2   .GATCA.ATCCG.GG.CT..A....TT..AC...TC.......G...G.GA........C.A..T....GGTTT....A...G..CCA.AG...A...CT
HM635168_GII.2   .GATCA.T..CG.GG..C..A....C...ACT...C..A..A.A...G.CA.T..C..CC.T.....A.GGTTT....AAC.G..CCAAAG...C..ACT
U22498_GII.3     .GGTGA.C..TG..G.CT..A....TT.AACG...C.C.AC..A.A.G.CA.......CC.A.....T.GGTTT..A.A.C.G..GCAAAG...C..CCT
DQ078829_GII.4   .TGTTA.TTCTG..G.CT.AA....T...AC....C.....A.A..TG.GA....C..CC.A..T..T.GGTTT..A.AA..G..GCA.AG...A..ACT
HM635108_GII.14  ..ATTA.CTCTG..G..C.......C...AC......A...A.A..GG.GA.T......C....T....GGTTT....AAC.G..CCAAAG...A..ACT
Muestra 4_GI     .TGTG..C.AAC.GC.A........T.....T...C.T...........C..AAAA.....CATC....A......GC..C.T..CC.CAAC..C.....
Muestra 6_GII    .TGTTA.TTCTG..G..T.AA....T...AC....C.....A.A..TG.GA....C..CC.A..T..T.GGTTT..A.AAC.G..GCA.AG...A..ACT
Muestra 28_GII   .CAC.A.C.AAG.G..CC.T.....CT..AC...TC..A..A.GGATG.G.GT..G..CC.A.....T.GGT.T..A.AAC.T...CAAT.C..A...AT
Muestra 43_GII   .TGTTA.CTCTG..G..C.......C...ACA...C.C...A.G..TG.GA.......CC.A..T..T.GGTTT..A.AA..G..ACAAAGC..A...CT
Muestra 50_GII   .GATTA.T..CG.GG..C..A....C...AC....C..A..A.A...G..A....C..CC.T.....A.GGTTT....AA..G..CCAAAGC..C..ACT

                         510       520       530       540       550       560       570       580       590       600
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
M87661_GI.1      ACGCCAAATCTTCTGGACCCGCGGGCCCAATCATTCAGATCCATCAGAGACTCTAGTGCCACACACTCAAAGAAAAATACAGTTGATTTCACTTCTAGGG
JX846929_GI.3    .A.A..GC.T.GG..............G.....CGA........TC.....A..G..C......T.G..G..G..GG.C..AC....A..C..G..G..T
KJ196298_GI.8    .A.A...C...GG...........A.....C...GA...C..G.TT........G.........T.A.........G.T..A.....A..C..A..G..T
GU299761_GI.8    .A.A...C...GG...........A.....C...GA...C..G.TT........G.........T.A.........G.T..A.....A..C..A..G..T
U07611_GII.1     TA.G..G..G.A......TA.G..C.....C...GAG........T..A..AA.GA.A.....TT.C.....GCCC...........G..T..G.....T
AY134748_GII.2   CA.G..G..A.A......TA.G..C.....C...GAG..C..G..C..A..AA.GA.A.....T.C..G..GCCT......C....G..T...T.G..T
HM635168_GII.2   TA.G...T.G.AT......AAA..C.........GA...C..C.TT...T.AA.GA.T.....T.C..G...CCC.....AC.C..G.....CT.G..C
U22498_GII.3     CA.G..GC.A.A......AA.A..A..T..C...GA...C..CAGT..A..CA.GA.A.....TG.G.TG...CCCG.G...C.C..GG....A..G..A
DQ078829_GII.4   CA.A.....G.A......TA.G..C.....C...GA...C.....T..A..AA.GA.T.....TT.C......CCC.....A.....G..C..A..G..A
HM635108_GII.14  CA.G..G..G.A......A.G..A..G..C...GAG..C..C..T..A..AA.GA.A.....T.C......CCC.....AC....G.....A..G..T
Muestra 4_GI     .A.A...C...GG........A..C.........GAT..C..T.TT..A..CT.G........TT.A........G..C...C.A..A.....A.....T
Muestra 6_GII    CA.A.....G.A......TA.G..T.....C...GA...C.....T..A..AA.GA.T.....TT.C......CCC.....A.....G..C..A..G..A
Muestra 28_GII   GA.A...T.G..T......AAG........C...GAC.....CAAT.....AA.GA.T......T.C..G..GCCC.....AC.A..G...T.G..G...
Muestra 43_GII   CA.G.....G.A......TA.G..T.....C...GA.........T..A..AA.GA.A.....T.C......CCC.....A.....G..CT.G..G..C
Muestra 50_GII   TA.G...T.G.A......AAA..A..T......GA...C..C.TT...T.AA.GA.T.....TT.C..G...CCC.....AC.C..G.....CT.G..C

                         610       620       630       640       650       660       670       680       690       700
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
M87661_GI.1      GAAGCTTCACTCCATGGTGAGAAATTTTACAGAAAGATTTCCAGCAAGGTCATACATGAAATCAAGACTGGTGGATTGGAAATGTATGTCCCAGGATGGC
JX846929_GI.3    ......G.............A.....C...........AG......G...T..T..G...G.T..AGAG..G...C.T.....C..CA....T..T....
KJ196298_GI.8    ..G..CG.C..A........A.....C.....G.....AG....T.G......C..A...G.T...GAA..G..TC....G..C...A....T..G....
GU299761_GI.8    ..G..CG.C..A........A.....C.....G.....AG....T.G......C..A...G.T...GAA..G..T.....G..C...A....T..G....
U07611_GII.1     ......G..T.G..C...CCAGC...C.....C..A..CAGT.AACTA.....TGCA..GT.G...GAA.....CA....CT.T..C..G..CA.GCAAG
AY134748_GII.2   .....AG.CT.G......CCA.C........CC..A..CAGT.AACT......CACA..GC.G...GAA.....CA....TT.T..C..G..CA..CA.G
HM635168_GII.2   .....AG..T.G....AACCATC.........C.....CAG..AGCTT..G...TC....T.G..AGAA......A....TT.T..C..G..CA.GCAAG
U22498_GII.3     ...T.C..C..AA....ACCCTC.........C...G.CAG..AGCT...T...TC....C.T...GAG..A...A....TT.T.....G..CA..CAAG
DQ078829_GII.4   ..G..CG.......C..CCCAGC...C.....C..A...AG..AGTTA..T..TGCA..GC.A..AGAA.....CA....TT.T..C..G..CA..CAAG
HM635108_GII.14  ......G..T.G.....CCCATC...C..T..T..A..CAG..AATT......TTCA...T.G..AGAA......A....TT.T..C..G..CA..CAAG
Muestra 4_GI     .....AG.G........C..A.....C...........AG.A....G...T..C..A...G.G...GAA.....GC.A.....C..CA....T.......
Muestra 6_GII    ..G..CG.......C..CCCAGC...C.....C..A...AG..AGTT...T..TGCA..GC.A..AGAA.....CA....TT.T..C..G..CA..CAAG
Muestra 28_GII   ..G..AG..T.A..C..ACCAGTT..C..T.AG..AG.CAGT.AATTA..T..CAC...GC....AGAG......A....TT.T..C..G...A.GCAAG
Muestra 43_GII   ..G...G.......C..CCCAGC.........C..A...AGT.AATT......TGCA..GC.G...GAA.....CA....TT.T..C..G..CA..CAAG
Muestra 50_GII   .....AG....G....AACCATC......T..C.....CAG..AGCTT..G...TC...GT.G..AGAA......A....TT.C..C..G..CA.GCAAG

                         710       720       730       740       750       760       770       780       790
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
M87661_GI.1      AGGCCATGTTCCGCTGGATGCGCTTCCATGACCTCGGATTGTGGACAGGAGATCGCGATCTTCTGCCCGAATTCGTAAATGATGATGGCGTCTAA
JX846929_GI.3    ......................A........T.GA.TC.......G.....C........C........T.AT......................
KJ196298_GI.8    ......................A........T.AA.T......................CT.......T.AT......................
GU299761_GI.8    ......................A........T.AA.T......................CT.......T.AT......................
U07611_GII.1     ..C.G......A.A......A.A...TCA.....GA.CAC....GAG..C......A....GGCT...AGT..T..G.....A.........G..
AY134748_GII.2   .AC.......A.G......A.A...TCA..TT.GA.CAC....GAG..C......A....GGCT...AGT..T..G.....A.........G..
HM635168_GII.2   .AC.T.....TA.G......A.G...TCA..TT.GA.CAC....GAG..C......A.....GCT...AGTC.T..G.....A.........G..
U22498_GII.3     ..T.A......A.G......A.G...TCA..T..AA.CACA...GAG..C......A....GGCCT..AGT..T..G.....A.........G..
DQ078829_GII.4   ..C.A......A.A......A.A...TCA..T..GA.CAC....GAG..C......A....GGCT...AGT..T..G.....A.........G..
HM635108_GII.14  .AC.A.....TA.G......A.A...TCA..TT.GA.CAC....GAG..C......A....GGCT...AGT..T..G.....A.........G..
Muestra 4_GI     .A.....................A........TT.GA.T........G..G...........C........T.AT..G..................
Muestra 6_GII    ..C.A......A.A......A.A...TCA..T..GA.CAC....GAG..C......A....GGCT...AGT..T..G..................
Muestra 28_GII   .AC.T.....TA.G......A.A...TC......TA.CACT...GAG..C......A.....GCT......GGT..G..................
Muestra 43_GII   ..C.A......A.G......A.A...TCA..T..GA.CAC....GAG..C......A....GGCT...AGT..T..G..................
Muestra 50_GII   .AC.T.....TA.G......A.A...TCG..TT.GA.CAC....GAG..C......A.....GCT...AGTC.T.....................
```

Figura 14. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de NoV de este estudio (continuación).

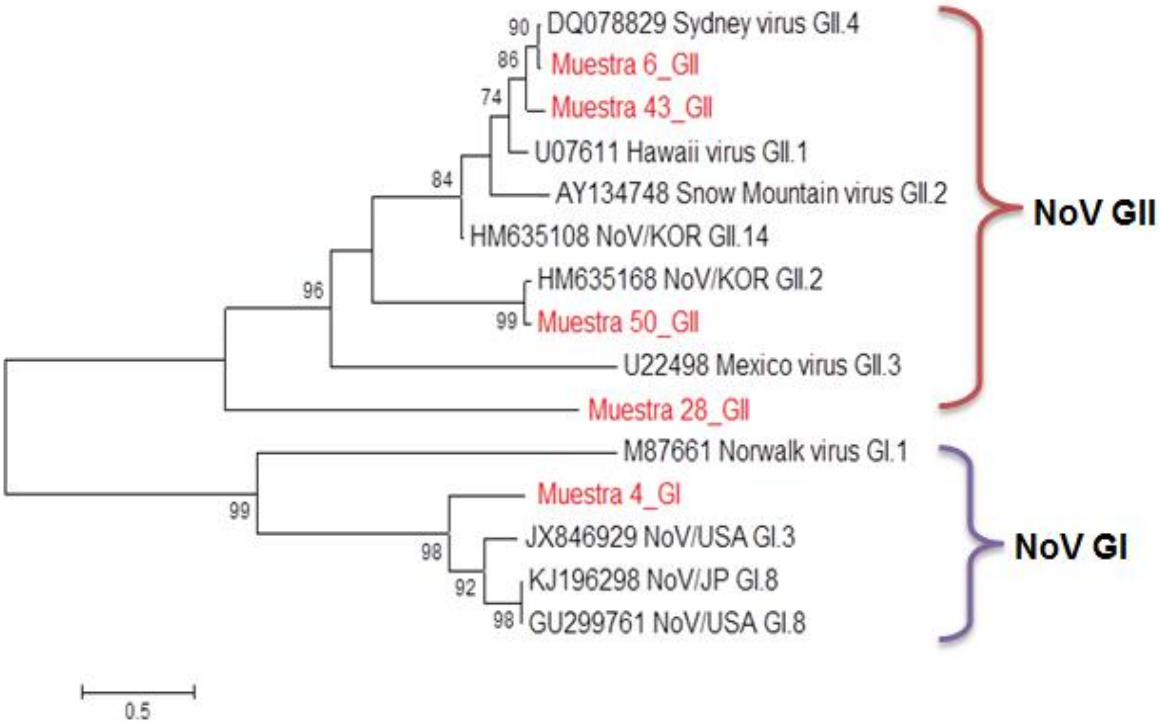


Figura 15. Árbol filogenético basado en la secuencia parcial de los genes *RdRp* y *VP1* (795 pb), de 5 NoV aislados en este estudio. Las cepas de color rojo, representan las muestras positivas a NoV ya diferenciadas en este trabajo. Las cepas de color negro, representan las cepas de referencia de NoV utilizadas para comparar, obtenidas de GenBank. El número en las ramas indica el valor de bootstrap por grupo, indicado como el porcentaje de 1,000 réplicas usando el método de Neighbor-Joining con el método de máxima verosimilitud. La escala de la distancia se encuentra en las unidades de número de sustituciones de bases por sitio.

Tabla 11. Matriz de identidad entre las cinco secuencias de NoV obtenidas en este trabajo y diez secuencias de referencias previamente publicadas para otros NoV.

Cepa	M4	M6	M28	M43	M50	GI.1	GI.3	GI.8/JP	GI.8/USA	GII.1	GII.2	GII.2/KOR	GII.3	GII.4	GII.14
M4		0.642	0.612	0.644	0.637	0.734	0.825	0.833	0.832	0.626	0.645	0.636	0.607	0.638	0.633
M6	0.642		0.737	0.896	0.802	0.62	0.633	0.647	0.647	0.869	0.833	0.801	0.782	0.977	0.854
M28	0.612	0.737		0.738	0.74	0.608	0.632	0.627	0.627	0.734	0.735	0.745	0.708	0.734	0.747
M43	0.644	0.896	0.738		0.791	0.637	0.635	0.647	0.647	0.875	0.841	0.788	0.779	0.891	0.861
M50	0.637	0.802	0.74	0.791		0.606	0.626	0.625	0.625	0.797	0.791	0.952	0.768	0.798	0.822
GI.1	0.734	0.62	0.608	0.637	0.606		0.739	0.758	0.759	0.625	0.633	0.593	0.61	0.622	0.625
GI.3	0.825	0.633	0.632	0.635	0.626	0.739		0.855	0.854	0.635	0.628	0.628	0.607	0.632	0.651
GI.8/JP	0.833	0.647	0.627	0.647	0.625	0.758	0.855		0.998	0.641	0.637	0.62	0.617	0.644	0.646
GI.8/USA	0.832	0.647	0.627	0.647	0.625	0.759	0.854	0.998		0.641	0.637	0.62	0.617	0.644	0.646
GII.1	0.626	0.869	0.734	0.875	0.797	0.625	0.635	0.641	0.641		0.86	0.792	0.767	0.876	0.849
GII.2	0.645	0.833	0.735	0.841	0.791	0.633	0.628	0.637	0.637	0.86		0.796	0.789	0.838	0.845
GII.2/KOR	0.636	0.801	0.745	0.788	0.952	0.593	0.628	0.62	0.62	0.792	0.796		0.767	0.796	0.822
GII.3	0.607	0.782	0.708	0.779	0.768	0.61	0.607	0.617	0.617	0.767	0.789	0.767		0.788	0.773
GII.4	0.638	0.977	0.734	0.891	0.798	0.622	0.632	0.644	0.644	0.876	0.838	0.796	0.788		0.857
GII.14	0.633	0.854	0.747	0.861	0.822	0.625	0.651	0.646	0.646	0.849	0.845	0.822	0.773	0.857	

Consideraciones Finales

Es importante destacar que este trabajo se hizo con muestras de los hospitales con mayor afluencia de pacientes en Hermosillo, Sonora y no en el total de la población. La gran mayoría de personas con gastroenteritis no acuden a visita médica ni a realizarse análisis, por lo que se encuentran fuera de los alcances de este estudio. La falta de registros y recolección de datos actuales, el desconocimiento sobre el patógeno y la carencia de métodos para un diagnóstico prematuro, hace mucho más difícil tener una visión clara sobre esta problemática.

VIII. CONCLUSIÓN

En este estudio, se demostró la presencia de NoV en pacientes con gastroenteritis, que acudieron a hospitales de Hermosillo, Sonora. La prevalencia encontrada fue de 77 %, sugiriendo a NoV como posible agente causal de gastroenteritis. Esta prevalencia es superior a la prevalencia anual reportada para Estados Unidos (58 %). La presencia de este patógeno fue detectada tanto en niños como adultos, principalmente del sexo masculino. Los genogrupos encontrados fueron GI y GII, y fue posible determinar el genotipo mediante secuenciación: GI.8, GII.2 y GII.4. Además, se encontró diversidad de genotipos del virus en las cinco muestras secuenciadas por ser altamente mutagénico.

IX. RECOMENDACIONES

Claramente está, que se tiene que tener más cuidado sobre la gastroenteritis causada por NoV, debido a que el número de casos va en aumento. Además, reiterar el compromiso de las instituciones de salud de reportar los casos ante las autoridades competentes. También, que el organismo encargado de la vigilancia epidemiológica en el país, actualice sus registros, ya que la gastroenteritis por NoV, se está convirtiendo en un problema grave. Con ello, es indispensable poder seguir implementando métodos diagnósticos capaces para la detección temprana de NoV, e intentar encontrar un tratamiento adecuado para minimizar este problema.

X. BIBLIOGRAFÍA

Alvarado-Ríos L., Castillo-Aguilar W. 2012. Gastroenteritis por virus en Lima. Revista Médica Herediana. 23: 70-76.

Arámbulo III P., Almeida C.R., Cuéllar S.J., Belotto A.J. 1995. La venta de alimentos en la vía pública en América Latina. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 118(2): 97-107.

Atmar R.L., Estes M.K. 2001. Diagnosis of noncultivatable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. Clinical Microbiology Reviews.14:15–37.

Bellido J.B., Álvarez M.C., García S., Hernández G., Godoy P., Moraga F., Pañella H., Puig J., Rius C., Sánchez A.,Sanz J.C., Varela M.C. 2007. Epidemiología de las gastroenteritis agudas víricas. EMISA. Sexta edición. Valencia. 164 pp.

Bertolotti-Ciarlet A., Crawford S.E., Hutson A.M. y Estes M.K. 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expressionand stability of the viral capsid proteinVP1: a novel fuction for the VP2 protein. Journal of Virology. 77(21): 11603-11615.

Bok K., Abente E.J., Realpe-Quintero M., Mitra T., Sosnovtsev S.V., Kapikian A.Z., Green K.Y. 2009. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. Journal of Virology. 83(22):11890-11901.

Cannon R.O., Poliner J.R., Hirschhorn R.B. 1991. A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. 164. The Journal of Infectious Diseases. 164(5): 860-863.

Dennehy P.H. 2011. Viral gastroenteritis in children. Pediatric Infectious Disease Journal. 30(1): 63-64.

Donaldson E.F., Lindesmith L.C., LoBue A.D., Baric R.S. 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. Nature Reviews Microbiology. 8(3): 231-241.

Doorn L., Kleter B., Hoefnagel E., Stainier I., Poliszczak A., Colau B., Quint W. 2009. Detection and genotyping of human rotavirus VP4 and VP7 genes by reverse transcriptase PCR and reverse hybridization. Journal of Clinical Microbiology, 47(9):2704-2712.Duarte Tagles E. 2012. Comer bien evita enfermedades gastrointestinales. Periódico Expreso. 2353.

Dung T.T.N., Phat V.V., Nga T.V.T., P. My P.V.T., Duy P.T., Campbell J.I., Thuy C.T., Hoang N.V.M., Minh P.V., Phuc H.L., Tuyet P.T.N., Vinh H., Kien D.T.H., Huy H.L.A., Vinh N.T., Nga T.T.T., Hau N.T.T., Chinh N.T., Thuong T.C., Tuan H.M., Simmons C., Farrar J.J., Baker S. 2013. The validation and utility of a quantitative one-step multiplex RT real-time PCR targeting rotavirus A and norovirus. Journal of Virological Methods. 187: 138-143.

Eckardt A., Baumgart D. 2011. Viral gastroenteritis in adults. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery. 6(1): 54-63.

Esseili M.A., Wang Q., Saif L.J. 2012. Binding of human GII.4 norovirus virus-like particles to carbohydrates of romaine lettuce leaf cell wall materials. Applied and Environmental Microbiology. 78(3): 786-794.

Estrada-García J.F., Cerna M.R., Thompson C., López Saucedo. 2002. Faecal contamination and enterotoxigenic Escherichia coli in street-vended chilli sauces in Mexico and its public health relevance. Epidemiology and Infection. 129: 223-226.

Félix-Valenzuela L., Resendiz-Sandoval M., Burgara-Estrella A., Hernández J., Mata-Haro V. 2012. Quantitative detection of hepatitis A, rotavirus and genogroup I norovirus by RT-qPCR in fresh produce from packinghouse facilities. Journal of Food Safety. 32: 467-473.

Gómez-Santiago F., Ribas-Aparicio R.M., García-Lozano H. 2012. Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in Mexican children. Virology Journal. 9(54). http://www.virologyj.com/content/9/1/54.

Hernández B., Velasco-Mondragón H.E. 2000. Encuestas transversales. Salud Pública de México. 42(5): 447-455.

INEGI. 2011. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Takeda N., Katayama K. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. Journal Clinical of Microbiology. 41: 1548-1557.

Kapikian A Z. 1997. Viral gastroenteritis. Evans A.S., Kaslow R.A., editors. Viral infections of humans: epidemiology and control. 4th ed. New York. 285–343 p.

Khan A. S., Moe C. L., Glass R. I., Monroe S. S., Estes M. K., Chapman L. E., Jiang X., Humphrey C., Pon E., Iskander J.K., Schonberger L.B.1994. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: comparison and application of molecular method-based assays. Journal of Clinical Microbiology. 32: 318–322.

Koopmans M., von Bonsdor C., Vinjé J., de Medici D., Monroe S. 2002. Foodborne viruses. FEMS Microbiology Reviews. 26: 187-205.

Koopmans M., Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. International Journal of Food Microbiology. 90: 23-41.

Lochridge V.P., Jutila K.L., Graff J.W. y Hardy M.E. 2005. Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. Journal of General Virology. 86: 2799-2806.

Logan C., O'Leary J.J., O'Sullivan N. 2006. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. Journal of Clinical Microbiology. 44(9): 3189–3195.

Mateu E., Casal J. 2003. Tamaño de la muestra. Revista de Epidemiología y Medicina Preventiva. 1: 8-14.

Milián F., Harris B., Arriaga C., Thomsen B., Stuber T., Gonzalez D., Alvarez G., Santillán M., Morales A., Estrada C. 2010. Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 1(4): 403-415.

Molina Chavarría A. 2014. Detección de norovirus mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y su prevalencia en

los pacientes con gastroenteritis de los hospitales de Hermosillo, Sonora. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.

Monroe S.S. 2011. Control and prevention of viral gastroenteritis. Emerging Infectious Diseases. 17(8). 1347-1348.

Ochoa T.J., Velapatiño G. 2012. Gastroenteritis por virus en Lima. Revista Médica Herediana. 23: 136.

Pang X.L., Preiksaitis J.K., Lee B. 2005. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroup I and II in patients with acute gastroenteritis. Journal of Clinical of Virology. 33: 168-171.

Prasad B.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G. y Estes M.K. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science. 256(5438): 287-290.

Saitou N., Nei M.1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.

Sánz J.C., Fernández M., Herranz N. y Sánchez-Fauquier A. 2008. Evaluación de una nueva técnica de ELISA para el diagnóstico de brotes de gastroenteritis causados por norovirus. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 26(7): 478-479.

Sina H., Baba-Moussa F., Kayodé A.P., Noumavo P.A., Sezan A., Hounhouigan J.D., Kotchoni S.O., Prévost G., Baba-Moussa L. 2011. Characterization of Staphylococcus aureus isolated from street foods: toxin profile and prevalence of antibiotic resistance. Journal Applied Biosciences. 46: 3133-3143.

SINAVE. 2013. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. www.sinave.gob.mx

SUIVE/DGE/SSA. 2011. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario 2011. Versión Ejecutiva.

Tamura K., Nei M., Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). 101: 11030-11035.

Tan M., Huang P., Meller J., Zhong W., Farkas T. y Jiang X. 2003. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. Journal of Virology. 77(23): 12562-12571.

Torner-Gràcia, N. 2008. Estudio epidemiológico de los brotes de gastroenteritis aguda de etiología vírica en Cataluña (Tesis Doctoral). http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2852/NTG_TESIS.pdf?sequence=1

Treanor J.J., Dolin R. 2005. Norovirus and other caliciviruses, Principles and practice of Infectious diseases. Elsevier Churchill Livingstone. 6th edition. Philadelphia.

Tu E.T.-V., Bull R.A., Greening G.E., Hewitt J., Lyon M.J., Marshall J.A., Mclver C.J., Rawlinson W.D.,White P.A. 2008. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. Clinical Infectious Diseases. 46: 413-420.

Ushijima H., Okitsu S., Khamrin P. 2011. Calicivirus. Uirusu. 61: 193-203.

Vila J., Álvarez-Martínez M. J., Buesa J., Castillo J. 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 27(7): 406-411.

Vinjé J., Hamidjaja R.A., Sobsey M.D. 2004. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. Journal of Virological Methods. 116: 109-117.

Wilhelmi I., Román E., Sánchez-Fauquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. Clinical and Microbiology Infection. 9(4): 247- 262.

Yan Y., Huang H., Gao L., Ji J., Ge Z., Zhu X., He P. y Chen Z. 2013. A one-step multiplex real-time RT-PCR assay for rapid and simultaneous detection of human norovirus genogroup I, II and IV. Journal of Virological Methods. 189: 277-282.

Yu Y., Yan S., Li B., Pan Y., Wang Y. 2014. Genetic diversity and distribution of human norovirus in China (1999-2011). Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2014: 1-13.