



UNIVERSIDAD DE SONORA

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

"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

"DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE CEPAS DE SAPOVIRUS EN NIÑOS CON GASTROENTERITIS"

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Para Obtener el Título de:

QUIMICO BIOLÓGO CLÍNICO

Presenta:

RICARDO ROMERO ARGUELLES

NAVOJOA, SONORA

OCTUBRE 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

APROBACIÓN

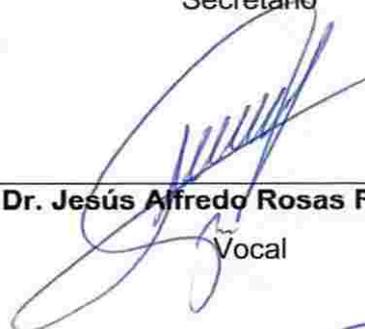
Los miembros del jurado asignados para revisar la tesis profesional de **Ricardo Romero Arguelles**, han encontrado satisfactorio el trabajo y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.



Dra. Guadalupe González Ochoa
Presidente



Dra. Lilian Karen Flores Mendoza
Secretario



Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez
Vocal



Dr. José Guadalupe Soñanez Organis
Suplente

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



MC. Ramona Icedo García

Jefe de Departamento de Ciencias Químico
Biológicas y Agropecuarias

AGRADECIMIENTOS

A:

Primeramente, a **Dios** por permitirme cumplir uno más de mis sueños.

La **Dra. Guadalupe González Ochoa** por haberme abierto las puertas de su laboratorio y sobre todo por haber confiado en mí en todo momento.

A la **Universidad de Sonora U.R.S** por formarme como todo un profesional con la ayuda de grandes maestros que sirvieron de pilares.

A los Doctores **José Guadalupe Soñánez Organís** y **Jesús Alfredo Rosas Rodríguez** por abrirme las puertas de sus laboratorios para la realización práctica de mi trabajo, y darme el apoyo necesario cuando se necesitaba.

A mi comité de tesis por brindarme su apoyo en la elaboración de este trabajo.

Mis amigos y compañeros de laboratorio por haber formado un gran equipo de trabajo.

DEDICATORIA

A:

Mis padres Ricardo Romero Ríos y Jesús Arguelles Samaniego, gracias a su apoyo, amor y cariño que me han brindado he podido lograr una meta más en mi vida profesional. Gracias por compartir todos mis momentos de tristeza y alegría y por su apoyo, sin el cual todo hubiera sido más difícil, por ustedes seguiré adelante, hasta lograr realizar mis metas.

Mis hermanas Adriana Romero Arguelles y María Concepción Romero Arguelles que me han apoyado incondicionalmente en todo momento.

Mi esfuerzo y mi corazón para ustedes, siempre...

CONTENIDO

APROBACIÓN	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	5
Gastroenteritis	5
Sapovirus	7
Generalidades	7
Clasificación y Estructura	8
Patogénesis y Epidemiología	11
Cuadro Clínico y Diagnóstico	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Área de Estudio	15
Criterios de Inclusión y Exclusión	15

Estimación de la Severidad de la Gastroenteritis	15
Extracción de Ácidos Nucleicos	16
Síntesis de DNA Complementario y Amplificación del gen Parcial ORF1	16
Secuenciación y Análisis de las Secuencias	17
RESULTADOS	19
Análisis de la Severidad de la Gastroenteritis	19
Amplificación del gen de la Cápside de Sapovirus	22
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIÓN	28
BIBLIOGRAFIA	29
ANEXOS	34

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Principales agentes causantes de gastroenteritis.....	7
2	Secuencias utilizadas en el alineamiento	19
3	Severidad de la gastroenteritis en niños.....	21
4	Sintomatología clínica de los niños con gastroenteritis por sapovirus.....	22
5	Porcentaje de identidad de secuencias entre genogrupos de sapovirus.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Partícula viral de sapovirus.....	9
2	Genoma viral de sapovirus.....	10
3	Sintomatología clínica de los niños con gastroenteritis.....	20
4	Amplificación del gen de la cápside.....	23
5	Árbol filogenético de sapovirus.....	25

RESUMEN

La gastroenteritis aguda es una infección de la porción proximal del intestino delgado y del colon; afecta comúnmente a niños menores de 5 años. Entre los principales agentes infecciosos causales de gastroenteritis se encuentran rotavirus, calicivirus, astrovirus y adenovirus; quienes en conjunto se asocian al 70% de los casos de diarrea. Entre los Calicivirus humanos, sapovirus es el causante de aproximadamente 40% de las infecciones gastrointestinales en niños menores de cinco años. Sapovirus se clasifica actualmente en 14 genogrupos (GI-GXIV), de los cuales GI, GII, GIV y GV son lo que se asocian a infecciones en humanos. En el presente trabajo, se detectó y analizó el genotipo de las cepas de sapovirus en niños menores de cinco años con gastroenteritis atendidos en el Hospital del Niño y la Mujer en Cd. Obregón y en el Hospital General de Navojoa. Se realizó una extracción de RNA genómico a partir de muestras de heces de niños con gastroenteritis y posteriormente se llevó a cabo la síntesis de DNA complementario (cDNA) y la amplificación por PCR de la región codificante de la cápside VP1 (ORF 1) de sapovirus. El producto de PCR fue purificado y posteriormente secuenciado. De un total de 118 muestras de heces de niños con gastroenteritis, 7% (6/118) resultaron positivas para sapovirus. De estas muestras, el 67% (4/6) se asociaron a casos de gastroenteritis leve y 33% (2/6) a casos de severidad de gastroenteritis moderada. Por su parte, el análisis de secuencia indicó que dos de las muestras positivas para sapovirus eran genotipo GI.1 (1) y GII.1 (1). Esta última cepa de sapovirus (GII.1) no ha sido identificada en México, sin embargo, en otros países como en la India y Japón se reporta con una prevalencia del 2.7%, donde ha sido asociada a infecciones gastrointestinales severas. Por lo anterior queda establecido el aporte epidemiológico con respecto que cepas de sapovirus causante de gastroenteritis circulan en la región del Sur del Estado Sonora. La detección de cepas emergentes causantes de gastroenteritis como en el caso de sapovirus deja en claro la necesidad de más estudios de monitoreo epidemiológico y caracterización molecular de este virus, debido a que su estudio epidemiológico puede contribuir con el planteamiento de nuevas estrategias preventivas contra enfermedades gastrointestinales causadas por sapovirus.

INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis se define como una inflamación del revestimiento gástrico e intestinal, atribuible a una infección causada en un 70% por agentes virales, de los cuales sobresalen rotavirus, sapovirus, norovirus, adenovirus entéricos y astrovirus. Este padecimiento afecta principalmente a niños menores de cinco años y adultos de edad avanzada, ocasionándoles un cuadro clínico de diarrea, vómito y fiebre (Hostetler, 2004; Riechmann y col., 2014; Olivart y col., 2017). Las enfermedades gastrointestinales son un problema a nivel mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde los índices de mortalidad son elevados (Martínez y col., 2008; Anderson, 2010).

En México las enfermedades gastrointestinales representan una de las principales causas de consulta médica el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y otras instituciones del sector salud. Un estudio gubernamental durante el periodo de 1 año reportó 4,556 decesos causados por infecciones intestinales en las mismas fechas (Hernández y col., 2011). Entre los virus causantes de gastroenteritis sapovirus ha emergido a nivel mundial en donde, se ha incrementado el número de brotes y casos esporádicos de gastroenteritis aguda en niños menores de cinco años. Debido a que se han realizado pocos estudios de sapovirus es difícil establecer correlaciones o conclusiones sobre las tasas de incidencia, detección y prevalencia general. Sin embargo, de los estudios realizados se ha observado que la infección por sapovirus es más frecuente en niños pequeños que en adultos (Hansman y col., 2007; Svraka y col., 2010).

Los brotes de gastroenteritis aguda ocasionada por sapovirus pueden variar de una región geográfica a otra, lo que podría generar la presencia de este virus durante todo el año. Aunado a esto, el virus es capaz de presentar mutaciones y re-arreglos genéticos, que permiten su evolución y generación de cepas emergentes, aumentando su virulencia con capacidad de producir casos de gastroenteritis más severas, por lo cual es importante el monitoreo y caracterización de este tipo de virus causante de gastroenteritis aguda en México, así como sus variaciones y la severidad de la diarrea ocasionada, ya que esto podría contribuir a la creación de estrategias preventivas eficientes (Olivart y col., 2017).

ANTECEDENTES

Gastroenteritis

La gastroenteritis aguda es un síndrome diarreico atribuible a una infección de la porción proximal del intestino delgado o del colon. Este padecimiento se encuentra entre las enfermedades infecciosas más comunes a nivel mundial, y se asocia a una elevada morbimortalidad, particularmente en niños, adultos mayores, individuos desnutridos o inmunosuprimidos (Olivart y col., 2017).

Cada niño menor de 5 años de edad presenta promedio tres episodios anuales de diarrea aguda, acompañado o no de cefalea, deshidratación y vómito. A nivel mundial, la diarrea aguda es la segunda causa de muerte, y tanto la incidencia como el riesgo de mortalidad por diarrea son mayores en los infantes, particularmente en menores de 1 año. Otras consecuencias directas de la diarrea infantil son desnutrición, disminución del crecimiento y trastornos del desarrollo cognitivo (OMG, 2012; Martínez y col., 2015).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2013, existen alrededor de 2,000 millones de casos de enfermedades diarreicas a nivel mundial cada año, y 1.9 millones de niños menores de 5 años de edad fallecen por esta causa anualmente, fundamentalmente en los países en desarrollo. Esto asciende a 18% de todas las muertes de niños menores de cinco años, y significa que más de 5.000 niños mueren cada día como resultado de enfermedades diarreicas a nivel mundial. De todas las muertes infantiles provocadas por la diarrea, 78% ocurren en África y el sudeste Asiático (Wilhelmi y col., 2003; Farthing y col., 2012; OMG, 2012).

La gastroenteritis en niños ha sido un gran problema de salud a nivel mundial y una de las principales causas de muerte en niños en países en vías de desarrollo, y puede ser de origen bacteriano, parasitario y viral (Tabla 1). En México según el sistema nacional de vigilancia epidemiológica (SINAVE) en 2011 se ha verificado 5.437,299 de casos de enfermedades infecciosas intestinales de los cuales una cuarta parte se presenta en niños menores de 5 años, la gastroenteritis causada por virus representa más del 70% de los casos. De los agentes virales, rotavirus es el principal agente causal de gastroenteritis aguda en

lactantes y niños pequeños a nivel global, seguido de norovirus y sapovirus (Elliott, 2007; Ramani y Kang, 2009; Anderson, 2010).

TABLA 1. Principales agentes causantes de gastroenteritis

Virus	Tipo de Agente Infeccioso		
	Bacterias	Protozoos	Helminfos
<i>Rotavirus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Ascaris L.</i>
<i>Adenovirus</i>	<i>Salmonellas</i>	<i>Cryptosporidium sp</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>
<i>Astro virus</i>	<i>Shigella sp</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Angyostrongylis C.</i>
<i>Calicivirus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Isospora belli</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>Parvovirus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>Cyomegalovirus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Blastocystis sp</i>	<i>Capillaria P.</i>
<i>Coronavirus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Cyclospora Cayetanensis</i>	<i>Anisakis simple</i>

Fuente: modificado de: Díaz Mora y col., (2014).

Sapovirus y norovirus pertenecen a la familia *Caliciviridae*; norovirus se considera el de mayor incidencia y patogénesis; mientras que Sapovirus se asocia a gastroenteritis menos severas, aunque recientemente se han ido incrementando los casos de mortabilidad por este virus (Patel, 2008; Lee y col., 2013; Lu y col., 2015).

Sapovirus

Generalidades

Sapovirus fue detectado en 1977 en muestras de heces de niños infectados de gastroenteritis aguda en un brote epidémico que tuvo lugar en un orfanato en Sapporo, Japón (Chiba y col., 2000). Sapovirus es parte de la familia *Caliciviridae* (calicivirus) y al igual que norovirus se asocia a casos de gastroenteritis aguda en humanos (Howley, 2007; Lee y col., 2013). Los casos de gastroenteritis por sapovirus se consideraban esporádicos, y en la mayoría de los casos los niños infectados presentaban un cuadro gastrointestinal leve. Sin embargo, recientemente se han reportado casos de niños hospitalizados con gastroenteritis severa causada por sapovirus genotipo GI.1 (Chiba y col., 2000; Phan y col., 2007; Sdiri-Loulizi y col., 2010).

En México se estima que sapovirus es el causante de aproximadamente 40% de las infecciones gastrointestinales en niños menores de dos años, esto con respecto a los demás Calicivirus humanos. Sin embargo, la incidencia con la que se producen los brotes de gastroenteritis causados por sapovirus no se conoce con exactitud (Farkas y col., 2000; Domínguez y col., 2009). Un estudio realizado en el 2010 en Brasil, reveló una incidencia de sapovirus del 4.9% con respecto a los demás virus causantes de gastroenteritis aguda. Por otro lado, se obtuvo una incidencia del 11.9% en un estudio realizado en Irán en el 2012, utilizando un juego de oligonucleótidos específicos SLV5317 (CGGRCYTCAA AVSTACCBCCCCA) y SLV5749 (CTCGCCACCTACRAWGCBTGGTT) codificantes para la proteína principal de la cápside VP1 (Aragão y col., 2010; Romani y col., 2012).

La principal forma de contagio de sapovirus es la vía fecal-oral, de persona-persona, así como el consumo de alimentos o agua contaminados. El periodo de incubación es de 12-48 horas para que la gastroenteritis se manifieste. El cuadro clínico se caracteriza por la presencia de diarrea y vómito, aunque pueden presentarse otros síntomas como: fiebre, dolor abdominal, náuseas, dolor de cabeza, entre otros. La enfermedad ocasionada por este virus usualmente se cura en una semana sin necesidad de medicamento, convirtiéndolo en un proceso autolimitado, aunque ocasionalmente

puede presentarse como infección asintomática (Dos Anjos y col., 2011; Hall y col., 2013; Oka y col., 2015).

Clasificación y Estructura

Sapovirus es un virus con envoltura y un diámetro de 30-38 nm, presentan forma de estrella (Figura 1), su genoma es de RNA lineal de cadena sencilla en sentido positiva (ssRNA) de aproximadamente 7.3 a 7.5 Kb y su extremo 3' se encuentra poliadenilado (Figura 2) (Hansman y col., 2007; Zuckerman, 2009; Oka y col., 2012; Hall y col., 2013; Varela y col., 2016).

La clasificación de sapovirus es con base a la secuencia del gen que codifica para la cápside (VP1). Según esta clasificación hasta el momento, se ha descrito que sapovirus se divide en 14 genogrupos (GGI-GGXIV), de los cuales GGI, GGII, GGIV y GGV son lo que se asocian a infecciones en humanos (Farkas y col., 2004; Sdiri-Loulizi y col., 2011; Matussek y col., 2015).

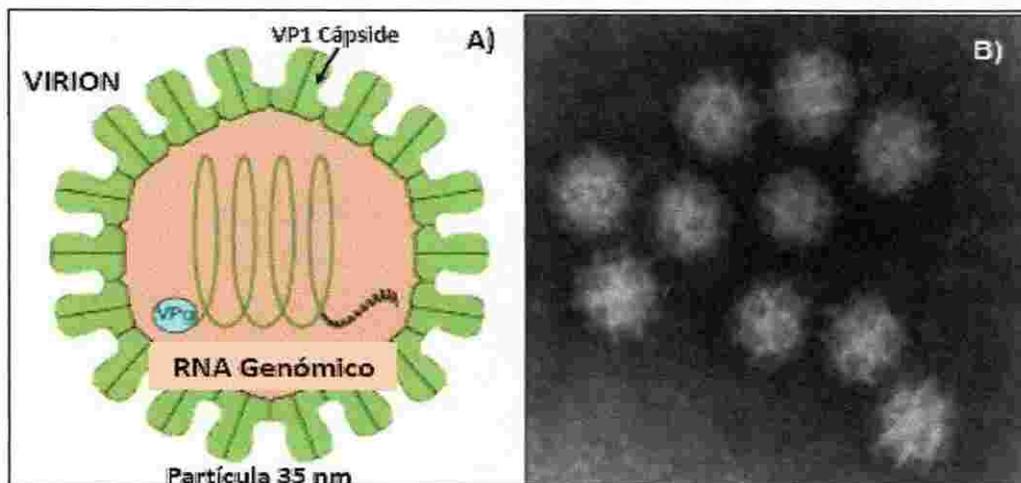


Figura 1. A) Estructura de la partícula viral (ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2008). B) Micrografías electrónicas de transmisión de partículas de sapovirus de muestras clínicas. (Oka y col., 2015).

Sapovirus cuenta con dos o tres marcos abiertos de lectura (ORFs), debido a un mecanismo llamado "escaneo fugaz" (leaky scanning) el cual un codón de iniciación débil de ARNm es a veces saltado por el ribosoma en la iniciación de la traducción. Además cuenta con seis proteínas no estructurales (NS1-NS7) y la proteína principal de cápside (VP1) son codificadas por ORF1, mientras que ORF2 y ORF3 codifican para proteínas que aún no han sido claramente definidas (Hansman y col., 2007; Svraka y col., 2010; Oka y col., 2012). ORF3, se encuentra superpuesto en ORF1 y sólo está presente en ciertos genogrupos de sapovirus (Tse y col., 2012).

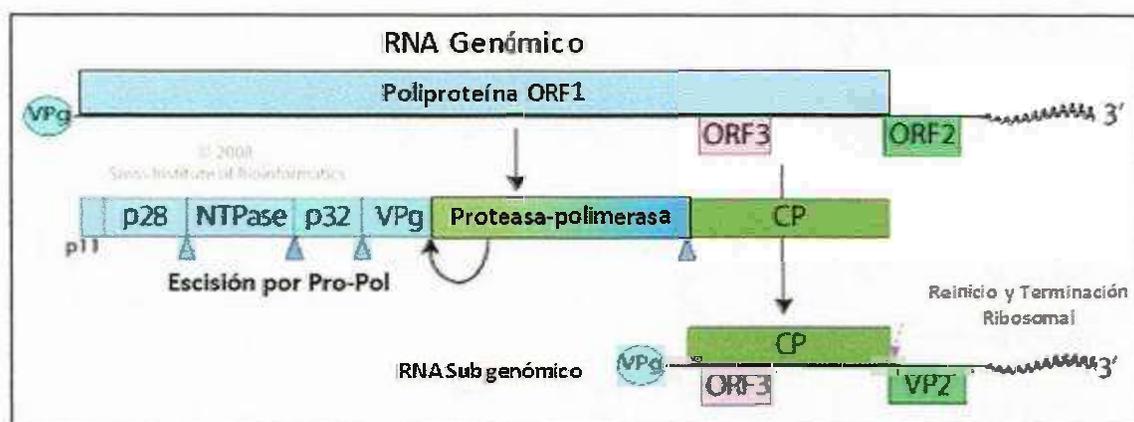


Figura 2. Estructura del genoma de sapovirus (ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2008).

Por medio de estudios filogenéticos, se ha identificado los genotipos de sapovirus y a la fecha se conocen 17, los cuales muestran más de un 20% de variaciones nucleóticas en el gen de la cápside (Lu y col., 2015; Matussek y col., 2015). El genogrupo comúnmente encontrado en humanos es GI, siendo el genotipo GI.1 el asociado a diarreas agudas en países como México, Tailandia, Japón y Pakistán (Sdiri-Loulizi y col., 2011). Recientemente se han identificado varias cepas recombinantes de sapovirus, las cuales pueden generarse por tres formas de recombinación: intergenogrupo, intergenotipo e intragenotipo (Phan y col., 2007). Se propone que las recombinaciones se originan debido al cruce entre la proteína VP1 y la polimerasa en

ORF1, ya que esta región es altamente conservada entre las cepas de Sapovirus (Hansman, 2005; Phan y col., 2007; Chanit, 2009; Oka y col., 2015).

Replicación

La cepa Cowden es la única cepa de los sapovirus entéricos porcinos de la cual se han podido hacer cultivos celulares (Buesa y Rodríguez, 2016). Debido a que no se ha descrito un cultivo celular *in vitro* disponible para Calicivirus humanos, su ciclo de replicación celular se deduce de cepas de Calicivirus animales que tienen una organización similar del genoma y pueden propagarse en cultivos celulares (Buesa y Rodríguez, 2016).

Los Calicivirus entéricos humanos se replican en el tracto gastrointestinal superior, lo que causa infecciones citolíticas en los enterocitos de las vellosidades intestinales, pero sin afectar a los enterocitos de la cripta del intestino delgado proximal. La unión al receptor de la célula diana es mediada por carbohidratos, pero en el caso de los genogrupos de sapovirus GI y GIV no se ha observado interacción con las proteínas de unión de las hemoglobinas, como en el caso de norovirus, por lo que tal vez exista la posibilidad de que los otros genogrupos puedan tener actividad de unión a ellos (Shirato-Horikoshi y col., 2007; Buesa y Rodríguez, 2016).

Patogénesis y Epidemiología

Desde el 2010 a la fecha, sapovirus y norovirus han surgido como importantes agentes etiológicos de la epidemia de las enfermedades diarreicas y esporádica en todos los grupos de edades (Matussek y col., 2015). La gastroenteritis viral es una enfermedad común con alta morbilidad en todo el mundo, especialmente en los lactantes y los ancianos (Oka y col., 2015). La mortalidad entre los niños es mayor en los países en desarrollo que en los países desarrollados (Svraka y col., 2010). Estos virus también están asociados con brotes esporádicos de gastroenteritis en lugares como guarderías, escuelas, hogares de ancianos orfanatos, y hospitales. Sapovirus afecta principalmente a bebés y niños menores de cinco años, en algunos casos puede provocar infecciones asintomáticas. En comparación a norovirus, sapovirus es menos estudiado, debido a que es un proceso auto limitado y puede pasar desapercibido ya que la enfermedad ocasionada es leve (Hall y col., 2013).

La gastroenteritis por sapovirus puede ser leve o moderada y presenta una tasa de prevalencia no más del 10% a nivel mundial (Matussek y col., 2015). Los Calicivirus son una causa importante de enfermedades humanas, y se enumeran los agentes patógenos en la categoría B de acuerdo con el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas de clasificación de los agentes patógenos importantes para la biodefensa. Sapovirus es comúnmente encontrado tanto en alimentos como en el agua contaminada, la cual ha sido implicada como la fuente principal de la infección (Dos Anjos y col., 2012). El principal mecanismo de transmisión es el directo (fecal-Oral), si bien la transmisión por el consumo de alimentos y/o agua contaminada es relevante; su transmisión se favorece por su persistencia en el medioambiente, por la ausencia de inmunidad de larga duración, por la baja dosis infecciosa (menos de 10 partículas virales). El reservorio y la fuente de infección son las personas con enfermedad aguda (Oka y col., 2015).

Cuadro Clínico y Diagnóstico

Sapovirus infecta al intestino delgado proximal generando síntomas clínicos que incluyen vómitos, dolor abdominal, deshidratación moderada grave, mala absorción de la lactosa y en menor medida diarrea y fiebre (Dey y col., 2007). El cuadro clínico de presentación suele ser más leve incluso que el de norovirus y suele autolimitarse, por lo que es muy rara la necesidad de hospitalización. El período de incubación varía entre 1-3 días (Figura 4) y su duración oscila entre 12 y 60 horas (Blacklow y Greenberg, 1991; Murray, 2006; Red, 2009; Bello y Hernandez, 2009).

Las infecciones causadas por sapovirus son poco frecuentes; sin embargo, ha sido recientemente reportado como una causa ocasional en hospitales y centros de salud en grupos de edad que varían de adultos jóvenes a ancianos. Lo que sugiere menos restricción de edad para la enfermedad de lo anteriormente observado (Ishida y col., 2008; Pang y col., 2009). La diarrea asociada a sapovirus es leve, aunque pueden ocurrir casos graves (Robinson y col., 2002).

Las cepas de sapovirus humanas no se pueden cultivar, por lo que su diagnóstico de sólo puede realizarse por medio de técnicas de biología molecular. Hasta el momento no existen métodos inmunológicos comercializados para el diagnóstico de las infecciones por sapovirus, por lo que debe realizarse por técnicas de transcripción reversa acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con oligonucleótidos específicos de sapovirus o con oligonucleótidos comunes a norovirus y sapovirus. Los genotipos de las cepas se determinan habitualmente por secuenciación de regiones amplificadas del gen de la ARN polimerasa y del gen de la cápside (Murray, 2006; Svraka y col., 2007; González, 2007; Red, 2009). En la actualidad, con el uso de técnicas moleculares, sapovirus ha sido cada vez más implicado como una causa muy importante de gastroenteritis (Grant y col., 2017).

HIPÓTESIS

La detección de sapovirus causantes de gastroenteritis en niños menores de cinco años en la región del sur de Sonora será mayor o igual al 6% respecto a casos previamente reportados en México.

OBJETIVOS

Objetivo General

Detectar y determinar el genotipo de las cepas de sapovirus en niños con gastroenteritis menores de cinco años en la región del Sur del estado de Sonora.

Objetivos Específicos

- Evaluar la severidad de la gastroenteritis mediante la escala propuesta por Ruuska y Vesikari.
- Determinar la incidencia de sapovirus en niños menores de cinco años con gastroenteritis y su relación con la severidad de la gastroenteritis en la región del Sur del estado de Sonora.
- Identificar los genotipos correspondientes de las cepas circulantes de Sapovirus detectado durante el periodo de estudio, mediante la secuenciación parcial del gen codificante para la proteína VP1 de la cápside en el marco de lectura ORF1.

MATERIALES Y METODOS

Área de Estudio

Las muestras de heces fecales se recolectaron del Hospital Regional de Navojoa y el Hospital del Niño y la Mujer en Cd. Obregón. Para el transporte de las muestras se utilizaron refrigerantes para mantener la temperatura fría, sin utilizar preservadores, una vez en el laboratorio se realizó una suspensión de cada muestra recolectada (heces diarreicas), en buffer de fosfatos (PBS) al 20% y posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Criterios de Inclusión y Exclusión

Se recolectaron muestras de heces de niños con gastroenteritis. Para el criterio de inclusión se consideró la edad del menor, no mayor a 5 años, presentar 3 o más episodios diarreicos en un tiempo no mayor de 24 h, vómito, fiebre o uno de los síntomas mencionados. Para lo anterior se aplicó un cuestionario en la recepción de cada una de las muestras donde se especificaba los síntomas que el paciente padecía (Anexo 1). Como criterios de exclusión, se consideró que la gastroenteritis fuera de origen bacteriano o parasitario y que el infante tuviera más de 5 años. Las muestras obtenidas de niños con gastroenteritis se transportaron al laboratorio de Microbiología e Inmunología (JL203) de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

Estimación de la Severidad de la Gastroenteritis

La severidad de la gastroenteritis se determinó en base al análisis de los síntomas del paciente de acuerdo a la escala de severidad propuesta por Ruuska y Vesikari, 1991. La escala de severidad, consiste en una tabla que resume cada uno de los síntomas de la

gastroenteritis como son diarrea, vomito, fiebre y deshidratación, estimando la frecuencia de cada uno y el puntaje específico asignado de acuerdo a la escala (Anexo 2). La sumatoria de los puntos en un caso determinado puede asociarse a la severidad de la gastroenteritis, una puntuación ≤ 10 se relaciona con casos de gastroenteritis leve, ≥ 11 casos moderados y ≥ 15 severos.

Extracción de Ácidos Nucleicos

La extracción del RNA se realizó utilizando el kit comercial QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit 50 (QIAGEN, Germany) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Brevemente, 140 μL de la muestra fueron mezclados con 560 μL del buffer mix (buffer AVL + buffer carrier RNA AVE) y homogenizados por 15 segundos mediante vortex (VORTEX MIXER), posteriormente se incubó a 25°C por 10 minutos para finalmente agregar 560 μL de etanol (96 % - 100%). Posteriormente, 630 μL de la mezcla anterior fue colocada en una minicolumna QIAamp y centrifugada a 6000 X g (7500 RPM) por un minuto para que el RNA se una a la membrana de las columnas. Las columnas fueron lavadas adicionando primeramente 500 μL del buffer AW1 y posteriormente con 500 μL del buffer AW2. La elución del RNA se realizó adicionando 60 μL de buffer AVE y centrifugando a 6000 X g (7 500 RPM) por 1 minuto, para finalmente almacenarlo a -20 °C.

Síntesis de DNA Complementario y Amplificación del gen Parcial ORF1

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó a partir de RNA utilizando el kit QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit 50 (QIAGEN, Germany). Brevemente, se mezclaron 10 ng de RNA con 1 μL (1 μM) del oligonucleótido externo SLV5317, se incubó a 95°C por 5 min y posteriormente se adicionaron 7 μL de la siguiente mezcla: 2 μL de Buffer M-MLV RT 5X (PROMEGA®), 1.3 μL de MgCl_2 (25 mM), 3.2 μL de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y 2 U de RT M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse*

Transcriptase, PROMEGA®). Finalmente, la mezcla anterior se incubó a 42°C por 60 min, seguido de 10 min a 72°C y se almacenó a -20°C.

La región parcial de la cápside ORF1 fue amplificada por medio de PCR en un termociclador (ProFlex PCR System, Applied Biosystems) usando oligonucleótidos específicos diseñados en base a la secuencia nucleotídica para sapovirus (KP298674.1). La reacción de PCR fue a un volumen final de 12.5 µl conteniendo: 6.5 µL de PCR Master Mix (PROMEGA®), 1 µL de cDNA equivalentes a 25-100 ng de RNA, 0.25 µL (25 µM) del oligonucleótido sentido "SLV5749" (CTCGCCACCTACRAWGCBTGGTT) y 0.25 µL (25 µM) del oligonucleótido anti sentido "SLV5317" (CGGRCYTCAA VSTACCBCCCCA). Las condiciones del programa de PCR fueron las siguientes: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 3 etapas a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 min, finalmente un ciclo de 72°C por 7 min (Romaní y col., 2012). El producto de PCR fue separado por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR® Safe DNA Gel stain (Invitrogen) y visualizado en un fotodocumentador MiniBis Pro DNr (Bio-Imaging Systems). Finalmente, los productos de PCR fueron purificados a partir del gel de agarosa utilizando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA®) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Secuenciación y Análisis de las Secuencias

Los productos de PCR fueron secuenciados por el método Sanger en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México en Cuernavaca, Morelos. Para demostrar que las secuencias nucleotídicas obtenidas corresponden a sapovirus, estas se compararon con las bases de datos del GenBank usando el algoritmo BLAST (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Por otro lado, para determinar el genogrupo correspondiente, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas obtenidas con las depositadas en la base de datos del GenBank (Tabla 2) usando el

programa BioEdit Sequence Alignment Editor
 (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Finalmente, las secuencias alineadas fueron analizadas utilizando el programa MEGA 7.0 (http://www.megasoftware.net/) para realizar el estudio filogenético. Los grupos de datos generados fueron analizados por el método de máxima verosimilitud en base al modelo Tamura-Nei (1993) con 1.000 bootstrap.

Tabla 2. Secuencias utilizadas en el alineamiento múltiple reportadas en el GenBank.

Nº	Procedencia	Genotipo	Nº de Acceso (GenBank)
1	Venezuela	GI.1	GU296663.1
2	Japón	GI.1	FJ823082.1
3	India	GII	KU317449.1
4	Japón	GII.1	LC081177.1
5	Aichio	GII.1	LC086705.1
6	PHL	GII.1	KP067430.1
7	Brasil	GIII	GU013771.1
8	Angelholm	GIV.1	DQ125333.1
9	Sapporo	GIV.1	DQ125333.1
10	Japón	GIV.1	DQ058829.1
11	Japón	GIV.1	DQ366346.1
12	California	GV.4	JN420370.2
13	Tailandia	GV.1	AY646856.2

RESULTADOS

Análisis de la Severidad de la Gastroenteritis

El análisis de la severidad de la gastroenteritis se realizó en base a 118 muestras. Del total de los casos, 64 (53.85%) se asociaron a niños y 54 (46.15%) a niñas. Donde ambos géneros 118 (100%) presentaban diarrea entre uno y cuatro días de duración, 55 (46%) vómito y 46 (39%) fiebre. Con respecto a la edad de los menores, 84 (72%) eran menores de dos años (Figura 3). Los niños menores de 1 año presentaron mayor incidencia en la sintomatología con respecto a la gastroenteritis. El análisis de severidad de la gastroenteritis mostró que 85 (72.03%) se asocian a casos de severidad leve, 26 (22.03%) moderados y 7 (5.98%) a casos severos (Tabla 3).

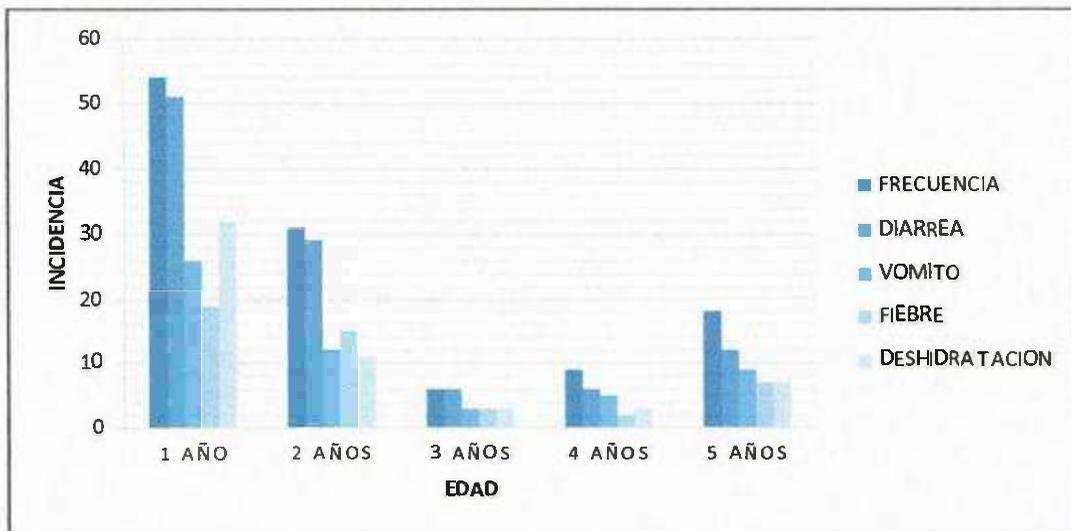


Figura 3. Severidad de la gastroenteritis en niños. Descripción de la sintomatología presente en los niños menores de cinco años con gastroenteritis en el Hospital General de Navojoa y en el Hospital del niño y la mujer.

Tabla 3. Análisis de la severidad de la gastroenteritis en niños menores de cinco años en base a la escala propuesta por Ruuska y Vesikari (1991).

Severidad	Clasificación	Incidencia	Sexo		Edad*	Días con Diarrea*	Evacuaciones Diarreicas*/24h	Días con Vomito*	Episodios de Vomito*/24h
			M	F					
≤ 10	Leve	85 (72.03%)	47	38	1.10 Años	2.5	3.1	1.1	0.6
≥ 11	Moderado	26 (22.03%)	12	14	1.7 Años	3.5	5.1	2.1	3.3
≥ 15	Severo	7 (5.98%)	5	2	0.9 Años	5.1	5.7	2.5	4.7

* Datos promedio

Con respecto a la severidad de la gastroenteritis ocasionada por sapovirus, se observó que los pacientes eran niños con edad que oscila entre los 4 meses y 5 años, incluyendo una sintomatología clínica de diarrea moderada (100%), fiebre (16%), deshidratación leve (33%) y en menor caso vómitos (16%) (Tabla 4). Según la escala propuesta por Ruuska y Vesikari, el 67% de los casos positivos para sapovirus se posicionan en una severidad leve, mientras que el 33% en una severidad moderada.

Tabla 4. Aspectos clínicos de los niños que presentaron gastroenteritis a causa de sapovirus.

Edad	Sexo	Diarrea (días)	Vómito (días)	Temperatura* (°C)	Deshidratación	Severidad de la gastroenteritis**
4m	M	1-4	0	37	Leve	Leve
36m	F	2	0	37	Sin deshidratación	Moderado
12m	F	2-3	0	37	Leve	Leve
60m	M	3	0	38.5	Sin deshidratación	Leve
24m	M	3	1	40	Leve	Leve
12m	M	6	0	37	Leve	Moderado

*En niños se considera Fiebre >38°C

** Escala de severidad de gastroenteritis de Ruuska y Vesikari

Amplificación del gen de la cápside de sapovirus

De las 118 muestras analizadas solo en 6 (7 %) amplificó el fragmento esperado de ~434 pb correspondiente a la región parcial del marco de lectura ORF1 codificante para la proteína principal de la cápside VP1 (Figura 4).



Figura 4. Amplificación del gen de la cápside VP1 de sapovirus, carril 1: Marcador de pares de bases (100pb DNA Ladder, Promega); carril 2-7 amplificación del segmento de la cápside (434 pb); carril 8 Control negativo.

Por otro lado, el producto de PCR que amplificó para el gen de la cápside de sapovirus fue enviado y secuenciado al Instituto de Biotecnología de la UNAM. En el análisis de secuencias a nivel de nucleótidos de 2/6 de las muestras positivas para sapovirus secuenciadas, nos reveló que 1 pertenece a sapovirus genotipo GI.1 con una identidad del 100% con cepas de sapovirus aisladas en Venezuela (GU296663.1) y Japón (FJ823082.1) y 1 a sapovirus GII.1 con una identidad del 96.7% con cepas aisladas en la India (KU317449.1) y Japón (LC081177.1) (Tabla 5).

El análisis filogenético de las 2 secuencias parciales de sapovirus aislados en este estudio, indicaron que una se agrupa al genogrupo GI.1 misma que se ubica en el grupo de cepas aisladas en Venezuela y Japón con un porcentaje del 99% (Figura 5). Por su parte, la cepa del genogrupo GII aislada en este estudio, se relacionó con el clúster correspondiente a cepas de sapovirus GI.1 aisladas en India, Filipinas y Japón con un porcentaje del 99% (Figura 5).

Tabla 5. Porcentaje de identidad de secuencias del gen VP1 de sapovirus de diferentes genogrupos

No. Genogrupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 GI.1_SONMX-58 LMI	-	100	100	54.2	55.0	55.4	55.4	55.0	41.6	68.2	67.8	67.4	67.4	59.8	67.0
2 GU296663.1 GI.1 Venezuela	100	-	100	54.2	55.0	55.4	55.4	55.0	41.6	68.2	67.8	67.4	67.4	59.8	67.0
3 FJ823082.1 GI.1 Japón	100	100	-	54.2	55.0	55.4	55.4	55.0	41.6	68.2	67.8	67.4	67.4	59.8	67.0
4 GII.1_SONMX-55 LMI	54.2	54.2	54.2	-	96.7	96.3	96.3	96.3	38.0	55.0	54.6	54.6	54.6	56.2	57.4
5 KU317449.1 Gil India	55.0	55.0	55.0	96.7	-	99.5	99.5	99.5	38.0	54.6	54.2	54.2	54.2	57.0	56.2
6 LC081177.1 Gil.1 Japón	55.4	55.4	55.4	96.3	99.5	-	100	99.1	37.6	54.2	53.8	53.8	53.8	57.4	56.6
7 LC086705.1 Gil.1 Aichio	55.4	55.4	55.4	96.3	99.5	100	-	99.1	37.6	54.2	53.8	53.8	53.8	57.4	56.6
8 KP067430.1 Gil.1 PHL	55.0	55.0	55.0	96.3	99.5	99.1	99.1	-	37.6	55.0	54.6	54.6	54.6	57.0	55.8
9 GU013771.1 swine Gil.1 Brasil	41.6	41.6	41.6	38.0	38.0	37.6	37.6	37.6	-	33.6	33.6	33.6	33.6	37.2	40.0
10 DQ125333.1 GIV.1 Angelholm	68.2	68.2	68.2	55.0	54.6	54.2	54.2	55.0	33.6	-	97.9	98.3	97.9	55.0	63.8
11 AJ786349.2 GIV.1 Sapporo Japón	67.8	67.8	67.8	54.6	54.2	53.8	53.8	54.6	33.6	97.6	-	99.5	99.1	54.2	64.2
12 DQ058829.1 GIV.1 JP	67.4	67.4	67.4	54.6	54.2	53.8	53.8	54.6	33.6	98.3	99.5	-	99.5	54.6	63.8
13 DQ366346.1 GIV.1 Japón	67.4	67.4	67.4	54.6	54.2	53.8	53.8	54.6	33.6	97.9	99.1	99.5	-	54.6	63.8
14 JN420370.2 GV.4 California	59.8	59.8	59.8	56.2	57.0	57.4	57.4	57.0	37.2	55.0	54.2	54.6	54.6	-	60.2
15 AY646856.2 GV.1 Tailandia	67.0	67.0	67.0	57.4	56.2	56.6	56.6	55.8	40.0	63.8	64.2	63.8	63.8	60.2	-

DISCUSIÓN

Sapovirus es uno de los agentes virales que comúnmente se asocian a infecciones gastrointestinales en niños menores de cinco años (Gutiérrez y col., 2010; Gomez y col., 2012). La detección de este virus se realiza actualmente por síntesis de cDNA y PCR del genoma viral; esta prueba ha permitido que sapovirus sea descrito como un patógeno emergente y poco frecuente en México y en otras partes del mundo como Japón y Canadá entre otros (Chiba y col., 2000; Phan y col., 2007; Farkas y col., 2004; Pang y col., 2009; Sdiri-Loulizi y col., 2010).

A pesar de que la incidencia real de sapovirus ha sido difícil de estimar por el reducido número de reportes disponibles a nivel mundial; estudios recientes han descrito que este virus juega un papel importante en términos de salud infantil (Zhou y col., 2016). Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue detectar y determinar el genotipo de las cepas de sapovirus en niños con gastroenteritis menores de cinco años en la región del sur del estado de Sonora. Los resultados indicaron que sapovirus se presentó con una incidencia del 7% (6/118) de las muestras analizadas, principalmente en muestras de niños menores de dos años, la cual presenta un aumento en la incidencia en comparación con estudios realizados en la Ciudad de México en el año 2010 y 2012, en la cual la incidencia de sapovirus oscila entre 0.25-1% (Gutiérrez y col., 2010; Gomez y col., 2012). Este es el primer estudio en el estado de Sonora donde se describe la presencia de sapovirus asociado a casos de gastroenteritis en la población infantil.

Para determinar la severidad de los casos de gastroenteritis por sapovirus en niños menores de cinco años, se realizó un análisis de cada uno de los síntomas en base a la escala propuesta por Ruuska y Vesikari (1991). El análisis de la severidad de la gastroenteritis de las 118 muestras en total indicó que el 72.03% (85/118) de los casos se asociaban a severidad leve, 22.03% (26/118) moderados y 5.98% (7/118) a casos severos. Por su parte, los casos positivos para sapovirus se asociaron a severidad leve en un 66% (4/6) y a una severidad moderada en el 34% (2/6). En promedio la gastroenteritis por sapovirus fue de 8 puntos respecto a la escala. En comparación con otros estudios en la región sobre otros agentes virales causantes de gastroenteritis en niños menores de cinco años, la severidad de la gastroenteritis ocasionada por sapovirus es más leve que la ocasionada por rotavirus y

norovirus, lo cual concuerda con lo mencionado por diferentes autores (Pang y col., 2009; Oka y col., 2015).

Al realizar el análisis de secuencias de las dos muestras positivas para sapovirus se observó que una de las cepas pertenecía al genotipo GI.1, la cual es una de las cepas más reportadas y asociadas a diarreas agudas en países como Tailandia, Japón y Pakistán (Sdiri-Loulizi y col., 2011). Por su parte, el análisis de otra de las cepas de sapovirus reveló que pertenece a cepas GII.1, la cual no se ha reportado en México y ha sido reportada en pocos países como Japón y Brasil (Aragão y col., 2010; Iritani y col., 2015). Aunque los casos de sapovirus se asociaron en su mayoría a gastroenteritis leves; este virus no deja de considerarse como un patógeno presente en la región como agente causal de diarrea en niños afectando su calidad de vida y su desarrollo. Aunado a lo anterior, la detección de genotipos poco comunes es indicador de la variabilidad genotípica del virus y del riesgo potencial de brotes infecciosos de sapovirus asociados a casos de gastroenteritis severa. Por tal motivo, la determinación de la incidencia y la variación de genotipos de sapovirus son importantes para el estudio del virus y el planteamiento de mejores estrategias de detección y prevención.

CONCLUSIÓN

De las 118 muestras analizadas, 6 muestras fueron positivas para sapovirus (7%), mientras que el análisis de secuencia de 2/6 de las muestras reveló la presencia de sapovirus GI.1 y GII.1, siendo esta última poco reportada a nivel mundial y reportada en México por primera vez. El análisis filogenético, indicó que las cepas reportadas en este trabajo, se ubican en el mismo grupo de cepas circulantes en Venezuela, la India y Japón. La severidad de la gastroenteritis ocasionada por sapovirus con respecto a los casos positivos, tiene una severidad leve, pero no se descarta el posible aumento de dicha severidad, dejando en claro la importancia de seguir monitoreando a nivel molecular las cepas circulantes de sapovirus en el país.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, E. J. (2010). Prevention and treatment of viral diarrhea in pediatrics. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(2), 205-217.
- Aragão, G. C., Oliveira, D. S., Santos, M. D., Mascarenhas, J. D. P., Oliveira, C. D., Linhares, A. C., & Gabbay, Y. B. (2010). Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saúde*, 1, 149-158.
- Bello, G., Hernandez, M., (2009). Virus emergentes Hendra virus, Norovirus y Sapovirus. Universidad de Barceló – Cátedra de Infectología. P. clínica. 163-267.
- Blacklow, N. R., & Greenberg, H. B. (1991). Viral gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 325(4), 252-264.
- Buesa, J., & Rodriguez-Díaz, J. (2016). The Molecular Virology of Enteric Viruses. In *Viruses in Foods* (pp. 59-130). Springer International Publishing.
- Chanit, W. (2009). Intergenogroup Recombinant Sapovirus in Japan, 2007–2008-Volume 15, Number 7—July 2009-Emerging Infectious Disease journal-CDC.
- Chiba, S., Nakata, S., Numata-Kinoshita, K., & Honma, S. (2000). Sapporo virus: history and recent findings. *Journal of Infectious Diseases*, 181(Supplement 2), S303-S308.
- Dey, S. K., Phan, T. G., Nguyen, T. A., Nishio, O., Salim, A. F. M., Yagyu, F., ... & Ushijima, H. (2007). Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004–2005. *Journal of medical virology*, 79(5), 633-638.
- Díaz Mora, J. J., Echezuria, L., Petit de Molero, N., Cardozo, M. A., Arias, A., & Rísquez, A. (2014). Diarrea aguda: Epidemiología, concepto, clasificación, clínica, diagnóstico, vacuna contra rotavirus. *Arch. venez. pueric. pediatr*, 77(1), 29-40.
- Domínguez, Á., Godoy, P., Torner, N., Cardeñosa, N., & Martínez, A. (2009). Las gastroenteritis víricas: un problema de salud pública. *Revista española de salud pública*, 83(5), 679-687.
- Dos Anjos, K., Lima, L. M., Silva, P. A., Inoue-Nagata, A. K., & Nagata, T. (2011). The possible molecular evolution of sapoviruses by inter-and intra-genogroup recombination. *Archives of virology*, 156(11), 1953.
- Elliott, E. J. (2007). Acute gastroenteritis in children. *BMJ: British Medical Journal*, 35-40.

- Farkas, T., Jiang, X., Guerrero, M. L., Zhong, W., Wilton, N., Berke, T., ... & Ruiz-Palacios, G. (2000). Prevalence and genetic diversity of human caliciviruses (HuCVs) in Mexican children. *Journal of medical virology*, 62(2), 217-223
- Farkas, T., Zhong, W. M., Jing, Y., Huang, P. W., Espinosa, S.M., Martinez, N., ... & Jiang, X. (2004). Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of virology*, 149(7), 1309-1323.
- Farthing, M., Salam, M., Lindberg, G., Dite, P., Khalif, I., & Salazar-Lindo, E. (2012). Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial.
- 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(1), 54.
- González de Caldas, R. Gastroenteritis de etiología viral no causada por Rotavirus. *VOX PEDIATRICA*. Volumen 15. N°1, 2007.
- Grant, L. R., O'Brien, K. L., Weatherholtz, R. C., Reid, R., Goklish, N., Santosham, M., ... & Vinjé, J. (2017). Norovirus and Sapovirus Epidemiology and Strain Characteristics among Navajo and Apache Infants. *PloS one*, 12(1), e0169491.
- Gutiérrez-Escolano, A. L., Velázquez, F. R., Escobar-Herrera, J., Saucedo, C. L., Torres, J., & Estrada-García, T. (2010). Human caliciviruses detected in Mexican children admitted to hospital during 1998–2000, with severe acute gastroenteritis not due to other enteropathogens. *Journal of medical virology*, 82(4), 632-637.
- Hall, A. J., Lopman, B. A., & Vinjé, J. (2013). Foodborne Infections and Intoxications: Chapter 22. Sapovirus. Elsevier Inc. Chapters.
- Hansman, G. S. (2005). Intergenogroup Recombination in Sapoviruses-Volume 11, Number 12—December 2005-Emerging Infectious Disease journal-CDC.
- Hansman, G. S., Oka, T., Katayama, K., & Takeda, N. (2007). Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Reviews in medical virology*, 17(2), 133-141
- Hernández, C. Aguilera, M.G. Castro, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 31(4), 137.
- Hostetler MA. 2004. Gastroenteritis: An Evidence-Based Approach to Typical Vomiting, Diarrhea and Dehydration. *Pediatric Emergency Medicine Practice*: 1-17.
- Howley P, Knipe D, Fields B: *Field's Virology*, 5th edn. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2007.
- Iritani, N., Yamamoto, S. P., Abe, N., Kubo, H., Oka, T., & Kaida, A. (2015). Epidemics of GI. 2 sapovirus in gastroenteritis outbreaks during 2012– 2013 in Osaka City, Japan. *Journal of medical virology*

- Ike, A. C., Hartelt, K., Oehme, R. M., & Brockmann, S. O. (2008). Detection and characterization of sapoviruses in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany. *Journal of Clinical Virology*, 43(1), 37-41.
- Ishida, S., Yoshizumi, S., Miyoshi, M., Ikeda, T., Okui, T., Katayama, K., ... & Oka, T. (2008). Characterization of sapoviruses detected in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis*, 61, 504-506.
- Lee, R. M., Lessler, J., Lee, R. A., Rudolph, K. E., Reich, N. G., Peri, T. M., & Cummings, D. A. (2013). Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC infectious diseases*, 13(1), 446.
- Lu, L., Jia, R., Zhong H., Xu, M., Su, L., Cao, L., ... & Xu, J. (2015). Molecular characterization and multiple infections of rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus and adenovirus in outpatients with sporadic gastroenteritis in Shanghai, China, 2010–2011. *Archives of virology*, 160(5), 1229-1238.
- Martínez M. Á. Gómez JB, García JC, Estape, JV. 2008. Microbiológico de las infecciones gastrointestinales.
- Martínez, M. A., de los Dolores Soto-del, M., Gutiérrez, R. M., Chiu, C. Y., Greninger, A. L., Contreras, J. F., ... & Isa, P. (2015). DNA microarray for detection of gastrointestinal viruses. *Journal of clinical microbiology*, 53(1), 136-145.
- Matussek, A., Dienus, O., Djeneba, O., Simporé, J., Nitiema, L., & Nordgren, J. (2015). Molecular characterization and genetic susceptibility of sapovirus in children with diarrhea in Burkina Faso. *Infection, Genetics and Evolution*, 32, 396-400.
- Moreno-Espinosa, S., Farkas, T., & Jiang, X. (2004, October). Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. In *Seminars in pediatric infectious diseases* (Vol. 15, No. 4, pp. 237-245). WB Saunders.
- Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2013). Emerging infectious diseases: threats to human health and global stability. *PLoS Pathog*, 9(7), e1003467.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaüer MA. *Microbiología Médica*. 5ª Ed. Elsevier, España, 2006.
- Oka, T., Wang, Q., Katayama, K., & Saif, L. J. (2015). Comprehensive review of human sapoviruses. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 32-53.
- Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., ... & Katayama, K. (2012). Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Archives of virology*, 157 (2), 349-352.
- Olivart, M., Galera, E., & Falguera, M. (2017). Gastroenteritis aguda y *Haemophilus parainfluenzae*: una asociación previsible pero no reportada. *Gastroenterología y Hepatología*, 40(1), 23-24.

- Organización Mundial de gastroenterología (OMG). (2012, Febrero). Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial. Disponible en: <http://www.worldgastroenterology.org>
- Pang, X. L., Lee, B. E., Tyrrell, G. J., & Preiksaitis, J. K. (2009). Epidemiology and genotype analysis of sapovirus associated with gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2004–2007. *Journal of Infectious Diseases*, 199(4), 547-551.
- Parashar, U. D., Burton, A., Lanata, C., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Steele, D., ... & Glass, R. I. (2009). Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *Journal of infectious diseases*, 200 (Supplement 1), S9-S15.
- Patel, M. M. (2008). Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis-Volume 14, Number 8—August 2008-Emerging Infectious Disease journal-CDC.
- Phan, T. G., Khamrin, P., Quang, T. D., Dey, S. K., Takanashi, S., Okitsu, S., ... & Ushijima, H. (2007). Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(4), 542-546.
- Ramani, S., & Kang, G. (2009). Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Current opinion in infectious diseases*, 22(5), 477-482.
- Riechmann ER, Torres JB, Rodríguez MJL. 2014. Diarrea aguda. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNP-AEP.
- Robinson, S., Clarke, I. N., Vipond, I. B., Caul, E. O., & Lambden, P. R. (2002). Epidemiology of human sapporo-like caliciviruses in the South West of England: Molecular characterisation of a genetically distinct isolate. *Journal of medical virology*, 67(2), 282-288.
- Romani, S., Azimzadeh, P., Mohebbi, S. R., Bozorgi, S. M., Zali, N., & Jadali, F. (2011). Prevalence of sapovirus infection among infant and adult patients with acute gastroenteritis in Tehran, Iran. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*, 5(1).
- Ruuska, T., & Vesikari, T. (1991). A prospective study of acute diarrhoea in Finnish children from birth to 2 1/2 years of age. *Acta Paediatrica*, 80(5), 500-507.
- Sdiri-Loulizi, K., Hassine, M., Gharbi-Khellifi, H., Aouni, Z., Chouchane, S., Sakly, N., ... & Aouni, M. (2011). Molecular detection of genogroup I sapovirus in Tunisian children suffering from acute gastroenteritis. *Virus Genes*, 43(1), 6-12.
- Shirato-Horikoshi, H., Ogawa, S., Wakita, T., Takeda, N., & Hansman, G. S. (2007). Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Archives of virology*, 152(3), 457-461.
- Stewart, A. G., Ghebrehewet, S., & MacPherson, P. (2016). New and emerging infectious diseases. *Health Protection: Principles and practice*, 271.

- Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., de Bruin, E., van der Veer, B., Dorresteyn, B., & Koopmans, M. (2007). Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *Journal of clinical microbiology*, 45(5), 1389-1394
- Svraka, S., Vennema, H., van der Veer, B., Hedlund, K. O., Thorhagen, M., Siebenga, J., ... & Koopmans, M. (2010). Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. *Journal of clinical microbiology*, 48(6), 2191-2198.
- Tse, H., Chan, W. M., Li, K. S., Lau, S. K., Woo, P. C., & Yuen, K. Y. (2012). Discovery and genomic characterization of a novel bat sapovirus with unusual genomic features and phylogenetic position. *PloS one*, 7(4), e34987.
- Varela, M. F., Hooper, A. S., Rivadulla, E., & Romalde, J. L. (2016). Human Sapovirus in Mussels from Ría do Burgo, A Coruña (Spain). *Food and environmental virology*, 8(3), 187-193.
- Wilhelmi, I., Roman, E., & Sanchez-Fauquier, A. (2003). Viruses causing gastroenteritis. *Clinical microbiology and infection*, 9(4), 247-262.
- Zuckerman, A. J. (2009). *Principles and practice of clinical virology*. John Wiley & Sons, 358-363.

ANEXOS

Anexo 1

Encuesta

IDENTIFICACIÓN:								
NOMBRE: _____								
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)						
FECHA DE NACIMIENTO: ____/____/____								
dd	mm	aa						
MUNICIPIO: _____		ESTADO: _____						
GENERO: M ____ F ____		EDAD: ____/____/____						
		Año Mes Día						
DOMICILIO ACTUAL: _____								
Calle y número	Colonia y/o Localidad	Municipio/Estado						
DATOS DE LA UNIDAD TRATANTE:								
NOMBRE: _____		CLAVE: _____						
¿El niño está en una guardería? Si ____ Nombre de la guardería: _____ No ____								
<p>ANTECEDENTES</p> <p>¿SE ALIMENTA DE PECHO MATERNO? <input type="checkbox"/></p> <p>1. Si</p> <p>2. No</p> <p>Edad de inicio _____</p> <p>Edad de termino _____</p> <p>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS</p> <p>FECHA DE INICIO</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%; text-align: center;">Dia</td> <td style="width: 33%; text-align: center;">Mes</td> <td style="width: 33%; text-align: center;">Año</td> </tr> </table> <p>EVACUACIONES:</p> <p>1. Líquida <input type="checkbox"/></p> <p>2. Pastosa</p> <p>3. Formada</p> <p>SÍNTOMAS</p> <p>Números de días con diarrea <input type="checkbox"/></p> <p>1. 1-4 días</p> <p>2. 5 días</p> <p>3. > 6 días</p> <p>Otro: _____</p>	Dia	Mes	Año	<p>Evacuaciones en 24 hrs <input type="checkbox"/></p> <p>1. 1-3 por día</p> <p>2. 4-5 por día</p> <p>3. > 6 por día</p> <p>Otro: _____</p> <p>Días con vómito <input type="checkbox"/></p> <p>1. No vómito</p> <p>2. 1 día</p> <p>3. 2 días</p> <p>4. 3 días</p> <p>Otro: _____</p> <p>Episodios de vómito en 24 hrs. <input type="checkbox"/></p> <p>1. cero</p> <p>2. 1 por día</p> <p>3. 2-4 por día</p> <p>4. > 5 días</p> <p>Otro: _____</p> <p>Temperatura en °C <input type="checkbox"/></p> <p>1. 37 °C</p> <p>2. 37.1 °C - 38.4 °C</p> <p>3. 38.5 °C - 38.9 °C</p> <p>4. >39 °C</p>	<p>Deshidratación <input type="checkbox"/></p> <p>1. Sin deshidratación</p> <p>2. Leve</p> <p>3. Moderada/severa</p> <p>Tratamiento <input type="checkbox"/></p> <p>1. Ninguno</p> <p>2. Medicamento supervisado</p> <p>3. Hospitalizado</p> <p>Vacuna contra rotavirus:</p> <p>Rotarix (si/no)</p> <p>1ª dosis: ____ Fecha: _____</p> <p>2ª dosis: ____ Fecha: _____</p> <p>Rotateq (si/no)</p> <p>1ª dosis: ____ Fecha: _____</p> <p>2ª dosis: ____ Fecha: _____</p> <p>3ª dosis: ____ Fecha: _____</p> <p>Datos de laboratorio:</p> <p>Fecha de toma de muestra:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%; text-align: center;">Dia</td> <td style="width: 33%; text-align: center;">Mes</td> <td style="width: 33%; text-align: center;">Año</td> </tr> </table> <p>Resultado:</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	Dia	Mes	Año
Dia	Mes	Año						
Dia	Mes	Año						
Observaciones:								
Responsable de la información:								
Nombre: _____		Teléfono: _____						
Dirección: _____								

Anexo 2

Tabla severidad de la gastroenteritis de Ruuska

Tabla que resume cada uno de los síntomas de la gastroenteritis, la frecuencia de cada uno y el puntaje específico asignado de acuerdo a la escala de Ruuska y Vesikari, 1991. La sumatoria de los puntos en un caso determinado puede asociarse a la severidad de la gastroenteritis una puntuación ≤ 10 se relaciona con casos de gastroenteritis leve, ≥ 11 casos moderados y ≥ 15 severos.

SINTOMATOLOGIA	FRECUENCIA	PUNTOS
Días con diarrea	<1	0
	1-4	1
	5	2
	6	3
Evacuaciones en 24 h	1-3	1
	4-5	2
	>6	3
Días con vómito	No vómitos	0
	1	1
	2	2
	3	3
Episodios de vómito en 24h	0	0
	1	1
	2-4	2
Temperatura en °C	>5	3
	37 °C	0
	37.1 °C - 38.4 °C	1
	38.5 °C - 39.9 °C	2
Deshidratación	>39 °C	3
	Nada	0
	Leve	2
Tratamiento	Moderada/severa	3
	Ninguno u otro	0
	Medicamento supervisado	1
	Hospitalizado	2

Anexo 3

Solicitud de Secuenciación

UNIDAD DE SINTESIS Y SECUENCIACION DE DNA (USSDNA) DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNAM

Solicitante: _____ email: _____ Tel. _____

Institución: _____ Dependencia: _____

Lider académico: _____ Fecha de solicitud: _____

NOTA: Nuestro secuenciador automatico de DNA lee correctamente alrededor de 700 pares de bases a partir de la base 50, desde el extremo 3' del oligo usado para el proceso de secuenciación.

	SELECCIONE TIPO DE ADN	Tamaño (Kbp)	Nombre de Muestra (4 a 7 caracteres)	Nombre de Oligo y Ta	Kit usado para la purificación del DNA
1	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
2	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
3	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
4	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
5	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
6	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
7	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
8	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
9	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
10	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
11	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
12	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
13	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
14	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
15	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
16	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
17	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____
18	PCR Plásmido	_____	_____	_____	_____

Si notas algo extraño en tus secuencias, por favor infórmalos directamente a la extensión 27712 o email (jay@ibt.unam.mx) para tratar de resolver el problema.

PREPARACION DE LA MUESTRA:

La mezcla DNA/Oligo se debe entregar en un volumen final de 16 µl, en un tubo eppendorf de tapa plana de 0.2 ml para PCR, sin anotaciones en la tapa. Dicha mezcla debe contener 10 pmolas del oligo elegido para secuenciar (por ejemplo, 1 ul de solución de oligo 10 µM (pmol/µl)) y 300-500 ng de plásmido si su tamaño es de 3-5 Kb. Si el plásmido es del doble de tamaño, entonces se deben entregar 600-1000 ng. En caso de productos de PCR, éstos se deben purificar por gel y entregar 100-120 ng, mezclados con 10 pmolas de oligo, en el mismo volumen final de 16 µl. La calidad del proceso de secuenciación depende principalmente de la calidad y cantidad del DNA entregado. Antes de enviar las muestras, se recomienda analizarlas por gel y cuantificarlas por nanodrop. La cuantificación por gel es subjetiva y no debe usarse para estimar la concentración de DNA.

La USSDNA puede adicionar los oligonucleótidos:

m13/pUC-40 FORWARD	5'-GTT TTC CAGT CACG TTG TA-3'
m13/pUC REVERSE	5'-TTGTGAGCGGA TAACAATTC-3'
T7 PRIMER	5'-TAA TACGAC TCACTA TAGGG-3'
SK PRIMER	5'-CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC-3'
T3 PRIMER	5'-CGCATTTAA CCC TCACTAAAG-3'
KS PRIMER	5'-TCGAGG TCGACG GTA TCG-3'