

**Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Xochimilco  
Ciencias Biológicas y de la salud  
Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica**

**“TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *NOROVIRUS* POR PCR EN  
TIEMPO REAL”**

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

18 de Septiembre 2019 – 18 de Marzo 2020

**José María Vargas Lazgare**

**Matrícula: 2152042925**

---

Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa  
Profesor de la Universidad Autónoma  
Metropolitana unidad Xochimilco.  
Asesor Interno

---

D. en C Herlinda García Lozano  
Jefa del Laboratorio de Virus Gastrointestinales  
Asesor externo

**18/Marzo/2020.**

# Índice

1. Introducción.....	3
2. Marco Teórico.....	3
2.1 Gastroenteritis – Enfermedad Diarreica Aguda.....	3
2.2 Norovirus.....	4
2.3 Métodos de detección de <i>NoV</i> .....	9
2.4 RT-qPCR.....	10
3. Justificación.....	11
4. Objetivos.....	11
4.1 Objetivo General.....	11
4.2 Objetivos específicos.....	11
5. Metodología.....	11
5.1 Muestras de heces y obtención de ácidos nucleicos.....	11
5.2 Identificación de muestras positivas a <i>NoV</i> GI por RT-PCR.....	12
5.3 RT-qPCR para muestras positivas a <i>NoV</i> GI y GII.....	12
5.4 RT-PCR para posibles muestras a usar como controles a <i>NoV</i> GI.....	13
6. Resultados.....	13
6.1 Muestras positivas a <i>NoV</i> GI.....	13
6.2 RT-qPCR Duplex para muestras positivas a <i>NoV</i> GI y GII.....	13
6.3 RT-qPCR Duplex para muestras positivas.....	14
6.4 RT-PCR para confirmación de controles positivos a <i>NoV</i> GI.....	14
7. Actividades extras realizadas en el Laboratorio de Virus Gastrointestinales....	15
8. Discusión.....	16
9. Conclusión.....	16
10. Recomendaciones.....	17
11. Bibliografía.....	17

## 1. Introducción

Las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, y ocasionan la muerte de 525, 000 niños cada año (Organización Mundial de la Salud, 2017) y los *Norovirus (NoV)* humanos son la principal causa de gastroenteritis aguda epidémica y pandémica en todo el mundo (Fumian y otros, 2019). Las heces enteras son la muestra clínica preferida para la detección de *NoV* porque contiene una mayor cantidad de virus (Vinjé, 2015). Aunque la RT-PCR se ha convertido en el estándar para el diagnóstico de infección por *NoV* en todo el mundo Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos (Escobar Herrera y otros, 2006).

En el presente estudio se pretende implementar la técnica de RT-qPCR en tiempo real para la detección de los genogrupos GI y GII de *Norovirus* humano. Para lo cual se identificaron muestras positivas para los genogrupos GI y GII de *NoV* a través de RT-PCR de punto final para usar como controles positivos en los ensayos de RT-qPCR, en dichos ensayos se usaron diferentes valores de threshold y Ct. Sin embargo, resulta de gran importancia tener un control interno confiable que pueda ser usado para que los ensayos puedan ser cuantitativos.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Gastroenteritis - Enfermedad Diarreica Aguda (EDA)

Se define la gastroenteritis aguda como una inflamación y/o disfunción intestinal producida por un agente infeccioso o sus toxinas. Se caracteriza por un síndrome diarreico, acompañado o no de vómitos y dolor abdominal. El proceso es más frecuente y grave en los niños que en el adulto sano (Rojas y otros, 2000).

Las gastroenteritis de origen vírico son las más frecuentes en los países industrializados. Las gastroenteritis víricas cursan con náuseas, vómitos, diarrea, malestar, dolor abdominal, cefalea y fiebre. Se transmiten fundamentalmente de forma fecal-oral por contacto interpersonal o por ingestión de agua o alimentos contaminados (Bellido Blasco, 2006). Los brotes de gastroenteritis viral están asociados con la contaminación del agua debido a las aguas residuales que contienen las partículas virales, que se descargan en aguas superficiales y ríos (Mendieta y otros, 2017).

A nivel mundial, casi una quinta parte de todos los casos de gastroenteritis aguda son inducidos por *NoV* (Gelaw y otros, 2019), son responsables del 18% de todos los casos de gastroenteritis aguda en todo el mundo y son entre la segunda y tercera causa de mortalidad más común en niños menores de 5 años, ocasionando la muerte de 525,000 niños cada año (Organización Mundial de la Salud, 2017; Alam y otros, 2016; Santiso Bellón y otros, 2019), y se estima que 212,000 muertes anuales están relacionadas con el *NoV* (Fumian y otros, 2019). La mayor parte de los resultados graves de la enfermedad diarreica recae en los países de bajos ingresos (Gelaw y otros, 2019).

Se calcula que, en Estados Unidos, más del 90% de los brotes epidémicos de gastroenteritis son atribuibles a *NoV* (Ribes Fernández, 2010). Para la mayoría de las personas, la gastroenteritis por *NoV* es relativamente leve y de corta duración, pero los niños, las personas inmunocomprometidas y los ancianos son

especialmente vulnerables a la infección, con síntomas a menudo más largos y más graves (Alam y otros, 2016).

## 2.2. Norovirus (NoV)

Los NoV fueron los primeros virus que se visualizaron en heces, mediante microscopía electrónica en un brote de gastroenteritis ocurrido en un colegio de Norwalk, Ohio; en ese momento se les denominó virus Norwalk (figura 1) (Bellido Blasco, 2006; Ribes Fernández, 2010).

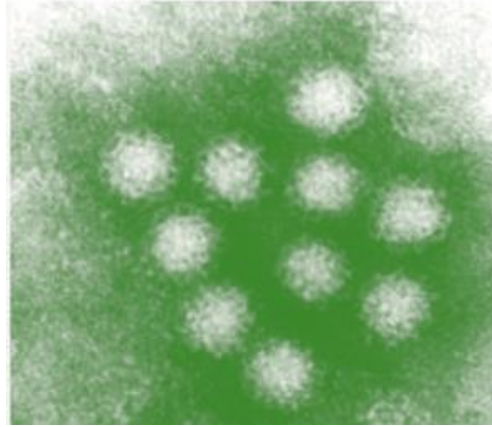
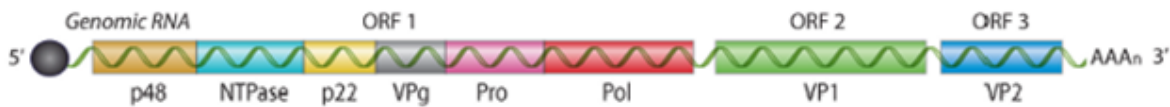


Figura 1. Partículas virales de Norovirus observadas mediante microscopio electrónico. Imagen tomada de (Bellido Blasco, 2006).

Los NoV humanos son la principal causa de gastroenteritis aguda epidémica y pandémica en todo el mundo, la cual ocurre con frecuencia en la temporada de invierno. Los brotes asociados con NoV afectan a personas de todas las edades (Fumian y otros, 2019).

Los NoV pertenecientes a la familia *Caliciviridae*, corresponden a un grupo de virus icosaédricos, no envueltos, de 26 a 35 nm de diámetro, (Agricultura, 2017), de RNA monocatenario de sentido positivo, con un genoma de 7,5 a 7,7 kb (Vinjé, 2015), que se organiza en tres marcos de lectura abiertos, (ORF1-ORF3). ORF1 codifica una poliproteína que se procesa proteolíticamente en 6 proteínas no estructurales (Robilotti y otros, 2015). ORF2 codifica la proteína principal de la cápside VP1, con dos dominios S y P, mientras que el ORF3 codifica la proteína menor de la cápside VP2 (figura 2) (Fumian y otros, 2019).



P48 (NS1/NS2)- N term (proteína amino terminal)	VPg (NS5)- Proteína viral ligada a genoma	VP1- Proteína mayor de la cápside
NTPasa (NS3) Nucleósido trifosfatasa	Pro (NS6)- Proteínasa	VP2- Proteína menor de la cápside
P22 (NS4) Proteína similar a 3A	Pol (NS7)- ARN polimerasa dependiente de ARN	

Figura 2. El genoma del Norovirus humano. El genoma está compuesto por un ARN lineal de sentido positivo, de 7.7 kb de longitud, unido covalentemente al genoma de la proteína viral (VPg) (circulo negro sólido) en el extremo 5' y poliadenilado en el extremo 3'. Hay tres marcos de lectura abiertos (ORF), designados ORF 1, ORF 2 y ORF 3 que codifican ocho proteínas virales. ORF 1 codifica las seis proteínas no estructurales (NS) que son procesadas proteolíticamente por la cisteína proteinasa codificada viralmente (Pro). ORF 2 y ORF 3 codifican los componentes estructurales del virión, la proteína viral VP1 y VP2, respectivamente. Imagen tomada de (Robilotti y otros 2015).

La necesidad de organizar las cepas de NoV en diferentes grupos o grupos genéticos se reconoció a mediados de la década de 1990, cuando los NoV se dividieron principalmente en genogrupos y genotipos basados en secuencias parciales de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Cuando más secuencias estuvieron disponibles, la clasificación cambió para designar genogrupos y genotipos basados en la secuencia completa de aminoácidos de VP1 con una diferencia de secuencia del 20% utilizada como umbral de corte para nuevos genotipos, y luego se ajustó al 15% (Chhabra y otros, 2019).

En 2013 investigadores del grupo de trabajo de clasificación de *Norovirus* (NCWG) propuso una nomenclatura estandarizada universal y un sistema de tipificación para la genotipación de los NoV GI y GII utilizando el agrupamiento filogenético de las secuencias de aminoácidos VP1 completas. Basado en un análisis de los datos de secuencia disponibles en ese momento, los NoV se clasificaron en seis genogrupos (GI a GVI), con un séptimo genogrupo propuesto (GVII). Estos genogrupos se dividieron en más de 40 genotipos (figura 3) (Chhabra y otros, 2019 y Fumian y otros, 2019), con características antigénicas propias y virulencia variable (Bellido Blasco, 2006).

En 2019, se propuso aumentar el número de genogrupos a 10 (GI-GX) y el número de genotipos a 49 (9 GI, 27 GII, 3 GIII, 2 GIV, 2 GV, 2 GVI y 1 genotipo cada uno para GVII, GVIII, GIX (anteriormente GII.15) y GX (Chhabra y otros, 2019).

Los NoV del genogrupo GI y GII son los más comunes que infectan a los humanos y que se pueden dividir en 9 y 22 genotipos, respectivamente (Alam y otros 2016). Sin embargo, solo un genotipo (GII.4) ha sido la causa más frecuente de infecciones en todo el mundo (Fumian y otros, 2019). Durante las últimas dos décadas, ocho variantes GII.4 han estado circulando, cada una reemplazando una variante dominante anterior y desde 2012 GII.4 Sídney es la variante GII.4 más contemporánea (Chhabra y otros, 2019).

En Brasil se reportaron brotes donde el 72.5% (50/80) fueron por GII.4, en Vietnam el 78% de brotes estuvo relacionado al mismo genotipo (53/68) y en Japón se reportaron 39 brotes entre diciembre de 2001 y abril de 2006 (Ritchie, 2016).

Nuevas variantes de GII.4 emergen cada 2-3 años y se convierten en la causa de epidemias globales de gastroenteritis agudas (Kim y otros, 2013). En el invierno de 2014-2015, una nueva variante del NoV GII.17 surgió y se hizo predominante en Huzhou, y reemplazó a la cepa GII.4 Sídney 2012 que circulaba anteriormente (Cheng y otros, 2018).

El NoV es altamente contagioso y se propaga principalmente por contacto directo de persona a persona o indirectamente a través de fómites o mediante el consumo de alimentos o agua contaminados (Alam y otros, 2016; Miranda Guarines, 2020).

Varios factores mejoran la transmisibilidad del NoV, incluido el pequeño inóculo requerido para causar infección (<100 partículas virales), diseminación viral prolongada y su capacidad para sobrevivir en el medio ambiente (Robilotti y otros, 2015).

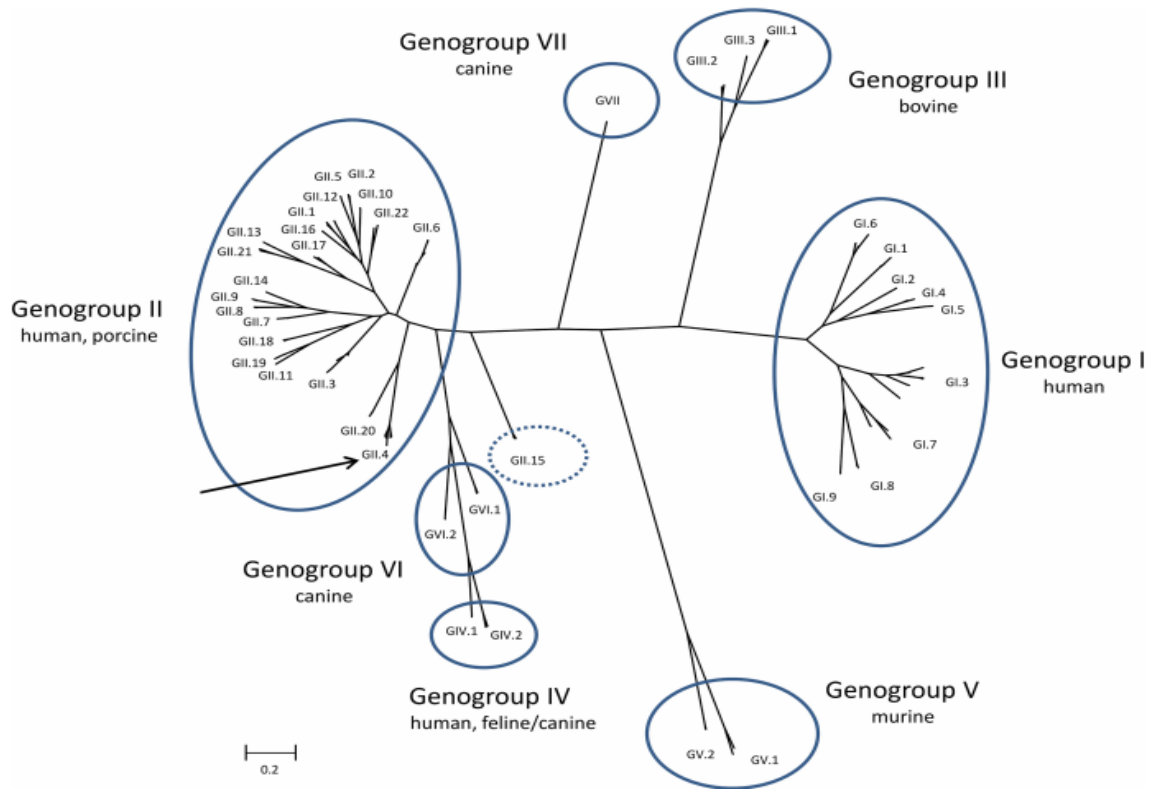


Figura 3. Clasificación de los Norovirus en siete genogrupos (GI-GVII) según la diversidad de secuencia de aminoácidos en la proteína completa de la cápside VP1. Imagen tomada de (Vinjé, 2015).

Los NoV infectan a una amplia gama de especies de mamíferos huéspedes que incluyen humanos, perros, gatos, cerdos, ratones, ovejas y vacas. Recientemente se han identificado varios nuevos NoV no clasificados en murciélagos, leones marinos y marsopas y en primates no humanos (Chhabra y otros, 2019).

El período de incubación de una infección por NoV es, generalmente, de 24-48 h (Vinjé, 2015). La enfermedad se caracteriza clínicamente por la aparición brusca de náuseas (79%), vómitos (69%), diarrea no sanguinolenta (66%), fiebre (37%) y dolor abdominal (30%) (Ribes Fernández, 2010).

Se ha demostrado que la infección depende de la presencia de antígenos de grupo histosanguíneo (HBGA) específicos, que actúan como receptores para el virus en el intestino de los hospedadores susceptibles. La combinación de la unión específica de cada cepa de NoV a receptores HBGA específicos y la expresión variable de los mismos puede explicar la distinta susceptibilidad a la infección. Los NoV se unen a los receptores celulares a través de un dominio específico de la proteína de la cápside. Esta posee dos dominios funcionales: el dominio S (la porción interna de la cápside) y el dominio P (la porción protuberante). El dominio P se divide en los subdominios P1 (el enlace entre el interior y la región P2) y P2 (que se une al receptor celular y es la región más externa de la cápside). La secuencia génica que codifica P2 es la región más variable del genoma de NoV y expresa determinantes de su unión al receptor y epítomos reconocidos por anticuerpos (Ribes Fernández, 2010).

La presencia o la ausencia de alelos de los genes FUT1, FUT2 y FUT3, que codifican las enzimas que glicosilan de forma secuencial distintos precursores, determinan si un individuo es susceptible a la infección por una cepa determinada de *NoV*. El estado denominado “secretor” depende de la expresión del gen que codifica la enzima  $\alpha$ -1,2-fucosiltransferasa (FUT2) y determina la susceptibilidad a las infecciones por *NoV* (Ribes Fernández, 2010).

Las personas que son “no secretoras” (20% de los europeos) son resistentes a la infección por el virus Norwalk (GI.1). Se ha observado que algunas cepas de *NoV* infectan sólo a un conjunto de la población humana y se han identificado ocho patrones distintos de HBGA que permiten la unión a muy diversos genotipos de norovirus dentro de los genogrupos GI y GII, lo que hace posible que prácticamente todos los individuos sean susceptibles a la infección por alguna cepa de *NoV*. Aunque parece que los HBGA son esenciales para la infección, pueden existir otros receptores adicionales, o los *NoV* podrían unirse a otros hidratos de carbono no identificados todavía (Ribes Fernández, 2010).

Se desconoce el mecanismo de internalización de los *NoV* humanos después de unirse a los HBGA, pero dependerá de la dinamina y el colesterol, como se ha demostrado para los *NoV* murinos. La replicación del virus ocurre en el citoplasma en estrecha asociación con los complejos de membrana derivados del huésped (figura 4). Los mecanismos de montaje y liberación de *NoV* humanos siguen siendo en gran medida desconocidos (De Graaf y otros, 2016).

Una persona puede contraer la enfermedad del *NoV* varias veces en su vida porque hay muchos tipos diferentes de *NoV*. La infección con un tipo de *NoV* puede no protegerlo contra otros tipos. Es posible desarrollar inmunidad a tipos específicos. Pero, no se sabe exactamente cuánto dura la inmunidad (Centro para el control y prevención de enfermedades, 2018).

Los estudios realizados con voluntarios demostraron que los individuos infectados desarrollan una respuesta inmunitaria después de la infección, aunque de corta duración, de entre 6 y 14 semanas (Ribes Fernández, 2010).

Según se va haciendo más aparente la importancia de los *NoV* tanto a nivel clínico como socioeconómico, va ganando más fuerza la necesidad del desarrollo de una vacuna, sin embargo, el desarrollo de vacunas efectivas para prevenir la gastroenteritis por *NoV* no sería adecuado si no se prueba que tras la infección se produce inmunidad efectiva a largo plazo (Bellido Blasco, 2006). Además, no se han conseguido aislar ni cultivar *NoV* humanos en cultivos celulares, y tampoco se dispone de un modelo animal, lo que dificulta su estudio (Ribes Fernández, 2010).

Lo que más dificulta el desarrollo de una vacuna es que las cepas de *NoV* se someten a procesos continuos de mutaciones puntuales y/o recombinación (Santiso Bellón y otros, 2019).

En muestras de materia fecal se ha encontrado que los *Calicivirus* son tan frecuentes como los Rotavirus (García y otros, 2004). En poblaciones pediátricas en países industrializados donde se ha introducido una vacuna contra el rotavirus, los *NoV* están reemplazando rápidamente al *Rotavirus* como la causa más común de gastroenteritis aguda (Vinjé, 2015).



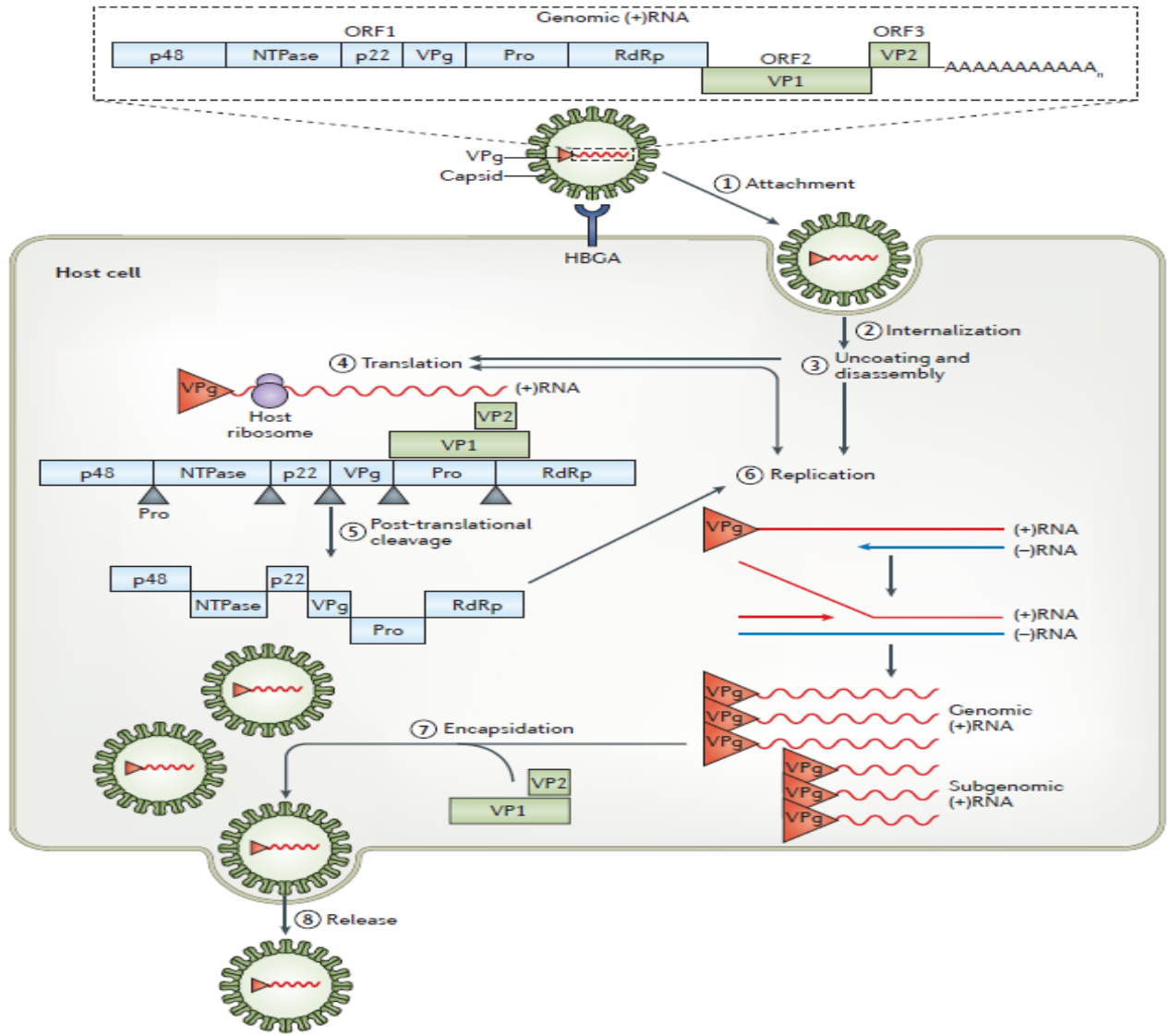


Figura 4. La composición y el ciclo de vida de los NoV humanos. La cápside se adhiere a la superficie celular a través de interacciones entre VP1 y los antígenos del grupo histo-sanguíneo del huésped (HBGA) (paso 1), y posteriormente se internaliza, no se recubre y se desmonta (pasos 2,3). El ARN (+) se transcribe y traduce en el citoplasma de la célula huésped. La traducción está mediada por factores de traducción del huésped que son reclutados por la proteína del virus no estructural VPg, que se une covalentemente al extremo 5' del genoma (paso 4). La poliproteína codificada por ORF1 se escinde post-traduccionalmente (paso 5) por la proteasa codificada por virus Pro (también conocida como NS6 o 3C-like), en proteínas individuales: p48 (también conocido como NS1 / 2 o N-term), NTPase (también conocido como NS3 o 2C-like), p22 (también conocido como NS4 o similar a 3A), VPg, Pro y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Durante la replicación del genoma, el ARN (+) es transcrito en ARN de sentido negativo ((-) ARN), que se utilizan como plantillas para la síntesis de nuevos ARN genómicos y subgenómicos (+), respectivamente (paso 6). Los ARN subgenómicos (+) contienen solo ORF2 y ORF3, y se utilizan para producción de VP1 y VP2. Durante la encapsidación (paso 7), los ARN genómicos (y posiblemente subgenómicos) (+) se empaquetan en nuevos viriones, que posteriormente se liberan de la célula huésped infectada (paso 8), aunque el mecanismo por el cual se produce la liberación sigue siendo en gran medida desconocido. Imagen tomada de (De Graaf y otros, 2016).



### 2.3. Métodos de detección de NoV.

Las muestras de heces enteras son la muestra clínica preferida para la detección de NoV porque contienen una mayor cantidad de virus. Debido a que la rápida propagación del NoV es un problema importante de salud pública, el diagnóstico rápido de laboratorio (Tabla 1) es esencial para ayudar a la implementación de medidas de control apropiadas para reducir la propagación del virus y la magnitud de los brotes (Vinjé, 2015).

Tabla 1. Análisis de laboratorio para la detección de Norovirus. Tabla tomada de (Vinjé, 2015).

Pruebas de laboratorio	Ventajas	Desventajas	Tiempo	Mercado
Microscopia electrónica	Capacidad de detectar múltiples patógenos virales.	Equipo y entrenamiento costoso, rendimiento bajo, insensible.	15 min	Laboratorios de referencia
Inmunoensayo enzimático inmunológico	Alta especificidad, alto rendimiento	57-76% sensibilidad	60-90 min	Salud pública, laboratorios clínicos
Inmunocromatografía	Alta especificidad, sin equipo especial, una muestra puede ser probada	35-52% sensibilidad	15 min	Punto de cuidado
RT-PCR convencional	Amplicones de PCR pueden ser secuenciados y usados para tipificación	Los resultados deben ser confirmados por secuenciación o hibridación	5-6 horas	Laboratorios de referencia
RT-PCR en tiempo real	Alta especificidad, sensibilidad y rendimiento, posibilidad de multiplexar múltiples objetivos.	Requiere equipo de PCR, reduce especificidad clínica	3 horas	Salud pública, laboratorios clínicos

La microscopía electrónica (EM) fue el primer método para detectar el virus. Una simple prueba rápida de NoV sería una alternativa atractiva a los ensayos más exigentes técnicamente, como los inmunoensayos enzimáticos (EIA) y la PCR de transcriptasa inversa. Los ensayos de flujo lateral inmunocromatográfico (ICG) no requieren equipo de laboratorio especializado y están diseñados para pruebas rápidas (15 minutos) de muestras individuales, pero con una sensibilidad baja. El aumento de la especificidad y sensibilidad se logra mediante el uso de ensayos de Retro Transcriptasa PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) que no requieren análisis de gel de agarosa y posterior confirmación y, en la mayoría de los protocolos, usan sondas oligonucleotídicas marcadas con fluorescencia (Vinjé, 2015).

#### 2.4. RT-qPCR

Aunque la RT-PCR se ha convertido en el estándar para el diagnóstico de infección por NoV en todo el mundo. Sin embargo, la sensibilidad de la RT-PCR puede verse afectada por la presencia de inhibidores en muestras clínicas y ambientales a pesar del uso de métodos de extracción diseñados para eliminar inhibidores. Por lo tanto, no detectar estos virus podrían deberse a la presencia de inhibidores de RT-PCR resultando en resultados falsos negativos (Escobar Herrera y otros, 2006).

Los ensayos de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) muestran la mayor promesa debido a su simplicidad y capacidad para generar datos cuantitativos (Jothikumar y otros, 2005). Los métodos moleculares que utilizan RT-PCR y RT-qPCR se utilizan ampliamente para detectar NoV en diversos campos, incluidos los diagnósticos, la investigación de brotes y la vigilancia ambiental. Se han desarrollado y validado varios métodos de RT-qPCR para detectar NoV que se sabe que infectan a los humanos (Masago y otros, 2016).

A medida que evolucionan las tecnologías de diagnóstico, RT-PCR se está reemplazando por la RT-qPCR, que puede ser más sensible y rápido y, cuando se usa con una sonda Taqman (figura 5), proporciona confirmación y cuantificación en un solo ensayo (Glass y otros, 2009).

Debido a que solo una pequeña región del genoma del NoV está suficientemente conservada para el desarrollo de cebadores y sondas de oligonucleótidos específicos de genogrupo, la mayoría de los ensayos RT-qPCR de NoV informados se dirigen a esta región de unión ORF1-ORF2. Los ensayos RT-qPCR de un solo paso, en los que se realizan tanto la transcripción inversa como la amplificación de ADNc en una sola reacción, requieren menos manipulación de la muestra y, por lo tanto, disminuyen el riesgo de contaminación cruzada, lo que los convierte en un formato preferido en los laboratorios clínicos (Vinjé, 2015).

La inclusión de pruebas de diagnóstico de NoV mediante PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real en la rutina clínica y de salud pública en los últimos años ha confirmado la importancia de los NoV GI y GII a nivel mundial (Chhabra y otros, 2019).

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun con una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia (Tamay De Dios y otros, 2013).

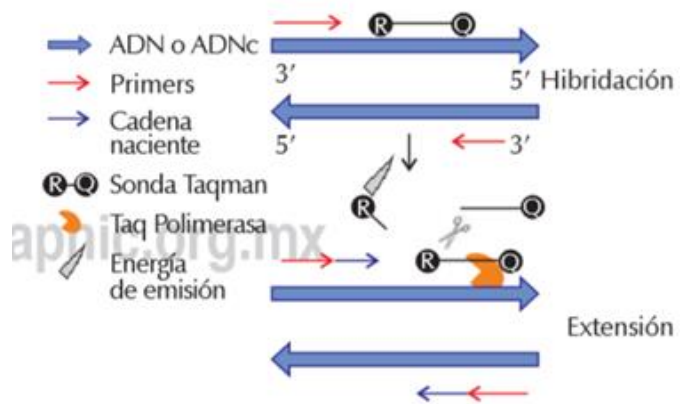


Figura 5. Método específico mediante la utilización de las sondas Taqman. Imagen tomada de (Tamay De Dios y otros, 2013).

### 3. Justificación

Las enfermedades diarreicas (gastroenteritis aguda) son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, y ocasionan la muerte de 525 000 niños cada año (Organización Mundial de la Salud, 2017) . Estas enfermedades se caracterizan por un síndrome diarreico, ocasionalmente acompañado de vómitos y dolor abdominal (Rojas y otros, 2000).

El agente *Norwalk* fue el primer virus identificado como causante de gastroenteritis en humanos (Glass y otros 2009). Los virus de tipo *Norwalk*, de la familia *Caliciviridae*, son el principal agente causal de la gastroenteritis aguda no bacteriana la cual ocurre con frecuencia en la temporada de invierno en todo el mundo (Kojima y otros, 2001; Farkas, 2015).

Un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa asociado a la transcriptasa inversa (RT-PCR) se ha convertido en el método de referencia para detectar el *Norovirus* en muestras fecales, agua y alimentos. La PCR en tiempo real (qPCR) está reemplazando a la RT-PCR porque es más sensible y rápida, además cuando se usa con una sonda Taqman, proporciona confirmación y cuantificación en un solo ensayo (Glass y otros, 2009).

Por lo tanto, el diagnóstico molecular por esta metodología permitirá identificar, diferenciar y tipificar los genogrupos GI y GII de *Norovirus* asociados a la EDA.

### 4. Objetivos

#### 4.1. Objetivo General

- Colaborar en la implementación de la RT-qPCR en tiempo real para la detección de los genogrupos GI y GII de *Norovirus* Humano.

#### 4.2. Objetivos Específicos

- Identificar muestras positivas para los genogrupos GI y GII de *Norovirus* a través de RT-PCR de punto final.
- Implementar el método de RT-qPCR para *Norovirus* a partir de muestras fecales. Considerando los valores de Ct y de threshold.
- Identificar los genogrupos GI y GII de *Norovirus* en muestras con un diagnóstico presuntivo de Gastroenteritis Viral por RT-qPCR, que ingresen al laboratorio, a través de los NuTraVE-EDA.

### 5. Metodología

#### 5.1. Muestras de heces y obtención de ácidos nucleicos

Se usaron muestras de heces fecales y de RNA positivas a *NoV*, del banco de muestras del 2019 del Laboratorio de Virus Gastrointestinales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (InDRE). A partir de las muestras de heces se realizó la extracción de ácidos nucleicos de forma manual con el mini kit QIAamp® para ARN viral. El cual consiste en realizar una dilución 1:1 para la cual se toman 300 µL de muestra fecal y 300 µL de solución salina, después se centrifuga y se toman 140 µL de sobrenadante que es colocado en un tubo Eppendorf, junto con 560 µL de buffer de lisis (AVL) para eliminar proteínas y lisar a las células, 5.6 µL de acarreador y se deja por 10 min. a temperatura ambiente. Después se le agregan 560 µL de etanol para sedimentar el material genético, se toman 630 µL y se colocan en una camisa con una columna de gel de sílice, se centrifuga a 8000 rpm por 1 min.

se pasa la columna de sílice a otra camisa y se colocan otros 630  $\mu\text{L}$  que se centrifugan a 8000 rpm por 1 min. Se vuelve a pasar la columna de sílice a otra camisa y se agregan 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado (AW1) y se centrifuga a 8000 rpm por 1 min. Nuevamente se cambia la columna de sílice a otra camisa y se colocan 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado (AW2) y se centrifuga a 14000 rpm por 3 min. y en seguida se vuelve a centrifugar a 14000 rpm por 1 min. Se vuelve a cambiar la columna de sílice ahora a un tubo Eppendorf y se colocan 60  $\mu\text{L}$  de buffer AVE para eluir, se deja incubar por 1 min. a temperatura ambiente y finalmente se centrifuga a 8000 rpm por 1 min. Posteriormente se saca la columna del tubo Eppendorf. La elución que va a contener el ácido nucleico viral puro va a quedar en el tubo Eppendorf y finalmente se puede almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2 Identificación de muestras positivas a NoV GI por RT-PCR

Se realizaron dos ensayos de RT-PCR de punto final, la primera fue para 93 muestras de RNA positivas a NoV y la segunda para 18 muestras de RNA positivas a NoV, en ambos casos se usaron 3 controles (control positivo, control negativo y control negativo de reacción), se usaron los cebadores GISKF y GISKR reportados por (Kojima, y otros, 2001), la enzima SúperScript-platinum Taq de Invitrogen®. Bajo las siguientes condiciones de reacción para 35 ciclos de PCR:  $45^{\circ}\text{C}$  a 30 min. para la retrotranscripción,  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 min. para desnaturalización,  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 seg. para desnaturalización,  $49^{\circ}\text{C}$  por 45 seg. para alineación,  $73^{\circ}\text{C}$  por 50 seg. para elongación y finalmente  $73^{\circ}\text{C}$  por 7 min. para extensión final.

Posteriormente para obtener los resultados de la RT-PCR se realizaron electroforesis en gel de agarosa prefabricados E-Gel Ex 2% agarosa que contiene SYBR® Gold II, que fueron corridos por 10 min. en un E-Gel adaptador base de Invitrogen®. Para lo cual se usaron 18  $\mu\text{L}$  de marcador de 1kb y 18  $\mu\text{L}$  de cada muestra de RNA amplificado. Finalmente se tomó una imagen del gel con ayuda de un fotodocumentador BioRad y el programa Quantity one.

### 5.3 RT-qPCR para muestras positivas a GI y GII.

Se realizó un ensayo de RT-qPCR a partir de las muestras encontradas como positivas a NoV GI y algunas muestras positivas a NoV GII para corroborar que puedan ser usadas como controles. La RT-qPCR se llevó a cabo usando los cebadores mostrados en la tabla 2 reportados por (Jothikumar, y otros, 2010 y Trujillo, y otros, 2006), se usó la enzima AgPath ID® One-step bajo las siguientes condiciones de reacción para 50 ciclos:  $45^{\circ}\text{C}$  por 10 min. para la retrotranscripción,  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 min. para la inactivación,  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 seg. para desnaturalización y  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 min. para el alineamiento.

Tabla 2. Cebadores y sondas. A partir de que cepa de referencia fue sintetizado cada cebador y sonda.

Cepa de Referencia	Cebador Forward	Cebador Reverse	Sonda	Método
M87661	GISKF	GISKR	-	RT-PCR
M87661	Cog 1F	Cog 1R	Ring 1C	RT-qPCR
AF145896	Cog 2F	Cog 2R	Ring 2	RT-qPCR

#### 5.4 RT-PCR para posibles muestras a usar como controles a NoV GI.

Se realizó por duplicado un ensayo de RT-PCR para las posibles muestras a usar como controles en los ensayos de RT-qPCR. Con la finalidad de obtener los amplicones de NoV GI y GII y mandar a secuenciarlos y posteriormente realizar un alineamiento bioinformático para determinar a qué cepa corresponden ambos controles.

El ensayo de RT-PCR se llevó a cabo con las mismas condiciones de las RT-PCR descritas en el punto 6.2.

## 6 Resultados

### 6.1 Muestras positivas a NoV GI

En la primera RT-PCR de 93 muestras se obtuvieron tres muestras positivas, mientras que en la segunda de 18 muestras se obtuvieron 2 muestras positivas a NoV GI (figura 6). Sin embargo, solo dos muestras podrían usarse como posibles controles positivos para la RT-qPCR.

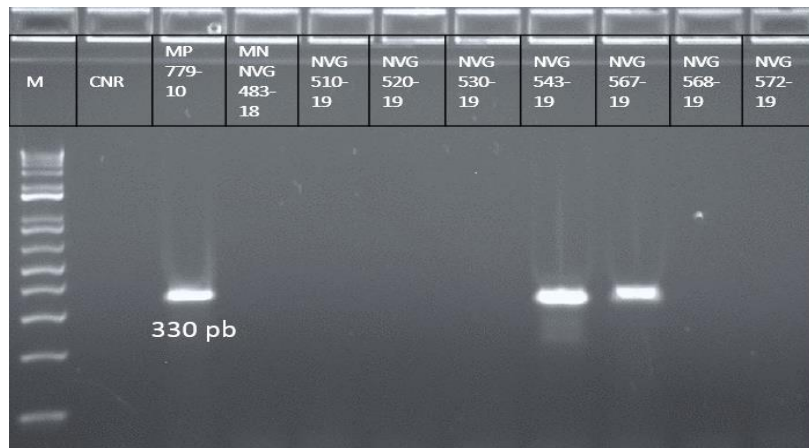


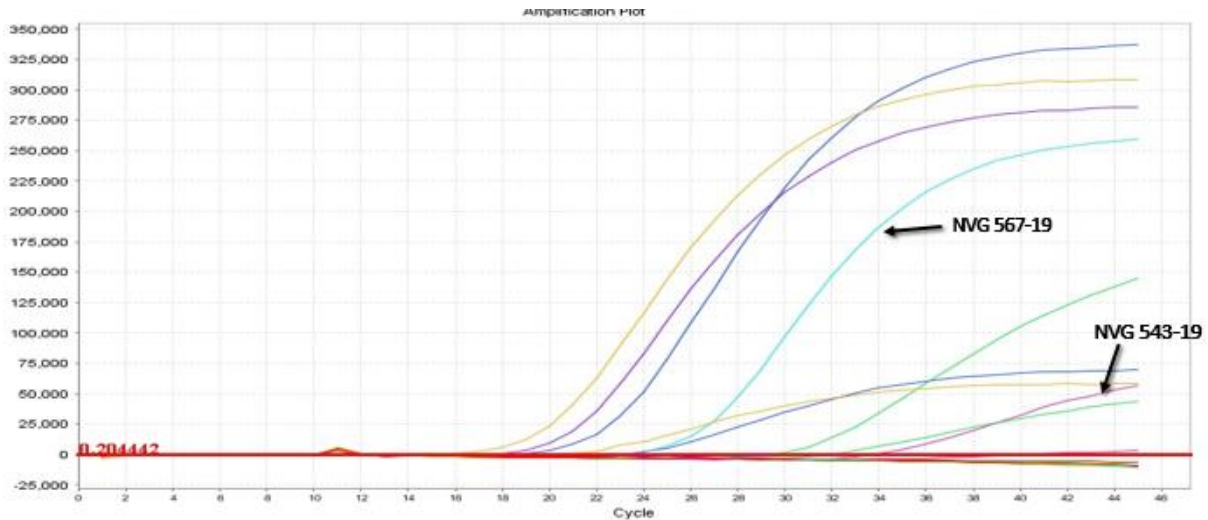
Figura 6. Gel de agarosa con dos muestras positivas a NoV GI.

### 6.2 RT-qPCR Duplex para muestras positivas a NoV GI y GII.

En la RT-qPCR realizada para observar la amplificación de las muestras positivas a NoV GI se encontró que la muestra NVG 543-19 tiene muy poca amplificación, ya que tiene un Ct muy alto, y no se observa una curva sigmoide, sin embargo, la muestra NVG 567-19 si presenta un buen Ct por lo tanto es mejor candidata a ser usada como control positivo para futuros ensayos. Los valores de Ct de ambas muestras se encuentran en la tabla 3, estos fueron tomados con base en las curvas de la gráfica 1.

Tabla 3. Muestras positivas a NoV GI y su Ct obtenido.

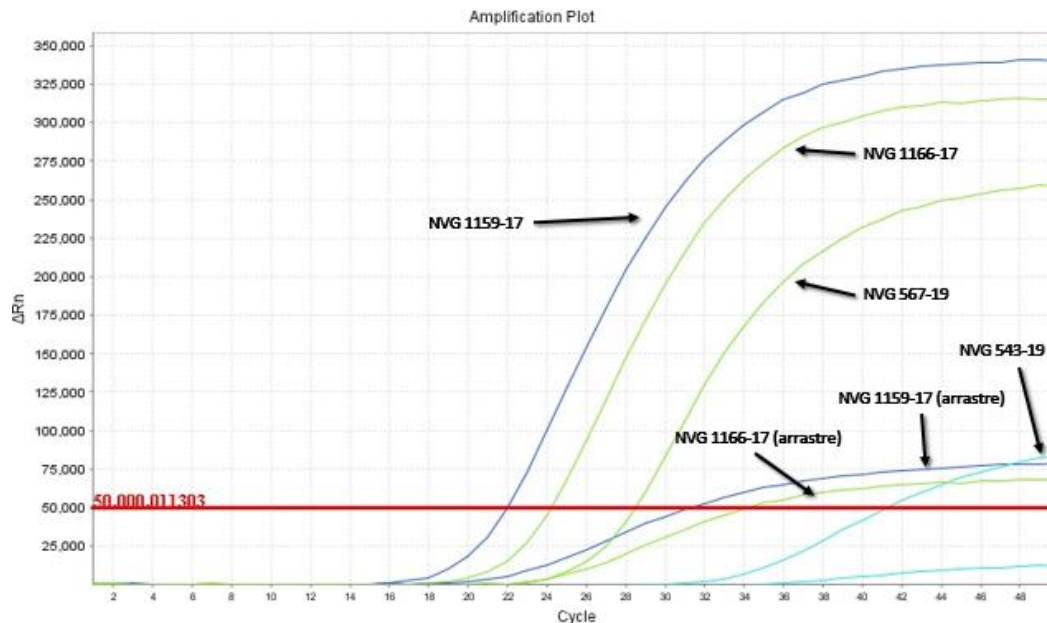
Muestra	NVG 567-19	NVG 543-19
Genotipo	GI	GI
Ct	23.45 - 45	33.79 - 40



Gráfica 1. Curva sigmoide de dos muestras positivas a NoV GI. La muestra NVG 567-19 (azul) presenta una buena amplificación, mientras que en la muestra NVG 543-19 (morado) no se observa una buena curva sigmoide.

### 6.3 RT-qPCR Dúplex para muestras positivas

En los ensayos de RT-qPCR dúplex para muestras positivas a NoV GII se observa un arrastre en las gráficas (gráfica 2), se trató de eliminar este arrastre usando una mayor cantidad de templado, menor enzima e iniciadores, sin embargo, el arrastre no se logró eliminar.



Gráfica 2. Muestras a NoV GII con su arrastre. Muestras positivas a NoV GII (NVG 1159-17, NVG 1166-17), muestras positivas GI (NVG 567-19, NVG 543-19)

### 6.4 RT-PCR para confirmación de controles positivos a NoV GI.

En los dos ensayos realizados por RT-PCR se observó que la muestra NVG 567-19, que anteriormente había dado un resultado positivo, ahora mostraba un resultado negativo (figura 7), por lo tanto, esta muestra ya no podría ser usada como control en los ensayos de RT-qPCR.

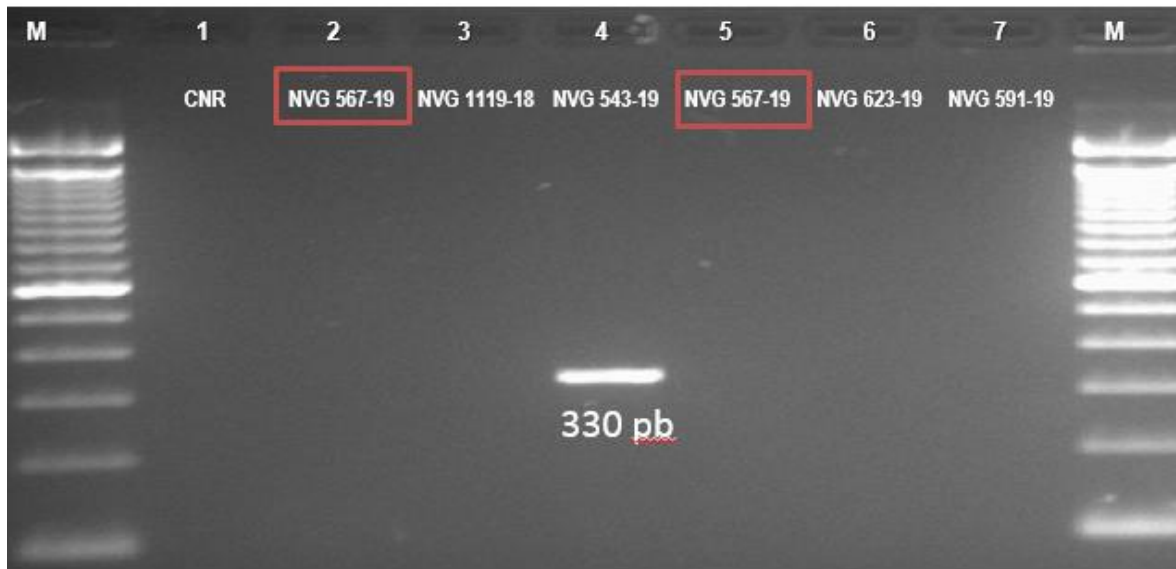


Figura 7. Gel de agarosa para NoV GI. Se observa a la muestra NVG 567-19 con un resultado negativo.

## 7 Actividades extras realizadas en el Laboratorio de Virus Gastrointestinales.

- I. Se colaboró en la realización de ensayos de RT-PCR de punto final, para corroborar que las muestras elegidas como controles sigan dando un resultado positivo, bajo las siguientes condiciones de ciclado para 35 ciclos de PCR: 45°C a 30 min. para la retrotranscripción, 95°C por 10 min. para desnaturalización, 94°C por 30 seg. para desnaturalización, 49°C por 45 seg. para alineación, 73°C por 50 seg. para elongación y finalmente 73°C por 7 min. para extensión final. A los amplicones obtenidos se les realizó una electroforesis en gel de agarosa.
- II. Se participó en el etiquetado de desecho de reactivos y contenedores para material de desecho.
- III. Se realizó la actualización digital y en carpetas físicas del banco de dispositivos médicos.
- IV. Se colaboró en la realización de RT-qPCR para la estandarización del método para la identificación de NoV en ácidos nucleicos extraídos a partir de muestras fecales. Para la RT-qPCR se usaron las siguientes condiciones de ciclado para 50 ciclos: 1 ciclo a 45°C por 10 min para la retrotranscripción, 1 ciclo a 95°C por 10 min para desnaturalización, 15 seg a 95°C para desnaturalización y 1 min a 60°C para alineamiento. Para distinguir como se muestran las curvas de GI de GII. Con base en los artículos de (Hill, Mull, Jothikumar, Ferdinand, & Vinjé, 2010) y (Trujillo, y otros, 2006).
- V. Se elaboraron ejercicios de bioinformática para los alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos y búsqueda de secuencias del genbank en el NCBI con el programa Bioedit.
- VI. Se apoyó en la realización de ensayos ELISA de tipo sándwich dirigidos al gen VP6 de Rotavirus, con el fin de observar el cambio de color que tienen las muestras positivas a Rotavirus por la unión antígeno-anticuerpo.



- VII. Se apoyó en la preparación del panel para la evaluación de la RNLSP. Así como en los procesos de embalaje, y documentación de envío.
- VIII. Se auxilió al personal del laboratorio en la capacitación en PAGE para los estados (Campeche, Estado de México, Querétaro y Aguascalientes) miembros de la RNLSP.
- IX. Se efectuaron ensayos de PAGE para la detección de Rotavirus. Con el fin de distinguir los patrones electroforéticos que tienen las muestras positivas.

## 8 Discusión

En un estudio realizado por (Gómez Santiago y otros, 2012) se encontró que de 131 muestras positivas a *Calicivirus* de las cuales 88 fueron positivas a *NoV* GII, concretamente 86 a *NoV* GII.4 y 2 a *NoV* GII.2. Con lo cual se ha seguido observando que el genotipo predominante en México es *NoV* GII.

Esto se pudo observar ya que en el presente proyecto de las 118 muestras analizadas por RT-PCR solamente 5 dieron positivo a *NoV* GI. Sin embargo, solo 2 de las 5 muestras mostraban una carga viral alta, esto con lo observado en el gel de agarosa. Pero debido a que la muestra NVG 567-19 en ensayos posteriores de RT-PCR dio un resultado negativo, y la muestra NVG 543-19 no mostraba una buena amplificación en la RT-qPCR. Por lo tanto no se pudo obtener una muestra positiva a *NoV* GI que pueda servir como control positivo a dicho genotipo, para futuros ensayos de RT-qPCR.

Por otra parte las posibles muestras a ser usadas como control positivo de *NoV* GII no mostraron problema, debido a que este genotipo infecta a la mayoría de la población en México. Sin embargo, en lo concerniente a la técnica de RT-qPCR, las muestras positivas a *NoV* GII que se analizaron revelan un ligero arrastre (gráfica 2), que a pesar de los diferentes intentos por eliminarla (mayor templado, menor enzima e iniciador) no se logró quitarlas. Creemos que este arrastre se deba a una unión inespecífica de los iniciadores y sonda GI en las cepas GII, por lo tanto una de las propuestas para eliminar estos arrastres es diseñar iniciadores más específicos para las cepas de *NoV* GII que más circulan en el país.

Con la reciente propuesta de aumentar los genogrupos a 10 y los genotipos a 49 resulta de gran importancia tener técnicas estandarizadas para tipificación, sobre todo por que los *NoV* están aumentando su incidencia y su importancia en salud pública, ya que es un virus que evoluciona y constantemente están saliendo nuevos genotipos, o variación dentro de un mismo genotipo.

## 9 Conclusión

Las perspectivas a futuro que se plantean para estandarizar la técnica de RT-qPCR consiste en la obtención de un amplicón que posteriormente sea secuenciado e insertado en un plásmido para después pueda ser usado como control positivo, y por lo tanto ser usado para realizar una curva estándar para fijar el límite de detección en el cual se pueda decir si una muestra desconocida es positiva o negativa y si es *NoV* GI o GII.

Debido al reciente aumento de casos de diarrea aguda causada por NoV resulta de gran importancia la creación de una vacuna, sin embargo, se ha encontrado que una vez contraída la enfermedad el individuo solamente tendrá inmunidad por 4-6 meses, y quizás no sea contra todos los genotipos. Lo que hace muy difícil la creación de una vacuna, ya que podría no causar una inmunidad prolongada.

## 10 Recomendaciones

Además de la obtención de un plásmido que funcione como control para los ensayos de RT-PCR y RT-qPCR, también se recomienda el diseño de iniciadores a partir de las cepas que más circulan en el país, tanto para NoV GI como para GII. Para hacer el ensayo aún más específico

## 11 Bibliografía

1. Agricultura, M. d. (14 de Octubre de 2017). *Norovirus*. Recuperado el 8 de Noviembre de 2019, de <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-02-Norovirus-v01.pdf>
2. Aguilar Rojas, A., Segura Schulz, C., & Boscá Crespo, A. (2000). *Gastroenteritis Agudas*. Málaga, España.
3. Alam, A., Quresh, S. A., Vinjé, J., & Zaidi, A. (2016). Genetic Characterization of Norovirus Strains in Hospitalized Children From Pakistan. *Journal Medical of Virology*, 216-223.
4. Bellido Blasco, J. B. (2006). *Epidemiología de las Gastroenteritis Agudas Víricas*. Valencia, España: Sociedad Española de Epidemiología.
5. Centers for Disease Control and Prevention, C. (01 de Junio de 2018). *Norovirus*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2019, de <https://www.cdc.gov/norovirus/about/index.html>
6. Chhabra, P., De Graaf, M., Parra, G., Chi-Wai Chan, M., Green, K., Martella, V., & Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of general virology*, 1393-1406.
7. De Graaf, M., Van Beek, J., & Koopmans, M. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Microbiology*, 421-433.
8. Escobar Herrera, J., Cancio, C., Guzmán, G., Villegas Sepulveda, N., Estrada García, T., García Lozano, H., . . . Gutiérrez Escolano, A. (2006). Construction of an internal RT-PCR standard control for the detection of human caliciviruses in stool. *Journal of Virological Methods*, 334-338.
9. Espinosa Garcia, A. C., Arias Ortiz, C. F., & Mazari-Hiriart, M. (2004). Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública. *Hidrobiológica*, 166-178.
10. Farkas, T. (2015). Rhesus enteric calicivirus surrogate model for human norovirus gastroenteritis. *Journal of General Virology*, 1504-1514.

11. Fumian, T. M., Fioretti, J. M., Lun, J. H., Dos Santos, I. A., White, P. A., & Miagostovich, M. P. (2019). Detection of norovirus epidemic genotypes in raw sewage using next generation sequencing. *Environment International*, 282-291.
12. Gelaw, A., Pietsch, C., Mann, P., & Liebert, U. G. (2019). Molecular detection and characterisation of sapoviruses and noroviruses in outpatient children with diarrhoea in Northwest Ethiopia. *Epidemiology and Infection*, 1-7.
13. Glass, R., Parashar, U., & Estes, M. (29 de Octubre de 2009). Gastroenteritis por Norovirus. *The New England Journal of Medicine*, 1776-1785.
14. Gómez Santiago, F., Ribas Aparicio, R., & García Lozano, H. (2012). Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in Mexican children. *Virology Journal*, 54-62.
15. Hill, V. R., Mull, B., Jothikumar, N., Ferdinand, K., & Vinjé, J. (2010). Detection of GI and GII Noroviruses in Ground Water Using Ultrafiltration and TaqMan Real-time RT-PCR. *Food and Environmental Virology*, 218-224.
16. Ji, L., Cheng, L., Xu, D., Wu, X., & Han, J. (2018). Nearly complete genome sequence of one GII.17 Norovirus identified by direct sequencing from HuZhou, China. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 1-9.
17. Jothikumar, N., Lowther, J. A., Henshilwood, K., Lees, D. N., Hill, V. R., & Vinjé, J. (2005). Rapid and Sensitive Detection of Noroviruses by Using TaqMan-Based One-Step Reverse Transcription-PCR Assays and Application to Naturally Contaminated Shellfish Samples. *American Society for Microbiology*, 1870-1875.
18. Kim, J.-S., Kim, H. S., Hyun, J., Wonkeun, S., & Kim, H.-S. (2013). Molecular Epidemiology of Human Norovirus in Korea in 2013. *BioMed Research International*, 1-8.
19. Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Uchida, K., Takeda, N., Natori, K., & Katayama, K. (2001). Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of virological methods*, 107-114.
20. L., T., C., I., & C., V. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud*, 70-78.
21. Masago, Y., Konta, Y., Kazama, S., Inaba, M., Susuki, A., & Omura, T. (2016). Comparative Evaluation of Real-Time PCR Methods for Human Noroviruses in Wastewater and Human Stool. *Journal Plos ONE*, 1-10.
22. Mendieta Mendoza, A., Zavala Diaz, F. J., Delgado Gardea, M. E., Gomez Flores, R., Tamez Guerra, P., Contreras Cordero, J. F., & Erosa Vega, G. (2017). Prevalence of Rotavirus Genogroup A and Norovirus Genogroup II in Bassaseachic Falls National Park Surface Waters in Chihuahua, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1-11.
23. Miranda Guarines, K., Germano Mendes, R., Ferraz de Magalhães, J., & Pena, L. (2020). Partial Genome Sequences of Human Norovirus Strains from northeast Brazil. *microbiology Resources Announcements*, 135-138.

24. OMS. (02 de Mayo de 2017). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 30 de Septiembre de 2019, de Enfermedades diarreicas: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
25. Ribes Fernández, J. M., & Buesa Gómez, J. (2010). Infecciones por Norovirus. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica.*, 51-55.
26. Ritchie, A., Hung, A., & Gómez Sánchez, M. (2016). Detección de Norovirus GI Y GII en muestrasde agua del Río Piura mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. *Salud tecnología veterinaria*, 47-54.
27. Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. A. (2015). Norovirus. *Clin. Microbiology Rev.*, 134-164.
28. Santiso Bellón, C., Monzó, C., Fuentes Trillo, A., Rodríguez Díaz, J., Buesa, J., & Chaves, F. (2019). Nearly Complete Genome Sequences of Human Norovirus Belonging to Several Genotypes from Valencia, Spain. *Microbiology Resource Announcements*, 1-3.
29. Trujillo, A. A., McCaustland, K. A., Zheng, D.-P., Hadley, L. A., Vaughn, G., & Adams, S. M. (2006). Use of TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR for Rapid Detection, Quantification, and Typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 1405-1412.
30. Vinjé, j. (2015). Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *Journal of clinical Microbiology*, 373-381.