

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE)

“Dr. Manuel Martínez Báez”

**“Optimización del método RT-PCR en tiempo real para la
detección de *Rotavirus*”**

BRENDA JUÁREZ PATRICIO

SERVICIO SOCIAL

Del 18 de septiembre de 2019 al 18 de marzo de 2020

Departamento de Virología
Laboratorio de Virus Gastrointestinales (LVGI)

Unidad Xochimilco
Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo

Asesor Interno
Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa
Profesor de la UAM-X

Asesor Externo
Dra. en C. Herlinda García Lozano
Jefa del Laboratorio de Virus Gastrointestinales del InDRE

18 - Marzo – 2020

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Epidemiología <i>Rotavirus</i>	4
2.2. <i>Rotavirus</i>	5
2.3. Clasificación del <i>Rotavirus</i>	6
2.4. <i>Rotavirus</i> de Grupo A.....	7
2.5. Ciclo de replicación del <i>Rotavirus</i>	8
2.6. Técnicas de identificación de RVA.....	9
2.7. RT-qPCR.....	9
2.8. Curva estándar.....	10
3. OBJETIVOS.....	11
3.1. Generales.....	11
3.2. Específicos.....	11
4. JUSTIFICACIÓN.....	11
5. METODOLOGÍA.....	12
5.1. Muestras de heces.....	12
5.2. Ensayos de purificación de ARN a partir de muestras de heces.....	12
5.3. Amplificación por RT-PCR en tiempo real.....	13
5.4. Ensayos de reproducibilidad.....	14
5.5. Ensayo de comparación de dos diferentes kits de extracción de ácidos nucleicos.....	14
6. RESULTADOS.	15
6.1. Ensayos de purificación de ARN a partir de muestras de heces.	15
6.2. Ensayos de reproducibilidad.	16
6.3. Ensayo de comparación de dos diferentes kits de extracción de ácidos nucleicos.....	19
6.4. Comparación de la RT-qPCR con PAGE y RT-PCR.	19
7. ACTIVIDADES REALIZADAS.....	20
8. DISCUSIÓN.....	21
9. CONCLUSIÓN.	23
10. RECOMENDACIONES.....	23
11. BIBLIOGRAFÍA.....	24

“Optimización del método RT-PCR en tiempo real para la detección de *Rotavirus*”

1. INTRODUCCIÓN.

Dentro de las distintas enfermedades que existen entre la población infantil, se han ido descubriendo virus como *Rotavirus*, *Norovirus*, *Astrovirus* y *Adenovirus* asociados con la producción de manifestaciones diarreicas, las cuales son las mayores causas de enfermedad y muerte en niños menores de 5 años, particularmente en países de bajos recursos y en vías de desarrollo (González Fernández, *et al.*, 2003; Parashar, *et al.*, 2018). Entre los agentes virales asociados con dichas enfermedades diarreicas, son causadas principalmente por el *Rotavirus* (RV), el cual se transmite por vía fecal-oral (ano-mano-boca), producto de la ingestión de agua o alimentos contaminados con RV provenientes de la materia fecal o por contacto directo con residuos fecales, provocando ~215,000 muertes cada año en todo el mundo (González Fernández, *et al.*, 2003; Secretaría de Salud, 2012; Crawford *et al.*, 2017; Steger, *et al.*, 2019).

Los RV son miembros de la familia *Reoviridae*, están formados por una nucleocápside viral, compuesta de 3 capas concéntrica las cuales empaquetan un genoma de ARN bicatenario de 11 segmentos dentro de una partícula icosaédrica no envuelta (Steger *et al.*, 2019). El serotipo se determina por la tipificación serológica de las proteínas de la cápside externa, mediante la glicoproteína (proteína G o VP7) y los subtipos de proteína escindida por proteasa (proteína P o VP4) (Tamayo Meneses & Moreno Lagos, 2007; Payne & Parashar, 2018). Las diferentes especies de RV se clasifican en diez grupos A-J, esto es de acuerdo con las diferencias antigénicas de VP6 (Crawford, y otros, 2017). El *Rotavirus* de Grupo A (RVA) es el principal virus causante de infecciones, por lo tanto, son clasificados con base a las diferencias de sus genotipos, dichas diferencias son basadas en la secuencia de RNA de la glicoproteína (G o VP7) y de la proteína escindida por proteasa (P o VP4) (Tamayo Meneses & Moreno Lagos, 2007; Crawford *et al.*, 2017; Steger, *et al.*, 2019).

Como se mencionó el RVA, es de relevancia en términos epidemiológicos por su impacto en la salud pública en humanos (más común en bebés y niños pequeños, pero los niños mayores y los adultos también pueden contraerla), ya que es la causa más común de infecciones diarreicas y es uno de los más importantes patógenos que causa Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) en los niños (Luchs & Tavares, 2016; Center for Diseases Control and Prevention, 2017; Steger, *et al.*, 2019).

Para la identificación de los RVA en México, se utilizan técnicas moleculares como la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) para la detección del gen VP6 (De la Cruz Hernández *et al.*, 2017; Reynoso Utrera *et al.*, 2019). La RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) es un método altamente sensible, ya que se ha encontrado que es capaz de detectar un alto porcentaje de muestras positivas a

RV a partir de muestras negativas, las cuales habían sido analizadas previamente por PAGE y RT-PCR; además una ventaja de la RT-PCR en tiempo real es que permite obtener los resultados en solo un día (Tamay de Dios, *et al.*, 2013; De la Cruz Hernández, *et al.*, 2017).

Se han desarrollado varios ensayos de RT-qPCR para la detección de RVA dirigido a VP2, VP4, VP6, VP7, NSP3 Y NSP4 (Mijatovic Rustempasic, *et al.*, 2013; Liu, *et al.*, 2015). Pero debido a la diversidad genética de los segmentos genéticos VP4 y VP6, se ha demostrado que el gen NSP3, codificado por el segmento genómico 7, es el mejor objetivo para la detección de una amplia variedad de genotipos RVA, múltiples ensayos de RT-qPCR se ha dirigido a una región altamente conservada cerca del extremo 3' del gen NSP3 (Mijatovic Rustempasic, *et al.*, 2013)

El objetivo de este trabajo fue optimizar el método de detección de RVA por medio de la técnica RT-qPCR, ya que es necesario la implementación de un método que detecte oportunamente a RVA y para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos, utilizando iniciadores específicos para el segmento del gen NSP3 debido a que es una región altamente conservada, en muestras de heces de niños menores de 5 años que ingresaron al laboratorio a través del servicio de Núcleo Trazador de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Diarreicas Agudas (NUTraVE-EDA) en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” en el Laboratorio de Virus Gastrointestinales (LVGI).

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Epidemiología Rotavirus.

Las diarreas en el mundo son de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en los menores de 5 años, y están asociadas generalmente a deficiencias higiénicas que facilitan la transmisión “ano-mano-boca”. El RV es la principal causa de EDA infantil en diferentes áreas geográficas del mundo relacionadas sobre todo con países en vías de desarrollo, el RV cual se transmite por vía fecal-oral (ano-mano-boca), producto de la ingestión de agua o alimentos contaminados con RV provenientes de la materia fecal o por contacto directo con residuos fecales (Crawford *et al.*, 2017; González Fernández, *et al.*, 2003; Secretaría de Salud, 2012).

En el mundo, cada año existen 25 millones de visitas clínicas, 2 millones de ingresos hospitalarios y aproximadamente ~215,000 de muertes en niños menores de cinco años a causa del RV (Parashar, *et al.*, 2018; World Health Organization, 2013; Steger *et al.*, 2019).

Debido a la incidencia de esta enfermedad a nivel mundial, el desarrollo de vacunas y la introducción de las mismas ha sido una alta prioridad para la OMS y la Alianza Mundial para Vacunas e Inmunización (GAVI), por lo tanto, existen dos vacunas licenciadas, precalificadas por OMS y que están disponibles en el mercado: la monovalente (G1P[8]) de Rotarix® desarrollada por

GlaxoSmithKline Biologicals (GSK) y la pentavalente (G1, G2, G3, G4 y P[8]) de RotaTeq® producida por Merck and Co (Amin Blanco & Fernández Castillo, 2016; Sicard, *et al.*, 2019).

A pesar de la disponibilidad de vacunas eficaces contra el RVA, este virus ubicuo, altamente virulento y extremadamente transmisible sigue siendo la causa más común de diarrea en niños menores de dos años a nivel mundial (Dung, *et al.*, 2017). Posiblemente debido al reordenamiento, ya que está asociado al surgimiento de nuevos genotipos, con características genéticas y antigénicas nuevas (Amin Blanco & Fernández Castillo, 2016).

En México actualmente el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) es la instancia del Sector Salud responsable de establecer los procedimientos para la vigilancia epidemiológica de las EDA que orienten las acciones de control de manera oportuna, por medio del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), la Red de Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) y de Núcleo Trazador de Vigilancia Epidemiológica (NuTraVE), el cual constituye una modalidad de vigilancia epidemiológica orientada a la identificación temprana de riesgos a la salud de la población, la cual es llevada a cabo en el Laboratorio de Virus Gastrointestinales del InDRE (Secretaría de Salud, 2012; InDRE, 2015).

2.2. Rotavirus.

El RV en humanos fue inicialmente descrito en 1973 por Ruth Bishop en Australia quién describió "partículas virales" al observar al microscopio electrónico biopsias de intestino delgado de niños con diarrea severa, al observarse al microscopio electrónico presentaba forma de una rueda, por lo tanto, estos virus fueron bautizados con el nombre de *Rotavirus*, del latín rota, que quiere decir rueda (Fig. 1) (Tamayo Meneses & Moreno Lagos, 2007).

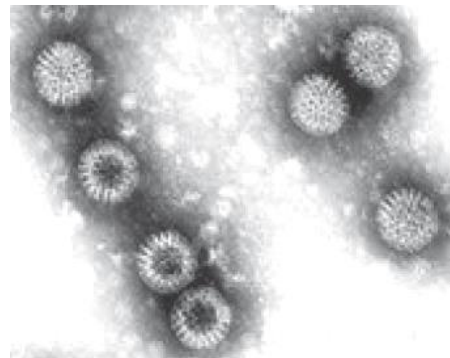


Figura 1. Rotavirus en Microscopía Electrónica.
Fuente: Tamayo Meneses & Moreno Lagos, (2007), Rotavirus en Microscopía Electrónica: obséRVese el aspecto de <<rueda de carreta>> del virus, figura, recuperado de: Scielo.

Los RV son miembros de la familia *Reoviridae*, se encuentran recubiertos por una nucleocápside viral, compuesta de 3 capas concéntrica las cuales empaquetan un genoma de ARN bicatenario (dsRNA) de 11 segmentos dentro de una partícula icosaédrica no envuelta (Steger *et al.*, 2019). Los segmentos de ARN codifican seis proteínas virales estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) las cuales provocan una respuesta inmunológica en los huéspedes infectados y seis proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6) que están involucradas en la replicación del genoma y el antagonismo de la respuesta inmunológica innata (Fig. 2). (Crawford, *et al.*, 2017; Payne & Parashar, 2018). El genoma viral se encuentra asociado a VP1 (ARN polimerasa

dependiente del ARN) y a VP3 (la guanilil-metil-transferasa) dentro del virión (Contreras Treviño & Padilla Noriega, 2018).

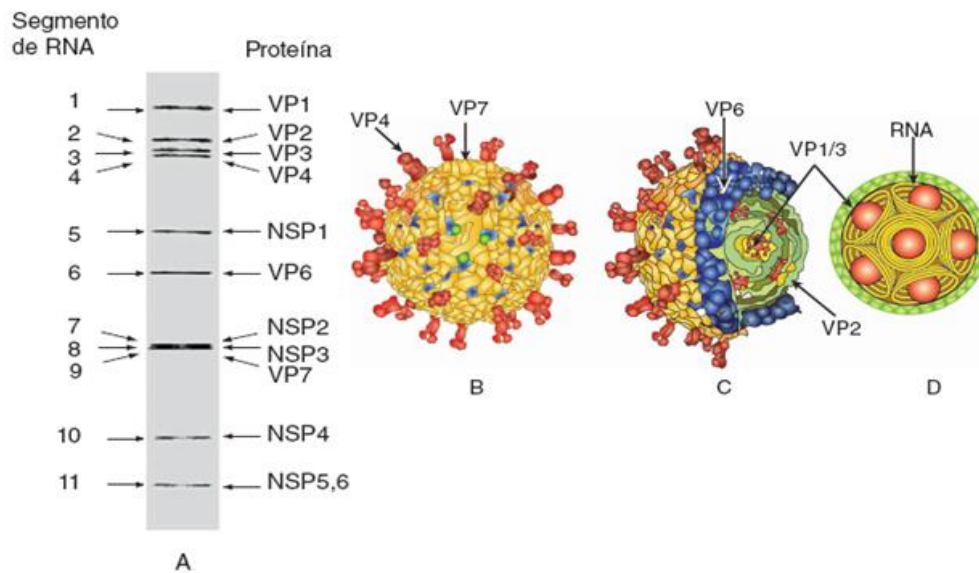


Figura 2. Estructura de Rotavirus. A) Se muestran los 11 segmentos de dsARN que comprende el genoma del Rotavirus obtenido por medio de la técnica PAGE, los segmentos de los genes están numerados a la izquierda y las proteínas que codifican se indican a la derecha. B) Estructura de la capa externa de la cápside VP4 (rojo) y VP7 (amarillo). C) Se observan las capas internas VP6 (azul) y VP2 (verde) y las enzimas transcripcionales (en rojo) ancladas al interior de la capa VP2 en los cinco ejes. D) Representación esquemática de la organización del genoma en Rotavirus. Los segmentos del genoma se representan como espirales cónicas invertidas que rodean las enzimas de transcripción (mostradas como bolas rojas) dentro de la capa VP2 en verde. E y F.

Fuente: Desselberger, U. (2014). Aspectos de la estructura del Rotavirus, figura, recuperado de: ELSEVIER.

2.3. Clasificación del Rotavirus.

Los RV se clasifican en grupos o serogrupos según sus características serológicas, dicha clasificación se realiza dependiendo de los diferentes epitopes presentes en la proteína VP6 (ubicada en la capa intermedia) (Espinosa Uribe & Solano Castro, 2008; Tamayo Meneses & Moreno Lagos, 2007). Lo cual permite identificar los diez grupos A-J de RV en la naturaleza (Steger, *et al.*, 2019; Crawford, *et al.*, 2017).

Se ha encontrado que el grupo A, B, C y H que se encuentran asociados a la gastroenteritis aguda en humanos y animales, los demás grupos solo se detectaron en animales (Luchs & Tavares Timenetsky, 2016; Madhuri, *et al.*, 2019).

El Rotavirus de Grupo A (RVA), es el grupo de relevancia en términos de epidemiología e impacto en la salud pública en humanos, es más común en bebés y niños pequeños, pero los niños mayores y los adultos también pueden contraerla (Luchs & Tavares Timenetsky, 2016). Es la causa más común de infecciones diarreicas y es uno de los más importantes patógenos que causa EDA en los niños (Crawford, *et al.*, 2017). Tienen un alto grado de homología genética con las cepas de animales, y puede producirse una transmisión directa de animal a humano (Crawford, *et al.*, 2017; Luchs & Tavares Timenetsky, 2016).

2.4. Rotavirus de Grupo A.

El RVA mide 100 nm incluyendo las espículas, el genotipo de RVA se determina por la tipificación de las proteínas de la cápside externa, mediante la glicoproteína (proteína G o VP7), y los subtipos de proteína escindida por proteasa (proteína P o VP4) (Contreras Treviño & Padilla Noriega, 2018; Tamayo Meneses & Moreno Lagos, 2007; Payne & Parashar, 2018). Hasta la fecha, se han identificado 36 genotipos G y 51 genotipos P de especies de *Rotavirus*, aunque globalmente, seis tipos G (es decir, G1, G2, G3, G4, G9 y G12) y tres tipos de P (es decir, P[4], P[6] y P[8]) predominan y seis cepas de RVA que generalmente representan más del 90% del RVA que circula en todo el mundo: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] y G12P[8] (Crawford, *et al.*, 2017; Madhuri, *et al.*, 2019).

El genoma del RVA es de aproximadamente de un tamaño de 18,500 pb y los segmentos de genes tienen entre 667 y 3302 pb de longitud; Existe un enorme grado de diversidad genómica entre la mayoría de las cepas, cada segmento del genoma es un gen que codifica una sola proteína viral (Desselberger, 2014). Por lo tanto, 6 genes codifican las proteínas estructurales VP1 a VP4, VP6 y VP7, y 5 genes codifican las proteínas no estructurales NSP1 a NSP5. En el sistema de clasificación, cada gen se designa con una sola letra (definida por la función de proteína codificada), y el genotipo asignado es un número (Tabla 1) (Steger, *et al.*, 2019).

Tabla 1. Clasificación de los segmentos del genoma de RVA.

Gen/Proteína	Porcentaje de identidad (%)	Numero de genotipos	Función
VP1	83	R1-R22	ARN dependiente de ARN polimerasa
VP2	84	C1-C20	Nucleocápside
VP3	81	M1-M20	Metiltransferasa
VP4	80	P[1]-P[51]	Proteasa – acopleamiento sensible
VP6	85	I1-I26	Capa intermedia de la capsida
VP7	80	G1-G36	Glicoproteína
NSP1	79	A1-A31	Antagonista de la inmunidad innata
NSP2	85	N1-N22	NTPasa; formación del viroplasma
NSP3	85	T1-T22	Potenciador de la traducción
NSP4	85	E1-E27	Enterotoxina; Ensamblaje
NSP5	91	H1-H22	Fosfoproteína; Formación del viroplasma

Fuente: Steger, Boudreaux, La Conte, Pease, & McDonald (2019). Nucleotide sequence-based genotype classification of RVA genome segments, Tabla, recuperado de: *Journal of Virology*.

Los genes de RV se pueden "reorganizar", debido a duplicaciones parciales de nucleótidos (nt) o deleciones de segmentos de ARN generados por formas especiales de recombinación intragénica, además se descubrió que los *Rotavirus* con reordenamientos en 3 genes empaquetan aproximadamente 1800 pb adicionales de ARN, es decir, aproximadamente el 10% del genoma, son competentes en replicación y son física y genéticamente estables (Desselberger, 2014).

2.5. Ciclo de replicación del Rotavirus.

Los RV tienen la capacidad de adherirse al revestimiento epitelial del tracto gastrointestinal, donde se replican en los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado, la entrada al enterocito se produce vía los glucolípidos de la superficie de las células directamente o a través de endocitosis (Amin Blanco & Fernández Castillo, 2016).

Una vez infectados los enterocitos, por la primera vía el RV se unen a los siálicos-glicanos (o antígenos del grupo histo-sangre) en la superficie de la célula huésped ya que VP8 los reconoce específicamente (Desselberger, 2014). Posteriormente para la penetración de la membrana, la proteína VP4 debe ser escindida proteolíticamente por la tripsina en fragmentos VP8* y VP5* para cebar la TLP (por sus siglas en inglés Triple-Layered Particle) (Trask, *et al.*, 2013; Guerrero & Acosta, 2016).

La endocitosis es mediada por no clatrina y no caveolina, las cuales libera el virión al endosoma temprano, posteriormente la eliminación de la capa externa, es provocada por el bajo nivel de calcio del endosoma y la penetración de la membrana por VP5*, da como resultado la liberación de la DLP (por sus siglas en inglés Doble-Layered Particle) (Desselberger, 2014; Guerrero & Acosta, 2016). Los complejos polimerasa viral dentro del DLP son transcripcionalmente activas y comienzan de inmediato la síntesis de once especies de ARN (+) en el citosol, esto activa el complejo polimerasa interna de VP1 y VP3 para transcribir ARNs (+) cubiertos (Trask, *et al.*, 2013; Crawford, *et al.*, 2017).

La proteína NSP3 recluta a los ARN mensajeros virales y se une al factor de inicio de la traducción 4G (eIF4G), lo que resulta en una inhibición de la traducción celular y la facilitación de la síntesis de proteínas virales (Contreras Treviño & Padilla Noriega, 2018). En el citoplasma de la célula infectada NSP2 se une al ARN como a NSP5 los cuales se ubican conjuntamente alrededor de la transcripción de DLP e interactúan para formar cuerpos de inclusión llamados viroplasma, los cuales secuestran los componentes necesarios para la replicación del genoma y en los que se lleva a cabo la replicación del genoma y la morfogénesis viral (Trask, *et al.*, 2013; Contreras-Treviño & Padilla-Noriega, 2018).

La condensación de la proteína interna de la cápside VP2, alrededor del complejo de surtido desencadena la síntesis de dsARN por VP1, posteriormente la proteína de la cápside intermedia VP6, luego se ensambla en el núcleo naciente para formar el DLP, para ensamblar completamente, el DLP debe salir del viroplasma, asociarse con la proteína VP4, y luego romper la membrana del retículo endoplásmico (RE) para obtener acceso a la glucoproteína VP7 y así permitir la formación del TLP (Trask, *et al.*, 2013; Desselberger, 2014). La partícula viral completa es liberada por lisis celular o asociada a vesículas procedentes del RE (Fig. 3) (Crawford *et al.*, 2017).

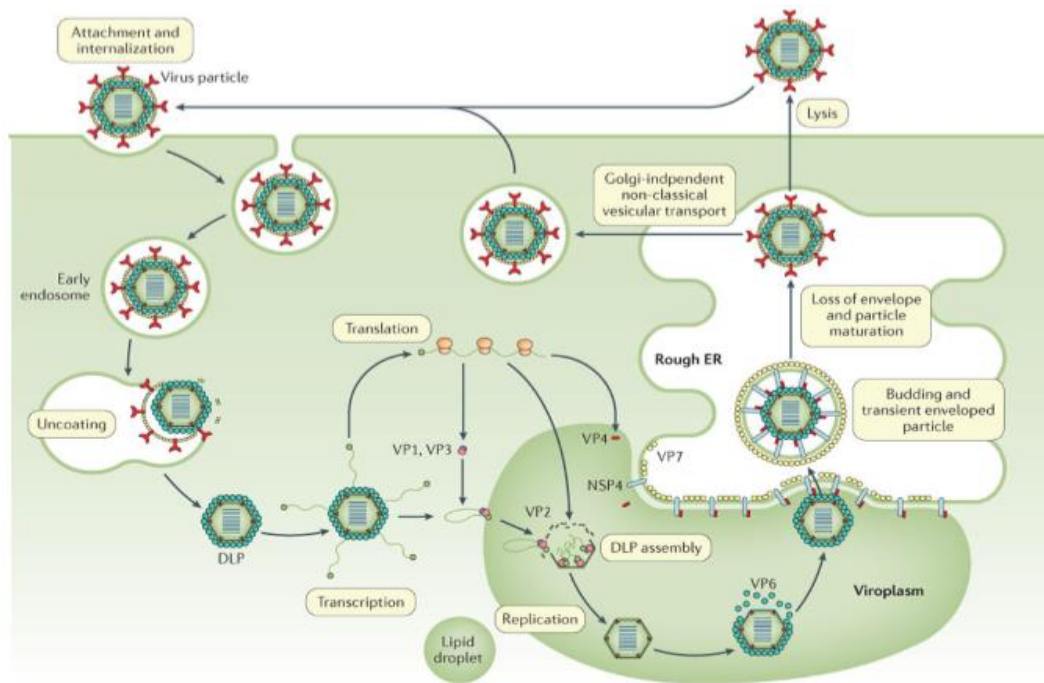


Figura 3. Replicación del Rotavirus. Las partículas de triple capa (TLP) de RV se unen primero a los siálicos-glicanos seguido de la interacción con otros receptores celulares. Posteriormente se internaliza por medio de endocitosis, debido a los bajos niveles de calcio se libera en una partícula de doble capa (DLP), transcripcionalmente activa. La cual transcribe ARNm para traducir proteínas virales. El genoma se replica y empaqueta en la DLP en un viroplasma. El DLP sale del viroplasma para unirse al NSP4, y luego romper la membrana del retículo endoplásmico (RE) para obtener acceso a la glucoproteína para volver a formar la TLP.

Fuente: Crawford et al., (2017). El ciclo de replicación del Rotavirus, figura, recuperado de: Nat. Rev. Dis. Primers.

2.6. Técnicas de identificación de RVA.

Para la identificación de los RVA en México, se utilizan técnicas de identificación como la microscopía electrónica (EM), inmunoensayo enzimático (EIA), electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) y actualmente la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR) (De la Cruz Hernández, et al., 2017; Reynoso Utrera et al., 2019).

La transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de polimerasa multiplex/anidada (RT-PCR) tiene la ventaja de hacer un diagnóstico molecular y tipificar RVA simultáneamente (Luchs & Tavares Timenetsky, 2016). Pero la técnica tiene desventajas, ya que requiere de múltiples tubos y pasos de pipeteo lo cual incrementa la posibilidad de contaminación, así como la eliminación del paso de corrimiento del gel, además de la eliminación de productos químicos tóxicos y cancerígenos que son necesarios para teñirlo (Freeman, et al., 2008).

2.7. RT-qPCR.

La RT-PCR en tiempo real ofrecen ventajas sobre la técnica tradicional RT-PCR, debido que es un método altamente sensible, ya que se ha encontrado que es capaz de detectar un alto porcentaje de muestras positivas a RVA a partir de muestras negativas, las cuales habían sido analizadas previamente por PAGE y

RT-PCR; un mayor rendimiento y permite obtener los resultados en solo un día, así como la cuantificación de las cargas virales (Tamay de Dios, *et al.*, 2013; Mijatovic-Rustempasic, *et al.*, 2013; De la Cruz Hernández *et al.*, 2017).

Se han desarrollado varios ensayos de RT-qPCR para la detección de RVA dirigido a VP2, VP4, VP6, VP7, NSP3 Y NSP4 (Mijatovic-Rustempasic, *et al.*, 2013; Liu, *et al.*, 2015).

Debido a la diversidad genética de los segmentos genéticos VP4 y VP6, se ha demostrado que el gen NSP3, codificado por el segmento genómico 7, es el mejor objetivo para la detección de una amplia variedad de genotipos RVA, múltiples ensayos de RT-qPCR se ha dirigido a una región altamente conservada cerca del extremo 3' del gen NSP3 (Mijatovic Rustempasic, *et al.*, 2013).

2.8. Curva estándar.

En el ensayo realizado (De la Cruz Hernández, y otros, 2017), se utilizó un Amplirun® Rotavirus ARN Control (Viracell) para poder realizar una curva estándar, donde hicieron diluciones; dichos resultados permitieron establecer la eficiencia de la reacción de 95.519% con un valor de coeficiente de correlación (r^2) de 0.998 (Gráfico 1). Utilizaron un ARN con una concentración de 3.05×10^8 copias del genoma en una mezcla de reacción, en el cual se determinó que el sistema puede detectar a RVA hasta el ciclo 38 y que el límite de cuantificación es de hasta 3.05 copias de genoma, donde se consideró que todas las muestras serán tomadas como positivas cuando se tenga un valor de Ct <38 (Gráfico 2).

Es más preciso tomar medidas durante la fase exponencial, donde las muestras replicadas se amplifican exponencialmente, por lo tanto, es recomendable fijar el threshold (Umbral) en esa región (ThermoFisher, 2018).

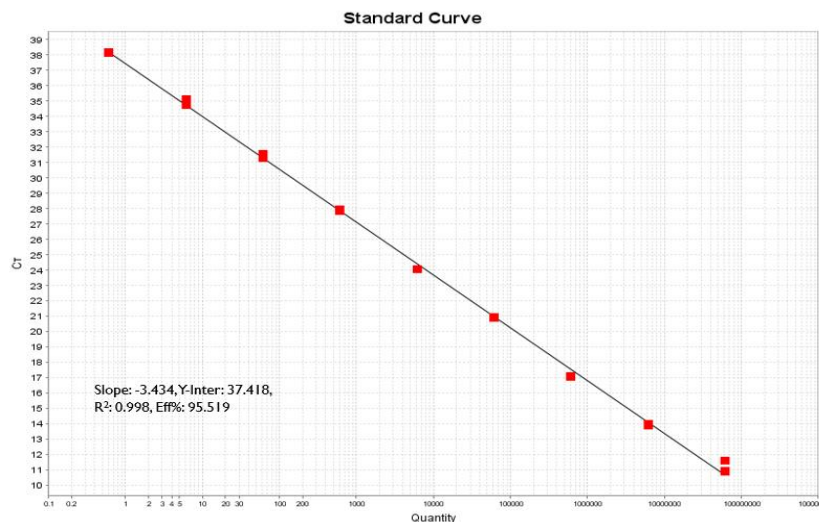


Gráfico 1. Eficiencia, linealidad y sensibilidad analítica del ensayo para la identificación de RVA a partir de la curva estándar. Se muestran 9 diluciones seriadas con factor 10, de 3.05×10^8 a 3.05 copias del genoma/ μ L.

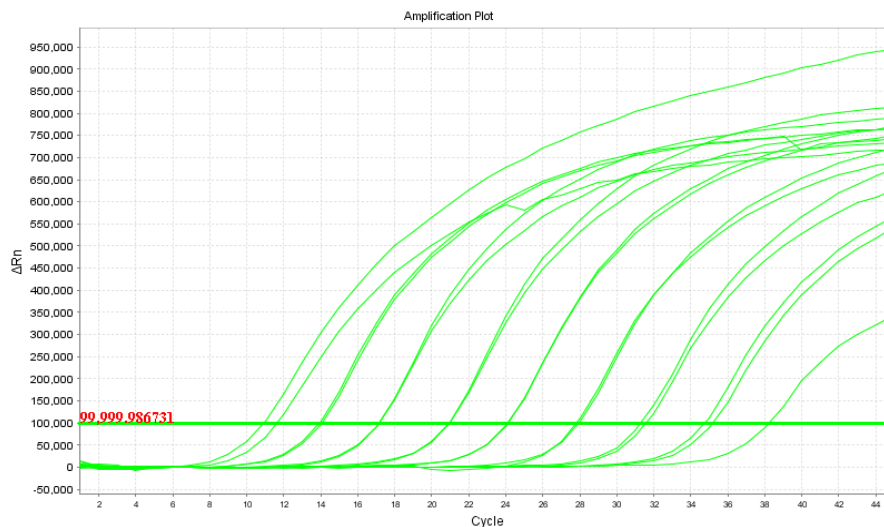


Gráfico 2. Intervalo reportable, límite de detección y cuantificación del ensayo para la identificación de RVA a partir de la curva estándar. Se muestran 9 logaritmos de detección que van de 3.05×10^8 a 3.05 copias del genoma en la reacción.

3. OBJETIVOS.

3.1. Generales.

Coadyuvar en la optimización de la técnica de RT-qPCR para la detección de *Rotavirus* Grupo A, a partir de muestras fecales de niños menores de 5 años.

3.2. Específicos.

- Optimizar la extracción manual del material genético a partir de muestras fecales.
- Optimizar el método de RT-PCR en tiempo real con en el valor de corte con base en las muestras positivas y negativas.
- Realizar la detección de *Rotavirus* mediante la RT-PCR en tiempo real en muestras que ingresen al laboratorio a través del servicio de NUTraVE-EDA.

4. JUSTIFICACIÓN.

El RV es uno de los más importantes patógenos que causa la EDA en niños menores de 5 años, se presenta en forma endémica o epidémica, particularmente en países de bajos recursos y en vías de desarrollo, el cual es la mayor causa de enfermedades y muertes con ~215,000 cada año en todo el mundo (Amin Blanco & Fernández Castillo, 2016; Gautam *et al.*, 2016; Komoto *et al.*, 2018). El RVA, es el grupo de relevancia en términos de epidemiología e impacto en la salud pública, ya que es la causa más común de infecciones diarreicas y es uno de los más importantes patógenos que causa EDA en los niños (Luchs & Tavares Timenetsky, 2016; Center for Diseases Control and Prevention, 2017; Steger, *et al.* 2019).

En México las enfermedades intestinales son una de las principales causas de mortalidad en menores; Por lo cual, el Sistema Nacional de Vigilancia

Epidemiológica (SINAVE) es la instancia del Sector Salud responsable de establecer los procedimientos para la vigilancia epidemiológica de las EDA que orienten las acciones de control de manera oportuna y uniforme, por medio del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) (Secretaría de Salud, 2012; InDRE, 2015)

Para la identificación de los RVA en México, se utilizan técnicas moleculares como la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) para la detección del gen VP6 (De la Cruz Hernández *et al.*, 2017; Reynoso Utrera *et al.*, 2019). Sin embargo, estas técnicas requieren de varios procedimientos, por lo que es difícil la obtención de resultados oportunos, sobre todo cuando se tienen un gran número de muestras por procesar, como en los casos de brotes de gastroenteritis por *Rotavirus* (Reyna Figueroa, *et al.*, 2012; De la Cruz Hernández, *et al.*, 2017; Parashar, *et al.*, 2018).

Por lo tanto, es necesario la implementación de un método que detecte oportunamente a RVA. La RT-PCR en tiempo real es un método altamente sensible, ya que se ha encontrado que es capaz de detectar un alto porcentaje de muestras positivas y permite obtener los resultados en solo un día (Tamay de Dios, *et al.*, 2013; De la Cruz Hernández, *et al.*, 2017). Sin embargo, al igual que todas las técnicas moleculares, es necesario mejorar el proceso de detección por RT-qPCR para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

5. METODOLOGÍA.

5.1. Muestras de heces.

Se obtuvieron muestras de heces de pacientes con diagnóstico de gastroenteritis viral de niños menores de 5 años, provenientes del laboratorio de Virus Gastrointestinales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”.

5.2. Ensayos de purificación de ARN a partir de muestras de heces.

Los extractos de heces se sometieron a diferentes diluciones de las muestras con diferentes diluyentes, en la primera purificación se utilizó solución salina (SS) con base con el desarrollo reportado por Anaya Molina *et al.*, (2018) y De la Cruz Hernández *et al.*, (2017) y para los ensayos con Regulador fosfato salina (PBS por sus siglas en ingles) se realizaron de acuerdo con los desarrollos reportados por Freeman, *et al.*, (2008); Mo, *et al.*, (2015) y Xie, *et al.*, (2018). El ARN se purifico a partir de los siguientes ensayos:

Panel 1:

- 1) 300 µl de muestra de heces previamente diluida con 300 µl SS.
- 2) 300 µl de muestra de heces previamente diluida con 300 µl PBS.
- 3) 150 µl de muestra de heces previamente diluida con 150 µl SS y PBS.

- 4) 60 µl de muestra de heces previamente diluida con 540 µl SS.
- 5) 60 µl de muestra de heces previamente diluida con 540 µl PBS.
- 6) 60 µl de muestra de heces previamente diluida con 270 µl SS y 270 µl PBS.

Panel 2:

- 1) 300 µl de muestra de heces previamente diluida con 300 µl SS.
- 2) 300 µl de muestra de heces previamente diluida con 300 µl PBS.
- 3) 60 µl de muestra de heces previamente diluida con 540 µl SS.
- 4) 60 µl de muestra de heces previamente diluida con 540 µl PBS.

Panel 3:

- 1) 300 µl de muestra de heces previamente diluida con 300 µl SS.
- 2) 60 µl de muestra de heces previamente diluida con 540 µl SS.
- 3) 60 µl de muestra de heces previamente diluida con 570 µl SS.

Todos los paneles posteriores se purificaron:

- 1) 300 µl de muestra de heces previamente diluida con 300 µl SS.

Después se usó un QIAamp® Viral ARN Mini kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Diagrama 1). El ARN se eluyó en 60 µl de agua libre de nucleasas.

5.3. Amplificación por RT-PCR en tiempo real.

Cada muestra se procesó y analizó por RT-qPCR, donde se incluyeron múltiples controles negativos y positivos para cada ensayo de RT-qPCR. La RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando las condiciones previamente reportadas en el desarrollo de De la Cruz Hernández *et al.*, (2017) y Anaya Molina *et al.*, (2018):

Se utilizaron iniciadores específicos para un segmento del gen NSP3 (Tabla 2), así como una sonda fluorogénica, utilizando la tecnología TaqMan®. En una placa de 96 pozos, se agregaron 10 µl de la mezcla de iniciadores y la sonda junto con 2 µl de dsARN, el cual fue desnaturalizado en un Eppendorf 6325 en un gradiente térmico con un ciclo de 95°C/2.5 min. Posteriormente, se agregaron 13 µl de una segunda mezcla, la cual contenía el Kit Super Script III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR junto con el buffer de reacción 2X (Tabla 3).

Tabla 2. Iniciadores y sondas utilizados en la detección de RVA por RT-qPCR.

Región codificante	Secuencia (5´- 3´)	Fluoróforo/Quencher	Referencia
NSP3	NVP3-FDeg: ACC ATC TWC ACR TRA CCC TC NVP3-R1: GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA NVP3-Probe: A ^g TG AGC ACA ATA GTT ^b AAA AGC TAA CAC TGT CAA	FAM ^(a) – BHQ1 ^(b)	Freeman <i>et al.</i> ,2008

Tabla 3. Mezclas de reacción para la detección de RVA por RT-qPCR

	Reactivo	Cantidad (µL)
Mezcla de Reacción 1	H ₂ O	9
	NVP3-FDeg (40 pmoles)	0.3125
	NVP3-R1 (40 pmoles)	0.3125
	NVP3-P (10 pmoles)	0.375
	ARN	2
Mezcla de Reacción 2	2X premix	12.5
	Enzima	0.5
	Cantidad final	25

Se ocupó el equipo ABI 7500 conectado al software v2.0.6 (Applied Biosystems) para aplicar el ensayo TaqMan®, usando las siguientes condiciones de termociclado, para la reacción de la transcriptasa reversa 50°C/30 min. y 95°C/2 min., para la amplificación 45 ciclos de 95°C/15 seg. y 60°C/60 seg.

5.4. Ensayos de reproducibilidad.

Para la reproducibilidad del método se evaluó con los parámetros de Ct (Ciclo umbral de detección) que van de 25-35, para así poder determinar un corte de Ct donde los resultados obtenidos sean confiables, donde se realizó una comparación de los resultados obtenidos inicialmente en un ensayo (Referencia o Ref.) contra los obtenidos en los ensayos.

5.5. Ensayo de comparación de dos diferentes kits de extracción de ácidos nucleicos.

Se comparó el QIAamp® Viral ARN Mini kit (Diagrama 1) con el RNeasy PowerMicrobe Kit de Qiagen (Diagrama 2) y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

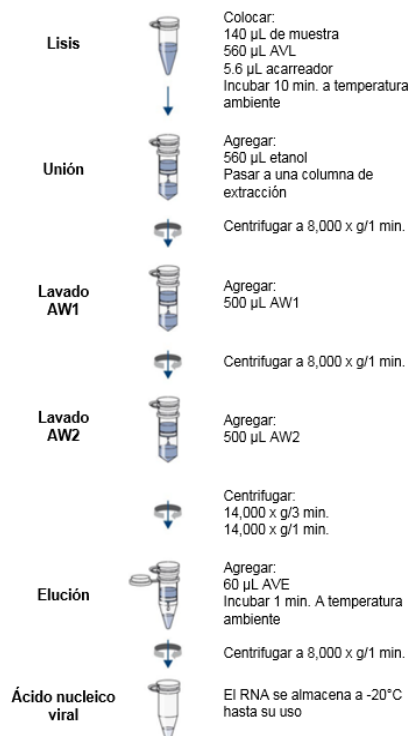


Diagrama 1. Extracción de RNA por columnas de QIAamp® Viral RNA Mini kit.

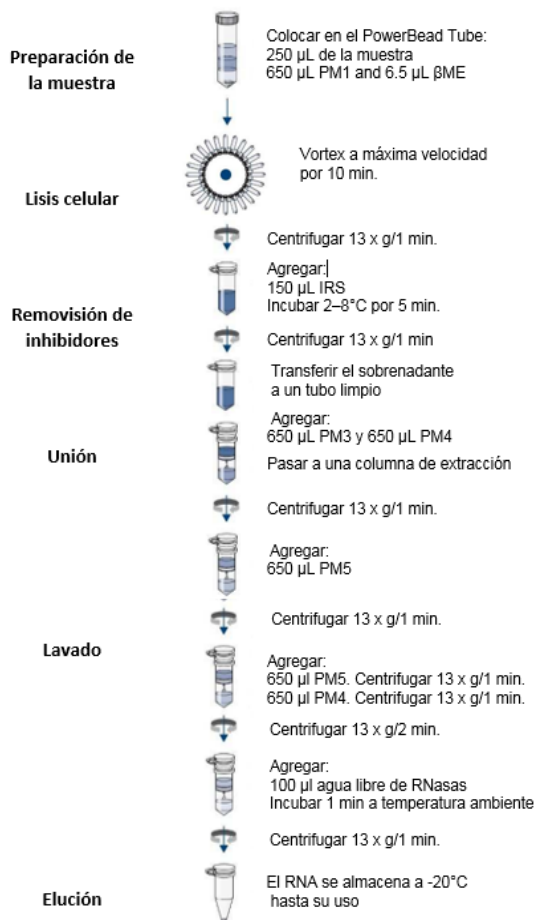


Diagrama 2. Extracción de RNA por columnas de RNeasy PowerMicrobe Kit.

6. RESULTADOS.

6.1. Ensayos de purificación de ARN a partir de muestras de heces.

Los valores reportados (Tabla 4-6) mediante las diferentes condiciones de extracción que se sometieron a la reacción de RT-qPCR para la identificación del gen NSP3 de RVA.

Tabla 4. Panel 1 del ensayo de purificación de ARN a partir de muestras de heces.

Panel 1	Ct	Muestra	NVG-614
		Ref.	33.6
		SS	39.35
		PBS	39.75
		SS+PBS	40.24
		10%SS	37.06
		10%PBS	35.64
		10%SS+10%PBS	40.09

Tabla 5. Panel 2 del ensayo de purificación de ARN a partir de muestras de heces.

Panel 2	Muestra	Ct							
		CN	CPM	CNM	Ref.	SS	10%SS	PBS	10%PBS
	NVG-600	43	14.49	43	33.56	36.06	35.14	37.06	35.08
	NVG-614	43	14.49	43	33.6	32.72	32.14	33.49	32.5
	NVG-616	43	14.49	43	17.56	15.69	17.29	15.26	17.51
	NVG-631	43	14.49	43	33.13	32.47	31.19	32.73	34.36

Tabla 6. Panel 3 del ensayo de purificación de ARN a partir de muestras de heces.

Panel 3	Muestra	Ct						
		CN	CPM	CNM	Ref.	SS	10%SS	5%SS
	NVG-600	45	13.9	41.63	33.56	45	42.93	40.63
	NVG-614	45	13.9	41.63	33.6	45	38.97	45
	NVG-696	45	13.9	41.63	40.68	43.17	45	34.11
	NVG-623	45	13.9	41.63	31.91	45	41.25	40.31
	NVG-719	45	13.9	41.63	38.86	45	42.62	41.04
	NVG-619	45	13.9	41.63	31.77	16.71	17.93	19.66
	NVG-723	45	13.9	41.63	38.81	40.2	40.06	37.66
	NVG-703	45	13.9	41.63	20.07	19.39	22.17	24.08

6.2. Ensayos de reproducibilidad.

Se procesaron muestras con diferente Ct para poder observar la reproducibilidad del método (Tabla 7-9) y para poder determinar la relación existente del Ct con las muestras (Gráfico 3 es representativo a los demás gráficos obtenido en la reacción de RT-qPCR).

Tabla 7. Ensayos de reproducibilidad.

Panel 4	Muestra	Ct				
		CN	CPM	CNM	Ref.	SS
	NVG-24	43	13.96	42.19	32.98	39.93
	NVG-27	43	13.96	42.19	33.17	39.79
	NVG-43	43	13.96	42.19	34.75	42.61
	NVG-50	43	13.96	42.19	32.02	34.89
	NVG-51	43	13.96	42.19	34.37	37.36

En el Panel 5 al 5" se amplificaron por triplicado los panes usando los extractos que fueron extraídos nuevamente. Los cuales fueron sometidos a la reacción de RT-qPCR para la identificación del gen NSP3 de RVA.

En el Panel 6 de la muestra NVG-335 a NVG-124 se realizaron extracciones a partir de muestras de heces y de la muestra NVG-415 a NVG-614 se utilizaron los extractos de referencia provenientes del banco de extractos, los

cuales fueron sometidos a la reacción de RT-qPCR para la identificación del gen NSP3 de RVA (Tabla 8).

Tabla 8. Ensayos de reproducibilidad.

	Muestra	Ct	
		Ref.	SS
Panel 6	NVG-335	26.54	24.36
	NVG-386	28.62	27.35
	NVG-490	16.24	15.44
	NVG-571	30.14	36.02
	NVG-527	30.24	27.96
	NVG-72	30.69	31.07
	NVG-114	30.48	32.73
	NVG-83	27.95	30.97
	NVG-124	29.81	37.07
	NVG-415	26.65	27.82
	NVG-419	26.23	26.75
	NVG-441	25	26
	NVG-450	23.47	33.13
	NVG-516	25.53	26.66
	NVG-518	22.41	23.87
	NVG-573	28.68	45
	NVG-616	17.56	19.46
NVG-619	31.77	33.28	
NVG-614	33.6	35.49	

Se realizó una comparación del Panel de Referencia con el Panel 6 debido a que son el mismo extracto y de los Panel 5 al 5" que fueron amplificados por triplicado usando extractos extraídos nuevamente con el Panel referencia (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de los Ensayos utilizando el mismo extracto (Panel 6) y nuevo extracto (Paneles 5 al 5") contra el Panel de referencia.

	Muestra	Ct				
		Panel Ref.	Panel 6	Panel 5	Panel 5'	Panel 5"
Paneles	NVG-415	26.65	27.82	22.97	23.7	22.9
	NVG-419	26.23	26.75	25.61	25.2	25.96
	NVG-441	25	26	19.91	-	19.51
	NVG-450	23.47	33.13	19.85	-	20.16
	NVG-516	19.83	26.66	20.01	19.81	20.37
	NVG-518	16.61	23.87	18.14	17.67	18.01
	NVG-573	28.68	45	32.79	32.93	33.31
	NVG-664	20.85	-	19.82	19.66	20.26
	NVG-690	26.56	-	26.38	26.36	27.05
	NVG703	20.07	-	18.82	19.32	18.95

Se determinó el porcentaje de reproducibilidad con base con diferentes intervalos de Ct (Tabla 10 y 11).

Tabla 10. Porcentaje de reproducibilidad.

N. de muestras	Ct	Porcentaje de reproducibilidad (%)		Total (%)
		Si	No	
9	<25	100	0	100
12	25-30	75	25	100
13	31-35	46.1538462	53.8461538	100
3	36-40	66.6666667	33.3333333	100
sin dato	41-45	sin dato	sin dato	sin dato

Tabla 11. Porcentaje de reproducibilidad.

N. de muestras	Ct	Porcentaje de reproducibilidad (%)		Total (%)
		Si	No	
9	<25	100	0	100
9	25-27	100	0	100
3	28-30	0	100	100
11	31-33	36.364	63.636	100
2	34-36	50	50	100
2	37-39	50	50	100
Sin dato	>40	Sin dato	Sin dato	Sin dato

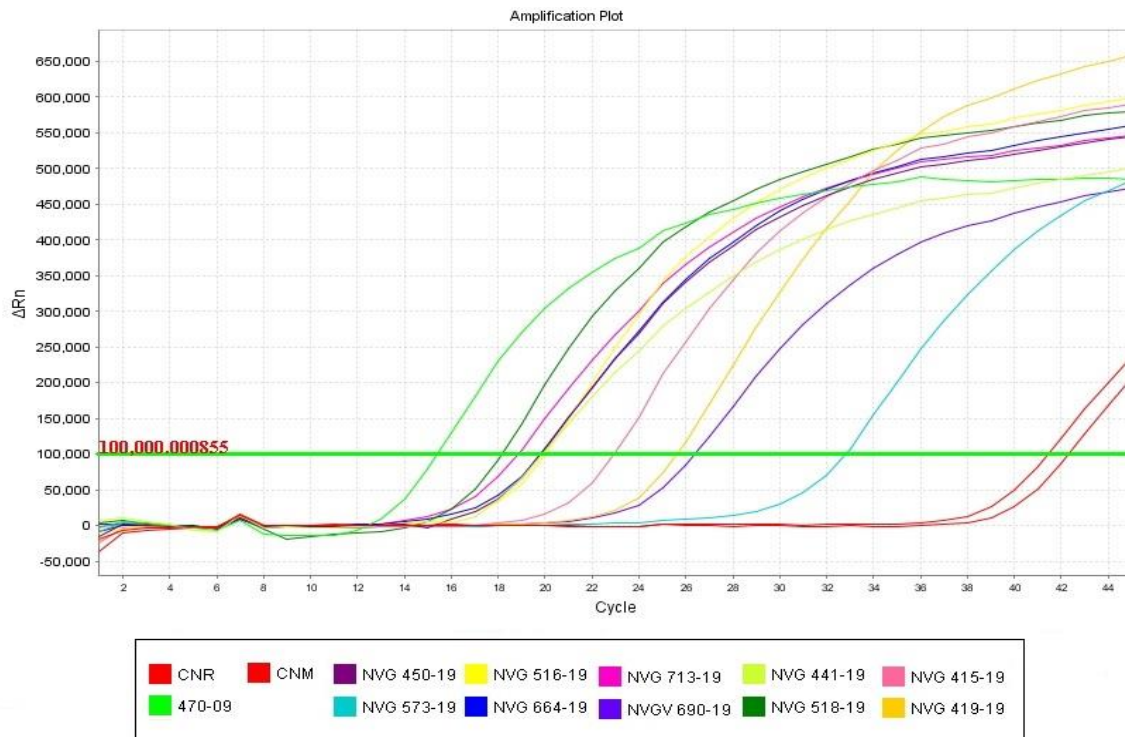


Gráfico 3. Representativo a los demás gráficos obtenidos en la reacción RT-qPCR, obtenido en los ensayos de reproducibilidad del Panel 5. ΔRn significa la flourescencia emitida por el fluoroforo.

6.3. Ensayo de comparación de dos diferentes kits de extracción de ácidos nucleicos.

Se procesó una muestra por duplicado usando tanto el kit de extracción QIAamp® Viral ARN Mini kit (color azul) y el RNeasy PowerMicrobe Kit ambos de Qiagen, realizando una nueva extracción por cada muestra (Tabla 12).

Tabla 12. Comparación de dos diferentes kits de extracción de ácidos nucleicos.

Panel	Muestra	Ct				
		CN	CPM	CNM	Ref.	SS
4	NVG-114	43	16.96	42.19	30.48	32.34
	NVG-114	43	16.96	42.19	30.48	34.98
	NVG-114	43	16.96	42.19	30.48	31.77
	NVG-114	43	16.96	42.19	30.48	35.16

6.4. Comparación de la RT-qPCR con PAGE y RT-PCR.

Con base a las muestras positivas a RVA se realizaron intervalos de Ct para poder comparar el porcentaje de detección entre las técnicas de PAGE y RT-PCR de genotipos G y P (Tabla 13 y Gráfico 4).

Tabla 13. Comparación porcentual de la RT-qPCR contra PAGE y RT-PCR de genotipos G y P.

Intervalos Ct	Total de muestras	RESULTADO Positivo NSP3	% Positivo NSP3	Positivo PAGE InDRE	% Positivo PAGE InDRE	Positivo GENOTIPO G	% Positivo GENOTIPO G	Positivo GENOTIPO P	% Positivo GENOTIPO P
10 a 14	53	53	100	53	100	53	100	53	100
15-19	114	114	100	111	97.368	112	98.245	112	98.245
20-24	56	56	100	39	69.642	38	67.857	38	67.857
25-27	18	18	100	6	33.333	6	33.333	6	33.333
28-30	22	22	100	1	4.545	1	4.545	1	4.545
31-34	125	125	100	0	0	0	0	0	0
35-38	154	126	81.818	0	0	0	0	0	0
39-40	69	0	0	0	0	0	0	0	0
>41	105	0	0	0	0	0	0	0	0

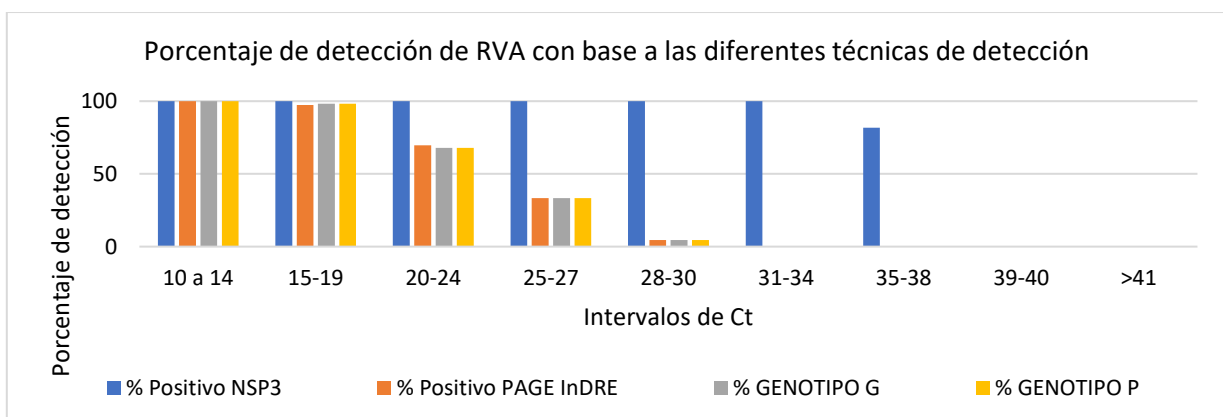


Gráfico 4. Porcentaje de detección de RVA con base a las diferentes técnicas de detección.

7. ACTIVIDADES REALIZADAS.

- a) Se realizaron ensayos de purificación de RNA a partir de muestras de heces, sometiéndolos a diferentes diluciones de la muestra con diferentes diluyentes y posteriormente se llevó a cabo la reacción de RT-qPCR para la identificación del gen NSP3 de RVA.
- b) Se organizó el archivo de dispositivos médicos tanto en la base de datos como en el archivero, donde se tenían que identificar los equipos dados de baja, en uso y verificar el expediente de cada uno de los equipos médicos, para este último punto se basó en la guía para la integración de expedientes de los equipos médicos y de laboratorio (EML) con clave INEM-G-06/0. En dicha guía se establecen los lineamientos que debe cumplir cada expediente ubicado en el laboratorio, el cual debe tener documentos como: la identificación del equipo, nombre del fabricante, fecha de puesta en operación, ubicación, el registro que confirme la aceptación inicial del equipo para su operación cuando el laboratorio lo recibe, instrucciones del fabricante, mantenimiento realizado, etc.
- c) Durante la semana de capacitación de la técnica de PAGE al personal de los laboratorios estatales de salud pública (LESP), se tomó el curso de capacitación teórica y práctica. La capacitación incluyó la extracción del genoma viral a partir de la muestra de materia fecal, hasta la elaboración de geles de poliacrilamida. La capacitación también incluyó la elaboración de etiquetas de eliminación de desechos con base a las NOM-018, NOM-002, NOM-003 y la NOM-054.
- d) Se participó en la elaboración de la base de datos del banco de oligonucleótidos y sondas físico y electrónico. El banco electrónico contiene los oligonucleótidos existentes con su información correspondiente: Nombre del oligonucleótido en LVGI, nombre en literatura, referencia, gen blanco, 5' modificación, secuencia, 3' modificación, número de bases, nmol, OD, catálogo, lote, fecha de síntesis, liofilizado o hidratado, etc.
- e) Se realizó la identificación de rotavirus por medio de la técnica de electroforesis a partir de productos de PCR de las reacciones de identificación de los genes VP7 y VP4 del RVA. Los productos de PCR se corrieron en el E-Gel Size Select 2%.
- f) Se realizó el procedimiento de la metodología del proceso de extracción de material fecal de forma manual del estuche RNeasy PowerMicrobiome Kit Qiagen®, para el uso del mismo.
- g) Se coadyuvo en la capturar electrónica de los resultados de la evaluación del PANEL a los LESP, así como los oficios de respuesta del a la RNLSP.
- h) Se realizó un análisis de los ensayos de RT-qPCR que se han y he realizado para poder determinar la reproducibilidad que existe.

- i) Se realizó la técnica de PAGE para la detección de Rotavirus y a la preparación de sustancias para la técnica, como capacitación.
- j) Se realizó una verificación del material existente del banco de extractos de RNA existente con el archivo electrónico.
- k) Se realizó un ensayo bioinformático en la plataforma de Bioedith donde se hizo una alineación de dos iniciadores de diferentes protocolos para obtener un fragmento de 1049 pb que sirva para obtener un plásmido que sirva como control positivo.
- l) Se realizó la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) para la detección de Rotavirus grupo A, como capacitación.
- m) Se realizó el formato de la metodología del proceso de purificación de fragmentos obtenidos por PCR por medio del Quantum Prep Freeze N´ Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns Kit, para realizar ensayos probando el kit.

8. DISCUSIÓN.

En el Panel 1 se analizó que al volver a realizar la extracción con SS (método convencional) y al compararlo con las diluciones se observó que las diluciones al 10% SS y 10% PBS disminuyó el Ct, pero al compararlo con el Ct de referencia solo el que es similar es al 10% PBS.

En el Panel 2 muestra que el Ct en la dilución al 10% SS es similar al de referencia y al que se extrajo nuevamente, pero esta dilución bajo muy poco el Ct.

En el Panel 3 observamos que cuando comparamos la nueva extracción con SS con las diluciones notamos que el Ct disminuye, pero como los extractos se ocupan para detección de otros virus (Adenovirus, Norovirus, Astrovirus) la extracción puede ser no funcional para dichas detecciones, además que la disminución del Ct no es relevante para realizar la purificación con algunas de las diluciones mencionadas. Así como también notamos que cuando se vuelve a realizar la extracción con SS los valores de Ct no son similares a los de referencia por lo cual se prosiguió a realizar ensayos de reproducibilidad.

En el Panel 4 observamos que cuando se tiene un Ct mayor a 30 la mayoría de los Ct no son similares al valor de referencia por lo cual se prosiguió a realizar un ensayo (Panel 5) con muestras de referencia que presentaran un Ct menor a 29 con lo cual observamos que muestras muestran un Ct similar, pero pareciera que muestras con valor de Ct mayor a 28 no son reproducibles ya que el Ct aumenta, esto puede ser debido a que la muestra se haya degradado. Por lo cual, se volvieron a amplificar los extractos utilizados en el Panel 5 obteniendo los paneles 5' y 5".

Cuando se hace la comparación de los paneles anteriormente mencionados pudimos observar que las muestras que presentan un Ct menor al de 28 son reproducibles en comparación con la muestra NVG-753 ya que el Ct que se tiene de referencia es de 28.68 y en los panes 5, 5' y 5" obtuvimos Ct de 32.79, 32.93 y 32.31 lo cual muestra que cuando se extrae nuevamente la muestra y es utilizado el mismo extracto existe reproducibilidad. Por lo cual realizamos el Panel 6 donde se amplificaron algunas de las muestras de los paneles 5, utilizando los extractos de referencia y la muestra NVG-753 que fue amplificada con el mismo extracto, el Ct aumento a 45, esto puede ser debido a que el extracto se haya degradado.

En el Panel 6 el ensayo se dividió en dos partes ya que se utilizaron extractos nuevos a partir de muestras de heces (NVG-335 a NVG-124) y los extractos de referencia provenientes del banco de extractos (NVG-415 a NVG-614), notamos que muestras con un Ct mayor a 28 ya no presentan reproducibilidad ya que el nuevo Ct que se obtiene no es similar al de referencia, pero cuando se utiliza el mismo extracto pareciera que es reproducible como se había mencionado.

Posteriormente se hizo la comparación de los Cts obtenidos, cuando se trabaja con el mismo extracto se pueden obtener Cts similares.

Se realizaron porcentajes de reproducibilidad para poder determinar en que Ct los resultados son confiables. En el Tabla 10 en el rango de Ct de 25-30 obtuvimos un 75% de reproducibilidad por lo cual en el Tabla 11 realizamos los rangos más cortos con lo cual pudimos determinar que después del Ct 28 ya no es reproducible el método ya se obtuvo un 100% de no reproducibilidad cuando se compara el extracto extraído nuevamente contra el de referencia.

En la Tabla 12 se observa que a pesar de que aumenta el Ct en la nueva extracción utilizando el kit de extracción QIAamp® Viral ARN Mini kit (Ct color azul) con respecto al de referencia existe una reproducibilidad, cuando se usa el RNeasy PowerMicrobe Kit ya no es similar el valor de Ct obtenido, pero se necesitaría hacer más extracciones del uso de segundo Kit para poder discernir entre uno del otro. No se pudo seguir realizando más extracciones debido al uso limitado del Kit, esto es debido a que no se tenía más reactivos del RNeasy PowerMicrobe Kit para realizar más ensayos.

Se realizó un análisis de los diferentes intervalos de Ct mostrado en la Tabla 13 y Gráfico 4, para poder determinar la relación que existe entre una técnica con otra, en el cual se observa que conforme va aumentando el Ct va disminuyendo la sensibilidad de las otras técnicas en comparación con la RT-PCR en tiempo real.

Se hizo una correlación entre las muestras positivas detectadas por RT-qPCR con las técnicas utilizadas en LVGI como es PAGE y la RT-PCR (detección de genogrupos VP4 y VP7), en donde se analizó que dichas técnicas tienen una sensibilidad para detectar los genogrupos y los 11 segmentos cuando el Ct es menor de 28, ya que después de este Ct las técnicas no tienen la sensibilidad adecuada para detectar RVA.

9. CONCLUSIÓN.

Con base a los datos obtenidos por los ensayos para la optimización de la presente técnica se llega a la conclusión de que se debería realizar la obtención de un plásmido que pueda servir para obtener una curva estándar confiable y que, además, este plásmido, sirva como un control positivo para futuros ensayos. Debido a que De la Cruz Hernández, y otros, 2017, determinaron que RVA es detectable hasta el ciclo 38, con base en una curva estándar realizada por dicho autor, sin embargo, al realizar ensayos para fines de este estudio se encontró que los valores de Ct no eran comparables debido a que threshold está colocado por encima del inicio de la fase exponencial así como no se tomó en cuenta la zona gris, es decir, intervalos de valores analíticos que se encuentran entre los umbrales de positividad y negatividad. Ya que en los ensayos realizados en el presente trabajo se determinó que el valor de corte era menor al establecido por De la Cruz Hernández, y otros, 2017.

Se obtuvo que muestras que tienen un periodo corto de tiempo (meses) al extraerlas nuevamente y procesarlas son reproducibles.

Sin embargo, cuando se realizaron nuevamente extracciones a partir de materia fecal previamente analizada y que fueron almacenada en refrigeración a 4°C, se obtuvo que con un Ct mayor a 28, estos valores no eran similares al de referencia, debido a que existe una degradación del ARN ya que se encuentra dentro de la materia fecal y en ella pueden existir distintos agentes que pueden degradarlo. También se observó que si se hacen múltiples ensayos a partir del mismo extracto si es reproducible.

Con base al porcentaje de detección de RVA por RT-qPCR, es una técnica sensible en comparación de las otras técnicas que se utilizan en el laboratorio de LVGI.

10. RECOMENDACIONES.

Se recomienda que se siga utilizando el Kit QIAamp® Viral ARN Mini kit debido a que al utilizar el RNeasy PowerMicrobe Kit el Ct aumenta, pero pareciera que es reproducible el método. Debido a esto es recomendable que se realicen más ensayos con el RNeasy PowerMicrobe Kit.

Se recomienda que se establezcan una relación entre las muestras positivas detectadas por RT-qPCR con las técnicas utilizadas en LVGI como es PAGE y la RT-PCR (detección de genogrupos VP4 y VP7), ya que se analizó que dichas técnicas tienen una sensibilidad para detectar los 11 segmentos de ARN y los genogrupos cuando el Ct es menor de 28, ya que después de este Ct las técnicas no tienen la sensibilidad adecuada para detectar RVA.

Finalmente, se recomienda que el threshold sea al comienzo fase exponencial, por lo tanto, si nos basamos con dicho dato el corte de Ct debería ser menor a reportado por De la Cruz Hernández, y otros, 2017, ya que detectó el RVA hasta el ciclo 38 con un límite de cuantificación de hasta 3.05 copias de genoma, por

lo tanto, falto tomar en cuenta la zona gris, de modo que ya no se asegura obtener resultados veraces.

11. BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Amin Blanco, N., & Fernández Castillo, S. (2016). Vacunas contra rotavirus: estado actual y tendencias futuras. *FILAY*, 89-97.
- 2) Anaya Molina, Y. (2018). Tesis: Estudio molecular de los brotes por rotavirus en Chiapas mediante RT-PCR en tiempo real 2010 y 2012. CDMX: Instituto Politécnico Nacional.
- 3) Anaya Molina, Y., De la Cruz Hernández, S. I., Andrés Dionicio, A. E., Terán Vega, H. L., Méndez Pérez, H., Castro Escarpulli, G., & García Lozano, H. (2018). A one-step real-time RT-PCR helps to identify mixed rotavirus infections in Mexico. *Elsevier Inc.*, 288-293.
- 4) CDC. (20 de Diciembre de 2017). Center for Diseases Control and Prevention (CDC). Recuperado el 20 de Septiembre de 2019, de Center for Diseases Control and Prevention (CDC): <https://www.cdc.gov/dotw/rotavirus/>
- 5) Contreras Treviño, H. I., & Padilla Noriega, L. (2018). Regulación de la traducción mediada por la proteína NSP3 de Rotavirus. *Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.*, 124-133.
- 6) Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., . . . Estes, M. K. (2017). Rotavirus Infection. *Nat Rev Dis Primers*, 39.
- 7) De la Cruz Hernández, S. I., Anaya Molina, Y., Gómez Santiago, F., Terán Vega, H. L., Monroy Leyva, E., Méndez Pérez, H., & García Lozano, H. (2017). Real-time RT-PCR, a necessary tool to support the diagnosis and surveillance of rotavirus in Mexico. *Elsevier Inc.*, 272-276.
- 8) Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *ELSEVIER*, 75-96.
- 9) Dung, T. N., Thanh Duy, P., Sessions, O. M., Sangumathi, U. K., Vinh Phat, V., Thanh Tam, P., & Nguyen To, N. (2017). A universal genome sequencing method for rotavirus A from human fecal samples which identifies segment reassortment and multi-genotype mixed infection. *BMC Genomics*, 16.
- 10) Espinosa Uribe, A. M., & Solano Castro, S. M. (2008). Detección de Rotavirus por medio de la técnica de RT-PCR en muestras de compost elaborado a partir de biosólidos y residuos vegetales. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- 11) Freeman, M. M., Kerin, T., Hull, J., McCaustland, K., & Gentsch, J. (2008). Enhancement of Detection and Quantification of Rotavirus in Stool Using a Modified Real-Time RT-PCR Assay. *Journal of Medical Virology*, 1489-1496.
- 12) Gautam, R., Mijatovic-Rustempasic, S., Mathew D., E., Tam, K., Quaye, O., & Bowen, M. (2016). One-step multiplex real-time RT-PCR assay for detecting and genotyping wild-type group A rotavirus strains and vaccine strains (Rotarix and RotaTeq) in stool samples. *PeerJ*, 1-30.
- 13) González Fernández, M. D., Hidalgo Rodríguez, R., & Silvia Blay, L. (2003). Rotavirus: Enfermedad emergente de transmisión digestiva. *Scielo*, 1561-3119.

- 14) Guerrero, C. A., & Acosta, O. (2016). Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection. *World Journal of Virology*, 38-62.
- 15) InDRE. (Febrero de 2020). Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorios de la gastroenteritis viral: Rotavirus, Norovirus, Astrovirus y Adenovirus entericos. Recuperado el 10 de Enero de 2020, de Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorios de la gastroenteritis viral: Rotavirus, Norovirus, Astrovirus y Adenovirus entericos:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/538724/Lineamientos_Rotavirus_270220.pdf
- 16) Komoto, S., Fukuda, S., Ide, t., Ito, N., Sugiyama, M., Yoshikawa, T., Taniguchi, K. (2018). Generation of Recombinant Rotaviruses Expressing Fluorescent Proteins by Using an Optimized Reverse Genetics System. *Journal of Virology*, 15.
- 17) Liu, J., Lurain, K., Sobuz, S. U., Begunm, S., Kumburu, H., Gratz, J., Houpt, E. R. (2015). Molecular genotyping and quantitation assay for rotavirus surveillance. *Journal of Virological methods*, 157-163.
- 18) Logan, C., O'Leary, J., & O'Sullivan, N. (2006). Real-Time Reverse Transcription-PCR for Detection of Rotavirus and Adenovirus as Causative of Acute Viral Gastroenteritis in Children. *Journal of Clinical Microbiology*, 3189-3195.
- 19) Luchs, A., & Tavares Timenetsky, M. d. (2016). Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. *einstein (Sao Paulo)*, 278-287.
- 20) Madhuri, S., Shital, G., Atul, M., Ranshing, S., & Chitambar, S. (2019). Evaluation of different genomic regions of Rotavirus A for development of real time PCR. *Journal of Virological Methods*, 65-71.
- 21) Maldonado Barney, A. A. (2008). Tesis: Diagnóstico de rotavirus por la técnica de rotaforesis y prueba de ELISA en niños con gastroenteritis aguda. México: UAM.
- 22) Mijatovic Rustempasic, S., Tam, k. I., Kerin, T. K., Lewis, J. M., Gautam, R., Quaye, O., Bowen, M. D. (2013). Sensitive and Specific Quantitative Detection of Rotavirus A by OneStep Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay without Antecedent Double-Stranded-RNA Denaturation. *Journal of Clinical Microbiology*, 3047-3054.
- 23) Mo, Q.-H., Wang, H.-B., Tan, H., Wu, B.-M., Feng, Z.-L., Wang, Q., Yang, Z. (2015). Comparative detection of rotavirus RNA by conventional RT-PCR, TaqMan RT-PCR and real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Journal of Virological Methods*, 1-4.
- 24) Parashar, U. D., S. Nelson, A., & Kang, G. (2018). Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *Department of Health & Human Services. BMJ*, 19.
- 25) Payne, D. C., & Parashar, U. D. (18 de Mayo de 2018). Chapter 13: Rotavirus. En *C. f. Prevention, VPD Surveillance Manual* (págs. 13.1-13.17). USA: Centers for Disease Control and Prevention. Obtenido de <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt13-rotavirus.html>

- 26) Reyna Figueroa , J., Sánchez Uribe, E., Esteves Jaramillo , A., Hernández Hernández, L. C., & Richardson, V. (2012). Enfermedad diarreica por rotavirus en brotes epidémicos. *Scielo*, 142-172.
- 27) ReynosoUtrera, E., Bautista Gómez , L. G., Martínez Castañeda, J. S., Romero Nuñez , C., García Rubio, V. G., Aguado Almazán, G., Espinosa Anaya, E. (2019). Análisis de la presencia de Rotavirus en conejos del Estado de México. *Revista Mexicana Ciencias Pecuarias*, 511-521.
- 28) Salud, S. d. (23 de Octubre de 2015). ¿Qué es el Rotavirus? Recuperado el 15 de Octubre de 2019, de ¿Qué es el Rotavirus?: <https://www.gob.mx/salud/articulos/que-es-el-rotavirus>
- 29) Secretaría de Salud. (Septiembre de 2012). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Enteritis por Rotavirus. Obtenido de Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Enteritis por Rotavirus: http://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/acerca_de/marco_j/manualesvep/Manual_ROTAVIRUS.pdf
- 30) Sicard, M., Bryant, K., Muller, M., & Quach, C. (2019). Rotavirus vaccination in the neonatal intensive care units: where are we? A rapid review of recent evidence. *Current Opinion*, 25.
- 31) Steger, C. L., Boudreaux, C. E., LaConte, L. E., Pease, J. P., & McDonald, S. (2019). Group A Rotavirus VP1 Polymerase and VP2 Core Shell Proteins: Intergenotypic Sequence Variation and In Vitro Functional Compatibility. *Journal of Virology*, 27.
- 32) Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*, 70-78.
- 33) Tamayo Meneses, L., & Moreno Lagos, O. (2007). Rotavirus. *Revistas Bolivianas*, 97-106.
- 34) ThermoFisher. (2018). PCR en tiempo real versus digital versus PCR tradicional. Recuperado el 03 de Febrero de 2020, de PCR en tiempo real versus digital versus PCR tradicional: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>
- 35) Trask, S. D., McDolnald, S. M., & Patton, J. T. (2013). Structural Insights into the Coupling of Virion Assembly and Rotavirus Replication. *Nat. Rev. Mirobiol.*, 165-177.
- 36) WHO. (2013). Weekly epidemiological record. World Health Organization, 49-64.
- 37) Xie, X.-T., Macdonald, R. E., Tapscott, B., Nagy, E., & Turner, P. V. (2018). Detection of Astrovirus, Rotavirus C, and Juvenile Farmed Mink (*Neovison vison*). *Frontiers in Veterinary Science*, 1-8.