

VIGILANCIA AMBIENTAL MOLECULAR DE ROTAVIRUS GRUPO A HUMANOS

Cristina Villena Portella
Tesis Doctoral



Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona



Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia (1997-1999)

Albert Bosch i Navarro, Catedràtic de Microbiologia, i Rosa M^a Pintó Solé, Professora Titular de Microbiologia a la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona,

CERTIFIQUEN

Que el treball d'investigació titulat "**VIGILANCIA AMBIENTAL MOLECULAR DE ROTAVIRUS GRUPO A HUMANOS**" i presentat com a tesi doctoral per Cristina Villena Portella s'ha realitzat sota la nostre direcció al Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia, i que reuneix els requisits necessaris per optar al Grau de Doctor en Biologia

I per que així consti, firmem la present certificació amb data de 3 de novembre de 2003

Dr. Albert Bosch i Navarro

Dra. Rosa M^a Pintó i Solé

virtuositat

virtut

virulència

virulent

virus m. (med) Agent
infectiu, infiltrable, de
naturalesa poc coneguda i
gènere invisible. 2. Humor
maligne 3. fig. Malignitat

vis

visar

visatge

visca

Arimany, 1995

ÍNDICE

ÍNDICE	i
AGRAÏMENTS	v
ABREVIATURAS, ANGLICISMOS Y UNIDADES	ix

INTRODUCCIÓN	1
---------------------	----------

1. Los rotavirus	3
1.1. Los rotavirus como miembros de la familia <i>Reoviridae</i>	3
1.2. Características particulares de los rotavirus.....	4
1.3. Morfología.....	4
1.4. Clasificación	5
1.5. Proteínas estructurales	9
1.6. Ciclo replicativo.....	16
2. Importancia sanitaria. Morbilidad y mortalidad	17
3. Vías de transmisión de rotavirus	20
4. Profilaxis	21

OBJETIVOS	23
------------------	-----------

CAPÍTULO 1

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CONCENTRACIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ROTAVIRUS DEL GRUPO A EN AGUA RESIDUAL	27
--	-----------

1.1. Antecedentes	29
1.2. Material y métodos	35
1.2.1. Concentración vírica por liofilización	35
1.2.2. Detección molecular de rotavirus del grupo A por RT-PCR de un fragmento del sexto segmento	36
1.2.2.1. Extracción de ácidos nucleicos	36
1.2.2.2. Transcripción reversa y amplificación por PCR de un fragmento de 186 bp del sexto segmento de rotavirus	36
1.2.2.3. Confirmación mediante hibridación- <i>Southern blot</i>	37

1.2.3. Cuantificación molecular de rotavirus del grupo A mediante RT-PCR a tiempo real del sexto segmento	39
1.2.4. Construcción de un RNA patrón	40
1.2.5. Cuantificación del título infeccioso de suspensiones de rotavirus mediante cultivo celular	49
1.2.5.1. Cepas víricas.....	49
1.2.5.2. Líneas celulares.....	50
1.3. Resultados	51
1.3.1. Determinación y puesta a punto de un método de detección molecular de rotavirus	51
1.3.2. Puesta a punto de un método de cuantificación molecular por RT-PCR a tiempo real de rotavirus.	57
1.3.3. Eficiencia de recuperación de rotavirus mediante liofilización	61
1.4. Discusión.....	65

CAPÍTULO 2

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ROTAVIRUS EN AGUA RESIDUAL	71
2.1. Antecedentes	73
2.2. Material y métodos	77
2.2.1. Muestras	77
2.2.2. Detección, confirmación y cuantificación de rotavirus.....	77
2.2.3. Detección y confirmación de astrovirus, virus de la hepatitis A y norovirus	78
2.2.4. Análisis estadístico	82
2.3. Resultados	83
2.3.1. Rotavirus en aguas residuales de Barcelona.....	83
2.3.2. Cuantificación de la carga viral de rotavirus en las aguas residuales de Barcelona.....	87
2.4. Discusión.....	99

CAPÍTULO 3

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ROTAVIRUS DEL GRUPO A EN AGUA RESIDUAL DE BARCELONA: EMERGENCIA DE GENOTIPOS POCO COMUNES	103
3.1. Antecedentes	105
3.2. Material y métodos	109
3.2.1. Genotipado de la glicoproteína VP7 (G) mediante RT-PCR-Seminested..	109
3.2.2. Genotipado de la proteína sensible a proteasas VP4 (P) mediante RT-PCR-Seminested	112
3.2.3. Caracterización de aislados G5. Análisis filogenético.....	115

3.3. Resultados	117
3.3.1. Genotipado G	117
3.3.2. Genotipado P.....	119
3.3.3. Combinaciones G-tipo/P-tipo.....	121
3.3.4. Caracterización de los aislados G5.....	122
3.4. Discusión	125

CONCLUSIONES	133
---------------------	------------

APÉNDICE I: SOLUCIONES Y TAMPONES	137
--	------------

APÉNDICE II: OLIGONUCLEÓTIDOS	143
--------------------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	147
---------------------	------------

AGRAÏMENTS

Des de molt petita sentia gran atracció per las plantes i els animals, i tenia molt clar que volia ser veterinària. El fet de poder ser el metge dels animals que m'estimava em feia sentir bé amb mi mateixa. No volia passar-me la vida ordenant llibres o darrera un taulell manegant els cèntims dels altres. Però a mesura que s'acostava el moment de l'elecció (la selectivitat) el meu avi matern em feia dubtar més i més de la meva elecció. És el que passa amb professions típicament sexistes. Jo volia ser veterinària de grans animals, no de gossets que tussen. Així és que la meva predilecció pels animals es va estendre a tot l'ecosistema: volia ser biòleg. Llavors la biologia era una carrera considerada pels amants de la natura i farres de cap de setmana. Però de mica en mica es va anar perfilant com una de les carreres amb més espectre i futur. Englobava moltes matèries diverses i era pionera en molts camps.

L'any olímpic va ésser per mi, i per molta gent de la meva generació, un gran any. Vaig entrar en la Facultat de Biologia per a iniciar, el que seria, la meva carrera professional, i vaig conèixer la persona amb la que compartiria molts moments especials de la meva vida, en David. Ell fou qui m'obligà a conèixer un altre ecosistema totalment desconegut per mi, el submarí. Sé que sona molt pastelós però aquell any vam iniciar el nostre repte de ser biòlegs. Amb els anys, aquest gran repte va ésser assolit, i ara, no tan sols em sento viròloga sinó també una gran amant de la natura.

Bastant abans d'acabar la carrera ja sentia curiositat per conèixer un laboratori: com funcionava, com es treballava, etc. Així vaig topar amb la Dra. Rosa Pintó al passadís de Microbiologia i li vaig demanar per veure i participar en la recerca del seu grup. Així vaig fer-ho i em varen convidar fins i tot a un congrés: estava totalment enlluernada. Un cop acabada la carrera se'm va oferir la possibilitat d'iniciar una tesis doctoral. Immediatament vaig dir que sí. Era un repte molt emocionant. I ara, després de 6 anys de tesi doctoral (un gran període formatiu per a mi) em trobo escrivint l'apartat d'agraïments en la que desitjo agrair a tothom el fet de tan sols creuar-se pel meu camí.

La iniciativa, la direcció, l'afany per entendre els virus entèrics, la decisió, l'esperit de grup, la perspectiva de les coses i la visió de futur ho dec a l'Albert. La formació, el treball diari, la crítica, la maduresa, l'ànsia d'autosuperació ho dec a la Rosa.

L'ajuda, el companyerisme, l'alegria, l'il·lusió, el compartir bons i desafortunats moments, la gran amistat i estimació ho dec a Glòria, Susana, Santi i Xavi. Amb la Glòria hem après a comprendre el món des d'una altra perspectiva, sempre ha estat al meu costat i hem compartit molts moments i anècdotes. A la Susana li agraeixo el seu desinteressat ajut, la seva comprensió, la seva particular i feliç visió del món, el seu optimisme, seny i la seva capacitat pacificadora. En Santi sempre ha estat l'home del grup, el mimat per totes (trobaré a faltar les nostres baralles per colonitzar l'espai). A Xavi, per ser el més veterà, el més savi (el corrector ortogràfic, lèxic i gramatical del grup); li agraeixo la meva formació inicial al laboratori i la seva constant disponibilitat per ajudar-me en qualsevol petit problema. Va ésser el meu instructor, company i és un gran amic. Hem compartit molts moments importants.

La ajuda, la cooperació, l'esforç i molts moments de satisfacció també els dec a l'Àngels, el Piotrek i la Patrícia. No vull oblidar-me dels nous fitxatges: la Mari, el Lluís, l'Hèctor, la Xantal i la Islem, que gaudeixen de gran optimisme i alegria, i que s'embarquen en la mateixa fita que jo em vaig embarcar 6 anys enrera. Els hi desitjo molta sort. Tampoc vull oblidar-me de l'inoblidable Walled, qui m'ha mostrat una altre visió del món i de la ciència.

Els préstecs, la ajuda, els consells, els debats, els acudits i molts bons moments també els dec a molts membres del Departament de Microbiologia. Després de prop 8 anys són moltes les persones que he conegut i m'han ajudat en menor o major grau. He disfrutat molt el companyerisme existent en aquest Departament on tothom és membre d'un grup però tots som un mateix grup de microbiologia. He vist acabar i marxar molts companys que no retornen. Moltes vegades penso en ells. Potser m'estic fent gran i em torno melancòlica.

En els últims anys he compartit més experiències amb els laboratoris propers al meu. Concretament, al laboratori 5 -el nostre immediat veí- haig d'agraciar moltes coses. Al Jordi els seus consells i sabiduria multidisciplinar, al Marc les seves previsions meteorològiques, a Quim la seva desinteressada ajuda, a Zaira ser l'ànima femenina del grup, a Jorge les seves sonates. Al laboratori 3 i 4 devem gran nombre de consells, auxilis, préstecs, xerrades i bons moments. A Cristina dec la seva experiència i estima, als membres del seu laboratori (la Rosa, la Paytu, la Núria, l'Eva, el Nacho, l'Eli i José M^a), per compartir l'estona de dinar, quan baixava tard, i debatre sempre grans temes d'interès. Al laboratori 1 i 2 devem els préstecs, companyia i amistat. Molts moments hem compartit en les pràctiques, en partits de bàsquet, en sopars, i en moltes coses més però que per la divisió física del nostre Departament hem perdut el contacte diari. Sobretot al grup del Joan Tomás (la Maite, la Ceci, la Maria, la Ina, ...) qui m'ha facilitat sempre que ho he necessitat les

fràgils bombolles de vidre del liofilitzador. No oblidó a tots aquells companys que no hi són avui amb nosaltres però que tinc molt presents.

La part financera la dec a la Universitat de Barcelona, gràcies al gaudiment d'una beca de recerca i docència de la pròpia universitat. Amb ella he pogut assolir un dels meus objectius personals i m'ha ofert la possibilitat d'experimentar la satisfacció de transmetre els meus senzills coneixements a les immediates generacions.

Els meus avis materns i paterns han estat grans determinants del meu fonament professional i personal. A ells dec els consells, la bondat, la simplicitat, l'experiència, l'estima i el carinyo. Però també ho han estat la Dolors, el Manel, la Moni, el Quinti, la Sra. Pilar, el Sr. Pepito, el Marc, la Nuri i el Salva, sobretot per la seva ajuda moral, la seva confiança en mi, el seu suport, la seva satisfacció pel meu esforç, l'esbarjo, la estima i el carinyo. No puc oblidar als amics a qui els hi dec l'orgull, la mirada endavant, l'amistat, la confiança en un mateix (a la Marta, als del càmping, als de la carrera, als vinícoles, als bilingües...). A molts d'ells els hi dec la crítica i la visió de la societat capitalista que em permetia reconèixer de que estava fent allò que realment volia.

Una visió diferent de la societat és la del gran grup de companys i amics dels "biolocos", els qui m'han donat l'oportunitat de conèixer com es crea una empresa, com fan créixer els pollastres, com es reproduïxen els neros, com s'operen per marcar-los, com agafar ous entre aigües amb bosses industrials de plàstic i lluitar alhora contra les oblades; com recluten i creïxen les gorgònies, com et punxes amb una garota mentre la contes, com es fan jardinetes d'algues marines amb rajoles, com trobar parcel·les de corall vermell; com buscar llagostes en els col·lectors i trobar popets; com mesurar roques, transectes i parcel·les; com parlar, escriure i discutir sota aigua; i sobretot, com es busquen, contes, fotografien, mesuren, marquen, s'assenten, desapareïxen, surten de marxa per la nit ... les *PALINURUS ELEPHAS*!!!!

En Joseba és un altre patidor del ritme de vida dels "biolocos". Ell i jo sabem que es viu amb un biòleg marí. A ell agraeixo la seva generosa i desinteressada ajuda en el disseny i maquetació de la tesis.

Encara que tot l'esforç, el sacrifici, l'insistència, l'optimisme, la companyia, l'ajuda, la diversió, el carinyo, la felicitat i l'amor ho dec a en David. Ha sigut l'aport d'energia, la ajuda espiritual, l'ànima bessona, les ganes i il·lusió, el pany de llàgrimes i el somriure.

Sense tots i cadascun de vosaltres aquest treball no estaria aquí avui. A tots vosaltres, gràcies!

ABREVIATURAS, ANGLICISMOS Y UNIDADES

aa	Aminoácido/s
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenztiazolín-6-sulfónico)
<i>Background</i>	Señal de fondo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Col.	Colaboradores
CPE	Efecto citopatogénico
CSPD	<i>Disodium 3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) [3.3.1.1.^{3,7}] decan}-4-yl)phenyl phosphate</i> <i>tricyclo</i>
dATP	2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitosina-5'-trifosfato
DEAE	Sulfato dextrano de sodio
dGTP	2'-deoxiguanosina-5'-trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
dsRNA	Ácido ribonucleico de cadena doble
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-deoxitimidina-5'-trifosfato
dUTP	2'-deoxiuridina-5'-trifosfato
EDIM	<i>Epizootic diarrhea of infant mice virus</i>
EDTA	Ácido etileno-diamina-tetraacético
eIF4G1	Factor celular implicado en la iniciación de la traducción
ELISA	Ensayo inmunosorbente de enzima ligado
FCS	Suero fetal de ternera
x g	Fuerza centrífuga expresada en múltiplos de la gravedad
HAsV	Astrovirus humanos
HAV	Virus de la hepatitis A
HRV	Rotavirus humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanosulfónico
MEM	Medio de cultivo mínimo esencial
M-MuLV-RT	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney
MOI	Multiplicidad de infección

MPN	Número más probable de partículas infecciosas
<i>Nested</i>	Segunda amplificación del DNA por PCR utilizando <i>primers</i> diferentes a la primera PCR
NLV	Virus Norwalk-like
NV	Norovirus
ORF	Pauta de lectura abierta (<i>Open reading frame</i>)
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
<i>Pellet</i>	Sedimento resultante después de una centrifugación
PM	Peso molecular
<i>Primer</i>	Oligonucleótido, cebador
<i>Reassortment</i>	Fenómeno de intercambio genético que tiene lugar en la célula huésped donde dos o más virus parentales intercambian segmentos enteros de material genético, heredándose en la progenie.
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SD	Desviación estándar
SDS	Sodio dodecil sulfato
SG	Subgrupo
<i>Seminested</i>	Segunda amplificación del DNA por PCR utilizando uno de los <i>primers</i> de la primera PCR
<i>Southern blot</i>	Transferencia del DNA de un gel de electroforesis a una membrana
<i>split-ratio</i>	Número de subcultivos originados a partir de un cultivo original
ssRNA	Ácido ribonucleico de cadena sencilla
T _m	Temperatura de fusión (<i>Melting temperature</i>)
Tween-20	Sorbitan monolaurato polioxietileno

Unidades y prefijos de unidad

°C	Grados Celsius	K	10 ³
g	Gramos	m	10 ⁻³
l	Litros	μ	10 ⁻⁶
M	Molar	n	10 ⁻⁹
N	Normal	p	10 ⁻¹²
pb	Pares de bases		

INTRODUCCIÓN

1. LOS ROTAVIRUS

1.1. Los rotavirus como miembros de la familia *Reoviridae*

Todos los miembros de la familia *Reoviridae* poseen un genoma formado por 10, 11 ó 12 segmentos de RNA de doble cadena, miden entre 60 y 85 nm, carecen de envuelta lipídica, presentan proteínas distribuidas en capas concéntricas siguiendo una simetría icosaédrica y la replicación tiene lugar en el citoplasma, formándose viroplasma en las células infectadas. Dentro de los géneros que se agrupan en esta familia (ver tabla 1.1) *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus* y *Coltivirus* infectan mamíferos y aves.

TABLA 1.1. Géneros clasificados dentro de la familia *Reoviridae*.

Familia	Género	Especie tipo	Huésped
<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i>	Mammalian orthoreovirus	Vertebrados
	<i>Orbivirus</i>	Bluetongue virus	Vertebrados
	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus A	Vertebrados
	<i>Coltivirus</i>	Colorado tick fever virus	Vertebrados
	<i>Aquareovirus</i>	Aquareovirus A	Vertebrados
	<i>Cypovirus</i>	Cypovirus 1	Invertebrados
	<i>Fijivirus</i>	Fijivirus 1	Plantas
	<i>Phytoreovirus</i>	Rice dwarf virus	Plantas
	<i>Oryzavirus</i>	Rice regged stunt virus	Plantas

Cabe destacar que de las 6 familias víricas existentes con genoma dsRNA (*Reoviridae*, *Birnaviridae*, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Hypoviridae* y *Cystoviridae*), *Reoviridae* es la que posee mayor diversidad de huéspedes.

1.2. Características particulares de los rotavirus

Los rotavirus, como miembros de la familia *Reoviridae*, poseen características comunes a todos los géneros de esta familia, pero presentan algunas propias resumidas en la tabla 1.2.

TABLA 1.2. Características de los rotavirus.

Estructura
Partículas icosaédricas de entre 65 a 75 nm
Cápside formada por tres capas proteicas
No envueltos
La cápside contiene todos los enzimas necesarios para la replicación del RNA
Genoma
Once segmentos de RNA de doble cadena distinguibles electroforéticamente
Los segmentos de RNA purificados no son infecciosos
Cada segmento de RNA codifica para al menos 1 proteína
En infecciones duales en una misma célula los segmentos de RNA pueden intercambiarse (en inglés "reassorting")
Replicación
Propagación facilitada por proteasas
Replicación citoplasmática
Formación de cuerpos de inclusión
Estado transitorio de partículas envueltas durante un estadio de la morfogénesis
Liberación de la progenie mediante lisis celular o transporte vesicular no clásico en células epiteliales polares.

1.3. Morfología

Mediante técnicas de microscopia electrónica es posible observar tres morfologías distintas de viriones de rotavirus (ver figura 1.3.):

- La partícula completa (triple capa) con un aspecto semejante a una rueda (de aquí el nombre de rotavirus, en latín *rota* significa rueda).
- La partícula carente de la capa más externa, conocida como partícula de doble capa, presenta una morfología muy rugosa debido a que la periferia muestra subunidades triméricas de la cápside interna.
- La partícula de capa simple, la cual sólo muestra el *core*. Normalmente se encuentra agregada y no presenta genoma.

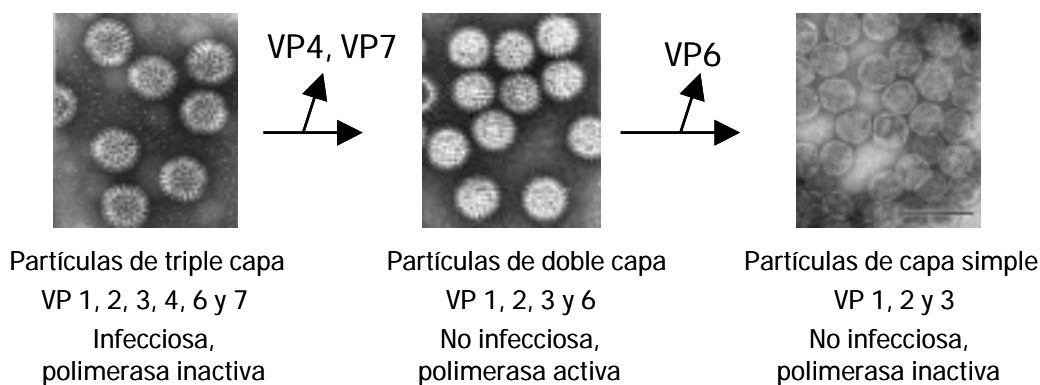


FIGURA 1.3. Estructura y propiedades biológicas de las partículas de los rotavirus. Mediante tinción con 1% de molibdato amónico es posible observar en el microscopio electrónico las tres morfologías características de rotavirus (Estes, 2001). La barra representa 100 nm.

1.4. Clasificación

Los rotavirus se clasifican en serogrupos, subgrupos y serotipos según sus características serológicas. Se conocen 7 diferentes **serogrupos** o **grupos** dependiendo de los diferentes epítomos presentes en la proteína VP6, a cada uno de los cuales se le ha asignado una letra: los grupos A, B y C han sido aislados tanto en humanos como en animales, mientras que los grupos D, E, F y G han sido sólo aislados en animales (Kapikian *et al.*, 2001). La mayoría de infecciones por rotavirus en humanos son causadas por rotavirus del grupo A. Estos virus son capaces de intercambiar segmentos de su genoma entre miembros de su mismo serogrupo, pero no si son de diferentes serogrupos (Yolken *et al.*, 1988). El serogrupo A se asocia típicamente a diarreas en personas y animales jóvenes. El serogrupo B se ha asociado a epidemias anuales de diarrea grave en adultos en China (Hung *et al.*, 1983, Wang *et al.*, 1985; Su *et al.*, 1986) y en la India (Krishnan *et al.*, 1999), y a brotes de diarrea no tan grave en neonatos en China (Mackow, 1995). El serogrupo C ha sido esporádicamente descrito en muestras fecales de niños con diarrea (Rodger *et al.*, 1982; Penaranda *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 1995; Mackow, 1995; Otsu, 1998) y en varios brotes (Matsumoto *et al.*, 1989; Caul *et al.*, 1990; Hamano *et al.*, 1999). Muy pocos rotavirus de serogrupo diferente al A han podido propagarse en cultivo celular (Saif *et al.*, 1988; Welter *et al.*, 1991; Sanekata *et al.*, 1996; Shinozaki *et al.*, 1996). La proteína VP6 es el antígeno predominante de grupo, seguramente porque constituye el 51% del virión (Kapikian *et al.*, 2001).

Dentro del grupo de rotavirus A se han definido diferentes **subgrupos** (SG) atendiendo a la presencia o ausencia de distintos tipos de epítomos inmunoreactivos frente a determinados anticuerpos monoclonales. Se conocen el SG I, SGII, SG I+II, SG no-I y SG

no-II según sean reactivos o no a los anticuerpos monoclonales 255/60 y 631/9 (Greenberg *et al.*, 1983). El SG II es el más frecuente entre las cepas humanas (Georges-Courbot *et al.*, 1988; Beards *et al.*, 1989; Arista *et al.*, 1990; Mohammed *et al.*, 1994; Iturriza-Gómara *et al.*, 2001) mientras que el SG I es más frecuente entre las cepas de origen animal (López *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1997).

Los rotavirus del grupo A comprenden gran número de serotipos definidos mediante ensayos de neutralización (Hoshino y Kapikian, 1996). Estos ensayos han desenmascarado la existencia de dos proteínas externas de la cápside, altamente reactivas frente anticuerpos neutralizantes de la infección: las proteínas VP7 y VP4 (ver figura 1.5.1.). El hecho de que los genes que codifican para ambas proteínas puedan segregarse independientemente da la posibilidad de la existencia de antígenos de neutralización heterólogos (Hoshino *et al.*, 1985).

Así, la clasificación de los rotavirus es un sistema binario que distingue distintos **serotipos** de las proteínas VP7 y VP4 (Rodger y Holmes, 1979; Hoshino *et al.*, 1984; Graham y Estes, 1985; Hoshino y Kapikian, 1996). Por el momento se conocen 15 serotipos de VP7 y 13 serotipos de VP4 -tablas 1.4.1. y 1.4.2. respectivamente- (Hoshino y Kapikian, 1996; Rao *et al.*, 2000; Estes, 2001). Dado que VP7 es una glicoproteína, el serotipo VP7 también es conocido como G-serotipo o G-tipo. En el caso de VP4, debido a que es una proteína sensible a proteasas, se le denomina P-serotipo o P-tipo (Mattion *et al.*, 1994).

El procesamiento de la proteína VP4 genera dos subunidades, VP8* y VP5*. Estudios con recombinantes, que expresaban VP8* y VP5* de tres cepas de rotavirus humanas, demostraron que la subunidad VP8* contiene los principales lugares antigénicos para la especificidad serotípica, mientras que la subunidad VP5* contiene lugares responsables de la reacción cruzada entre diferentes VP4 (Larralde *et al.*, 1991). Sólo la variación nucleotídica existente entre los aminoácidos de las posiciones 84 y 180 de la subunidad VP8* ha sido útil para definir los epítomos específicos de P-tipo (Larralde y Gorziglia, 1992). La poca disponibilidad de anticuerpos y antisueros que reconocieran específicamente los diferentes serotipos de la proteína VP4, llevó a la necesidad del estudio de sus propiedades basándose en la secuencia nucleotídica del gen que codifica para ésta. Hasta el momento se conoce la existencia de al menos 21 genotipos de VP4, de los cuales sólo 16 se corresponden con serotipos conocidos (Hoshino y Kapikian, 1996; Rao *et al.*, 2000; Estes, 2001). En cambio, en el caso de la proteína VP7 existe una correlación muy clara entre genotipo y serotipo (Gouvea *et al.*, 1990).

Todo esto ha llevado a una nomenclatura consenso entre la mayoría de autores para definir los serotipos de un determinado aislado de rotavirus. Se describe el G-tipo como G y el número de G-tipo, y el P-tipo como P y el número de serotipo y/o el número de

genotipo correspondiente entre corchetes. Por ejemplo, la cepa de rotavirus humana Wa sería **G1 P1A[8]** (ver tablas 1.4.1. y 1.4.2.).

TABLA 1.4.1. Serotipos G VP7 de rotavirus del grupo A.

Serotipo	Humanos	Animales ^a
G1	Wa, KU, RV-4, K8, D, M37, Mont, WI79, AU32, HN-1, GR475/87	Bo/T449, Po/C60, Po/C91, Po/C95, Po/CN117, Po/C86, Po/S7, Po/S8
G2	DS-1, S2, RV-5, RV-6, KUN, HN-126, 1076, E201, E210, HU5, TA3, TA20	
G3	Ito, YO, P, M, Nemoto, AU-1, RV-3, W178, AK-35, ST8, MO, McN13, McN14, HCR3, CHW927A, Ro1845, O264, AU228, PA710, CHW2, CHW17, CH-55, AI-75, J-12, TK08, TK28	Si/SA11 CI3, Si/SA11 4fm, Si/SA11-SEM, Si/SA11-FEM, Si/RRV, Ca/K9, Ca/CU-1, Ca/A79-10, Ca/LSU79C-36, Ca/RS15, La/ALA, La/C-11, La/R-2, La/BAP-2, Eq/H-2, Eq/FI14, Eq/HO-5, Eq/69, Eq/124, Eq/K1673, Eq/311, Fe/Cat97, Fe/Cat2, Fe/Cat22, Fe/taka, Fe/FRV64, Fe/FRV-1, Mu/EW, Mu/EB, Mu/EL, Mu/EC, Mu/EHP, Mu/YR-1, Po/CRW-8, Po/A131, Po/A138, Po/LCA843, Po/A821, Po/A411, Po/BEN-307, Po/PRV 4F, Po/AT/76, Ov/LRV1, Po/MDR-13 ^b
G4	Hochi, Hosokawa, ST3, 57M, ST4, VA70	Po/Gottfried, Po/SB-1A, Po/SB-2A, Po/BEN-144, Po/BMI-1
G5	IAL28 ^c , BR1054	Po/OSU, Po/EE, Po/TFR-41, Po/A34, Po/A46, Po/C134, Po/CC17, Po/S8, Eq/H-1
G6	PA151, PA169, MG6	Bo/NCDV-Lincoln, Bo/UK, Bo/B641, Bo/RF, Bo/C486, Bo/WC3, Bo/KN-4, Bo/IND, Bo/BRV033, Bo/B-60, Bo/CR231/39, Ov/LRV2, Cap/Cap455
G7		Ch/Ch-2, Ty/Ty-1, Ty/Ty-3, Pi/PO-13, Bo/993/83
G8	69M, B37, HAL1166, HAL1271, HMG89	Bo/678, Bo/A5, Bo/NCDV-Cody, Bo/J2538, Eq/26/94
G9	WI61, F45, Mc523, AU32, US1205, Mc345, 116E	Po/ISU-64, Po/S8, Ov/LRV
G10	I321, Mc35, A28, A64	Bo/B223, Bo/61A, Bo/V1005, Bo/KK3, Bo/B-11, Bo/A44, Bo/CR129, Bo/BR65/255, Eq/R-22, Ov/Ip14, Ov/K923
G11		Po/YM, Po/A253
G12	L26, L27	
G13		Eq/L338
G14		Eq/FI23, Eq/FR4, Eq/FR5, Eq/FR8, Eq/EQ431, Eq/CH3
G15		Bo/Hg18

^a Aislados de origen animal indicados por las abreviaciones: Si, simio; La, conejo; Po, porcino; Ca, canino; Mu, murino; Ty, pavo; Ch, pollo; Pi, paloma; Eq, equino; Fe, felino; Bo, bovino; Ov, ovino; Cap, cabrío.

^b Po/MDR-13 tiene reactividad serotípica dual (G3 y G5) (Nagesha *et al.*, 1990).

^c Hu/IAL28 tiene reactividad serotípica dual (G5 y G11) (Timenetsky *et al.*, 1997).

TABLA 1.4.2. Genotipos [P] y serotipos P VP4 de rotavirus del grupo A.

Genotipo	Serotipo	Humanos	Animales ^a
P[1]	P6	MP409	Bo/C486, Bo/NCDV, Bo/BRV033, Bo/BRV16, Bo/A5, Bo/CR231/39, Bo/J2538, Bo/RF, Si/SA11 4fm, Si/SA11-FEM, Eq/26/94, Ov/LRV1
P[2]	P5B		Si/SA11 C13, Si/SA11-SEM
P[3]	P5B		Si/RRV, Fe/FRV64
	P5A	Ro1845, HCR3	Ca/K9, Ca/CU-1, Ca/RS15, Fe/Cat97
P[4]	P1B	RV5, DS-1, S2, L26, KUN, E201, E210, CHW17	
P[5]	P7		Bo/UK, Bo/WC3, Bo/B641, Bo/61A, Bo/678, Bo/V1005, Bo/IND, Po/PRV 4S
P[6]	P2A	M37, 1076, RV-3, ST3, McN13, US1205, NnB1, S12/85	
	P2B		Po/Gottfried, Po/BEN-144, Po/S5, Po/S7, Po/SB-2A
	P2C	AU19	
P[7]	P9		Po/OSU, Po/TRF-41, Po/C60, Po/A821, Po/A138, Po/YM, Po/A253, Po/BMI-1, Po/AT/76, Po/SB-2A, Po/C95, Po/C134, Po/CC117, Po/CN117, Po/SB-1A, Po/CRW-8, Po/BEN-307, Po/A131, Po/EE, Po/ISU-64, Eq/H-1
P[8]	P1A	Wa, KU, P, YO, MO, VA70, D, AU32, CH-32, CH-55, CHW2, CH927A, CH927B, WI61, F45, AI-75, AI-53, AI-36, AI-39, Hochi, Hosokawa, BR1054, TK-08, TK-28, TK-15, 97'B53, J-12, CJN, 95-91, 95-87, Ito	Po/S8A, Po/S8B, Ov/LRV
P[9]	P3	K8, AU-1, PA151, M318, AU228, 02/92	Fe/FRV-1, Fe/Cat2
P[10]	P4	69M, 57M	Eq/H2, Eq/FI23, Eq/FI14
P[11]	P8	116E, I321	Bo/B223, Bo/A44, Bo/KK3, Bo/B-11, Bo/KN-4, Bo/CR129, Bo/BR65/255, Eq/R-22, Ov/LRV2
P[12]	P4		Eq/H-2, Eq/FI14, Eq/FI23, Eq/FR4, Eq/FR8, Eq/69, Eq/124, Eq/EQ431, Eq/K311, Eq/K1673, Eq/CH3
P[13]	P13		Po/MDR-13, Po/A46, Po/Clon8
P[14]	P11	PA169, HAL1166, HAL1271, HAL8590, Mc35, MG6, GR475/87	La/ALA, La/C-11, La/BAP-2, Cap/Cap455
	P11?		La/R-2
P[15]			Ov/Ip14, Ov/Ip16
P[16]	P10		Mu/Eb, Mu/EW, Mu/EC
P[17]			Pi/PO-13, Bo/993/83, Ch/Ch-1, Ty/Ty-1, Ty/Ty-3
P[18]	P12		Eq/L338
P[19]			Po/PRV 4F
P[20]			Mu/EHP
P[21]			Bo/Hg18

^a Aislados de origen animal indicados por las abreviaciones: Si, simio; La, conejo; Po, porcino; Ca, canino; Mu, murino; Ty, pavo; Ch, pollo; Pi, paloma; Eq, equino; Fe, felino; Bo, bovino; Ov, ovino; Cap, cabrío.

La homología entre diferentes aislados representantes de casi todos los serotipos de VP7 conocidos se muestra en la tabla 1.4.3. Se aprecia que incluso aislados que comparten el mismo G serotipo presentan un grado de homología a nivel de secuencia de aminoácidos

no mayor al 94.5% (véase Hu/P, Si/SA11 y Si/RRV). Dentro de cada serotipo la homología a nivel de secuencia de aminoácidos es alta (91-100%). En cambio, entre cepas de diferentes serotipos es bastante menor (Kapikian *et al.*, 2001).

TABLA 1.4.3. Porcentaje de homología tanto a nivel de secuencia nucleotídica como a nivel de secuencia aminoacídica entre diferentes aislados de G tipos (Kapikian *et al.*, 2001).

G SEROTYPE	1	2	3	3	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Strain	Wa	DS-1	P	SA11	RRV	ST3	OSU	UK	Ch2	69M	WI61	B223	YM	L26	L338	FI23
1 Wa		74.6	76.3	75.8	74.8	76.9	76.6	74.0	62.5	72.2	75.8	74.7	74.0	74.8	72.1	73.3
2 DS-1	74.2		75.2	74.2	74.2	71.3	72.9	73.8	61.4	73.6	73.9	73.1	75.9	73.7	71.3	71.2
3 P	82.8	74.9		81.7	82.6	75.6	78.2	79.2	63.8	76.3	79.3	77.9	78.1	76.5	76.0	78.0
3 SA11	81.6	75.2	91.4		84.4	74.7	76.9	77.4	61.5	75.4	78.7	77.4	78.0	77.3	76.0	78.6
3 RRV	80.7	74.9	92.3	94.5		75.1	77.6	78.1	63.6	77.0	79.5	77.2	79.2	76.1	75.7	81.1
4 ST3	76.7	71.8	78.1	77.3	78.7		76.6	74.5	63.8	71.9	76.4	73.3	75.2	73.7	71.8	72.7
5 OSU	78.2	73.9	85.0	84.4	85.0	75.5		75.6	64.6	75.2	78.9	74.2	82.9	75.5	73.2	73.8
6 UK	81.6	76.1	84.4	85.3	85.9	78.2	82.2		62.4	76.0	75.9	75.5	74.8	75.3	72.9	73.4
7 Ch2	58.3	57.5	58.9	58.9	59.6	62.9	58.1	59.9		61.3	61.9	63.2	61.1	62.5	62.8	62.2
8 69M	75.5	75.5	83.4	83.7	84.7	74.3	81.3	82.5	58.0		75.1	76.2	75.9	73.7	72.3	73.2
9 WI61	78.8	76.1	84.7	86.8	87.1	78.5	81.3	83.4	59.8	81.6		74.9	78.0	76.2	73.4	76.7
10 B223	79.1	73.3	84.7	84.1	85.3	74.5	80.1	82.8	60.8	81.0	81.9		74.9	73.3	73.3	72.0
11 YM	78.5	75.8	85.9	87.7	87.7	75.8	89.0	83.4	58.4	84.1	84.4	81.9		74.1	72.4	75.1
12 L26	76.3	76.1	79.8	80.1	81.0	76.3	80.1	78.2	58.4	79.1	80.4	78.8	80.1		73.4	74.2
13 L338	74.8	72.4	81.6	81.3	82.2	74.2	77.9	78.2	58.4	77.0	77.6	76.4	78.5	77.9		76.4
14 FI23	78.8	73.9	84.4	86.8	87.1	77.3	79.5	80.1	59.9	80.7	84.4	77.9	83.4	78.5	77.6	

En el caso de la proteína VP4, el grado de homología existente entre diferentes genes pertenecientes al mismo genotipo es superior al 85% (Cao *et al.*, 1999).

1.5. Proteínas estructurales

El genoma de rotavirus contiene 11 segmentos de dsRNA, los cuales miden entre 0.6 y 3.3 kilobases. Estos segmentos de RNA son numerados según el orden de migración en geles de poliacrilamida al 10%, siendo el 1 el más lento y el 11 el más rápido. En la tabla 1.5. se muestra las características y funciones conocidas de cada uno de los productos proteicos codificados por cada uno de los segmentos. El patrón migratorio de cada uno de los aislados de rotavirus serogrupo A puede variar. En los rotavirus de grupo A (como por ejemplo Wa) se reconocen normalmente 4 segmentos de gran peso molecular (1-4), 2 de mediano peso molecular (5 y 6), 3 de pequeño peso molecular (7-9) y 2 de incluso menor peso molecular (10 y 11) tal y como muestra la figura 1.5.1. Sin embargo, algunos rotavirus del grupo A poseen un patrón migratorio diferente. Por ejemplo, en los rotavirus de origen avícola el quinto segmento migra muy cerca del cuarto y los segmentos 10 y 11 son muy

difíciles de distinguir. En algunas cepas de origen humano el undécimo segmento migra más lentamente de lo habitual, encontrándose entre el noveno y el décimo segmento. Éste último patrón es el conocido como electroferotipo corto (como por ejemplo DS-1), que casi siempre corresponde al subgrupo antigénico I de rotavirus humanos (Hoshino y Kapikian, 1996). El electroferotipo largo (como el de rotavirus Wa) es característico de rotavirus humanos de subgrupo antigénico II (Kapikian *et al.*, 2001).

El análisis del electroferotipo es relativamente sencillo, rápido y una técnica muy popular para la detección de rotavirus y para estudios moleculares epidemiológicos donde es posible observar reorganizaciones genómicas (Hundley *et al.*, 1987; Nakagomi y Nakagomi, 1996). Sin embargo no es posible utilizarlo como único método de clasificación de las cepas de rotavirus ya que cepas muy diferentes pueden compartir el mismo patrón electroforético (Estes, 2001).

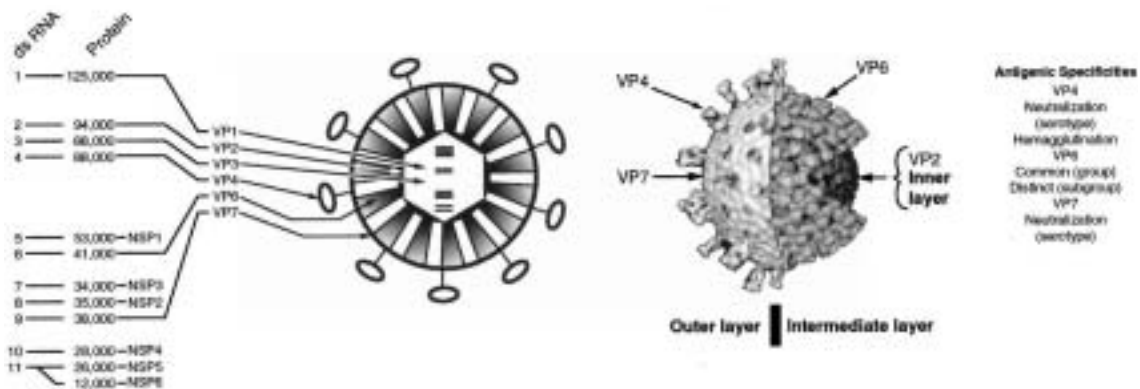


FIGURA 1.5.1. Esquema de una partícula de rotavirus madura (Kapikian *et al.*, 2001).

Los 11 segmentos de dsRNA se encuentran dentro del *core* de las partículas virales y no son infecciosos por sí solos. Las partículas virales poseen su propio enzima RNA polimerasa RNA dependiente, el cual transcribe cada segmento individual en mRNA. Cada cadena positiva del segmento de RNA empieza con una guanidina, seguida de una secuencia conservada que forma parte de una región no codificante del extremo 5': $5'GGCUUUUAAA^3$ (ver figura 1.5.2.). Posteriormente hay una región codificante con una única pauta de lectura (a excepción del gen 7, 9, 10 y 11) que finaliza con un codón *stop*. Seguidamente se encuentra una segunda región no codificante que contiene una secuencia conservada 3' terminal que termina con dos citosinas: $5'UUAAGUUAGAACUGUAUGAUGUGACC^3$. La longitud de las secuencias no codificantes varía para cada uno de los genes. Las secuencias de RNA genómicas de rotavirus son ricas en bases A+U (58-67%) y no presentan una señal de poliadenilación final (Estes, 2001).

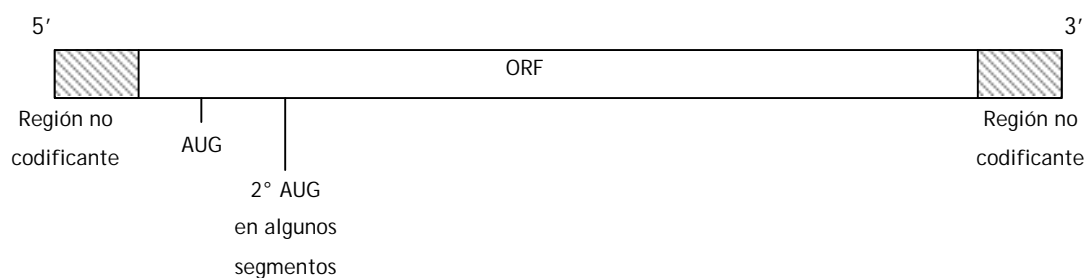


FIGURA 1.5.2. Estructura general de un segmento genómico de rotavirus.

TABLA 1.5. Proteínas de rotavirus.

Segmento genómico	Producto proteico ^a	Localización	Características y función
1	VP1	core	RNA polimerasa, unión al ssRNA, unión a VP3
2	VP2	core	unión al dsRNA, requerida para la actividad replicasa de VP1
3	VP3	core	Guaniltransferasa, metiltransferasa, unión a ssRNA, unión con VP1
4	VP4	cápside externa	Hemaglutinina, antígeno neutralizante, potenciación infectividad por proteasa, virulencia, putativa región de fusión, adhesión a la célula, induce protección
5	NSP1	no estructural	Básica, anillo de zinc, unión al ssRNA
6	VP6	cápside interna	Hidrofóbica, trimérica, antígeno de subgrupo
7	NSP3	no estructural	Ácida, dimérica, unión extremo 3' del mRNA viral, interacción con eIF4G1, inhibe traducción del huésped
8	NSP2	no estructural	Básica, oligomérica, unión al ssRNA, NTPasa
9	VP7	cápside externa	Glicoproteína integrada en la membrana del RER, trimérica, antígeno neutralizante, 2 regiones hidrofóbicas NH ₂ terminales, unión al Ca ²⁺ , induce protección
10	NSP4	no estructural	Glicoproteína transmembrana del RER, participa en morfogénesis, enterotoxina, induce protección
11	NSP5	no estructural	Básica, fosfoproteína, unión al ssRNA, proteína quinasa, interacción con NSP2 y NSP6
	NSP6	no estructural	Interacción con NSP5, presente en viroplasmos y en la mayoría de cepas

^a Los productos proteicos han sido denominados a propuesta de Mason (Mason *et al.*, 1980) y modificados por Liu (Liu *et al.*, 1988) y Mattion y colaboradores (1994). VP3 es el producto proteico del segmento 3 y VP4 es el producto proteico del segmento 4. Estudios previos denominaron VP3 al producto proteico del segmento 4. Cuando se confirmó que el segmento 3 codificaba para una proteína estructural localizada en el core, se estableció que al producto proteico del segmento 3 se le denominaría VP3 y se renombró VP4 al producto proteico del segmento 4 (Liu *et al.*, 1988).

Las proteínas estructurales VP4, VP6 y VP7 de los rotavirus han sido estudiadas extensamente debido a sus características bioquímicas, antigénicas y biológicas en la replicación y ensamblaje del virus, y son las usadas en el diagnóstico.

VP4

La proteína VP4 es el producto proteico del segmento genómico 4, no glicosilado, que se encuentra en la capa más externa de la cápside (Arias *et al.*, 1982; Mason *et al.*, 1980; Mc Crae y Mc Corquodale, 1982). Constituye un 1.5 % de la proteína viral (Mattion *et al.*, 1994). En muchas cepas es una hemaglutinina (Kalica *et al.*, 1983) responsable de la adhesión a la célula (Ruggeri y Greenberg, 1991; Crawford *et al.*, 1994).

El corte proteolítico de la proteína VP4 en las proteínas VP5* y VP8* confiere un aumento en la infectividad viral (Espejo *et al.*, 1981; Estes *et al.*, 1981). Se ha observado un incremento de penetración del virus dentro de la célula debido a éste procesamiento (Clark *et al.*, 1981; Fukuhara *et al.*, 1988; Kaljot *et al.*, 1988). Además, esta proteína se ha definido como determinante de virulencia en ratones y cerdos (Offit *et al.*, 1986b). Induce anticuerpos neutralizantes (Hoshino *et al.*, 1985; Offit y Blavat, 1986a) y anticuerpos dirigidos contra VP4 neutralizan la infectividad del virus *in vitro* (Greenberg *et al.*, 1983; Coulson *et al.*, 1985; Hoshino *et al.*, 1985; Taniguchi *et al.*, 1985; Kitaoka *et al.*, 1986; Burns *et al.*, 1988) y pasivamente protege a ratones de la infección vírica heteróloga *in vivo* (Offit *et al.*, 1986d). Posteriores estudios han mostrado que es capaz de inducir protección inmunitaria en animales (Offit *et al.*, 1986c; Mackow *et al.*, 1990), y es inmunogénica en niños y en animales (Shaw *et al.*, 1987; Svensson *et al.*, 1987; Conner *et al.*, 1988). Ratones inmunizados con proteína VP6 y VP8* de SA11 expresadas en *Escherichia coli* no presentaron diarrea tras la exposición posterior con el rotavirus murino EDIM (Gil *et al.*, 2000).

En la mayoría de aislados de rotavirus animales la proteína VP4 contiene 776 aminoácidos. En cambio todos los aislados de rotavirus humanos presentan un aminoácido menos entre las posiciones 134 y 136 de la proteína VP8* (Kantharidis *et al.*, 1987; Gorziglia, 1988). Por otro lado, la secuencia nucleotídica y el análisis directo de la secuencia aminoacídica ha permitido conocer los lugares exactos de procesamiento proteolítico. Se han identificado tres lugares de corte para la tripsina (arginina 231, arginina 241 y arginina 247) siendo las argininas 241 y 247 altamente conservadas en todas las cepas de rotavirus -señaladas en figura 1.5.3.- (Arias *et al.*, 1996; Gilbert y Greenberg, 1998).

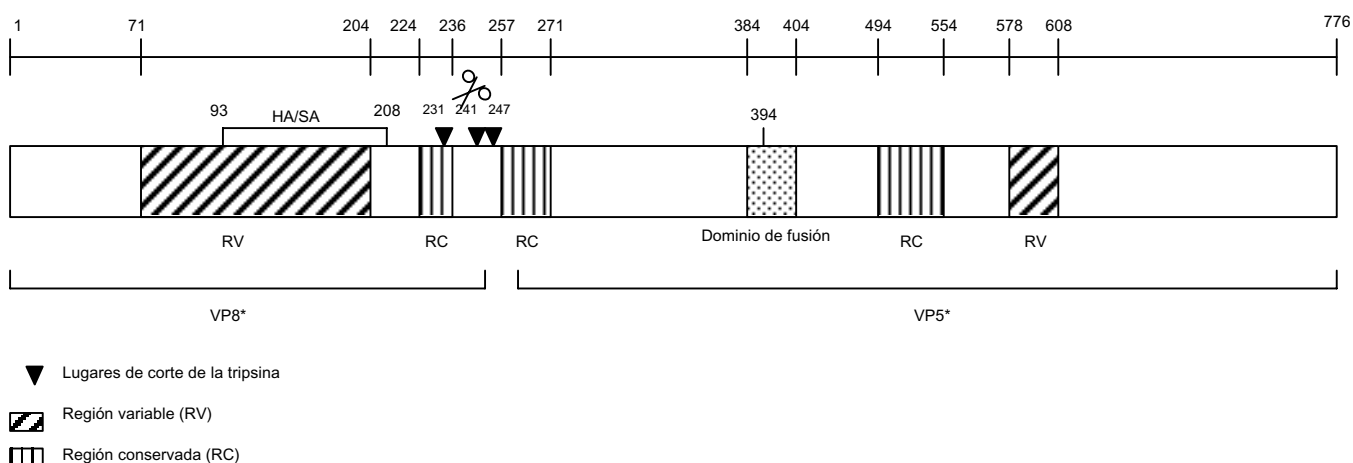


FIGURA 1.5.3. Esquema de la estructura de la proteína VP4 basada en la secuencia nucleotídica de diferentes aislados de rotavirus y de mutantes que escapan a anticuerpos monoclonales neutralizantes. Se muestran los dominios de hemaglutinación y de unión al ácido siálico (HA/SA). En el codón 394 se encuentra un epítipo neutralizante por anticuerpos monoclonales (Mackow *et al.*, 1988; Taniguchi *et al.*, 1988).

La región comprendida entre los aa 384 y 401 es una región altamente conservada entre todas las cepas de rotavirus sugiriendo que podría encontrarse involucrada en una función importante en el ciclo de replicación del virus. Esta región también comparte una alta homología con lugares de fusión interna encontrados en otros virus como en el virus Semliki Forest y en el virus Sindbis (Mackow *et al.*, 1988) especulándose su posible implicación en el proceso de entrada del virus a la célula o en el proceso de maduración de la partícula vírica durante su gemación de la membrana del retículo endoplasmático, o ambos.

La mayor variación se encuentra entre los aminoácidos 71 y 204 de la subunidad VP8*, y los análisis de secuencia han correlacionado el P tipo con los aminoácidos 84 y 180 (Larralde *et al.*, 1991; Larralde y Gorziglia, 1992).

VP6

La proteína VP6 es el principal componente estructural de los viriones. Interacciona simultáneamente con la proteína del core VP2 y con las dos proteínas de la cápside más externas VP4 y VP7 (Estes, 2001). La proteína VP6 forma trímeros espontáneamente y es extremadamente estable (Estes *et al.*, 1987). Éstos pueden ser disociados y reasociados con cambios de pH (Tosser *et al.*, 1992). Si se elimina esta proteína de los viriones pierden

la actividad polimerasa aunque no se sabe el motivo de tal fenómeno (Bican *et al.*, 1982; Sandino *et al.*, 1986). Es el principal antígeno utilizado en las pruebas de diagnóstico debido a que presenta epítomos muy conservados entre muchas de las cepas de rotavirus (Yolken y Wilde, 1994; Estes, 2001). Es una proteína hidrofóbica, altamente antigénica e inmunogénica, que puede inducir protección inmunitaria (Estes *et al.*, 1987).

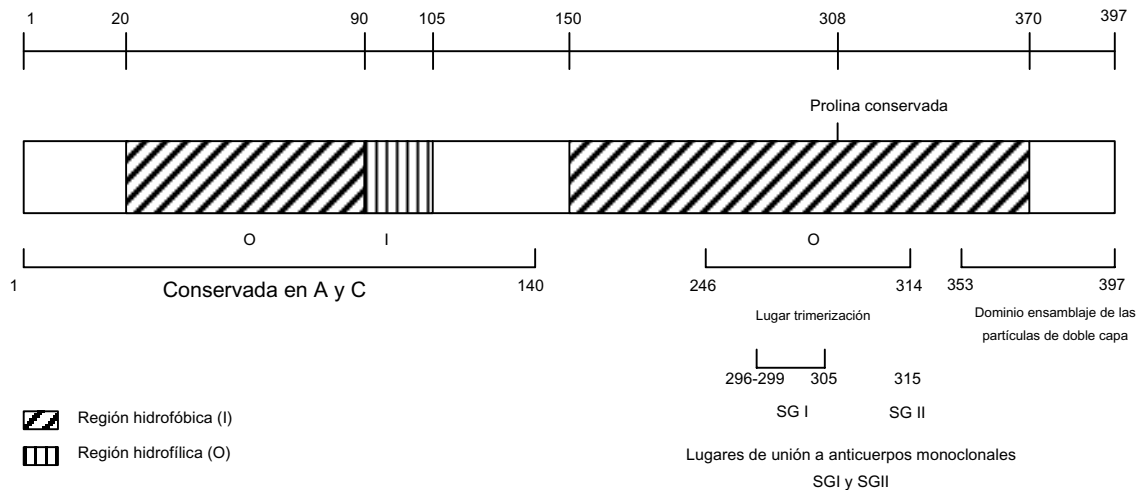


FIGURA 1.5.4. Esquema de las propiedades estructurales de la proteína VP6 (Estes, 2001).

Los análisis con variantes virales y proteínas quimeras han permitido conocer algunos dominios de la proteína (ver figura 1.5.4.). El dominio de trimerización se encuentra entre los aa 246 y 314, y un dominio necesario para la formación de partículas de doble capa se encuentra entre los residuos 353 y 397 (Tosser *et al.*, 1992; Affranchino *et al.*, 1997). Los residuos 296-299 y 305 son importantes porque determinan el epítomo del subgrupo I reconocido por el anticuerpo monoclonal 255/60 (Sheth *et al.*, 1996). El residuo 315 se encuentra implicado en la especificidad del subgrupo II (López *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1997). La prolina 308 está implicada en la estabilización del trímero (Shen *et al.*, 1994). La región N-terminal es crucial para el ensamblaje del virus. Se cree que está implicada en el transporte de la proteína VP6 hacia las inclusiones viroplasmáticas (Mansell *et al.*, 1994). Estudios con anticuerpos monoclonales han puesto de manifiesto que los aa 58-62 no son accesibles, y que podrían encontrarse en la interfase con VP2 (Tosser *et al.*, 1994).

VP7

La proteína VP7 es la segunda proteína más abundante del virión ya que constituye el 30% de la proteína viral (Mattion *et al.*, 1994). Es una glicoproteína presente en la cápside

externa. Es traducida y glicosilada con oligosacáridos de manosa mientras es insertada en la membrana del retículo endoplasmático, una inserción dirigida por una secuencia señal de corte encontrada en el extremo amino terminal de la proteína. Inicialmente se pensó que era el único antígeno que contenía determinantes neutralizantes (VR5, VR7, VR8 y VR9), y esto estimuló muchos estudios de su estructura, biosíntesis y función (Hoshino y Kapikian, 1994).

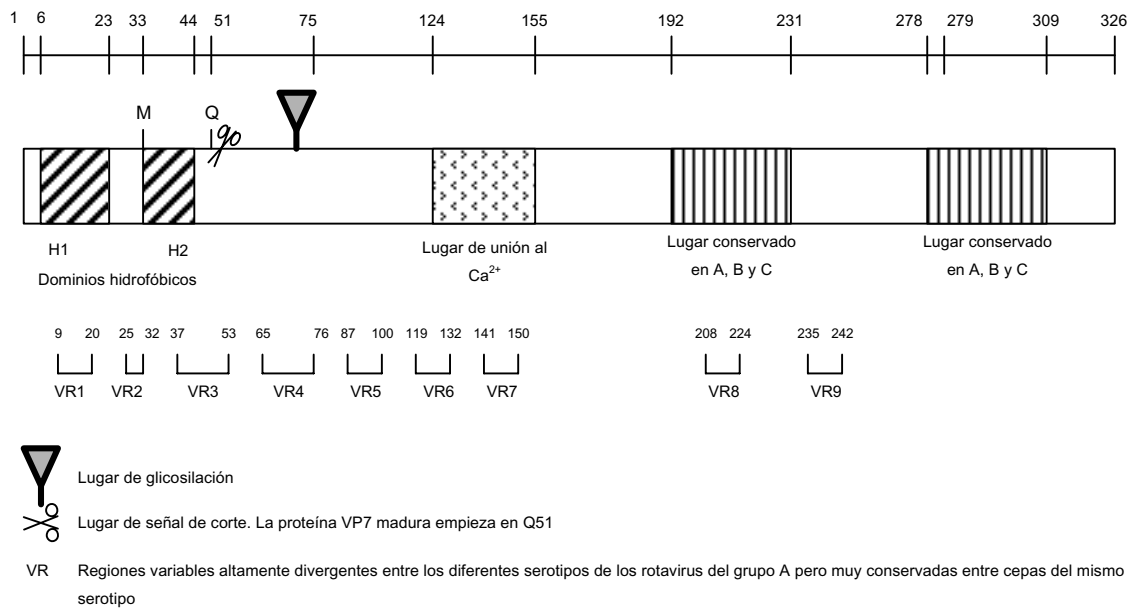


FIGURA 1.5.5. Esquema de la estructura de VP7.

Comparando la secuencia aminoacídica deducida de un gran número de aislados tanto de origen animal como humano se descubrieron importantes características biológicas. El ORF de 326 aa empieza con un codón de iniciación con una secuencia consenso débil. Un segundo ORF con una secuencia consenso fuerte se encuentra a 30 codones de distancia (metionina -M- en figura 1.5.5.). Ambos codones de iniciación preceden regiones de aminoácidos hidrofóbicos (H1 y H2) que podrían actuar como secuencias señal para dirigir la proteína VP7 hacia el retículo endoplasmático (ver figura 1.5.5.). En algunas cepas se encuentra un tercer ORF después del segundo dominio hidrofóbico (H2). El lugar de glicosilación en SA11 es en el aa 69, pero otras cepas pueden llegar a presentar hasta 3 lugares diferentes. La glutamina 51 es el lugar de corte del péptido señal en la proteína VP7 (Stirzaker *et al.*, 1987).

1.6. Ciclo replicativo

La mayoría de estudios del ciclo biológico de rotavirus se han llevado a cabo utilizando monocapas celulares a partir de células de riñón de mono y células epiteliales intestinales polarizadas humanas, aún siendo los enterocitos diferenciados del intestino delgado el tropismo celular natural de los rotavirus.

En líneas generales, la mayoría de cepas de rotavirus requieren la adición de proteasas exógenas en el medio de cultivo para activar la infectividad del virus (gracias al procesamiento de VP4). La replicación es totalmente citoplasmática (ver figura 1.6.). Las células no tienen enzimas para replicar el dsRNA, por tanto, el virus debe suministrar los enzimas necesarios. La función de los transcritos es doble: por un lado producir proteínas y, por otro lado, actuar de molde para producir las cadenas negativas de RNA (Estes, 2001).

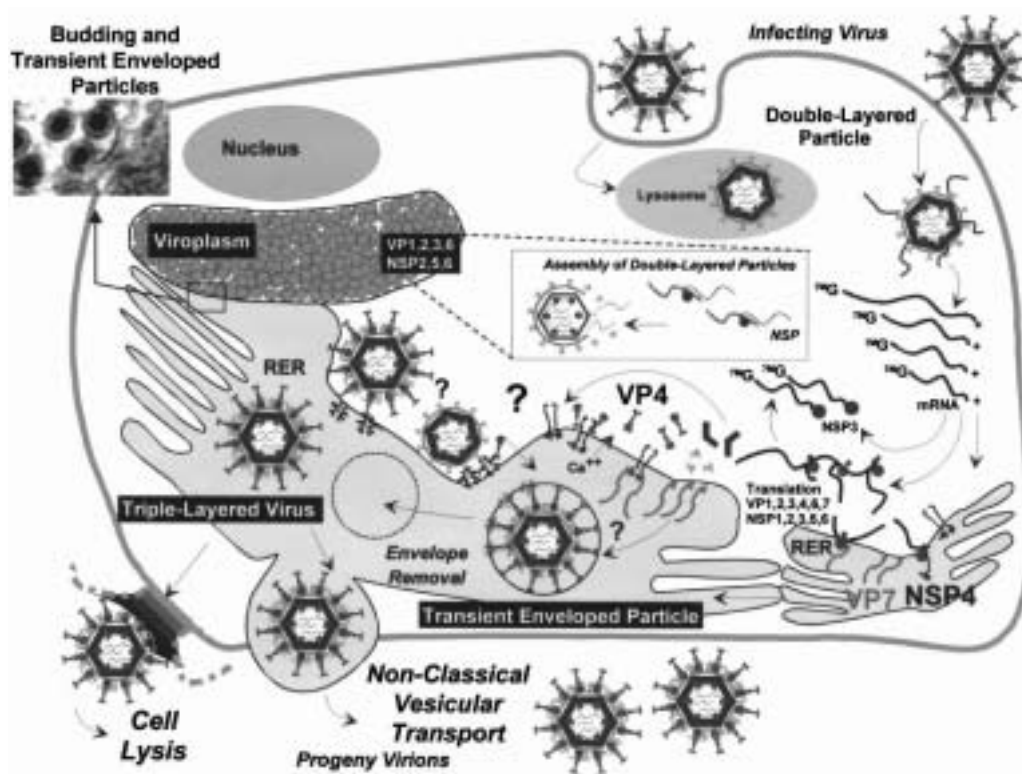


FIGURA 1.6. Esquema del ciclo replicativo de los rotavirus (Jourdan *et al.*, 1997).

Una vez sintetizada la cadena negativa queda asociada a la cadena positiva usada como molde. Los segmentos de dsRNA se forman en el interior de las partículas virales inmaduras. No se ha encontrado dsRNA o ssRNA de polaridad negativa libre en el interior de las células infectadas. Las partículas inmaduras se encuentran asociadas a

viroplasmias. Una vez las partículas han madurado, son liberadas al exterior de la célula mediante evaginación a través de la membrana del retículo endoplasmático, dónde adquieren las proteínas de la cápside más externas. Las células infectadas crecidas en monocapa lisan para liberar la progenie viral. En el caso de enterocitos polarizados, la replicación viral altera la función celular y el virus es liberado mediante un transporte vesicular que no muestra un efecto citopático evidente (Jourdan *et al.*, 1997).

2. IMPORTANCIA SANITARIA

La causa más común de gastroenteritis en niños es de origen viral. La gastroenteritis vírica puede ser causada por un gran número de virus como rotavirus, calicivirus, astrovirus, adenovirus, etc. Los rotavirus producen una inflamación del estómago y del intestino con las consecuentes diarreas, vómitos, dolor abdominal, dolor de cabeza y fiebre. Para la mayoría de las personas no se trata de una enfermedad grave, pero para aquellos que no tienen acceso a líquidos para poder reemplazar las pérdidas de fluidos por los vómitos y diarreas, puede convertirse en una enfermedad letal debido a la deshidratación.

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que los rotavirus son una de las principales causas de gastroenteritis grave en niños y en animales, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Bern *et al.*, 1992; Parashar *et al.*, 1998). Aunque la diarrea es una de las enfermedades más comunes en este grupo de edad en todo el mundo, tiene especial importancia en los países en vías de desarrollo donde constituye una de las principales causas de mortalidad infantil. Se calcula que 125 millones de niños menores de 11 meses de edad y 450 millones de niños de entre 1 y 4 años residen en países en vías de desarrollo. La incidencia de diarrea es 3,8 episodios por niño menor de 11 meses y 2,1 por niño entre 1 y 4 años de edad (Parashar *et al.*, 2003). La gastroenteritis es una de las seis principales causas de muerte y una de las tres primeras causas de muerte por enfermedad infecciosa (Murray y López, 1997a; Murray y López, 1997b; WHO, 1999; WHO, 1998).

A pesar de la magnitud del problema de la diarrea infantil, no se empezaron a conocer los agentes causantes de tales diarreas hasta los años 70 del pasado siglo. Los virus entéricos fueron descubiertos en los años 50, y aún siendo posible el cultivo *in vitro* de algunos de ellos, se tardaron varios años en encontrar su conexión como importantes agentes infecciosos causantes de diarrea (Yow *et al.*, 1970; Ramia, 1985).

Con el descubrimiento del virus de Norwalk y su asociación a una gastroenteritis epidémica viral en jóvenes y adultos en 1972 por Kapikian y colaboradores (Kapikian *et al.*, 1972), seguido del hallazgo de rotavirus humanos y su asociación con una grave

gastroenteritis endémica en niños en 1973 por Bishop y colaboradores (Bishop *et al.*, 1973), se empezó a ver por vez primera la importancia de estos agentes virales. Ambos fueron identificados mediante visualización directa en el microscopio electrónico. El virus Norwalk fue identificado en heces mediante microscopía inmunoelectrónica, mientras que los primeros rotavirus humanos fueron visualizados a partir de cortes ultrafinos de mucosa duodenal. Inmediatamente, otros rotavirus fueron identificados en heces por microscopía electrónica (Flewett *et al.*, 1973; Bishop *et al.*, 1974; Kapikian *et al.*, 1974; Middleton *et al.*, 1974).

Pronto se estableció que los rotavirus eran un importante agente etiológico de diarrea en niños y jóvenes, causante de entre el 35 y 50 % de las hospitalizaciones por gastroenteritis durante los dos primeros años de vida -ilustrado en figura 2.- (Kapikian, 1993).

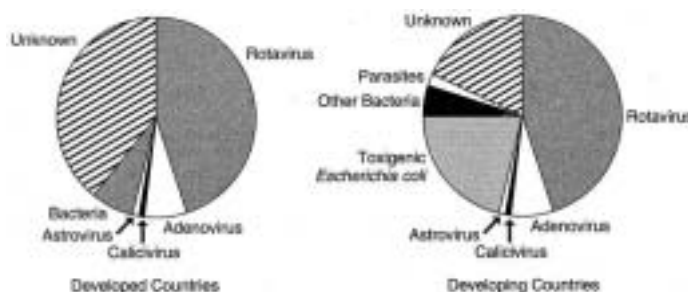


FIGURA 2. Estimación de la importancia de cada uno de los agentes causantes de diarrea grave que requieren hospitalización de niños y jóvenes en países desarrollados y en países en vías de desarrollo (Kapikian, 1993).

Con los conocimientos actuales y con las técnicas presentes se dispone de un mejor diagnóstico de los agentes etiológicos de las diarreas infantiles. En la actualidad, el agente viral más frecuentemente encontrado en niños menores de 5 años con gastroenteritis aguda son los rotavirus grupo A, causantes del 25 al 65% de gastroenteritis graves infantiles. El segundo agente encontrado son calicivirus (7-22%), y el tercer lugar se lo disputan astrovirus y adenovirus, con un 2-9% y 2-6% respectivamente (Bon *et al.*, 1999; Marie-Cardine *et al.*, 2002; Goodgame, 2003; Simpson *et al.*, 2003; Wilhelmi *et al.*, 2003).

Aunque los rotavirus humanos fueron descubiertos en 1973, cabe mencionar que en 1963 Adams y Kraft describieron la presencia de partículas virales en cortes ultrafinos de tejido intestinal de un ratón infectado con el virus EDIM (*Epizootic Diarrhea of Infant Mice virus*). Esas partículas eran muy similares a las encontradas por Bishop y colaboradores en extractos fecales de niños con gastroenteritis aguda (Bishop *et al.*, 1973). En ese mismo año, 1963, Malherbe y Harwin (Malherbe y Harwin, 1963) aislaron partículas víricas de 70 nm que denominaron SA11 (del inglés "simian agent 11") aisladas del tejido rectal de un mono vervet sano. Este aislado fue propagado en una línea celular procedente de tejido de riñón de esa misma especie de simio. Además, en 1969 Mebus y colaboradores (Mebus *et*

al., 1969) demostraron la presencia de partículas de 70 nm en heces de terneras con gastroenteritis, y demostraron su capacidad infectiva tras ser replicadas mediante calvas.

MORBILIDAD Y MORTALIDAD

Hasta el descubrimiento de los rotavirus, sólo una pequeña proporción de gastroenteritis graves en niños y neonatos podía ser relacionada con un agente etiológico (Yow *et al.*, 1970; Kapikian, 1975). Sin embargo, con la acumulación de estudios epidemiológicos tanto de países desarrollados como en vías de desarrollo, ha quedado establecido que rotavirus es uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis grave infantil en todo el mundo.

A partir de datos del Banco Mundial se calcula que cada año los rotavirus causan aproximadamente 111 millones de episodios de gastroenteritis que requieren sólo atención en casa, 25 millones que requieren la visita clínica, 2 millones que requieren hospitalización y entre 352.000 y 592.000 defunciones en niños menores de 5 años (datos resumidos en tabla 2.). Así, casi cada niño menor de 5 años tendrá un episodio de gastroenteritis causada por rotavirus, 1 de cada 5 necesitará visita médica, 1 de cada 65 será hospitalizado y, aproximadamente, 1 de cada 293 morirá (Parashar *et al.*, 2003).

La incidencia de la enfermedad causada por rotavirus es similar en países industrializados y en países en vías de desarrollo (ver tabla 2.). Sin embargo, los niños de los países en vías de desarrollo mueren con más frecuencia, posiblemente por un cúmulo de factores como un peor acceso a la terapia de rehidratación y una mayor prevalencia de desnutrición. Se ha calculado que 1.205 niños mueren cada día debido a una gastroenteritis causada por rotavirus y que el 82% de estas muertes ocurren en los países más pobres. El riesgo de mortalidad infantil por una gastroenteritis causada por rotavirus es de 1 entre 48.680 en los lugares con mayor poder adquisitivo y de 1 entre 205 en los lugares con menor fuente de ingresos (Parashar *et al.*, 2003).

TABLA 2. Incidencia global de la enfermedad causada por rotavirus en niños menores de 5 años (Parashar *et al.*, 2003).

	Número de episodios de la enfermedad de rotavirus		
	Países en vías de desarrollo	Países industrializados	Total
Atención en casa	104.280.000	7.122.000	111.402.000
Atención clínica	23.233.000	1.781.000	25.017.000
Atención hospitalaria	1.920.000	223.000	2.143.000

En los países industrializados la amplia distribución de rotavirus en la comunidad se encuentra reflejada por la universal adquisición de anticuerpos séricos en edad temprana.

La alta prevalencia de anticuerpos contra rotavirus se mantiene en la vida adulta, sugiriendo la existencia de reinfecciones subclínicas.

3. VIAS DE TRANSMISIÓN DE ROTAVIRUS

Los rotavirus se transmiten por la vía fecal-oral. Se ha especulado sobre su transmisión respiratoria pero las evidencias son, por el momento, circunstanciales (Gurwith *et al.*, 1981; Vollet *et al.*, 1981; Zheng *et al.*, 1991). Se encuentra poco documentada la fuente de infección en niños que no han estado en contacto con otros niños infectados. Se especula que el contagio pudiere provenir de infecciones subclínicas que cursan los individuos que rodean al neonato (Engleberg *et al.*, 1982; Grimwood *et al.*, 1983). En cambio está bien documentado la liberación de rotavirus del tracto intestinal de un individuo infectado antes de manifestar la diarrea e incluso una vez la diarrea ha cesado (Pickering *et al.*, 1988).

Su resistencia a la inactivación física mostrada en experimentos con rotavirus humanos y animales frente diferentes temperaturas puede ser una de las causas de su eficiente transmisión (Estes *et al.*, 1979; Moe y Shirley, 1982; Keswick *et al.*, 1983; Ansari *et al.*, 1991). Un rotavirus de ternera retuvo su infectividad en heces durante 7 meses a temperatura ambiente (Morris *et al.*, 1975). Otras observaciones que sugieren la contaminación ambiental como fuente de infección son la persistencia de infecciones en guarderías y la alta frecuencia de infecciones nosocomiales de rotavirus en hospitales. También su habilidad en retener su infectividad una vez desecado en superficies bajo diferentes condiciones puede contribuir a su transmisión (Wilde *et al.*, 1992; Abad *et al.*, 1994). Por contra, una humedad relativa alta (superior al 80%) resulta en una rápida pérdida de infectividad en rotavirus humanos (Ansari *et al.*, 1991). Una desinfección efectiva del material contaminado y una cuidadosa limpieza de las manos constituye una de las más importantes medidas para evitar la transmisión de la infección por rotavirus (Black *et al.*, 1981).

Los rotavirus han sido detectados en muchas superficies de guarderías, y en un estudio controlado se demostró que si la superficie contaminada con rotavirus era pulverizada con desinfectante no se producía infección sobre individuos voluntarios (Lloyd-Evans *et al.*, 1986; Ward *et al.*, 1991; Butz *et al.*, 1993). Esta aproximación puede ser aplicable en centros y hospitales para reducir la alta frecuencia de infección nosocomial, pero no se puede obviar la necesidad del desarrollo de una inmunoprofilaxis (Lloyd-Evans *et al.*, 1986).

La detección de rotavirus en agua potabilizada para el consumo humano (Deetz *et al.*, 1984; Keswick *et al.*, 1984; Gratacap-Cavallier *et al.*, 2000) o de la existencia de brotes

epidémicos originados por consumo de agua contaminada (Hopkins *et al.*, 1984; Hung *et al.*, 1984; Ansari *et al.*, 1991) está bien documentada. En marisco cercano a vertidos de aguas no depuradas también se ha detectado la presencia de rotavirus (Le Guyader *et al.*, 2000).

También se ha especulado sobre el papel de los animales como fuente de rotavirus infecciosos para humanos. El hecho que ciertos rotavirus animales compartan antígenos de neutralización con rotavirus humanos y que ciertos rotavirus animales hayan infectado humanos de forma natural o que hayan intercambiado material genético con rotavirus humanos refuerza esta hipótesis (Nakagomi y Nakagomi, 1993). De todas maneras este tipo de transmisión interespecie parece ser muy rara en la mayor parte del mundo, aunque la cepa humana-bovina *reassortant* I321 o una humana-porcina *reassortant* parecen ser endémicas en áreas como India y Brasil respectivamente (Das *et al.*, 1993; Gouvea *et al.*, 1999).

El período de incubación de la enfermedad se ha estimado ser inferior a 48 horas (Davidson *et al.*, 1975), aunque experimentos realizados a voluntarios a los cuales se les administró rotavirus oralmente desarrollaron la enfermedad entre las 24 y 56 horas (Kapikian *et al.*, 1983a; Kapikian *et al.*, 1983b).

4. PROFILAXIS

La vacunación es probablemente la única medida de control que tendría realmente un impacto significativo en la incidencia de la enfermedad. De entre todos los serogrupos, los rotavirus del grupo A son los realmente importantes desde el punto de vista de la salud pública, ya que infectan a niños y a crías de muchos animales. Existe reacción cruzada entre algunos antígenos de rotavirus de diferentes serotipos. La primera infección de rotavirus en un niño que no ha estado expuesto al virus produce una respuesta inmunológica específica a los antígenos de la cápside. Esta respuesta se va ampliando gracias a las siguientes exposiciones, y protege contra más serotipos. El rápido desarrollo de la inmunidad tras la infección natural fue lo que determinó la insistencia en el desarrollo de una vacuna contra rotavirus (CCDR, 2003).

Las primeras vacunas diseñadas contra rotavirus se basaron en la aproximación *jenneriana*, es decir, utilizando cepas de rotavirus vivas, atenuadas y antigénicamente relacionadas pero de origen no humano (Kapikian, 1994). Esta aproximación se basó en la teoría de que las cepas de rotavirus de origen animal y humano compartían un antígeno de grupo común, y que animales de experimentación inmunizados con cepas de otros animales presentaban un bajo riesgo de contraer la enfermedad. Las dos primeras

vacunas *jennerianas* fueron desarrolladas con las cepas bovinas RIT4237 y WC3 (Vesikari *et al.*, 1984; Clark *et al.*, 1996). Estudios para analizar el grado de protección que conferirían en niños entre 2 y 18 meses de edad desvelaron una eficacia muy variable. Una tercera vacuna *jenneriana* fue desarrollada utilizando la cepa simia MMU18006, la cual compartía especificidad neutralizante con las cepas de rotavirus humanos G3. Además crecía fácilmente en cultivo celular. Pero los niños vacunados presentaban una gran reacción (3 ó 4 días de fiebre tras la vacunación) y el grado de protección que confería era muy variable (Parashar *et al.*, 1998). Actualmente se sigue trabajando en ella intentando mejorar su capacidad protectora (Hoshino *et al.*, 2002)

Las siguientes generaciones de vacunas fueron diseñadas de manera que incluyeran más de un serotipo. La capacidad de los rotavirus a mezclar sus fragmentos genómicos (*reassortar*) durante infecciones mixtas *in vitro* permitía la producción de vacunas *reassortants* o aproximaciones de vacunas *jennerianas* modificadas. En agosto de 1999 se licenció en Estados Unidos la vacuna tetravalente *reassortant* de rotavirus humanos y el simio RRV (Parashar *et al.*, 1998). Esta vacuna se componía de los G-tipos más comunes encontrados en las cepas de origen humano: G1, G2, G3 y G4. El resto de proteínas pertenecían a la cepa de rotavirus RRV (Kapikian *et al.*, 1996). Tras la administración de esta vacuna en los programas de vacunación infantiles en Estados Unidos, y después de la inmunización de casi 1 millón de niños, aparecieron varios casos de intususcepción (obstrucción del intestino debido a una invaginación de éste) asociados a la vacuna. El riesgo más grande de intususcepción se encontraba entre los días 3 y 10 tras la primera de las tres dosis orales. La vacuna fue retirada 9 meses después del inicio de su comercialización (CCDR, 2003).

Actualmente sólo se encuentra licenciada y se administra la vacuna monovalente G10P[12] de rotavirus para ovejas en China, la LLR -*Lanzhou Institute of Biological Products*- (Cunliffe *et al.*, 2002b). De las siguientes nuevas vacunas candidatas sólo 2 han alcanzado la fase III de experimentación. Una de ellas, Rotateq (Merck), es una vacuna pentavalente basada en una cepa de rotavirus bovina (WC) combinada mediante el fenómeno de *reassortment* con los G-tipos y P-tipos más comunes en humanos (G1, G2, G3, G4 y P[8]) (Clark *et al.*, 1996). Hasta el momento ha superado la fase II y III del estudio, y confiere una buena protección frente la infección de rotavirus. La segunda candidata, la vacuna Rotarix 89-12 (GlaxoSmithKline), es una vacuna viva atenuada monovalente humana (G1P[8]) que se encuentra en fase II y III de evaluación. En los primeros ensayos mostraba una gran eficacia protectora (Bernstein *et al.*, 1999).

La Organización Mundial de la Salud recomienda enérgicamente el desarrollo rápido de una vacuna nueva y segura contra los rotavirus para los países industrializados y, sobretodo, para los países en vías de desarrollo.

OBJETIVOS

1. Desarrollar y evaluar un método de concentración, detección y cuantificación de rotavirus humanos del grupo A a partir de muestras de agua residual.
2. Estudio de la estacionalidad de rotavirus en agua residual de Barcelona así como la potencial correlación con casos clínicos.
3. Determinar los G y P genotipos de rotavirus del grupo A circulantes en el agua residual de Barcelona.

CAPÍTULO 1

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE
CONCENTRACIÓN, DETECCIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE ROTAVIRUS DEL
GRUPO A EN AGUA RESIDUAL**

1.1. ANTECEDENTES

Los motivos para aislar los virus presentes en el ambiente pueden ser muy diversos, desde demostrar posibles vías de transmisión de un determinado brote como identificar posibles reservorios naturales de los virus. Los virus entéricos comparten la vía de transmisión fecal-oral (ver tabla 1.1.). El medio acuoso, superficies inanimadas, alimentos, etc. son posibles vehículos de transmisión de éstos virus. Pero dado que la carga viral presente en el ambiente suele ser bastante baja, la detección vírica presenta dos puntos críticos: la eficiencia del método de concentración vírica empleado para reducir el volumen de trabajo y la sensibilidad del método de detección (Katzenelson, 1974). A lo largo de los años, ante el conocimiento de la importancia de los virus entéricos presentes en el ambiente, se han ido diseñando diferentes metodologías a fin de obtener una perspectiva global e intentar conocer la conexión entre el reservorio ambiental y la transmisión de la enfermedad. Algunos de los métodos empleados para la captura y/o concentración vírica a partir del

medio acuoso se hallan en la tabla 1.2. donde se muestran las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

TABLA 1.1. Virus entéricos humanos que pueden ser transmitidos por medio acuático (Tabla adaptada de Bosch, 1998).

Género	Nombre común	Enfermedad que causa
<i>Enterovirus</i>	Poliovirus	parálisis, meningitis, fiebre
	Coxsackievirus A, B	herpangina, meningitis, enfermedades respiratorias, fiebre, miocarditis, anomalías coronarias, enfermedad de manos, boca y pies, etc.
	Echovirus	meningitis, fiebre, enfermedades respiratorias, gastroenteritis, urticaria
<i>Hepatovirus</i>	Hepatitis A	hepatitis
<i>Reovirus</i>	Reovirus humanos	desconocida
<i>Rotavirus</i>	Rotavirus humanos	gastroenteritis
<i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus humanos	gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis
<i>Calicivirus</i>	Calicivirus humanos	gastroenteritis
	Norovirus	gastroenteritis, fiebre
	Sapovirus	gastroenteritis
	Hepatitis E	hepatitis
<i>Astrovirus</i>	Astrovirus humanos	gastroenteritis
<i>Parvovirus</i>	Parvovirus humanos	gastroenteritis
<i>Coronavirus</i>	Coronavirus humanos	gastroenteritis, enfermedades respiratorias
<i>Torovirus</i>	Torovirus humanos	gastroenteritis

Los métodos más utilizados para la etapa de concentración de virus a partir de muestras de agua son los siguientes:

- Los métodos basados en la previa **adsorción** de los virus a algún soporte y posterior **elución** para recuperarlos (ver tabla 1.3.). Entre estos soportes destacan las membranas electronegativas (Katayama *et al.*, 2002), las membranas electropositivas (Sobsey y Glass, 1980; Smith y Gerba, 1982; Raphael *et al.*, 1985; Mehnert y Stewien, 1993; Gilgen *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Abbaszadegan *et al.*, 1999; Queiroz *et al.*, 2000), el polvo de vidrio (Schwartzbrod y Lucena, 1978; Gajardo *et al.*, 1991), lana de vidrio (Vilaginés *et al.*, 1997), el hidróxido de aluminio (Farrah *et al.*, 1978), dióxido de sílice (Leisinger y Metzler, 1997; Baggi y Peduzzi, 2000), etc.

- Los métodos basados en la **precipitación** de los virus en suspensión, mediante floculación orgánica (Guttman-Bass y Armon, 1983), sulfato amónico (Shields y Farrah, 1986; Bosch *et al.*, 1988a) o hidroextracción con polietilenglicol (Ramia y Sattar, 1980; Lewis y Metcalf, 1988; Li *et al.*, 1998; Mignotte *et al.*, 1999; Casas y Sunen, 2002).

- El método de la **ultracentrifugación** (Mehnert y Stewien, 1993).

TABLA 1.2. Procedimientos propuestos para la concentración de virus a partir de muestras de agua (Gerba, 1983; Metcalf *et al.*, 1995).

Método	Principio	Ventajas	Desventajas	Bibliografía
Plataforma de gasa o algodón	Adsorción a una matriz de algodón y posterior elución a pH 8-9.	Aplicable a grandes volúmenes y en aguas altamente contaminadas. Económico	Recuperación vírica muy baja y no reproducible.	Fattal, 1974
Hydroextracción	Adsorción a una bolsa de diálisis fabricada con un polímero de PM entre 4.000 y 20.000 (PEG). También se utiliza el Carbowax 20.000 (tamaño de poro de 25 Å).	Simple y económico. Aplicable en etapa de reconcentración. Volumen inicial pequeño. Recuperación del 90-100% con Carbowax.	Recuperación entre el 3-30% con PEG. Incubación a 4°C para evitar inactivación vírica. Carbowax sólo aplicable en aguas con muy poca carga viral.	Wellings <i>et al.</i> , 1976; Lewis y Metcalf, 1988 Bitton, 1980
Separación en dos fases	Captura vírica en uno de los 2 polímeros orgánicos (PEG y DEAE) disueltos con el agua. Proceso dependiente del pH y de la fuerza iónica.	Simple y económico. Volumen inicial pequeño.	Recuperación muy variable (5-100%). El DEAE puede inactivar ciertos virus. El proceso es lento.	Lund y Hedstrom, 1966; Schuval <i>et al.</i> , 1969; Pöyry <i>et al.</i> , 1988
Ultracentrifugación	Sedimentación vírica a alta velocidad.	Alta recuperación.	Alto coste.	Mehnert <i>et al.</i> , 1997
Congelación	Incubación a -15°C en continua agitación. Los virus no son atrapados en los cristales de hielo y pueden ser recogidos en la fase acuosa no congelada.	Simple y económico.	Inviabile.	Bitton, 1980
Ultrafiltración	Retención de las partículas en función de su tamaño.	Gran recuperación vírica. Aplicable en etapa de reconcentración.	No aplicable en aguas turbias por colapso de los poros. Necesaria una prefiltración.	Bitton, 1980
Electroforesis	Migración de los virus hacia el ánodo en tampón pH neutro. Elución cambiando la polaridad de la corriente.	Buen sistema en combinación con las membranas de diálisis.	Inviabile para grandes volúmenes.	Bier y Cooper, 1967.
Adsorción a superficies:	Retención por fuerzas electroestáticas. Los virus son partículas hidrofílicas coloidales con carga eléctrica dependiendo del pH del medio. En los medios acuosos naturales se encuentran cargados negativamente.	Eficiente retención.	Coexisten dos limitaciones: capacidad de adsorción y capacidad de elución. Mayor manipulación de la muestra. Algunos componentes son inhibidores de técnicas moleculares posteriores.	(tabla 1.3.)

TABLA 1.3. Procedimientos de adsorción a superficies utilizados para la concentración de virus.

Método	Ventajas	Desventajas	Bibliografía
Filtros de membrana cargados negativamente	Aplicables a grandes volúmenes y en aguas altamente contaminada	Antes requiere ajustar la concentración de sales catiónicas y el pH	Metcalf, 1961; Wallis y Melnick, 1967
Filtros de membrana cargados positivamente	Aplicables a grandes volúmenes de agua	Sólo utilizados en aguas limpias	Sobsey y Glass, 1980;
Polielectrolitos insolubles	Aplicables a grandes volúmenes de agua	Eficiencia de recuperación variable	Wallis <i>et al.</i> , 1969
Precipitados de sales, hidróxido de aluminio, hidróxido férrico	Aplicable a pequeños volúmenes y en aguas altamente contaminadas	Elución con proteína y eficiencia de recuperación variable	Wallis y Melnick, 1967
Polvo de talco	Aplicable a grandes volúmenes	Elución con proteína a pH 9. Inhibición de posteriores técnicas moleculares	Sattar y Westwood, 1976; Sattar y Ramia, 1979
Óxidos de hierro (Fe ₂ O ₃ , Fe ₃ O ₄)	Aplicable a pequeños volúmenes y en aguas altamente contaminadas	Elución con proteína a pH 9. Inhibición de posteriores técnicas moleculares	Bitton y Mitchell, 1974
Polvo de vidrio	Aplicables a grandes volúmenes de agua. Recuperación alta	Necesidad de ajuste del pH antes y después de la concentración.	Schwartzbrod y Lucena, 1978
Lana de vidrio	Aplicables a grandes volúmenes de agua	Eficiencia de recuperación variable	Vilaginés <i>et al.</i> , 1993
Bentonita	Aplicable a pequeños volúmenes y en aguas altamente contaminadas	Recuperación máxima del 50%	Moore <i>et al.</i> , 1979
Sulfato de Protamina	Aplicable a pequeños volúmenes y en aguas altamente contaminadas	Eficiencia de recuperación variable según el virus	England, 1972

Muchas veces se utilizan combinaciones de varios métodos para mejorar la recuperación (Katzenelson *et al.*, 1976; Lewis y Metcalf, 1988; Toranzos y Gerba, 1989). Una segunda posibilidad propuesta por Kittigul y col. (2001) es la de utilizar la evaporación conjuntamente con la centrifugación mediante SpeedVac después de una primera etapa de concentración, para reducir aún más el volumen obtenido en la primera concentración (Kittigul *et al.*, 2001).

La utilización posterior de técnicas moleculares para la detección de los virus hace importante la eliminación de factores que puedan inhibirlas y el grado de pureza de los virus recuperados. Existe una gran variedad de estrategias para tal fin como son la diálisis, el tratamiento con proteinasa K, la extracción con solventes, la filtración mediante polvo de vidrio, la adsorción y precipitación de ácidos nucleicos, la sublimación, la PCR de captura antigénica y la replicación mediante cultivo celular (Bosch, 1998).

Para detectar rotavirus en diferentes tipos de aguas han sido utilizados y evaluados distintos métodos o combinaciones de diferentes métodos (Smith y Gerba, 1982; Bosch *et*

al., 1988a; Jothikumar *et al.*, 1995; Dubois *et al.*, 1997; Leisinger y Metzler, 1997; Mehnert *et al.*, 1997; Queiroz *et al.*, 2000 y 2001; Kittigul *et al.*, 2001; Casas y Sunen, 2002). En un estudio precedente en nuestro laboratorio se liofilizaron diferentes volúmenes de 1 ml de agua residual y se detectó la presencia de rotavirus (Gajardo *et al.*, 1995). En dicho estudio se calculó que era posible detectar mediante RT-PCR-*Nested* hasta 20 MPN/ml de una suspensión de rotavirus inoculada experimentalmente en agua residual. Dicha metodología fue aplicada posteriormente para la detección de otros virus entéricos como astrovirus (Pintó *et al.*, 2001).

En el presente capítulo se ha intentado optimizar dicho método para su aplicación a muestras de agua residual. El principio físico de la liofilización (o sublimación) se basa en el desecado de la materia a partir de un estado congelado. Mediante este método se eliminan compuestos volátiles, muchos de ellos inhibidores de posteriores técnicas moleculares, permitiendo recuperar los virus incluso en estado infeccioso. Por otra parte, hemos evaluado la eficiencia de recuperación vírica mediante la aplicación de una técnica cuantitativa molecular basada en una RT-PCR a tiempo real.

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.1. CONCENTRACIÓN VÍRICA POR LIOFILIZACIÓN

Para concentrar el agua residual mediante liofilización se congelaba un volumen de 50 ml de agua residual en un contenedor, se perforaba el tapón del mismo con una aguja para permitir un cierto intercambio de gases y se colocaba en un liofilizador Bench Top 3 (Virtis). Durante un mínimo de 48 horas la muestra fue sometida a -60°C y 30 miliTorr de presión de vacío. Una vez liofilizada la muestra se resuspendía en 0.5 ml de H_2O desionizada (MilliQ) libre de DNAsas y RNAsas o se almacenaba a 4°C hasta su procesamiento.

1.2.2. DETECCIÓN MOLECULAR DE ROTAVIRUS DEL GRUPO A POR RT-PCR DE UN FRAGMENTO DEL SEXTO SEGMENTO

1.2.2.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se utilizó el método descrito por Boom y colaboradores en 1990 detallado a continuación.

- Homogeneización de 50 µl del concentrado de agua residual en 0.9 ml de tampón L6 y 40 µl de solución de sílice. Incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugación 15 segundos a 12.000 xg para descartar el sobrenadante.
- Lavado del *pellet* dos veces con tampón L2, dos más con etanol 70% y uno final con acetona.
- Incubación del *pellet* durante 10 minutos a 56°C en el mismo tubo con la tapa abierta.
- Adición de 50 µl de tampón de elución y agitación suave. Incubación durante otros 10 minutos a 56°C con el tubo completamente cerrado y centrifugación a 12.000 xg durante 2 minutos.
- Recuperación del sobrenadante evitando aspirar restos de sílice. En todo el proceso se utilizaba material libre de DNAsas y RNAsas.

1.2.2.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y AMPLIFICACIÓN POR PCR DE UN FRAGMENTO DE 186 pb DEL SEXTO SEGMENTO DE ROTAVIRUS

El RNA vírico se retrotranscribía *in vitro* utilizando el enzima M-MuLV-RT Expand Reverse Transcriptase (Roche). Una vez obtenido el cDNA, se amplificaba mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando una mezcla de dos polimerasas: la *Taq* DNA polimerasa y la *Pwo* DNA polimerasa (Expand High Fidelity PCR System, Roche). Se eligieron unos *primers* que hibridaban en una región muy conservada en todos los aislados de rotavirus del grupo A conocidos: VP6-3 (⁵GCT TTA AAA CGA AGT CTT CAA C) y VP6-4 (⁵GGT AAA TTA CCA ATT CCT CCA G) (Dr. Jean Cohen, comunicación personal). El protocolo se detalla a continuación.

1 μ l extracto ácidos nucleicos + 9 μ l H ₂ O Choque térmico 5' a 99°C Se colocaba inmediatamente en hielo		
Preparación de la mezcla de reacción para la RT		
Componente	Volumen	Concentración final
5X Tampón de RT Expand	4 μ l	1X
100 mM DTT	2 μ l	10 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	2 μ l	0.2 mM
0.1 mM <i>primer</i> VP6-3	0.2 μ l	1 μ M
0.1 mM <i>primer</i> VP6-4	0.2 μ l	1 μ M
50 U/ μ l Transcriptasa Reversa Expand	0.1 μ l	5 U
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	1.5 μ l	
Extracto ácidos nucleicos 1/10	10 μ l	
Volumen total	20 μl	
Incubación 1h 50°C		

Preparación de la mezcla de reacción para la PCR			
Componente	Volumen	Concentración final	
10X Tampón de PCR Expand con 15 mM MgCl ₂	5 μ l	1X 1.5 mM	
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	5 μ l	0.2 mM	
0.1 mM <i>primer</i> VP6-3	0.25 μ l	0.5 μ M	
0.1 mM <i>primer</i> VP6-4	0.25 μ l	0.5 μ M	
3.5 U/ μ l HF PCR Expand polimerasa	0.15 μ l	0.5 U	
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	29.35 μ l		
Producto de la reacción RT	10 μ l		
Volumen total	50 μl		
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	9'	95°C	1X
Desnaturalización	1'	94°C	
Hibridación	1'	50°C	40X
Extensión	1'	72°C	
Extensión final	10'	72°C	1X

Finalizado el proceso, 10 μ l del producto amplificado eran sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X. El gel era teñido con bromuro de etidio o GelStar y los amplímeros eran visualizados mediante luz ultravioleta en un amplificador de imágenes (ImageMaster VDS, AMERSHAM BIOSCIENCES).

1.2.2.3. CONFIRMACIÓN MEDIANTE HIBRIDACIÓN-SOUTHERN BLOT

Se eligió la hibridación-*Southern blot* como sistema de confirmación de la naturaleza del amplímero porque, además, incrementaba la sensibilidad del método de detección molecular. La sonda diseñada "*probe* VP6" (5' CAA ATG ATA GTT ACT ATG AAT GG)

conjugada con digoxigenina era específica de una región interna del amplímero y reconocía una región del segmento 6 muy conservada entre los aislados de rotavirus del grupo A conocidos.

En primer lugar se transfería el DNA del gel de agarosa a una membrana de nylon. Para ello se cortaba el gel con un bisturí conservando el área de los amplímeros y se incubaba durante 15 minutos en 150 mM NaOH 4°C. Después se realizaba un lavado con TBE 0.5X a 4°C durante otros 10 minutos. Entre tanto se humedecía una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) con TBE 0.5X. El DNA del gel se transfería a la membrana mediante electroforesis durante 60 minutos a 60 voltios (200-220 miliamperios). El DNA transferido era inmovilizado mediante exposición a luz UV durante 3 minutos a temperatura ambiente. Adicionalmente, la membrana era incubada durante 20 minutos en el interior de una estufa de vacío a 120°C y almacenada a 4°C si no se proseguía con el protocolo inmediatamente.

En segundo lugar, se procedía a la hibridación. Se colocaba la membrana en una bolsa sellada con 2 ml de solución de prehibridación y se incubaba durante 18 horas a 42°C. Transcurrido este tiempo, se transfería a otra bolsa con 2 ml de solución de hibridación que contenía 5 pmol/ml de la sonda específica "*probe VP6*", y se incubaba durante 2 horas a 42°C. Posteriormente se realizaban una serie de lavados en 2X SSC, 2X SSC al 1%SDS y en 0.5X SSC al 1%SDS de 15 minutos de duración cada uno. Se estabilizaba la membrana en tampón I (ver apéndice I) y se bloqueaba durante 30 minutos con una solución bloqueante (ver apéndice I). Cumplido este tiempo se colocaba la membrana en contacto con una dilución 1:25000 del anticuerpo anti-digoxigenina-conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) diluido en solución bloqueante. Transcurridos 30 minutos, se realizaban 2 lavados de 15 minutos con tampón I, y se continuaba inmediatamente con el revelado.

Finalmente se procedía al revelado. Para ello se estabilizaba la membrana con tampón fosfatasa durante 2 minutos. Se colocaba en una bolsa sellada con 1:100 CSPD (Roche) diluido en el mismo tampón. Se incubaba 15 minutos a 37°C para permitir la reacción de la fosfatasa alcalina, se colocaba en contacto con un film fotográfico CURIX RP2 100 NIF (AGFA) en el interior de un *cassette* GEVAMATIC 18x24 cm (AGFA-GEVAERT) y se exponía entre 45 y 90 minutos. Todo ello se llevaba a cabo en una habitación oscura. Se sumergía el film en revelador radiográfico para revelado manual G150 (AGFA) durante 4 minutos, se lavaba en agua, se volvía a sumergir en fijador rápido para fijado manual G350 (AGFA) durante 4 minutos más y se aclaraba en agua.

1.2.3. CUANTIFICACIÓN MOLECULAR DE ROTAVIRUS GRUPO A MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL DEL SEXTO SEGMENTO

La cuantificación del número de moléculas de RNA presentes en el agua residual se llevó a cabo mediante RT-PCR a tiempo real con los aparatos 7700 y 7900 HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) de la unidad de Genómica de los Serveis Cientifictècnics de la Universitat de Barcelona. Estos termocicladores llevan incorporados un lector de fluorescencia que registra la fluorescencia emitida a lo largo del programa de PCR. Se escogió el *kit* de reactivos individuales (PE Biosystems) que incluía el fluorocromo *SYBR Green*. Se utilizó el formato de placa de 96 pocillos cerrados con tapones ópticos (PE Biosystems).

El RNA vírico se retrotranscribía tal y como se detalla en el apartado 1.2.2.2. Una vez obtenido el cDNA se realizaba la PCR cuantitativa tal y como se detalla a continuación.

Preparación de la mezcla de reacción para la PCR a tiempo real			
Componente	Volumen	Concentración final	
10X Tampón de PCR con SYBR Green	2.5 µl	1X	
25 mM MgCl ₂	1.5 µl	1.5 mM	
12.5 mM dATP, dCTP, dGTP y dUTP	2 µl	1 mM	
0.1 mM <i>primer</i> VP6-3	0.25 µl	1 µM	
0.1 mM <i>primer</i> VP6-4	0.25 µl	1 µM	
5 U/µl AmpliTaq Gold	0.125 µl	0.625 U	
1 U/µl Amperasa	0.25 µl	0.25 U	
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	13.125 µl		
cDNA (producto de la RT)	5 µl		
Volumen total	25 µl		
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Actividad Amperasa	2'	50°C	1X
Activación AmpliTaq Gold	10'	95°C	1X
Desnaturalización	15"	96°C	50X
Hibridación	1'	51°C	
Extensión	1'	73°C	
Lectura de fluorescencia	30"	75.5°C	

Las lecturas de emisión de fluorescencia se analizaron mediante el programa informático S. D. S. 1.9 (sistema Mac) en el caso del aparato 7700 o S. D. S. 2.0 (sistema PC) en el caso del aparato 7900, para visualizar el incremento de DNA sintetizado a lo largo del programa de PCR.

Una vez finalizado el programa de PCR se realizaba un programa adicional para conocer la/s temperatura/s de fusión de los amplímeros resultantes. Se desnaturalizaban los

amplímeros durante 1 minuto, se rehibridaban a 60°C durante 1 minuto y se realizaba una lenta subida de temperatura (19 minutos y 59 segundos) hasta la completa desnaturalización de todos los amplímeros. Era durante este gradiente de temperatura cuando se registraban los decrementos de emisión de fluorescencia debido a la desnaturalización de las dobles cadenas de DNA. Calculando la derivada de tales valores, se obtenía la curva de disociación de cada uno de los amplímeros a lo largo del gradiente de temperatura. La temperatura a la cual existía un decremento máximo de la fluorescencia correspondía a la temperatura de fusión del amplímero.

Desnaturalización	1'	95°C	
Hibridación	1'	60°C	rampa en 19:59 (20')
Desnaturalización	1'	95°C	

La aparición de más de una curva de disociación era indicativa de la existencia de más de un producto de DNA amplificado.

1.2.4. CONSTRUCCIÓN DE UN RNA PATRÓN

Para conocer la concentración de moléculas de dsRNA vírico se requería de un dsRNA de concentración conocida para confeccionar una recta patrón. Este dsRNA patrón debía tener una longitud similar al dsRNA vírico para que incorporara una cantidad de moléculas de SYBR Green similar a las que incorporaría el dsRNA vírico. Asimismo debía hibridar completamente con los mismos *primers* que el dsRNA vírico para evitar diferencias de eficiencia durante el proceso de la RT-PCR.

Es por ello que se procedió a la construcción de un RNA de cadena doble a partir del RNA de la cepa de rotavirus Wa. Para poder distinguirlo del RNA vírico se deleccionaron 48 pb. Para obtener grandes cantidades de RNA se transcribió *in vitro*. Para obtener el RNA de cadena doble se transcribió tanto la cadena positiva como la cadena negativa y se mezclaron a partes iguales una vez conocida la cantidad obtenida de cada una de ellas.

A continuación se muestra un esquema resumen de la metodología aplicada para la obtención del RNA patrón (figura 1.2.4.).

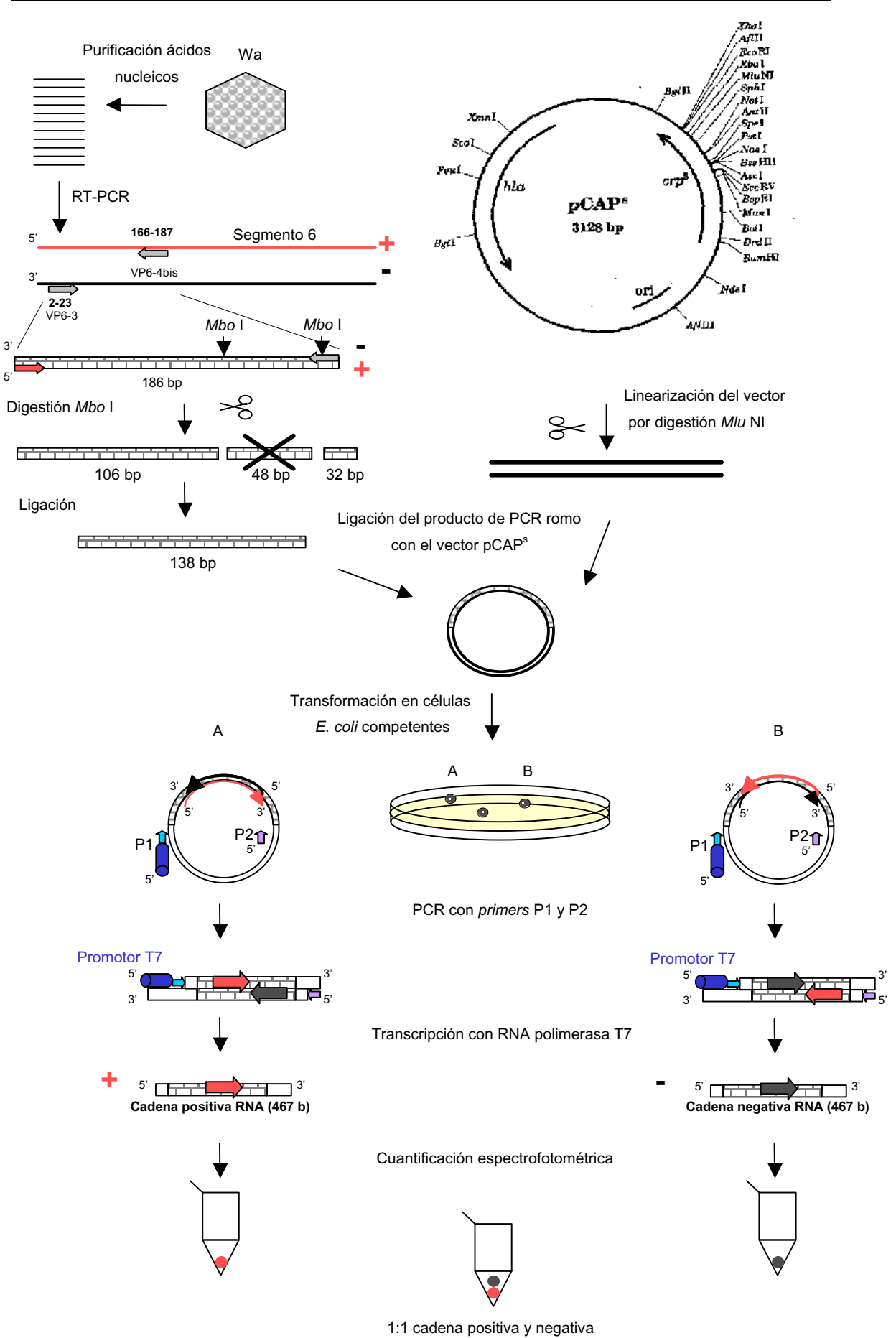


FIGURA 1.2.4. Esquema ilustrativo de la construcción del dsRNA patrón.

VECTOR DE CLONAJE

El vector de clonaje utilizado fue el plásmido pCAP^s -número de acceso AG001614- (Boehringer Mannheim) de 3128 pb que contiene el gen de resistencia a ampicilina y un gen que codifica una proteína activadora de un catabolito letal. En el interior de éste último gen se encuentra la única diana de restricción para la nucleasa *Mlu* NI. Este enzima confiere extremos romos. Todos aquellos transformantes que religuen el plásmido con un inserto de DNA alteraran la pauta de lectura del gen letal y multiplicarán normalmente. Todos aquellos transformantes que religuen el plásmido sin un inserto no alteraran el gen letal y no proliferaran. Este vector también posee los promotores de las RNA polimerasas SP6 y T7 para la posterior transcripción *in vitro* del DNA insertado.

OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO DE DNA A CLONAR

Para la obtención del DNA a insertar se realizó una RT-PCR de un fragmento de 186 pb del sexto segmento a partir del dsRNA del rotavirus Wa. Con la intención de deleccionar 48 pb internos del amplímero, se utilizó un *primer* que introdujo una diana de restricción para la nucleasa *Mbo* I. Para ello se realizó el procedimiento detallado a continuación.

1. Se sintetizó el cDNA de un fragmento de 186 pb del sexto segmento del rotavirus Wa mediante una retrotranscripción *in vitro* a partir del RNA vírico. Se utilizó el enzima M-MuLV y los *primers* VP6-3 y VP6-4bis (ver apéndice I). Éste último *primer* introduce una diana *Mbo* I. El protocolo fue idéntico al descrito en el apartado 1.2.2.

2. El cDNA obtenido se amplificó mediante la DNA polimerasa *Pwo* (Roche). Este enzima genera productos de PCR con extremos romos, a diferencia de la *Taq* que puede finalizar la síntesis de la cadena de DNA añadiendo una adenosina. El protocolo de PCR fue el siguiente:

Preparación de la mezcla de reacción para la PCR			
Componente	Volumen	Concentración final	
10X Tampón de PCR con 15 mM MgSO ₄	5 µl	1X	1.5 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	5 µl	0.2 mM	
0.1 mM <i>primer</i> VP6-3	0.5 µl	1 µM	
0.1 mM <i>primer</i> VP6-4bis	0.5 µl	1 µM	
5 U/µl <i>Pwo</i> DNA polimerasa	0.15 µl	0.75 U	
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	28.85 µl		
producto de RT	10 µl		
Volumen total	50 µl		
Fases de la PCR			
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	9'	95°C	1X
Desnaturalización	1'	94°C	
Hibridación	1'	50°C	40X
Extensión	1'	72°C	
Extensión final	10'	72°C	1X

3. El producto de PCR se purificó mediante el *kit "High Pure PCR product Purification kit"* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de PCR se completó hasta 100 µl finales con agua desionizada libre de DNAsas y RNAsas y se mezcló con 0.5 ml de *binding buffer*. El volumen total se transfirió a una columna con un filtro de fibra y se centrifugó a máxima velocidad (12.000 xg) durante 1 minuto. El filtro se lavó con 0.5 ml y posteriormente con 0.2 ml de *wash buffer*. Tras este último lavado, la columna se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml y se añadieron 70 µl de *elution buffer*. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, los ácidos nucleicos fueron recuperados del filtro mediante una centrifugación de 2 minutos a máxima velocidad.

4. La secuencia vírica presentaba una diana para la nucleasa *Mbo* I. Se generó una segunda diana mediante mutágenesis dirigida utilizando en la RT-PCR previa con un *primer* modificado con la base de interés (el VP6-4bis) variando así la posición 159 de la secuencia del rotavirus Wa número de acceso del GenBank K02086. Por lo tanto, el DNA de 186 pb se digirió con la nucleasa *Sau* 3AI (GIBCO) -isoesquizómero de *Mbo* I- para deleccionar 48 pares de bases internos y poder así distinguir por tamaño el amplímero vírico del amplímero patrón. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 16 horas, en un volumen total de 50 µl. Al día siguiente se comprobó la presencia de los fragmentos resultantes mediante un gel de agarosa al 3 % en TBE 1X.

5. El DNA total producto de la digestión fue precipitado tal y como se detalla a continuación.

- Adición de 4.3 µl de una solución 3M de acetato sódico pH 5.2, 3 volúmenes de etanol absoluto enfriado a -20°C y 17.7 µl de una solución 0.1 M de MgCl₂ a los 40 µl del producto de la digestión. Se incubó 18 h a -20°C.
- Centrifugación a 12.000 xg durante 30 minutos a 4°C.
- Eliminación del sobrenadante y adición de 700 µl de etanol 70 % enfriado a -20°C.
- Centrifugación 5 minutos a 12.000 xg a 4°C y repetición del paso anterior.
- Deshidratación del *pellet* en *Speed Vac* (SAVANT) durante 5 minutos, resuspensión en 50 µl de TE pH 8 y almacenamiento a -20°C.

6. Todos los fragmentos resultantes de la digestión se incubaron durante 16 horas con Ligasa DNA T4 (Boehringer Mannheim).

Preparación de la mezcla de reacción para la ligación		
Componente	Volumen	Concentración final
10X Tampón LIGASA T4	5 µl	1X
1U/µl LIGASA T4	2 µl	2 U
DNA digerido y precipitado	43 µl	
Volumen total	50 µl	

7. Para obtener el fragmento de DNA delecionado de 138 pb se realizó una electroforesis del DNA en un gel de agarosa al 3% en TAE 1X para discriminarlo del resto de fragmentos ligados y se recuperó mediante purificación con el kit "*High Pure PCR product Purification kit*". Siguiendo las instrucciones del fabricante, el fragmento de gel de agarosa con la banda de interés se colocó en un tubo de 1.5 ml y se añadió 300 µl de *Binding buffer* por cada 100 mg de gel de agarosa. Se incubó 10 minutos a 56°C para conseguir disolver la agarosa y así liberar los ácidos nucleicos. Se añadió 150 µl de isopropanol por cada 100 mg de gel de agarosa iniciales y se continuó con el protocolo descrito en el paso 3.

CLONAJE DEL FRAGMENTO DE DNA EN pCAP

Para la clonación se utilizó el kit "*PCR Cloning Kit (Blunt End)*" (Boehringer Mannheim). Se linealizó el vector con el enzima de restricción *Mlu* NI dejando extremos romos. El fragmento de 138 pb fue insertado al vector linealizado empleando Ligasa DNA T4 siguiendo el protocolo descrito en el paso 6 e incluyendo el vector.

Las células competentes *Escherichia coli DH5α* (Life Technologies, Invitrogen) fueron transformadas con el producto de ligación. Para ello se descongelaron lentamente las células competentes en hielo y se colocaron 85 µl en un vial de polipropileno Falcon 2059 preenfriado. Se les añadió 20 µl del producto de ligación y se incubaron durante 30 minutos en hielo, 45 segundos a 42°C y nuevamente en hielo 2 minutos más. Se les agregó 900 µl del medio S. O. C. precalentado a 37°C y se incubaron a 37°C durante 1h

en agitación (220 r. p. m.). Posteriormente se sembraron 125 μ l del producto de la transformación por placa de LB agar suplementada con 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron durante 18 horas a 37°C.

COMPROBACIÓN DE LA EXISTENCIA Y ORIENTACIÓN DEL INSERTO

Una fracción de cada una de las colonias aisladas se resuspendió en 100 μ l de H₂O desionizada. Se realizó un choque térmico de 5 minutos a 100°C y se centrifugó durante 2 minutos a 12.000 xg para separar los ácidos nucleicos bacterianos. Se recogió el sobrenadante y se realizó una PCR con los *primers* P1 y P2 (ver apéndice II) los cuales reconocen regiones del vector que flanquean al fragmento insertado (suministrados por el kit de clonación).

Preparación de la mezcla de reacción para la PCR			
Componente	Volumen	Concentración final	
10X Tampón de PCR Expand	5 μ l	1X	
25 mM MgCl ₂	4 μ l	2 mM	
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	5 μ l	0.2 mM	
0.1 mM <i>primer</i> P1	1 μ l	2 μ M	
0.1 mM <i>primer</i> P2	1 μ l	2 μ M	
3.5 U/ μ l HF PCR Expand polimerasa	0.25 μ l	0.875 U	
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	28.75 μ l		
Ácidos nucleicos bacterianos	5 μ l		
Volumen total	50 μl		
<hr/>			
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	2'	95°C	1X
Desnaturalización	40''	95°C	40X
Hibridación	30''	68°C	
Extensión	45''	72°C	
Extensión final	7'	72°C	1X

El amplificado de DNA se purificó con el *kit "High Pure PCR product Purification kit"* (Roche) y se secuenció con uno de los *primers* del fragmento (*primer* VP6-3) para confirmar la existencia del inserto y, a su vez, conocer la orientación.

El marcaje del DNA se realizó mediante PCR utilizando la mezcla de reacción BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v. 2.0. (Applied Biosystems) tal y como se detalla a continuación.

Preparación de la mezcla de reacción para la secuenciación			
Componente	Volumen	Concentración final	
<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction</i>	4 µl	1X	
5 µM <i>primer</i> VP6-3	0.64 µl	320 nM	
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	0.36 µl		
DNA purificado	5 µl		
Volumen total	10 µl		
Fases de la reacción	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización	10''	96°C	25X
Hibridación	5''	50°C	
Extensión	4'	60°C	

Los amplímeros marcados fueron posteriormente precipitados. Al producto de la secuenciación (10 µl) se le añadió 64 µl de etanol 95% y 26 µl de H₂O desionizada. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 xg durante 30 minutos. Al *pellet* se le agregó 200 µl de etanol 70 % y se centrifugó a 12.000 xg durante 5 minutos. Decantado el etanol, el *pellet* fue secado al aire.

La secuenciación se realizó mediante electroforesis por capilaridad en el aparato ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) en la unidad de Genómica del Parc Científic.

CONSERVACIÓN DE LOS CLONES DE INTERÉS

Se propagaron los clones en 5 ml de medio líquido LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina a 37°C en agitación a 220 r. p. m. durante 8h. Pasado este tiempo, las células fueron centrifugadas a 2.000 xg durante 10 minutos a 4°C. Las células bacterianas fueron resuspendidas en medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, alicuotadas en tubos de 1.5 ml con un 15% de glicerol y congeladas a -80°C.

OBTENCIÓN DEL DNA MOLDE PARA LA TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

A partir de la suspensión de ácidos nucleicos obtenidos a partir de una colonia se realizaba una amplificación del DNA con los *primers* que flanqueaban el fragmento insertado en el vector (*primers* P1 y P2) tal y como se ha descrito anteriormente pero con 5U/µl del enzima *Pwo* DNA polimerasa. El tamaño esperado era de 513 pares de bases (incluyendo el inserto de 138 pb). El *primer* P1 contenía el promotor transcripcional para la RNA polimerasa T7.

Una vez obtenida gran cantidad de DNA con extremos romos, se purificaba por el sistema fenol-cloroformo detallado a continuación.

- Dilución 1:1 (v:v) del producto de PCR con una solución de fenol saturado con Tris (pH 7-8) :cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- Homogeneización y posterior separación de fases por centrifugación a 12.000 xg durante 2 min, recuperación de la fase acuosa superior y dilución 1:1 (v:v) con la solución anterior de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- Homogeneización, centrifugación a 12.000 xg durante 2 min y recuperación de la fase superior. Dilución 1:1 (v:v) con una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
- Homogeneización, centrifugación a 12.000 xg durante 2 min y recuperación de la fase superior. Adición de 2 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20°C y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2.
- Incubación durante 1h a -20°C y centrifugación durante 30 minutos a 12.000 xg a 4°C.
- Lavado del *pellet* dos veces por difusión con etanol 70% preenfriado a -20°C y centrifugación durante 4 minutos a 12.000 xg a 4°C. Secado del *pellet* y resuspensión en 50 µl de agua desionizada libre de DNAsas y RNAsas.

CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA DEL DNA

Una vez obtenido el producto de PCR purificado se realizó una lectura de absorbancia a 260 nm para calcular la concentración obtenida, mediante el espectrofotómetro DU 640, Beckman Coulter. El rendimiento obtenido oscilaba entre 0.8 y 1.2 µg/µl de DNA según la equivalencia

Una unidad de $A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ de DNA de doble cadena.

Una relación A_{260}/A_{280} mayor o igual a 1.8 indicaba una pureza óptima del DNA.

OBTENCIÓN DEL RNA PATRÓN MEDIANTE TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

Para la obtención de RNA a partir de los clones seleccionados se utilizó el *kit "Riboprobe in vitro Transcription Systems"* (Promega) tal y como se detalla a continuación.

Preparación de la mezcla de reacción para la transcripción		
Componente	Volumen	Concentración final
5X Tampón transcripción	10 μ l	1X
100 mM DTT	5 μ l	10 mM
10 mM rATP	2.5 μ l	0.5 mM
10 mM rCTP	2.5 μ l	0.5 mM
10 mM rGTP	2.5 μ l	0.5 mM
10 mM rUTP	2.5 μ l	0.5 mM
Inhibidor de RNAsas 40U/ μ l	1.25 μ l	50 U
RNA polimerasa T7 15U/ μ l	1.33 μ l	20 U
H ₂ O	18.42 μ l	
DNA (0.8-1 μ g/ μ l)	4 μ l	3 μ g
Volumen total	50 μl	
Incubación 2h 37°C		

Se eliminó el DNA molde mediante digestión con 1U DNasa por cada μ g de DNA (RQ1 DNasa libre de RNAsas) del producto de transcripción durante 30 min a 37°C.

PURIFICACIÓN RNA

El RNA obtenido se purificaba mediante el siguiente procedimiento.

- Dilución 1:1 (v:v) con una solución fenol (saturado en agua):cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), homogeneización durante 1 minuto y centrifugación durante 2 minutos a 12.000 xg.
- Adición en la fase acuosa en relación 1:1 (v:v) de una solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), homogeneización durante 1 minuto y centrifugación durante 2 minutos a 12.000 xg.
- Adición en la fase acuosa de 0.5 volúmenes de 7.5 M acetato de amonio y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Incubación a -70°C durante 30 minutos y centrifugación durante 20 minutos a 12.000 xg a 4°C.
- Lavado del *pellet* con etanol 70%, centrifugación durante 5 minutos a 12.000 xg y secado.

Resuspensión en 22 μ l de H₂O desionizada libre de RNAsas y 1 μ l (26 U) de inhibidor de RNAsas (RNAguard RNase Inhibitor porcine, Amersham Pharmacia Biotech Inc). Cuantificación mediante espectrofotometría y almacenamiento a -70°C. El rendimiento obtenido fue de entre 0.2 y 0.1 μ g/ μ l de RNA de cadena sencilla según la equivalencia

Una unidad de A₂₆₀ = 40 μ g/ml de RNA de cadena sencilla.

Una relación A_{260}/A_{280} mayor o igual a 2.0 indicaba una pureza óptima del RNA.

1.2.5. CUANTIFICACIÓN DEL TÍTULO INFECCIOSO DE SUSPENSIONES DE ROTAVIRUS MEDIANTE CULTIVO CELULAR

La cuantificación del título vírico infeccioso de suspensiones de HRV se realizó por el método del número más probable (MPN). Se utilizaron monocapas celulares de la línea celular MA-104 crecidas en placas de 96 pocillos. Para ello se sembraban 200 μ l de una suspensión celular cuya concentración oscilaba entre 1×10^4 y 2×10^4 células/ml en cada pocillo y se incubaban a 37°C en una atmósfera con un 5% CO_2 . Una vez la monocapa celular alcanzaba la completa confluencia se procedía a la infección de ésta de la siguiente manera.

- Decantación del medio de crecimiento.
- Lavado de las monocapas celulares con un medio de cultivo sin suero fetal.
- Incubación de la suspensión vírica con 10 μ g/ml tripsina 1:250 (DIFCO) durante 30 minutos a 37°C.
- Inoculación de 20 μ l de la suspensión vírica a cuantificar en cada uno de los pocillos a razón de un mínimo de ocho réplicas por dilución ensayada.
- Incubación durante 60 minutos a 37°C en una atmósfera al 5% de CO_2 para permitir la adsorción vírica.
- Adición del medio post-infección (medio de crecimiento libre de suero fetal y suplementado con 5 μ g/ml de tripsina 1:250 DIFCO).
- Incubación a 37°C durante 7 días o hasta la aparición del CPE total.

1.2.5.1. Cepas víricas

Las cepas de rotavirus utilizadas en el presente trabajo fueron las de origen humano Wa, DS-1, Ito y VA70, la porcina OSU y la procedente de simio SA11. Todas ellas se propagaron en la línea celular MA-104.

Las cepas de origen humano Wa y DS-1 fueron cedidas por el Dr. Jorge Flores (entonces en *National Institutes of Health*, Estados Unidos). El rotavirus humano Ito^r p13 fue cedido por el Dr. Thomas Flewett (Hospital Regional de Birmingham). El rotavirus humano VA70 fue cedido por la Dra. Ruth Bishop (*Royal Children's Hospital*, Australia). El rotavirus porcino OSU fue cedido por el Dr. Jean Cohen (INRA, Francia) y el rotavirus de simio SA11 fue obtenido de la ATCC (VR-899).

OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES DE ROTAVIRUS

La obtención de suspensiones de rotavirus se realizaba mediante la infección de monocapas confluentes de MA-104. El protocolo seguido fue el siguiente:

- Decantación del medio de crecimiento.
- Dos lavados de la monocapa celular con PBS, para eliminar las trazas de suero fetal presente en el medio de cultivo.
- Inoculación del virus previamente activado con 10 µg/ml de tripsina de páncreas porcino tipo IX (SIGMA) durante 30 minutos a 37°C (m.o.i. 0.01-0.1). Con el fin de evitar la desecación de la monocapa se añadía 0.1 ml en frascos de 25 cm², 0.5 ml en frascos de 75 cm² y 1 ml en frascos de 175 cm².
- Incubación durante 90 minutos para permitir la adsorción del virus a las células, agitando suavemente cada 15 minutos aproximadamente.
- Incorporación del medio post-infección libre de suero fetal suplementado con 1 µg/ml tripsina de páncreas porcino tipo IX (10 ml en frascos de 25 cm², 40 ml en frascos de 75 cm² ó 75 ml en frascos de 175 cm²) - ver apéndice I - e incubación a 37°C.
- Cuando el efecto citopatogénico (CPE) alcanzaba el 75-100 % de la monocapa celular (2-5 días) el frasco infectado se sometía a 3 ciclos de congelación- descongelación.
- Recuperación del medio post-infección con restos celulares en tubos de polipropileno y centrifugación a baja velocidad (4000x g) durante 20 minutos para eliminar los restos celulares.
- Almacenamiento de la suspensión vírica a -70°C.

1.2.5.2. Líneas celulares

La línea celular empleada para la propagación de los rotavirus fue la MA-104. Son células derivadas de riñón de mono *Cercopithecus aethiops* y presentan una morfología epitelial. Es una de las líneas más utilizadas en la propagación de rotavirus (Smith y Gerba, 1982; Kitamoto *et al.*, 1991; Blake, 1993).

1.3. RESULTADOS

1.3.1. DETERMINACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN MOLECULAR DE ROTAVIRUS

El principal objetivo que nos planteamos fue desarrollar una técnica molecular sensible que detectara el mayor número posible de aislados de rotavirus. Para ello necesitamos poner a punto una RT-PCR genérica para rotavirus humanos del grupo A, pero a la vez, específica para rotavirus grupo A. El gen codificante de la proteína VP6 ofrecía un alto grado de homología entre todos los miembros de rotavirus del grupo A. Los *primers* VP6-3 y VP6-4 eran capaces de hibridar con todas las secuencias nucleotídicas del gen codificante de VP6 de rotavirus del grupo A disponibles en el GenBank (ver figura 1.3.1). No obstante, no eran capaces de hibridar con rotavirus grupo B ni C según las secuencias nucleotídicas disponibles. Dentro del grupo A de rotavirus, las secuencias que presentaban mayor número de diferencias con respecto a los *primers* fueron las que provenían de cepas animales, en especial, las de aves. En cambio, las que presentaban mayor similitud fueron las cepas humanas.

A-Ru/Wa	GGCTTAAAGAGAGCTGGACAGGAGGTTCTGTACTCAGCTGTCAAAATCTTAAGAGTGCATAGGACAAAATGCTGAAGGACATATATATCTCAATGTA	185
A-Ru/EE	185
A-Ru/SV2	185
A-Ru/82	185
A-Ru/8210	185
A-Ru/82128	185
A-Ru/87185	185
A-Ru/1876	185
A-Ru/Tp-1	185
A-Ru/Tp-3	185
A-Ru/CK-1	185
A-Eg/L198	185
A-Eg/80-5	185
A-Eg/8-1	185
A-Eg/8-2	185
A-Eg/P2-14	185
Eq/R-3	185
Eq/R-22	185
Eq/HI-23	185
A-Po/CRM-8	185
A-Po/GettF	185
A-Po/Y8	185
A-Ru/WC3	185
A-Ru/22R	185
A-Ov/Lc40	185
A-Ov/Lp14	185
R-13	185
OR4	185
DS2981	185
Nu/EDM	185
C-Ru/Sriat	184
C-Ru/Wndug	184
C-Ru/Jajer	184
C-Ru/Ereat	184
C-Ru/Sa1e	184
C-Po/Csade	183
C-Ru/HS076	183

A-Ru/Wa	GGGACTATTGACCAATGAAATGAGGAGGATGACATGAGGAAATGATTTTCAGATGAGGAGGATGCTTATTAAGAAATGAGGATTTGAGATT	210
A-Ru/EE	210
A-Ru/SV2	210
A-Ru/82	210
A-Ru/8210	210
A-Ru/82128	210
A-Ru/87185	210
A-Ru/1876	210
A-Ru/Tp-1	210
A-Ru/Tp-3	210
A-Ru/CK-1	210
A-Eg/L198	210
A-Eg/80-5	210
A-Eg/8-1	210
A-Eg/8-2	210
A-Eg/P2-14	210
Eq/R-3	210
Eq/R-22	210
Eq/HI-23	210
A-Po/CRM-8	210
A-Po/GettF	210
A-Po/Y8	210
A-Ru/WC3	210
A-Ru/22R	210
A-Ov/Lc40	210
A-Ov/Lp14	210
R-13	210
OR4	210
DS2981	210
Nu/EDM	210
C-Ru/Sriat	209
C-Ru/Wndug	209
C-Ru/Jajer	209
C-Ru/Ereat	209
C-Ru/Sa1e	209
C-Po/Csade	208
C-Ru/HS076	208

A-Ru/Wa	TTGGTATTAGGACACACATTTGACCTGAGGAGGATATATGAGGATGACGAGACTATAAGTGAATATTTAGTACTTATTAATGATATGATATGATAGG	315
A-Ru/EE	315
A-Ru/SV2	315
A-Ru/82	315
A-Ru/8210	315
A-Ru/82128	315
A-Ru/87185	315
A-Ru/1876	315
A-Ru/Tp-1	315
A-Ru/Tp-3	315
A-Ru/CK-1	314
A-Eg/L198	314
A-Eg/80-5	315
A-Eg/8-1	315
A-Eg/8-2	315
A-Eg/P2-14	315
Eq/R-3	315
Eq/R-22	315
Eq/HI-23	315
A-Po/CRM-8	315
A-Po/GettF	315
A-Po/Y8	315
A-Ru/WC3	314
A-Ru/22R	315
A-Ov/Lc40	315
A-Ov/Lp14	315
R-13	315
OR4	315
DS2981	315
Nu/EDM	314
C-Ru/Sriat	314
C-Ru/Wndug	314
C-Ru/Jajer	314
C-Ru/Ereat	314
C-Ru/Sa1e	314
C-Po/Csade	312
C-Ru/HS076	312

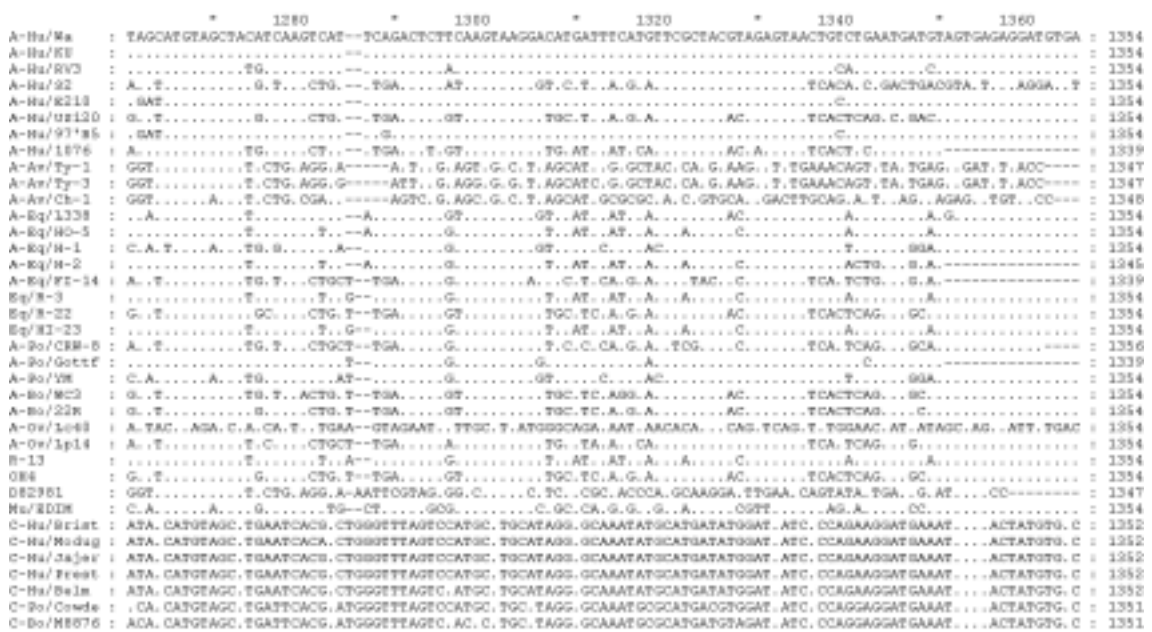


FIGURA 1.3.1. Secuencias nucleotídicas de algunos rotavirus del grupo A y C obtenidas del Genbank y alineadas mediante el programa informático CLUSTAL W. Se ha señalado en amarillo la región de hibridación de los *primers* VP6-3 y VP6-4. En verde se muestra la región de unión de la sonda empleada en la hibridación.

Una vez escogida la región a amplificar, se buscó en ella una región interna para el diseño de una sonda específica para la posterior confirmación mediante hibridación-*Southern blot* (señalada en la misma figura 1.3.1.). El método de detección de rotavirus grupo A mediante RT-PCR confirmación por hibridación-*Southern blot* utilizando cepas de laboratorio tanto humanas como animales fue capaz de detectar hasta 20 moléculas de dsRNA o 1 NMP/ml (partículas infecciosas). Normalmente, una suspensión de rotavirus adaptada a cultivo celular presentaba una proporción de 1 partícula infecciosa por cada 20-5000 partículas no infecciosas dependiendo de las condiciones de la infección y de la fase celular del cultivo en el momento de la posterior recuperación vírica.

Esta metodología fue aplicada a muestras clínicas procedentes de un brote de gastroenteritis en Albania dónde se sospechaba de la implicación de rotavirus. En 25 de 28 muestras clínicas fecales analizadas se detectó presencia de rotavirus mediante RT-PCR y confirmación por hibridación-*Southern blot*. En dos de las muestras donde no se detectó presencia de rotavirus se detectó norovirus. Posteriormente se procedió a la caracterización de estos aislados siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3. Por lo tanto, la técnica era específica para rotavirus.

1.3.2. PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN MOLECULAR POR RT-PCR A TIEMPO REAL DE ROTAVIRUS

El diseño de una sonda TaqMan para el marcaje de los ácidos nucleicos generados por los *primers* VP6-3 y VP6-4 requería encontrar una región muy conservada entre todas las cepas de rotavirus del grupo A. Simultáneamente, la sonda TaqMan debía tener una temperatura de fusión (T_m) 10°C superior a la T_m de los *primers*, una longitud mínima de 18 nucleótidos y una unión eficiente para la correcta cuantificación molecular. Diferencias de uno o dos nucleótidos respecto la sonda podía evitar la unión de ésta al amplificado generado durante la PCR, y por tanto, no marcarlo o marcarlo ineficientemente y subestimar la cantidad de RNA vírico presente en una muestra determinada. Al no poder cumplir con todas estas premisas previas se optó por utilizar el *SYBR Green* para el marcaje de ácidos nucleicos. Sin embargo, el *SYBR Green* se intercala entre las dobles cadenas de DNA de cualquier amplímero generado por los *primers* sin discriminación alguna.

Al iniciar la puesta a punto de la metodología cuantitativa estándar nos encontramos con la generación de dímeros de *primers*. El lector registraba tanto la señal generada por el amplímero deseado como la que generaban los amplímeros no deseados tal y como muestra la figura 1.3.2.1. Las curvas de disociación llevadas a cabo después de cada una de las PCR cuantitativas mostraban si existía más de un amplímero. La diferencia de T_m de cada uno de los amplímeros originaba curvas de disociación diferentes para cada uno de ellos.

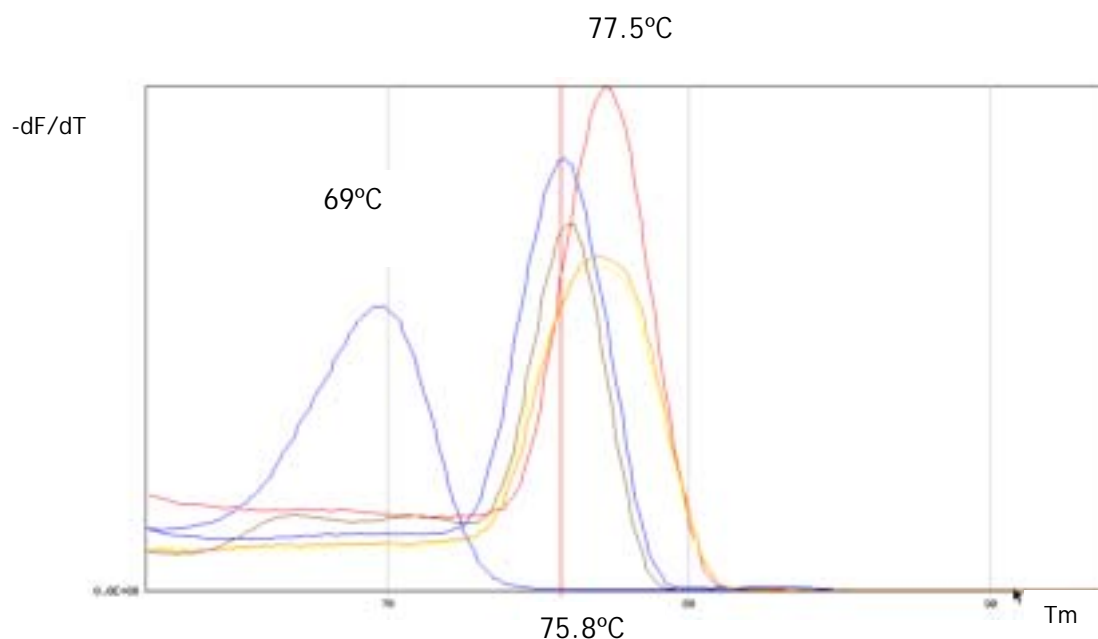


FIGURA 1.3.2.1. Curvas de disociación resultantes de cada uno de los amplímeros generados en cada uno de los tubos de RT-PCR. Cada curva corresponde a un solo tubo. El eje de ordenadas representa la derivada del decremento de emisión de fluorescencia (-dF/dT) durante el programa de desnaturalización progresiva descrito en el apartado 1.2.4. del apartado de material y métodos. El eje de abcisas muestra el gradiente de temperatura del tubo de PCR a lo largo de los 20 minutos de desnaturalización. Los amplímeros de 77.5°C de Tm correspondían al DNA amplificado procedente de diluciones del RNA patrón y los amplímeros de 75.8°C de Tm correspondían a diluciones del RNA vírico. El resto de amplímeros eran inespecíficos o dímeros de *primers* (Tm de 69°C).

Se procedió a la evaluación de la RT-PCR a tiempo real utilizando el RNA patrón y el RNA vírico de cepas de laboratorio. Ensayando diferentes condiciones de astringencia y diferentes condiciones de análisis de los datos se consiguió una sensibilidad máxima de detección y cuantificación de 1 molécula de dsRNA patrón. Sin embargo la linealidad sólo se mantenía entre 1×10^6 y 10 moléculas de dsRNA. La RT-PCR con los *primers* VP6-3 y VP6-4 generaba una cierta cantidad de dímeros de *primers*. Para evitar su interferencia en los análisis posteriores se realizó un paso específico de lectura de la fluorescencia a una temperatura 6.5°C por encima de la Tm de los dímeros de *primers* posteriormente a la fase de extensión de la PCR, temperatura a la cual los amplímeros específicos se mantenían en forma de doble cadena de DNA. Así pues, el programa final constaba de los siguientes pasos: 2 minutos a 50°C para la acción de la Amperasa, 10 minutos a 95°C para la activación de la *Taq* Gold polimerasa y 50 ciclos de 15 segundos a 96°C (fase de desnaturalización del molde), 1 minuto a 51°C (fase de hibridación de los *primers* al molde), 1 minuto a 73°C (fase de síntesis de las nuevas cadenas de DNA) y 30 segundos a 75.5°C para la lectura de la fluorescencia emitida por los amplímeros de doble cadena de DNA.

El análisis posterior se efectuaba con los registros de emisión de fluorescencia a lo largo del programa de PCR. El programa informático S.D.S. representaba en una gráfica los incrementos de fluorescencia en cada uno de los tubos a lo largo de cada uno de los ciclos de PCR (ver figura 1.3.2.2.). En los primeros 15 ciclos no se apreciaba apenas incremento en la emisión de fluorescencia. Los valores de fluorescencia emitida entre los ciclos 3 y 15 se utilizaron para establecer la señal de fondo (*background*). Se utilizaba la señal *background* media de todos los tubos más 10 veces la desviación estándar para establecer la emisión de fluorescencia basal o *threshold*. El ciclo en el cual se superaba esta fluorescencia basal se denominó Ct. Este valor Ct debía encontrarse siempre en la fase exponencial de la curva.

Tras visualizar el comportamiento del RNA patrón y de los diferentes controles negativos o pocillos sin molde (pocillo G1 -control negativo RT- y H1 -control negativo PCR- en figura 1.3.2.2.) durante la amplificación por PCR, se establecía la fluorescencia basal (ΔRn) para la determinación del valor Ct. Debido a la existencia de dímeros de *primers* durante la amplificación se estableció un nivel de fluorescencia basal siempre por encima de los controles sin molde tal y como se muestra en la figura 1.3.2.2. Un valor de Ct igual al número de ciclos totales de la PCR indicaba la ausencia de amplificación en ese pocillo.

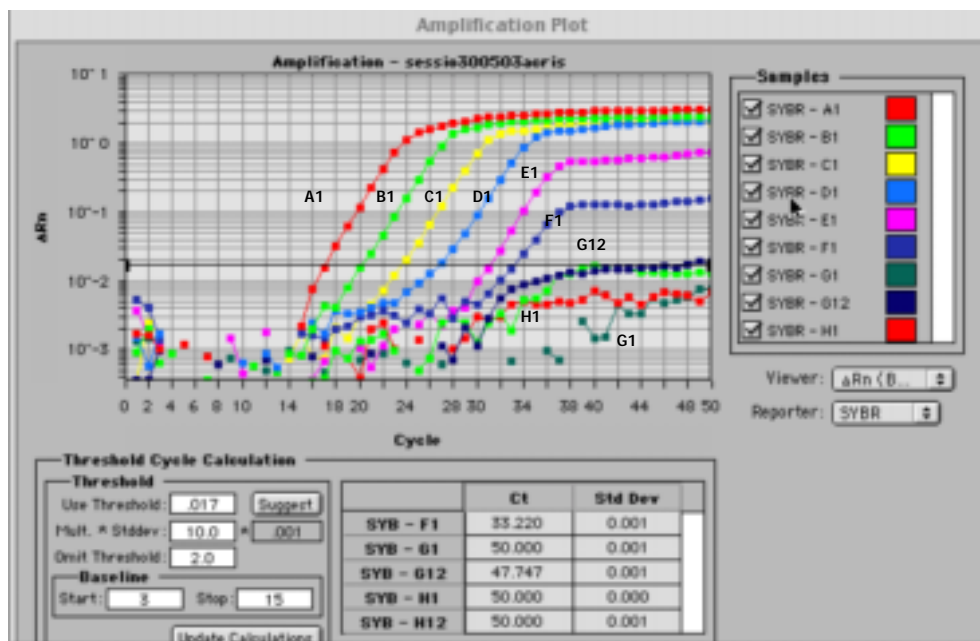


FIGURA 1.3.2.2. Muestra de una PCR cuantitativa típica. Mientras el SYBR Green se intercala entre las dobles cadenas de DNA que se sintetizan se va incrementando la cantidad de emisión de fluorescencia. Cada una de las curvas corresponde al incremento de fluorescencia continua de un solo pocillo. Los pocillos A1-F1 y G12 corresponden a diluciones logarítmicas en base 10 seriadas del dsRNA patrón (700000, 70000, 7000, 700, 70, 7 y 0.7 dsRNA/ml). G1 y H1 corresponden a controles sin molde de la RT y la PCR respectivamente.

El resultado de la PCR cuantitativa fue visualizado en gel de acrilamida al 8% (figura 1.3.2.3.) con el fin de comprobar una vez más si la señal provenía del amplificado deseado.



FIGURA 1.3.2.3. DNA amplificado a partir del RNA patrón mediante RT-PCR cuantitativa visualizado en un gel de acrilamida al 8%

Los valores de Ct de cada uno de los pocillos se interpolaron en la recta patrón construida a partir de la RT-PCR cuantitativa del banco de diluciones del dsRNA patrón de concentración conocida (ver figura 1.3.2.4.). Para cada uno de los experimentos se incluyó el banco de diluciones del dsRNA patrón y se construyó una recta patrón. Una pendiente de la recta patrón cercana a -3.2 muestra una eficiencia de la PCR del 100%. Es decir, una cantidad 10 veces menor de RNA supone un incremento de Ct de 3.2 ciclos en una RT-PCR completamente eficiente según indicaciones del fabricante.

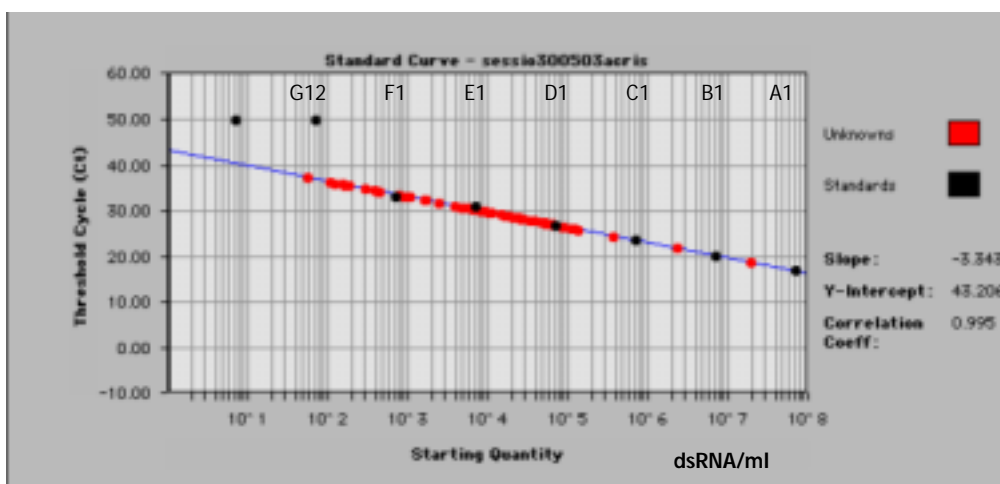
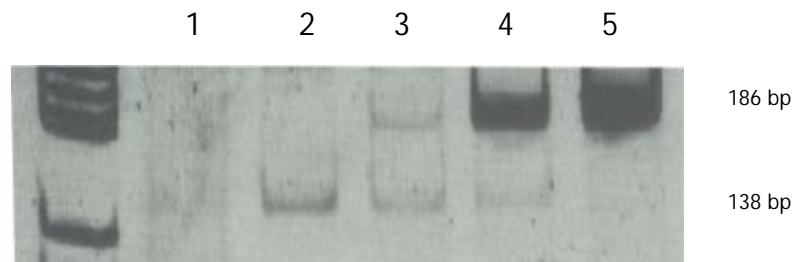


FIGURA 1.3.2.4. Recta patrón utilizada para interpolar el número de copias de RNA iniciales a partir del valor Ct. En el eje de ordenadas se muestra el valor Ct y en el eje de abscisas la concentración de dsRNA/ml. El programa informático también realizaba un análisis de regresión mostrando el coeficiente de correlación, la pendiente de la recta y el valor de corte en el eje de ordenadas.

El coeficiente de variación entre las Ct obtenidas a partir de un mismo dsRNA cuantificado 3 veces en una misma RT-PCR *real time* (o coeficiente intraensayo) oscilaba entre el 0.5 y 2.4%. En cambio, el coeficiente interensayo de un mismo dsRNA cuantificado 5 veces en RT-PCR a tiempo real realizadas en días diferentes era un poco más elevado, de entre 1.8 y un 4.3%. En todos los casos el mayor coeficiente de variación se encontró en las diluciones con menor cantidad de dsRNA.



Carril 1: Control negativo sin molde

Carril 2, 3, 4 y 5: Producto de RT-PCR a partir de diluciones seriadas de RNA viral

FIGURA 1.3.2.5. Gel de acrilamida de una RT-PCR competitiva del RNA viral (186 bp) junto con el RNA patrón (138 bp).

También se comprobó la cuantificación mediante RT-PCR competitiva (figura 1.3.2.5.). Esta técnica se basa en añadir una cierta cantidad de RNA patrón conocida en cada uno de los tubos provenientes de un banco de diluciones del RNA viral. La dilución en gel en la que se igualaron las intensidades de emisión de fluorescencia de las bandas obtenidas de los fragmentos correspondientes (carril 3 de la figura 1.3.2.5.) correspondía a aquella dilución del RNA viral en el que había la misma cantidad de RNA patrón. Una misma suspensión viral contenía 3250 dsRNA/ml según la RT-PCR competitiva y 5450 dsRNA/ml según la RT-PCR cuantitativa *real time*. Dichos valores se encuentran dentro del mismo rango, sobretodo teniendo en cuenta que la técnica competitiva es aproximativa.

1.3.3. EFICIENCIA DE RECUPERACIÓN DE ROTAVIRUS MEDIANTE LIOFILIZACIÓN

En tres días diferentes se recogió 1 litro de agua residual urbana, se centrifugó a baja velocidad durante 20 minutos para retirar el material en suspensión y se esterilizó mediante autoclave durante 20 minutos a 121°C. Una vez enfriada el agua esterilizada, se dividió en volúmenes de 100 ml en botellas de vidrio y se inoculó experimentalmente cada botella con diferentes cantidades de rotavirus humano Wa (1.2×10^7 , 1.2×10^6 , 1.2×10^5 y 1.2×10^6 MPN/100ml). Se homogeneizó 15 minutos mediante agitación magnética, se recogieron 50 ml en contenedores y se liofilizó tal y como se detalla en el apartado 1.2.1.

Cada uno de los experimentos (denominados A, B y C en la tabla 1.3.3.1.) fueron realizados en días diferentes, con suspensiones víricas diferentes y con agua residual diferente. El agua residual era recogida el mismo día que se realizaba el experimento para evitar cambios en su estado debido al propio almacenamiento.

Una vez obtenido el concentrado (factor de concentración 100 veces) se procedió a la cuantificación de los rotavirus infecciosos presentes mediante el método del número más probable (MPN) descrito en el apartado 1.2.5. y a la cuantificación de las moléculas de dsRNA presentes mediante la RT-PCR a tiempo real descrita en el apartado 1.2.3. Brevemente, se purificaron los ácidos nucleicos presentes en el concentrado y se retrotranscribió el dsRNA. Una vez obtenido el cDNA, se procedió a la cuantificación de éste mediante PCR a tiempo real. Comparando las curvas de amplificación del dsRNA vírico con las curvas del dsRNA patrón de concentración conocida se interpoló la concentración de moléculas genómicas presentes en el concentrado. Los resultados se muestran en la tabla 1.3.3.1.

TABLA 1.3.3.1. Carga viral antes y después de ser liofilizada del agua residual inoculada experimentalmente y los porcentajes de recuperación vírica. Se muestra la cuantificación mediante cultivo celular y en sombreado la cuantificación molecular. Los diferentes experimentos han sido agrupados según la cantidad de virus inoculada experimentalmente en el momento de iniciar el experimento.

Exp. ^a	Inoculado			Antes de liofilizar		Después de liofilizar		Recuperación (%)	
	MPN/100ml	MPN/50ml	dsRNA/50ml	MPN/0.5ml	dsRNA/0.5ml	NMP	dsRNA		
A	1.2x10 ⁷	6.0x10 ⁶	3.6x10 ⁸	6.0x10 ⁶	1.8x10 ⁸	100.0	48.5		
B	1.2x10 ⁷	5.8x10 ⁶	2.1x10 ⁸	8.7x10 ⁵	3.0x10 ⁸	15.1	144.0		
C	1.2x10 ⁷	4.6x10 ⁶	5.5x10 ⁸	5.8x10 ⁶	5.3x10 ⁸	125.8	95.9		
						80.3±58.0^b	96.1±47.7		
A	1.2x10 ⁶	6.0x10 ⁵	9.5x10 ⁷	4.0x10 ⁵	4.5x10 ⁷	66.2	47.6		
B	1.2x10 ⁶	6.0x10 ⁵	2.0x10 ⁷	6.0x10 ⁵	4.2x10 ⁷	100.3	212.5		
C	1.2x10 ⁶	6.0x10 ⁵	8.5x10 ⁷	5.5x10 ⁵	8.5x10 ⁷	91.7	100.0		
						86.0±17.8	120.0±84.3		
A	1.2x10 ⁵	6.4x10 ⁴	8.5x10 ⁶	4.6x10 ³	4.8x10 ⁶	7.1	56.7		
B	1.2x10 ⁵	5.4x10 ⁵	7.0x10 ⁶	4.6x10 ⁴	2.3x10 ⁷	8.4	332.0		
C	1.2x10 ⁵	4.0x10 ⁵	6.0x10 ⁶	1.2x10 ⁵	1.7x10 ⁷	29.4	280.0		
						14.9±12.5	222.9±146.3		
A	1.2x10 ⁴	3.4x10 ⁴	7.0x10 ⁵	2.1x10 ³	7.5x10 ⁵	6.2	107.1		
B	1.2x10 ⁴	1.2x10 ⁵	1.1x10 ⁶	4.6x10 ³	1.2x10 ⁶	3.8	109.0		
C	1.2x10 ⁴	2.9x10 ⁴	6.1x10 ⁵	4.0x10 ³	1.6x10 ⁶	14.0	262.3		
						8.0±5.3	159.5±89.1		

^a A cada uno de los tres experimentos se le ha asignado una letra (A, B o C). En cada experimento se inocularon experimentalmente 4 concentraciones víricas diferentes: 1.2x10⁷, 1.2x10⁶, 1.2x10⁵ y 1.2x10⁴MPN/100ml.

^b Promedio del porcentaje de recuperación y desviación estándar de los diferentes experimentos agrupados respecto a la carga vírica inoculada experimentalmente.

Los resultados obtenidos mostraron algunas sorpresas. Los títulos víricos infecciosos (MPN) de los contenedores antes de ser liofilizados no coincidían exactamente con la cantidad de virus inoculada experimentalmente en las botellas (ver tabla 1.3.3.1.). A menor cantidad vírica, mayor era el error en la cuantificación, siendo normalmente a la alza. Ello podría ser explicado por algún fenómeno producido durante el contacto vírico con el agua residual. Un efecto posible podría ser la desagregación de las partículas víricas debido a los detergentes presentes en el agua residual.

Por otro lado, la cantidad de copias genómicas presente (dsRNA) era considerablemente superior a la cantidad de partículas infecciosas (MPN) –ver tabla 1.3.3.1.-. La ratio media de virus infeccioso respecto virus no infeccioso fue de 1:10-1:100 para las soluciones antes de ser liofilizadas, y 1:10-1:600 para los concentrados finales tras liofilización. Ello nos condujo a la cuantificación de las suspensiones virales utilizadas en los tres experimentos (ver tabla 1.3.3.2.). En las suspensiones víricas antes de ser liofilizadas, encontramos unas proporciones de virus infeccioso respecto virus no infeccioso de 1:5000, 1:3675 y 1:17. Éste último era un sobrenadante de un cultivo recogido 18 horas después de la infección. Ello evidenció la presencia de gran número de partículas no infecciosas en el clarificado vírico obtenido en el laboratorio mediante propagación en la línea celular MA-104. Ello también fue comprobado mediante la titulación de estas mismas suspensiones con oro coloidal en el microscopio electrónico.

Cuando las suspensiones virales (tabla 1.3.3.2. "Wa antes liofilización") se ponían en contacto con el agua residual, parecía desaparecer una proporción de partículas no infecciosas (dsRNA) (ver tabla 1.3.3.1.). Si se hubiera tratado de un efecto de agregación de las partículas al entrar en contacto con el agua residual, también se hubiera observado en las partículas infecciosas (MPN). Pero las partículas infecciosas (MPN) no parecían agregarse en el agua residual antes de ser liofilizada. Por el contrario, en las suspensiones con menor inóculo vírico, la concentración vírica parecía ser mayor que el propio inóculo por algún efecto de desagregación. En cambio, si la desaparición de las partículas no infecciosas se hubiera tratado de una desestabilización de las partículas y consecuente destrucción, no se hubieran recuperado sus dsRNA genómicos posteriormente a la liofilización. Posiblemente, la presencia de inhibidores de la RT-PCR en el agua residual antes de ser liofilizada nos hizo subvalorar la carga viral real. Tras el proceso de liofilización, se eliminaron dichos inhibidores y pudimos cuantificar la cantidad real de copias de dsRNA.

Con el objetivo de valorar como podía afectar el proceso de liofilización a una suspensión vírica de rotavirus sin ser mezclada con agua residual se realizó el mismo ensayo pero con dicha suspensión directamente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.3.3.2.

TABLA 1.3.3.2. Carga vírica de las suspensiones virales utilizadas en los experimentos de la tabla 1.3.3.1., y porcentajes de recuperación tras ser liofilizados. Se muestra la cuantificación mediante cultivo celular y en sombreado la cuantificación molecular.

Exp.	Wa antes liofilización			Wa después liofilización		Recuperación (%)	
	NMP/10 ml	dsRNA/10 ml	ratio	NMP/0.1 ml	dsRNA/0.1 ml	NMP	dsRNA
A	1.2x10 ⁶	6.0x10 ⁹	1:5000	2.6x10 ⁵	5.1x10 ⁹	22.0	85.0
B	3.5x10 ⁶	1.3x10 ¹⁰	1:3675	1.3x10 ⁶	1.2x10 ¹⁰	36.2	93.4
C	1.8x10 ⁸	3.1x10 ⁹	1:17	3.3x10 ⁷	2.4x10 ⁹	18.1	76.4

Los porcentajes de recuperación de los rotavirus infecciosos presentes en el agua residual respecto los porcentajes de recuperación de los rotavirus infecciosos presentes en el propio medio de cultivo sin suero fetal eran distintos. En el caso de la recuperación a partir del agua residual la recuperación era mayor. Ello pudo ser debido a que la materia orgánica presente en el agua residual protegía las partículas víricas. En cambio, la suspensión vírica del laboratorio se encontraba diluída en medio de cultivo sin suero fetal, y sufrió entre un 6.6 y un 23.5% de inactivación debido al proceso de liofilización.

Cada una de las técnicas utilizadas para la cuantificación de rotavirus a partir de agua residual presentaba limitaciones. En el caso de la estimación de la cantidad de virus infecciosos por MPN nos encontramos que para concentraciones víricas inferiores a 50-60 NMP/ml era muy difícil la estimación debido a la toxicidad implícita del agua residual en su inoculación directa (sin diluir). Así mismo, la técnica de RT-PCR a tiempo real presentaba un límite de sensibilidad de 150 moléculas de dsRNA/ml aunque la linealidad de la cuantificación era mejor a concentraciones superiores.

1.4. DISCUSIÓN

Las aguas residuales urbanas domésticas que recibe la planta depuradora de Sant Adrià del Besòs en Barcelona se caracterizan por contener gran cantidad de materia orgánica y productos químicos. El caudal proviene del colector que recibe aguas residuales de la aglomeración urbana de Barcelona, del colector de Levante que aporta las aguas residuales de Sant Adrià de Besòs, Badalona, Montgat, Santa Coloma de Gramanet y Tiana, y del colector que recoge las aguas colindantes del margen izquierdo y derecho del río Besòs (ver figura 1.4.). Debido a la naturaleza del espécimen que se pretendía analizar fue necesario encontrar un método eficiente, sencillo y que permitiera trabajar con volúmenes relativamente pequeños. En nuestro laboratorio se había realizado una prueba piloto de utilización de la liofilización como sistema concentrador de rotavirus y eliminador de inhibidores de posibles técnicas moleculares posteriores (Gajardo *et al.*, 1995). En dicha prueba, 15 muestras de 1 ml de agua residual de este mismo origen fueron liofilizadas y resuspendidas en 50 µl de agua. En 4 de ellas se detectó rotavirus mediante

la RT-PCR-*nested* descrita por Gouvea y colaboradores en 1990 (Gouvea *et al.*, 1990). En dos de ellas se aisló el genotipo G1, en una el G2 y en la otra el G3.

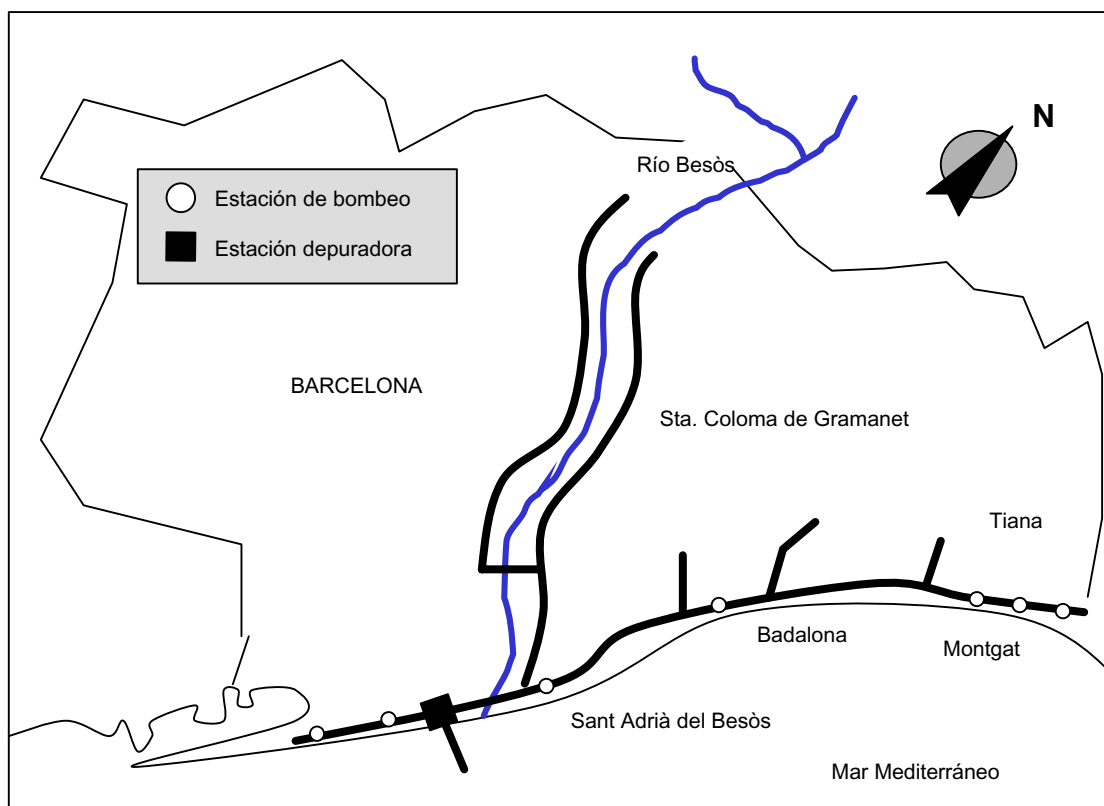


FIGURA 1.4. Plano procedencia del agua residual recogida durante el periodo de estudio.

Se quiso comparar el método de liofilización con algún otro método de concentración de virus entéricos. El método alternativo elegido fue la ultracentrifugación. Comparando ambos métodos, el porcentaje de recuperación del virus inoculado experimentalmente era prácticamente el mismo (datos no mostrados). Pero el grado de manipulación y las limitaciones del proceso debido a no disponer de un rotor de ultracentrifugación para volúmenes mayores de 8 ml hacía idóneo el método de la liofilización. La liofilización es un sistema sencillo, de fácil manejo y que permite procesar gran número de muestras a la vez. Para el análisis de una sola muestra es más rápido el sistema de ultracentrifugación, pero para el procesamiento de un alto número de muestras, la liofilización ofrece mayor rapidez.

Adicionalmente, se necesitaba un método molecular de detección de rotavirus que ofreciera una gran sensibilidad, especificidad y que fuera capaz de detectar el mayor número de cepas conocidas posibles de rotavirus del grupo A. Se escogió la detección de un fragmento de 186 pb del sexto segmento vírico altamente conservado entre todos los

rotavirus del grupo A conocidos. La proteína codificada por este segmento (la proteína VP6) presenta epítomos muy conservados, y es el principal antígeno utilizado en las pruebas de diagnóstico (Estes, 2001). Existían otros *primers* descritos específicos del sexto segmento de rotavirus pero no eran tan homólogos a las secuencias nucleotídicas de todas las cepas de rotavirus del grupo A conocidas como lo eran VP6-3 y VP6-4 (Green y Lewis, 1995; Nilsson *et al.*, 2000; Iturriza-Gómara *et al.*, 2002). Los *primers* de Green y Lewis (1995) son diferentes a los del presente trabajo pero amplifican la misma región que amplificamos con nuestros *primers*.

Tras la puesta a punto de la metodología se procedió a su aplicación en un brote de gastroenteritis declarado en Albania a finales del mes de diciembre de 2000. Dicho brote afectó a 2722 niños, de los cuales, 982 (56.4%) necesitaron atención médica. El 89.7% de afectados eran niños de entre 0 y 5 años de edad. De 28 muestras de heces analizadas, se detectó presencia de rotavirus en 25 de ellas. Posteriormente se caracterizaron genótipicamente mediante la metodología descrita en el capítulo 3 del presente trabajo. Se trataba de un brote de gastroenteritis probablemente de origen acuático provocado por una cepa de rotavirus G9P[8]1A. Tres de las mencionadas muestras presentaban coinfección con G3 y una muestra coinfección con P[6]2. También se detectaron dos muestras G2P[6]2 y una muestra G1P[6]2 (Villena *et al.*, 2003b).

Para poder valorar la eficiencia del sistema de liofilización, como sistema de recuperación de rotavirus a partir de agua residual para su posterior detección molecular, se necesitaba de un método de cuantificación molecular. Se decidió utilizar la PCR a tiempo real por ser un método sensible, reproducible, rápido y que reducía el riesgo de contaminación por no necesitar manipulación al finalizar la PCR (Freeman *et al.*, 1999; Mackay *et al.*, 2002; Klein, 2002). Se decidió utilizar los mismos *primers* que los utilizados en la detección molecular por sus características intrínsecas (T_m cercana a 60°C y longitud 20 nt) y extrínsecas (específicos de una región altamente conservada entre los rotavirus del grupo A).

Durante la puesta a punto de tal metodología aparecieron varias dificultades. La imposibilidad de diseñar una sonda específica de una región altamente conservada y que reuniera las condiciones óptimas para la PCR cuantitativa condujo a la utilización del *SYBR Green* como marcador de ácidos nucleicos. La existencia de dímeros de *primers* nos llevó a la necesidad de aumentar las condiciones de astringencia de la PCR y a la modificación de las condiciones habituales de lectura y análisis de los registros. Otra complicación adicional fue la necesidad de construir un RNA patrón con el que interpolar los valores de fluorescencia. El RNA patrón debía ser lo más parecido posible al RNA vírico, y por tanto, cumplir ciertos requisitos: debía ser de doble cadena, conservar la región de los *primers* y ser distinguible del RNA vírico para poder ser identificado tanto en caso de contaminación como para poder ser utilizado en RT-PCRs competitivas. Es por

eso que se decidió construirlo a partir del propio RNA vírico (para conservar la región de los *primers*), deleccionarle una zona interna (para que tuviera una longitud diferente) y sintetizar RNA con las dos polaridades (para formar posteriormente dsRNA). Finalmente se consiguió detectar hasta 1 molécula de dsRNA patrón pero la mejor linealidad se encontraba entre las 10 y 10^6 moléculas de dsRNA, resultado similar al presentado por Schwarz y colaboradores (Schwarz *et al.*, 2002) dónde ponen a punto una metodología similar para aplicar en muestras clínicas.

Una vez puesta a punto la PCR cuantitativa a tiempo real se valoró la eficiencia del sistema de la liofilización como método de concentración vírica y de eliminación de inhibidores de posteriores técnicas moleculares. Para ello se utilizó una cepa de rotavirus humano adaptada a la propagación *in vitro*. Debe tenerse en cuenta que a pesar de que el lugar de recogida del agua residual siempre era el mismo, existía una gran variabilidad visual (color, material en suspensión, dilución pluvial, etc.). Las suspensiones virales utilizadas también fueron diferentes a fin de aumentar la variabilidad entre experimentos. Los resultados, mostrados en la tabla 1.3.3.1., permitieron obtener unos porcentajes de recuperación elevados. En algunos experimentos los valores de copias genómicas recuperadas eran superiores a los preexistentes en las soluciones iniciales antes de ser liofilizadas. Una probable explicación pudiera ser el efecto agregador que existía al poner en contacto la suspensión vírica con el agua residual pero tal efecto no era observable en la cuantificación de virus infecciosos (MPN). Otra posible explicación pudiera ser la variabilidad existente al tomar una alícuota de la solución inicial donde se captura 50 μ l de un volumen total de 50 ml (una fracción 1/1000), mientras que del concentrado liofilizado se tomó 50 μ l de un total de 500 μ l (una fracción 1/10). Otra posible explicación podría ser la eliminación de inhibidores de las técnicas moleculares posteriores mediante la propia liofilización. Dicho efecto ya fue observado anteriormente en experimentos de recuperación de astrovirus a partir de agua residual mediante liofilización (Pintó *et al.*, 2001). Es posible que ambas circunstancias influyeran en estos resultados. A pesar de todas estas discrepancias, los porcentajes de recuperación de las copias genómicas no fueron inferiores al 47% en ningún caso.

Se incluyó la titulación por MPN del número de rotavirus infecciosos para conocer el grado de inactivación de rotavirus sometidos a liofilización de una duración de 48 horas. Los resultados obtenidos mostraron que la recuperación del virus infeccioso es cada vez menor cuanto menor es la concentración vírica (ver tabla 1.3.3.1.). En varios casos se recuperó el 100% del virus infeccioso inoculado. Experimentos posteriores de liofilización de suspensiones de rotavirus en el propio medio de cultivo libre de suero fetal dónde habían sido propagados mostraron una recuperación máxima del 36% de virus infeccioso (ver tabla 1.3.3.2.). Ello sugirió que la propia materia orgánica presente en el agua residual podía actuar como agente protector de los virus presentes. El resto de disparidad de

porcentajes de recuperación del virus infeccioso pudo ser debida a muchos factores incontrolables como la composición del agua residual o la tendencia del propio virus a agregarse. Las discrepancias del título vírico de la solución previamente a ser liofilizada no son tan evidentes en la cuantificación por cultivo celular, posiblemente porque el volumen titulado por infectividad fue veinte veces mayor (10 μ l en la RT-PCR cuantitativa frente los 200 μ l en la titulación mediante cultivo celular), y porque dicha cuantificación no se encuentra afectada por la existencia de inhibidores de las técnicas moleculares.

De todos estos resultados se concluye que la liofilización es un buen método de concentración de rotavirus a partir de pequeños volúmenes de agua residual tanto para la cuantificación molecular posterior como para la recuperación de rotavirus con capacidad infectiva.

CAPÍTULO 2

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ROTAVIRUS EN AGUA RESIDUAL

2.1. ANTECEDENTES

Las gastroenteritis víricas son un problema clínico frecuente e infradiagnosticado (García *et al.*, 1999). Se calcula que representan un 30 o 40% de las gastroenteritis agudas (Blacklow y Greenberg, 1991). Los agentes causales identificados con mayor frecuencia en niños menores de 5 años son los rotavirus del grupo A aunque también se aislan calicivirus, astrovirus, adenovirus, enterovirus, y reovirus (García *et al.*, 1999; Wilhelmi *et al.*, 2003). En España entre 1989 y 1995 se declararon 8265 hospitalizaciones causadas por rotavirus. De los que se conocía la edad (5241 pacientes) el 89.2% eran niños menores de 5 años, representando los rotavirus un 21.8 % de todos los patógenos identificados en heces de niños menores de 5 años (Visser *et al.*, 1999). En Cataluña 6711 casos de rotavirus fueron declarados al Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya desde 1995 hasta 2002. El 76.1% de los casos correspondía a niños menores de 2 años y la mayor incidencia se encontraba durante los meses de invierno (datos facilitados por la Dra. Ángela Domínguez del Departament de Sanitat i

Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya). Los rotavirus pueden causar infecciones subclínicas o gastroenteritis de intensidad entre media y grave, autolimitantes, caracterizadas por vómitos, diarreas acuosas y un poco de fiebre (Kapikian *et al.*, 2001).

Un paciente con diarrea causada por rotavirus puede llegar a excretar 10^{10} - 10^{11} partículas por gramo de heces diarreicas (Flewett y Woode, 1978). En un estudio llevado a cabo en el *Royal Children's Hospital* de Victoria, Australia, con 37 niños con edades comprendidas entre 1-39 meses ingresados por diarrea aguda causada por rotavirus, se llegó a detectar por RT-PCR (en 11 de ellos) excreción de rotavirus hasta 57 días después del ingreso (Richardson *et al.*, 1998). Otros estudios similares revelaron una excreción de hasta 10 o incluso 20 días, pero las técnicas de detección eran distintas, y probablemente, menos sensibles (Pickering *et al.*, 1988). Por otro lado, la excreción de rotavirus por personas asintomáticas ha sido bien documentada y puede jugar un importante papel en el endemismo de la enfermedad (Barnes *et al.*, 2003).

Los rotavirus son transmitidos por la vía fecal-oral. La dispersión persona a persona a través de manos contaminadas es probablemente la más importante en pequeñas comunidades, tales como centros pediátricos, centros geriátricos, etc. Los manipuladores de alimentos pueden contaminar comida al manipularla, y si no existe una posterior cocción (ensaladas, frutas, etc.) puede representar una fuente de infección. En un estudio llevado a cabo en la unidad pediátrica del Hospital Universitario de Grenoble, Francia, se intentó determinar el posible contagio a través de superficies inanimadas. Realizaron detección de rotavirus por RT-PCR en 55 superficies del hospital como manos, termómetros, material de limpieza, instrumental médico, etc. Se encontró una alta positividad (un 46% de las superficies estudiadas), siendo principalmente termómetros y alfombras las superficies más contaminadas (Soule *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta este hecho y la baja dosis infecciosa, que oscila entre las 10 y 100 partículas víricas infecciosas (Kapikian *et al.*, 2001) no es de extrañar la cantidad de infecciones nosocomiales que se producen.

Los rotavirus pueden ser muy estables en el ambiente (Estes *et al.*, 1979; Gironés *et al.*, 1989). El rotavirus Ito^r p13 resistió una desecación de hasta 60 días en una superficie inanimada sin pérdida apenas de título infeccioso (Abad *et al.*, 1994). Los rotavirus y el virus de la hepatitis A fueron los más resistentes frente la desecación respecto otros virus entéricos humanos (Abad *et al.*, 1994). En ambiente acuático como aguas altamente contaminadas y a 20°C, el rotavirus SA11 apenas mostró pérdida de título infeccioso durante 12-14 días, mientras que en aguas de estuario con una salinidad entre 26 y 30 gr/l el título infeccioso disminuyó aproximadamente 2 log₁₀ en los primeros 5-10 días (Hurst y Gerba, 1980). El agua residual contiene detergentes y compuestos químicos que pueden afectar la viabilidad de los rotavirus. En un estudio llevado a cabo en Nuevo Méjico, Estados Unidos, se intentó conocer el efecto del agua residual en los rotavirus. Se observó

que el material particulado y algunos detergentes no-iónicos podían ayudar a estabilizar las partículas víricas y reducir su inactivación frente otros factores como la temperatura o la presencia de detergentes iónicos con efecto virucida (Ward y Ashley, 1980). En otro estudio llevado a cabo en la Universidad de Michigan, Estados Unidos, se sometió un rotavirus de origen bovino a diferentes temperaturas, sin luz y con agitación continua. Para conseguir una reducción del 90% del título infeccioso en el agua residual se necesitaron 7 días a 26°C y 84 días a 8°C, 9 días más -en el caso de 8°C- que suspendiéndolo en agua destilada (Mc Daniels *et al.*, 1983).

En conjunto no es de extrañar la emergencia de brotes ya que se excretan en grandes cantidades, resisten bien las condiciones ambientales y la dosis infecciosa requerida para inducir la enfermedad es muy baja. También se conoce que las medidas sanitarias adecuadas para frenar la transmisión de las bacterias y los parásitos pueden ser ineficaces para el control de rotavirus. Los rotavirus del grupo A son endémicos mundialmente. Es la principal causa de diarrea severa en recién nacidos y niños, y alrededor de la mitad de los casos, requieren hospitalización. En áreas templadas las infecciones por rotavirus aparecen principalmente en invierno pero en los trópicos se distribuyen durante todo el año (Ansari *et al.*, 1991).

El número de casos clínicos declarados de gastroenteritis agudas causados por rotavirus, y la aparición de brotes, siguen una estacionalidad en nuestras latitudes. Recopilando la información publicada en diferentes países europeos, el máximo de infección sintomática ocurre primero en España en el mes de diciembre, seguido de Francia en febrero, Reino Unido en febrero-marzo y Holanda y Finlandia en marzo (Koopmans y Brown, 1999). Esta información proviene de los sistemas de recopilación de datos procedentes de los laboratorios de diagnóstico de los años 1989-1995 en España, 1988-1992 en Francia, 1981-1996 en Holanda, 1976-1995 en Finlandia y 1990-1996 en Reino Unido. No se sabe si esta clara estacionalidad se encuentra reflejada en el agua residual. En estudios realizados en Barcelona no se encontró estacionalidad en el agua residual del área urbana de dicha ciudad (Bosch *et al.*, 1988b).

Analizando animales filtradores marinos o de agua dulce que reciban continua emisión de agua urbana es posible también investigar lo que ocurre en el ambiente. En un estudio llevado a cabo en Nantes, Francia, se detectó la presencia de diferentes virus entéricos en diferentes especies de mariscos (en *Crassostrea gigas* y en *Mytilus galloprovincialis*) cultivados en 5 lugares diferentes de la costa francesa durante 3 años. A lo largo de los tres períodos anuales se detectó marisco contaminado con rotavirus, observándose los mayores porcentajes de contaminación durante diciembre, enero y febrero (Le Guyader *et al.*, 2000).

Ha sido demostrado que los rotavirus pueden retener su infectividad varios días en ambiente acuoso (Hurst y Gerba, 1980), y que se encuentran altos títulos de rotavirus infeccioso en agua residual (Bosch *et al.*, 1988a; Smith y Gerba, 1982). El objetivo de este capítulo fue tratar de descifrar que ocurría en el agua residual de Barcelona y establecer si existía o no estacionalidad tanto en la presencia como en la cantidad de rotavirus presentes en el agua residual a lo largo del año.

2.2.MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. MUESTRAS

Desde junio de 1998 hasta enero de 2003 se recogieron mensualmente 50 ml de agua residual cruda del colector de entrada de la planta depuradora de Sant Adrià del Besós. En menos de una hora fueron congeladas a -80°C en contenedores estériles de 50 ml hasta ser sometidas al proceso de concentración por liofilización descrito en el capítulo anterior.

2.2.2. DETECCIÓN, CONFIRMACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ROTAVIRUS

La obtención de ácidos nucleicos a partir de las muestras concentradas (factor de concentración 100 veces) se realizó mediante el método de Boom y colaboradores (Boom

et al., 1990), descrito en el capítulo anterior. Una vez obtenido el RNA vírico se sometió a los diferentes protocolos de detección y cuantificación descritos en el capítulo anterior.

2.2.3. DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE ASTROVIRUS, VIRUS DE LA HEPATITIS A Y NOROVIRUS

ASTROVIRUS

La metodología empleada para la detección de astrovirus a partir del extracto de RNA se fundamenta en la publicada en Guix *et al.*, 2002. El protocolo utilizado era el siguiente:

1 µl extracto ácidos nucleicos + 9 µl H ₂ O		
Choque térmico 5' a 99°C		
Colocado inmediatamente en hielo		
Preparación de la mezcla de reacción para la RT		
Componente	Volumen	Concentración final
5X Tampón de RT Expand	4 µl	1X
100 mM DTT	2 µl	10 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	2 µl	0.2 mM
0.1 mM <i>primer A2/A2bis</i> ¹	0.2 µl	1 µM
50 U/µl Transcriptasa Reversa Expand	0.1 µl	5 U
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	1.7 µl	
Extracto ácidos nucleicos 1/10	10 µl	
Volumen total	20 µl	
Incubación 1h 42°C		

Preparación de la mezcla de reacción para la PCR			
Componente	Volumen	Concentración final	
10X Tampón de PCR Expand	5 µl	1X	
25 mM MgCl ₂	4 µl	2 mM	
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	5 µl	0.2 mM	
0.1 mM <i>primer A1/A1bis</i> ¹	0.25 µl	0.5 µM	
0.1 mM <i>primer A2/A2bis</i> ¹	0.25 µl	0.5 µM	
3.5 U/µl HF PCR Expand polimerasa	0.15 µl	0.5 U	
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	25.35 µl		
Producto de la reacción RT	10 µl		
Volumen total	50 µl		
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	3'	95°C	1X
Desnaturalización	30"	94°C	40X
Hibridación	1'	55°C	
Extensión	30"	72°C	
Extensión final	7'	72°C	1X

¹ Los *primers* A1 y A2 detectan serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 8, mientras que los *primers* A1bis y A2bis detectan serotipos 6 y 7.

Finalizado el proceso, 10 µl del producto amplificado eran sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1X. Posteriormente, dicho gel era teñido con bromuro de etidio o GelStar. El tamaño de los fragmentos esperados oscilaba entre 189 y 237 pb.

La confirmación del producto de PCR se realizó mediante hibridación-Southern blot con una sonda específica y común a todas las cepas de astrovirus conocidas hasta la fecha, tal y como describen Guix y colaboradores (Guix *et al.*, 2002).

VIRUS DE LA HEPATITIS A

La metodología empleada para la detección del virus de la hepatitis A (HAV) a partir del extracto de RNA se fundamenta en la amplificación de un fragmento de la región 5' del genoma vírico mediante RT-PCR (Sánchez *et al.*, 2002). El protocolo seguido se detalla a continuación.

1 µl extracto ácidos nucleicos + 9 µl H ₂ O Choque térmico 5' a 99°C Colocado inmediatamente en hielo		
Preparación de la mezcla de reacción para la RT		
Componente	Volumen	Concentración final
5X Tampón de RT Expand	5 µl	1X
100 mM DTT	1.25 µl	10 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	2.5 µl	0.2 mM
0.1 mM <i>primer</i> HAV 240	0.125 µl	1 µM
50 U/µl Transcriptasa Reversa Expand	0.125 µl	5 U
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	6 µl	
Extracto ácidos nucleicos 1/10	10 µl	
Volumen total	25 µl	
Incubación 1h 45°C		

Preparación de la mezcla de reacción para la PCR		
Componente	Volumen	Concentración final
10X Tampón de PCR Expand	5 µl	1X
15 mM MgCl ₂		1.5 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	5 µl	0.2 mM
0.1 mM <i>primer</i> HAV 240	0.25 µl	0.5 µM
0.1 mM <i>primer</i> HAV 68	0.25 µl	0.5 µM
3.5 U/µl HF PCR Expand polimerasa	0.15 µl	0.5 U
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	29.35 µl	
Producto de la reacción RT	10 µl	
Volumen total	50 µl	

Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	4'	94°C	1X
Desnaturalización	1'	94°C	40X
Hibridación	1'	55°C	
Extensión	1'30"	72°C	
Extensión final	10'	72°C	1X

Finalizado el proceso, 10 µl del producto amplificado eran sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1X. Posteriormente, dicho gel era teñido con bromuro de etidio o GelStar. El tamaño del fragmento esperado era de 174 pb.

La confirmación del producto de PCR se realizó mediante hibridación-Southern blot con una sonda específica y común a todas las cepas de HAV conocidas hasta la fecha (Sánchez *et al.*, 2002).

NOROVIRUS

La metodología empleada para la detección de Norovirus (NV) a partir del extracto de RNA se fundamenta en la amplificación de un fragmento de 327 pb del gen que codifica la RNA polimerasa viral. El protocolo es una adaptación del descrito por Vinjé y Koopmans (Vinjé y Koopmans, 2000), que se halla detallado seguidamente.

1 µl extracto ácidos nucleicos + 9 µl H ₂ O Choque térmico 5' a 99°C Colocado inmediatamente en hielo		
Preparación de la mezcla de reacción para la RT		
Componente	Volumen	Concentración final
5X Tampón de RT Expand	4 µl	1X
100 mM DTT	2 µl	10 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	2 µl	0.2 mM
0.1 mM <i>primer</i> JV13I	0.2 µl	1 µM
50 U/µl Transcriptasa Reversa Expand	0.1 µl	5 U
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	1.7 µl	
Extracto ácidos nucleicos 1/10	10 µl	
Volumen total	20 µl	
Incubación 1h 42°C		

Preparación de la mezcla de reacción para la PCR			
Componente	Volumen	Concentración final	
10X Tampón de PCR Expand	5 µl	1X	
15 mM MgCl ₂		1.5 mM	
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	2.5 µl	0.1 mM	
0.1 mM <i>primer</i> JV13l	0.25 µl	0.5 µM	
0.1 mM <i>primer</i> JV12b	0.25 µl	0.5 µM	
3.5 U/µl HF PCR Expand polimerasa	0.15 µl	0.5 U	
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	31.85 µl		
Producto de la reacción RT	10 µl		
Volumen total	50 µl		
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	3'	95°C	1X
Desnaturalización	1'	94°C	40X
Hibridación	1' 30"	37°C	
Extensión	1'	72°C	
Extensión final	7'	72°C	1X

Finalizado el proceso, 10 µl del producto amplificado eran sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X. Posteriormente, dicho gel era teñido con bromuro de etidio o GelStar.

El método escogido para confirmar las muestras positivas e incluso, para incrementar levemente la sensibilidad, servía a la vez para genogrupar. Las sondas empleadas fueron las descritas en Vinjé y Koopmans (Vinjé y Koopmans, 2000) pero conjugadas con biotina. La GGla reconocía al genogrupo Ia (Norwalk), la GGlb reconocía cepas genogrupo Ib (Southampton, Desert Shield, Queens Arms, etc.) y la GGII permitía detectar cepas genogrupo II (Hawai, México, LordSDale, etc.). Este método requería el marcaje previo del amplificado con digoxigenina. Para ello se obtenía nuevamente producto de PCR a partir del cDNA pero utilizando una mezcla de nucleótidos con uno de ellos conjugado con digoxigenina (dATP, dCTP, dGTP, dTTP y DIG-11-dUTP) (Roche).

Una vez obtenido el amplímero marcado con digoxigenina se realizaba una ELISA con el kit *ELISA DIG detection* (Roche). Las sondas eran unidas a la base del pocillo gracias a la presencia de estreptavidina en el soporte en formato de placa de 96 pocillos, y el amplificado se unía a su correspondiente sonda mediante simple hibridación (ver figura 2.2.3.1.). El protocolo utilizado era el siguiente:

- Se mezclaron 20 µl de solución desnaturalizante y 15-20 µl del amplímero marcado con digoxigenina en un tubo de 1.5 ml. Al control negativo se le añadió H₂O_{bd}. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- Se añadió solución de hibridación hasta alcanzar 250 μ l de volumen total y una concentración de 7.5 pmol/ml de sonda marcada con biotina.
- Se transfirió 200 μ l de la solución resultante a cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (los cuales estaban recubiertos con estreptavidina). Se cubrieron con un adhesivo para evitar la evaporación y se incubaron durante 3 horas a 41°C.
- Se realizaron 5 lavados con el *washing buffer* suministrado por el *kit*.
- Se añadió 200 μ l de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa diluído 1:100 y se volvió a cubrir con el adhesivo para realizar una incubación de 45 minutos a 37°C en agitación.
- Se llevaron a cabo otros 5 lavados con *washing buffer* y se añadió 200 μ l de sustrato ABTS (suministrado también por el *kit*) por pocillo. Se favoreció la reacción a 37°C hasta la aparición de color y se realizó la lectura de la absorbancia a 405 nm.

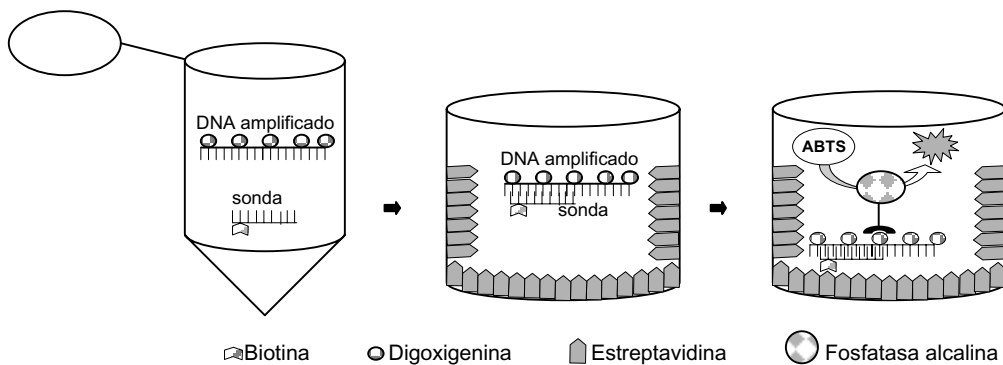


FIGURA 2.2.3.1. Esquema del método de hibridación y revelado del amplímero marcado con digoxigenina.

Una muestra era considerada positiva si el valor de la absorbancia resultante era mayor que el valor medio de los negativos más 3 veces la desviación estándar.

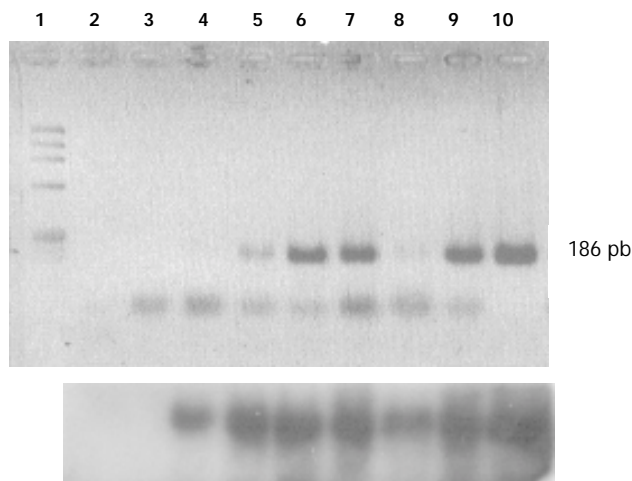
2.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa informático STATISTICA para Windows edición '98 (StatSoft, Inc.). Para conocer si los datos obtenidos seguían una distribución normal se utilizaron los análisis de Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors y Shapiro-Wilk. Los análisis de variabilidad entre grupos de valores con una distribución no paramétrica se llevaron a cabo mediante el test U de Mann-Whitney. El coeficiente de Spearman, Gamma, Kendall Tau y el análisis de regresión se utilizaron para los análisis de correlación. Para todos ellos se consideró un nivel de significación $p < 0.05$ (intervalo de confianza del 95%) para determinar si los datos obtenidos eran estadísticamente significativos.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. ROTAVIRUS EN AGUAS RESIDUALES DE BARCELONA

Durante un periodo de más de 4 años se recogieron mensualmente muestras de agua residual urbana de Barcelona, con la finalidad de evaluar la presencia o ausencia de rotavirus. Una vez concentrados 50 ml de agua residual mediante liofilización, se resuspendió el *pellet* en 0.5 ml de agua desionizada y se procedió a la extracción de ácidos nucleicos. Éstos eran sometidos a las diferentes RT-PCRs para determinar la presencia de diferentes virus entéricos en las muestras obtenidas.



Carril 1: marcador Φ X174/*Hae* III (1353, 1078, 872, 603, 310, 281/271, 234, 194, 118 y 72 pb)

Carriles 2 y 3: controles negativos RT y PCR

Carriles 4-9: muestras de agua residual de Barcelona

Carril 10: control positivo (clarificado rotavirus humano Wa)

FIGURA 2.3.1.1. Muestra del resultado de una RT-PCR de un fragmento de VP6 de rotavirus en un gel 2% de agarosa en TBE 1X y su respectiva confirmación por hibridación-Southern blot. El método de confirmación empleado permitía incrementar la sensibilidad (véase carril 4 y 8 dónde las bandas en el gel eran inexistentes o muy débiles respectivamente, pero en cambio, muy visibles en el film fotográfico revelado después de la hibridación-*Southern blot*).

Los rotavirus se detectaron de forma continuada a lo largo de todo el período de estudio. En 248 de 396 muestras analizadas desde junio de 1998 hasta enero de 2003 se detectaron rotavirus (un 62.6 % de positividad), presumiblemente humanos, debido al origen urbano del agua residual.

Los rotavirus fueron los virus entéricos más frecuentemente encontrados en las aguas residuales de Barcelona (ver figura 2.3.1.2.). Cabe considerar que existe una gran variabilidad tanto en el número de muestras recogidas en cada uno de los años como en el número de muestras analizadas para cada uno de los virus estudiados (ver tabla 2.3.1.1.). Agrupando los diferentes meses del estudio en periodos cálidos y periodos fríos es posible observar que los rotavirus se encuentran presentes durante todo el tiempo de estudio sin apreciarse una clara estacionalidad.

TABLA 2.3.1.1. Porcentajes de positividad para los diferentes virus entéricos en las muestras de agua residual de Barcelona recogidas desde junio de 1998 hasta enero de 2003.

	% muestras positivas			
	HRV ^a	HAsV ^b	HAV ^c	NV ^d
6/98 - 10/98 ^e	25.0 n=36	20.0 n=30	14.3 n=35	0.0 n=10
11/98 - 04/99 ^f	61.8 n=55	29.1 n=55	18.2 n=55	25.0 n=12
05/99 - 10/99	48.6 n=70	13.2 n=68	10.0 n=70	8.3 n=12
11/99 - 04/00	64.1 n=156	6.4 n=156	25.0 n=12	33.3 n=12
05/00 - 6/00	94.7 n=19	31.6 n=19	100.0 n=3	66.7 n=3
11/00 - 04/01	88.8 n=18	44.4 n=18	0.0 n=18	55.5 n=18
05/01 - 10/01	91.7 n=12	50.0 n=12	8.3 n=12	0.0 n=12
11/01 - 04/02	100.0 n=12	91.7 n=12	8.3 n=12	0.0 n=12
05/02 - 10/02	91.7 n=12	100.0 n=12	0.0 n=12	8.3 n=12
11/02 - 01/03	50.0 n=6	66.7 n=6	33.3 n=6	0.0 n=6
Total	62.6 n=396	22.7 n=388	13.6 n=235	19.3 n=109

^a Rotavirus humanos del grupo A.

^b Astrovirus humanos.

^c Virus de la hepatitis A.

^d Norovirus

^e Periodo considerado cálido (área transparente).

^f Periodo considerado frío (área sombreada).

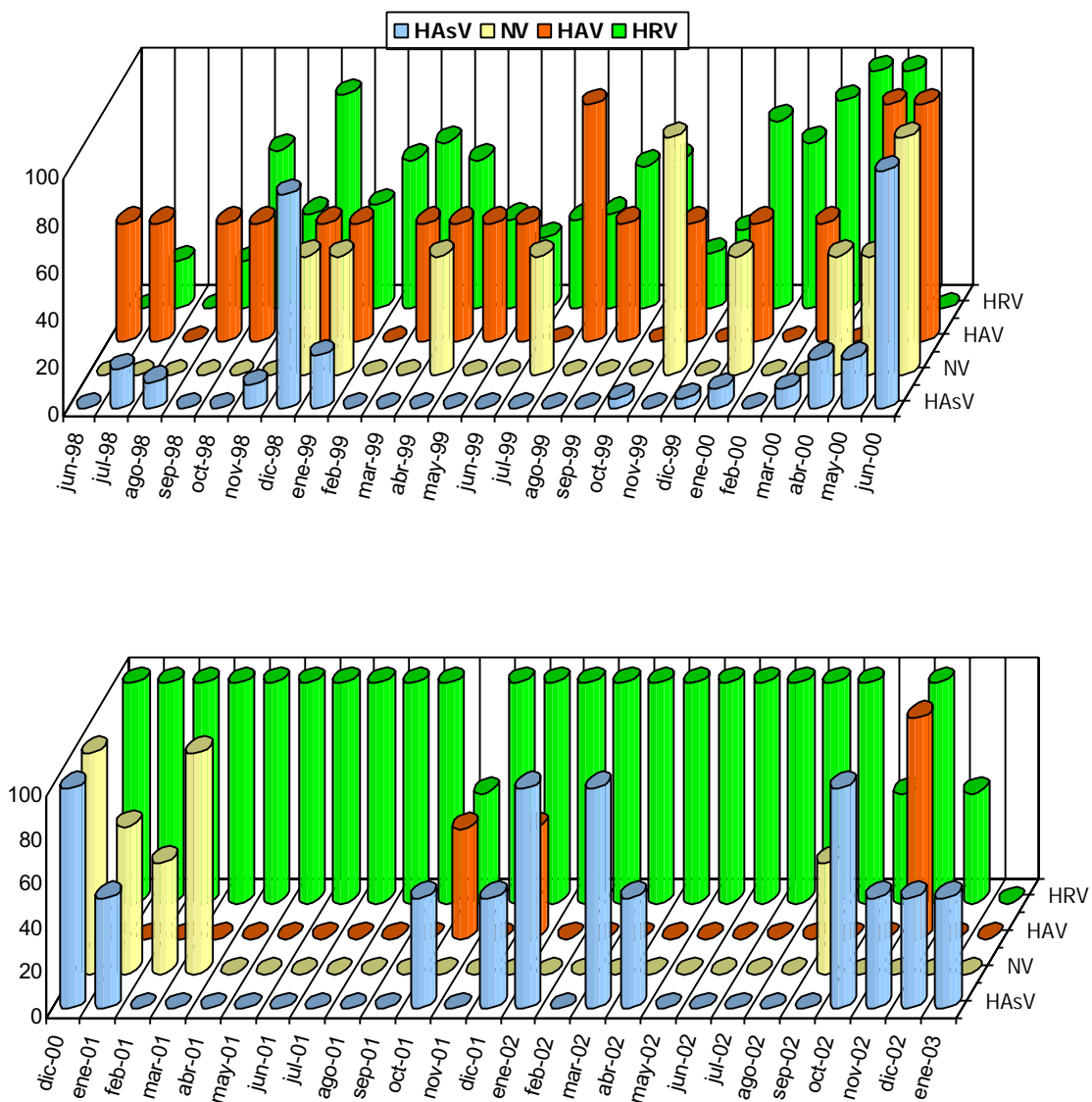


FIGURA 2.3.1.2. Distribución mensual de los diferentes virus entéricos estudiados en el agua residual de Barcelona, expresados en porcentajes de positividad respecto al total de muestras analizadas.

2.3.2. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DE ROTAVIRUS EN LAS AGUAS RESIDUALES DE BARCELONA

La presencia de rotavirus en el agua residual del área urbana de Barcelona era casi constante a lo largo del año, no pudiéndose observar estacionalidad. Dado que se encuentra bien documentada la estacionalidad clínica de rotavirus, decidimos investigar las posibles diferencias en la carga viral de dichas aguas a lo largo del año. Para ello, cuantificamos el número de copias genómicas presentes en el concentrado (100x) de agua residual mediante RT-PCR a tiempo real en cada una de las muestras en las que previamente habíamos detectado presencia de rotavirus. El resultado se muestra en la figura 2.3.2.1. Tan sólo fue posible cuantificar un 68% de las 248 muestras en las que se detectó presencia de rotavirus (ver tabla 2.3.2.1.). Ello pudiere deberse al deterioro de los rotavirus presentes en las muestras pese a su conservación a -80°C , pues la cuantificación se realizó en el año 2003.

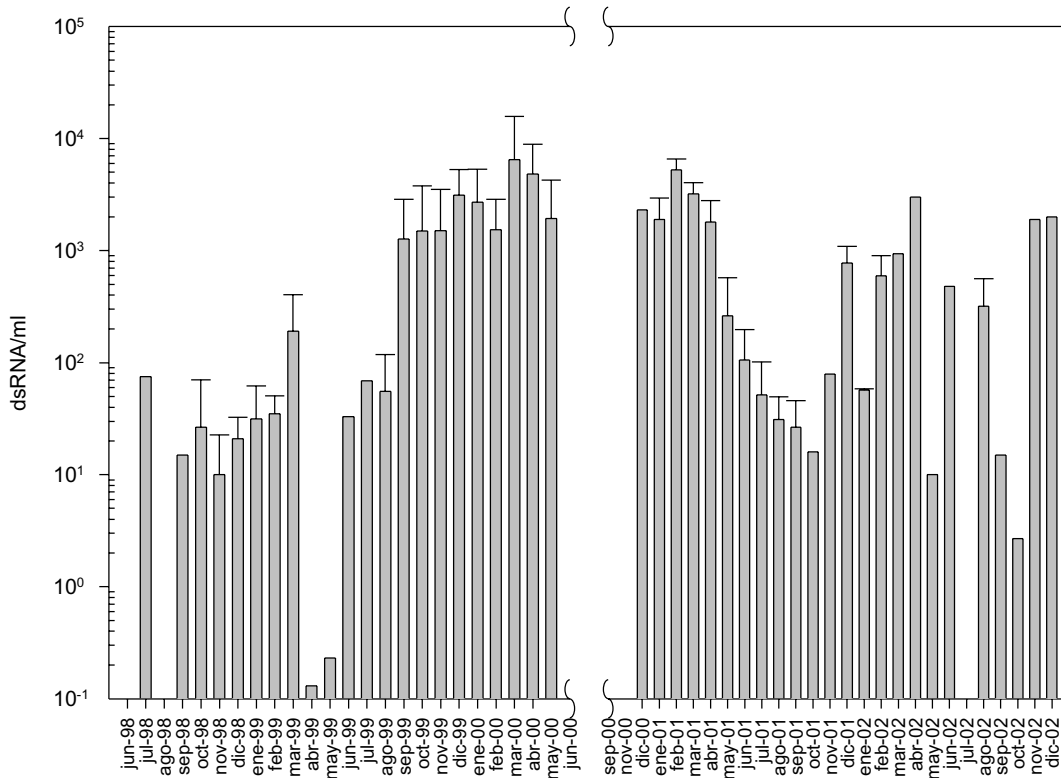


FIGURA 2.3.2.1. Carga viral media mensual (dsRNA de rotavirus por ml) en el agua residual de Barcelona durante todo el período de estudio. Durante el periodo comprendido entre julio y octubre de 2000 no se muestreó. La barra vertical de error representa la desviación estándar.

De las 169 muestras en las que fue posible conocer la carga de rotavirus presente, 50 pertenecían al periodo considerado cálido (Mayo-Octubre), lo cual representaba un 33.5%

respecto al total de muestras analizadas pertenecientes a este período, y 119 pertenecían al periodo frío (Noviembre-Abril), un 48.2% respecto al total de muestras analizadas pertenecientes a este período. Dicho de otro modo, de las 83 muestras pertenecientes al periodo cálido en las que se detectó presencia de rotavirus tan sólo fue posible cuantificar 50 de ellas (60.2%) y de las 165 pertenecientes al período frío, que también contenían rotavirus, fue posible cuantificar 119 (72.1%). Así, disponíamos de un mayor número de muestras recogidas en el periodo frío (un 62.4% de las muestras), que presentaban una mayor positividad y un mayor porcentaje de muestras cuantificables, aunque las diferencias con el período cálido no eran significativas.

TABLA 2.3.2.1. Número y porcentajes de las muestras cuantificadas mediante RT-PCR a tiempo real respecto al número de muestras positivas para rotavirus en cada uno de los períodos.

	periodo cálido	periodo frío	nº muestras totales
nº muestras recogidas	149 (37.6%) ^a	247 (62.4%)	396 (100.0%)
nº muestras con rotavirus	83 (55.7%) ^b	165 (66.8%)	248 (62.6%) ^d
nº muestras cuantificadas	50 (60.2%) ^c	119 (72.1%)	169 (68.1%) ^e

^a Porcentaje de muestras respecto al total recogidas.

^b Porcentaje respecto al número total de muestras disponibles de ese período de tiempo.

^c Porcentaje respecto al número de muestras positivas de ese período de tiempo.

^d Porcentaje de muestras positivas para rotavirus respecto al total de muestras analizadas.

^e Porcentaje de muestras cuantificadas respecto al número total de muestras en las que previamente se detectó presencia de rotavirus.

La distribución de los datos obtenidos de la carga viral del agua residual no siguió una distribución normal (ver figura 2.3.2.2.). Transformando estos datos al log+1 o la raíz cuadrada seguían sin ajustarse a una distribución normal (ver figura 2.3.2.3. y 2.3.2.4.). El análisis Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors y el análisis Shapiro-Wilk también nos indicaban que en ningún caso estos valores se ajustaban a una distribución normal.

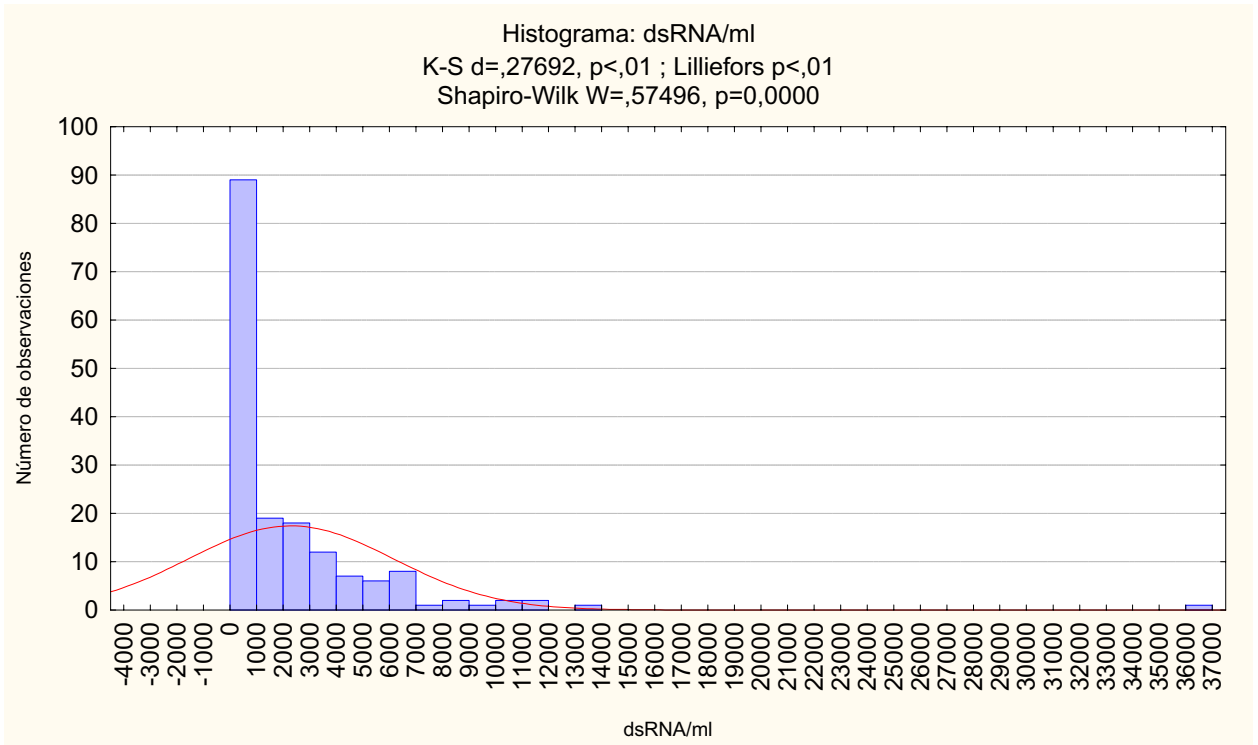


FIGURA 2.3.2.2. Distribución de las cargas virales presentes en el agua residual agrupadas en intervalos de 1000 copias de dsRNA/ml. Número de observaciones equivale a número de muestras.

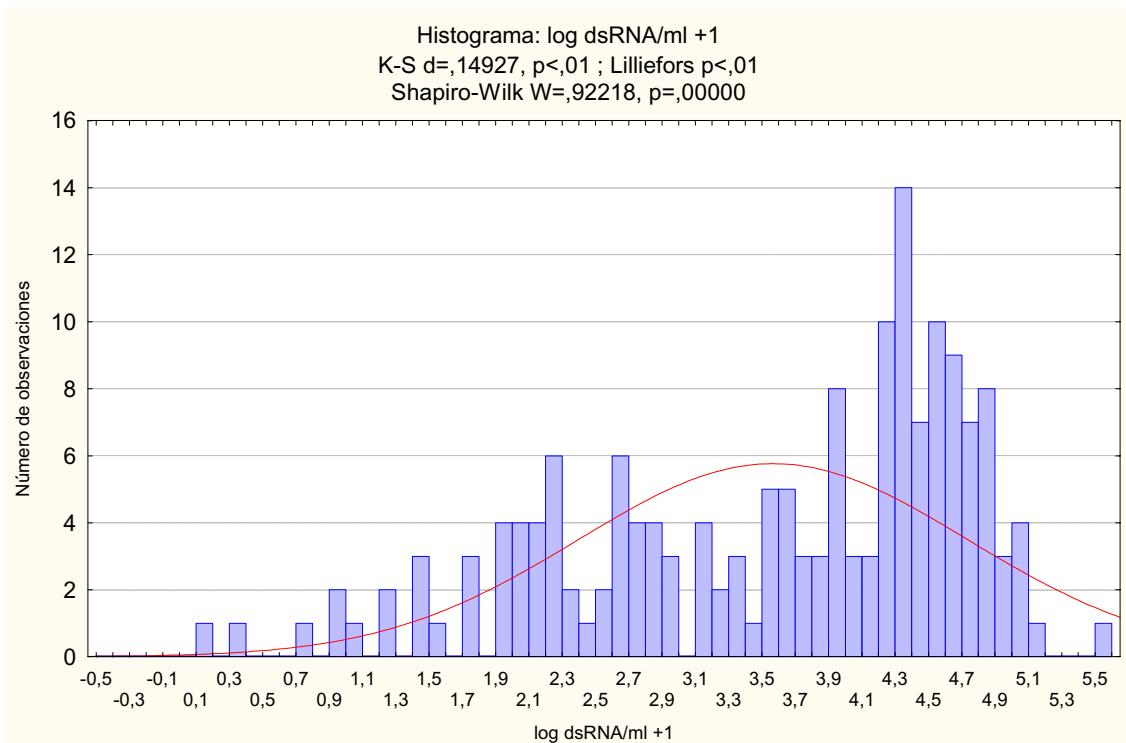


FIGURA 2.3.2.3. Distribución del log +1 de la carga viral presente en el agua residual agrupados en intervalos de 0.1 log copias de dsRNA/ml. Número de observaciones equivale a número de muestras.

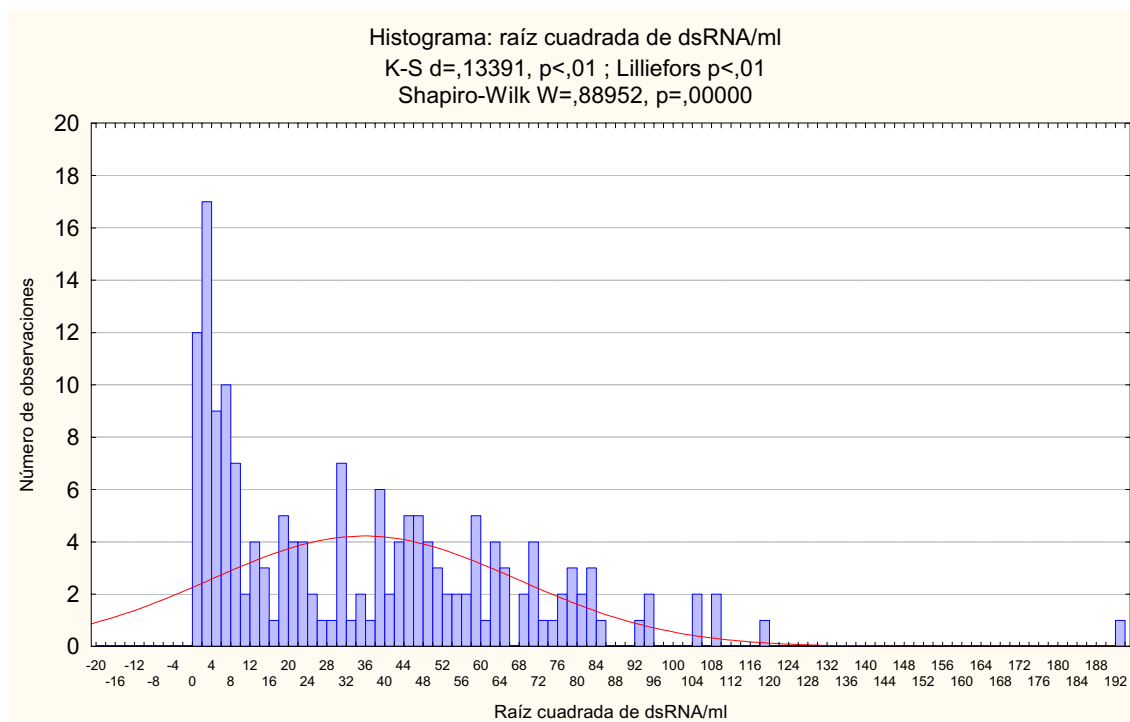


FIGURA 2.3.2.4. Distribución de la raíz cuadrada de la carga viral presente en el agua residual agrupados en intervalos de dos veces la raíz cuadrada de dsRNA/ml. Número de observaciones equivale a número de muestras

Con el fin de conocer si la cantidad de rotavirus presente en el agua residual presentaba estacionalidad decidimos aplicar la categoría mes "frío" o mes "cálido" a cada uno de los meses del año. A partir de la información climática de la zona de muestreo (observatorio Fabra i Puig de Barcelona) se decidió el criterio de categorización de los datos. Esta categorización se basó en la máxima diferencia entre las temperaturas medias de los meses correlativos. Es decir, disponiendo de las temperaturas medias mensuales de los años implicados en el estudio se observó que meses presentaban mayores diferencias respecto al resto. Posteriormente, se agruparon los meses correlativos en diferentes combinaciones y se escogió aquella ordenación que presentara mayores diferencias estadísticas entre grupos. Así, desde mayo a octubre se estableció el período "cálido", y de noviembre a abril el período "frío".

La carga viral promedio de las 169 muestras cuantificadas fue de 2292 ± 3871.3 dsRNA/ml. Según el análisis U de Mann-Whitney la cantidad de rotavirus presente en el agua residual en cada uno de los periodos era significativamente diferente ($p=0,000001$). La carga viral promedio del periodo considerado cálido era de 808.2 ± 1657 dsRNA/ml ($n=50$) y la del periodo considerado frío 2915.4 ± 4344.2 dsRNA/ml ($n=119$). Esta estacionalidad, sin embargo, no fue observada para todos los periodos anuales estudiados (datos mostrados en la tabla 2.3.2.2.). Los periodos anuales junio/1998-abril/1999 y

mayo/2000-abril/2001 no presentaban diferencias significativas entre las cantidades de rotavirus presentes en el agua residual durante el periodo cálido respecto al período frío.

TABLA 2.3.2.2. Promedio de la carga viral de las muestras de agua residual de Barcelona (dsRNA/ml) \pm SD tanto en global como para cada uno de los períodos propuestos por separado. Se incluye el análisis de la variabilidad de la carga viral entre el periodo cálido y el periodo frío en cada uno de los años de estudio y englobando todo el periodo de estudio.

Periodo anual	promedio periodo cálido mayo-octubre	promedio periodo frío noviembre-abril	análisis U Mann-Whitney
06/98-04/99 n=19	33.9 ^a \pm 38.8 n=5	70.1 \pm 130.2 n=14	p=0.853101
05/99-04/00 n=98	1089.8 \pm 1929.4 n=19	3677.2 \pm 5030.5 n=79	p=0.000803 *
05/00-04/01 n=24	1935.4 \pm 2322.0 n=9	2978.7 \pm 1759.2 n=15	p=0.121061
05/01-04/02 n=20	88.1 \pm 137.7 n=11	763.7 \pm 918.6 n=9	p=0.002691 *
05/02-01/03 n=8	191.3 \pm 234.0 n=6	1950.0 \pm 70.7 n=2	p=0.045501 *
06/98-01/03 ^b n=169	808.2 \pm 1657.0 (n = 50)	2915.4 \pm 4344.2 (n = 119)	p=0.000001 *

^a promedio carga viral (dsRNA/ml de agua residual)

^b periodo global de todo el estudio

* variancias entre grupos independientes significativamente diferentes en un intervalo de confianza del 95% para valores $p < 0.05$.

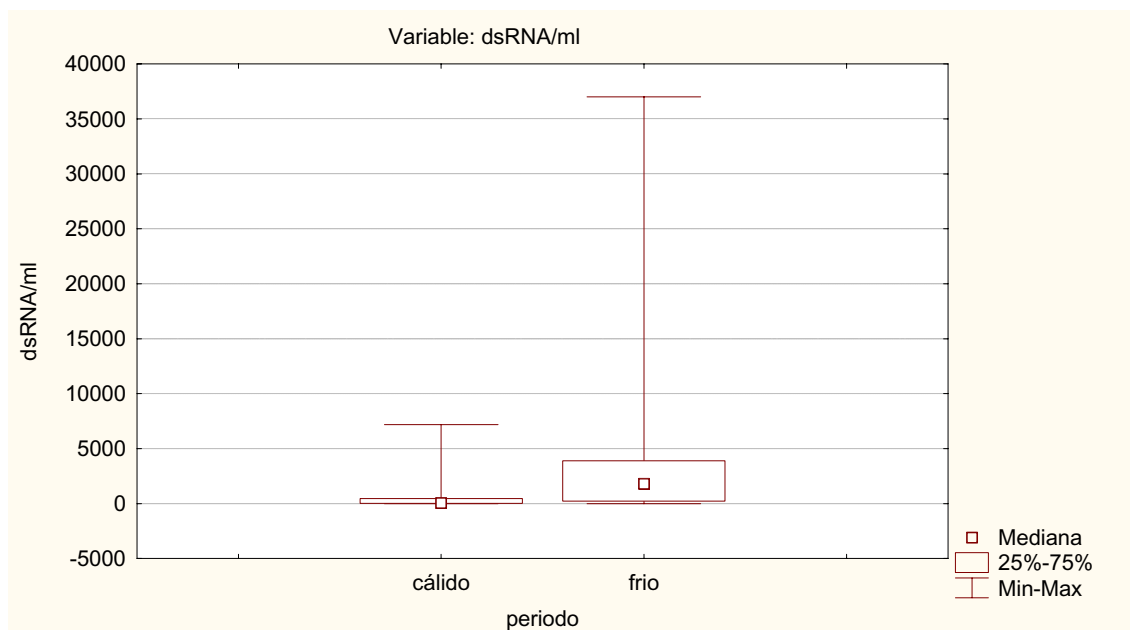


FIGURA 2.3.2.5. Gráfico por cajas de la carga viral presente en el agua residual en los periodos cálido y frío a partir de las 169 muestras cuantificadas.

Es posible entrever la diferencia existente entre el periodo cálido y el periodo frío observando el gráfico de cajas de las figuras 2.3.2.5. donde se encuentra representado la distribución de los valores. Se observa una mayor disparidad de las concentraciones presentes en el agua residual durante el periodo considerado frío.

El número de gastroenteritis clínicas causadas por rotavirus declaradas, en el mismo período de tiempo del estudio, al Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya (datos facilitados por la Dra. Ángela Domínguez) muestran también una estacionalidad estadísticamente significativa ($p < 0.00001$ análisis U de Mann-Whitney). El período invernal es el que presenta mayor número de casos clínicos declarados y el estival el que presenta menos (ver figura 2.3.2.6.).

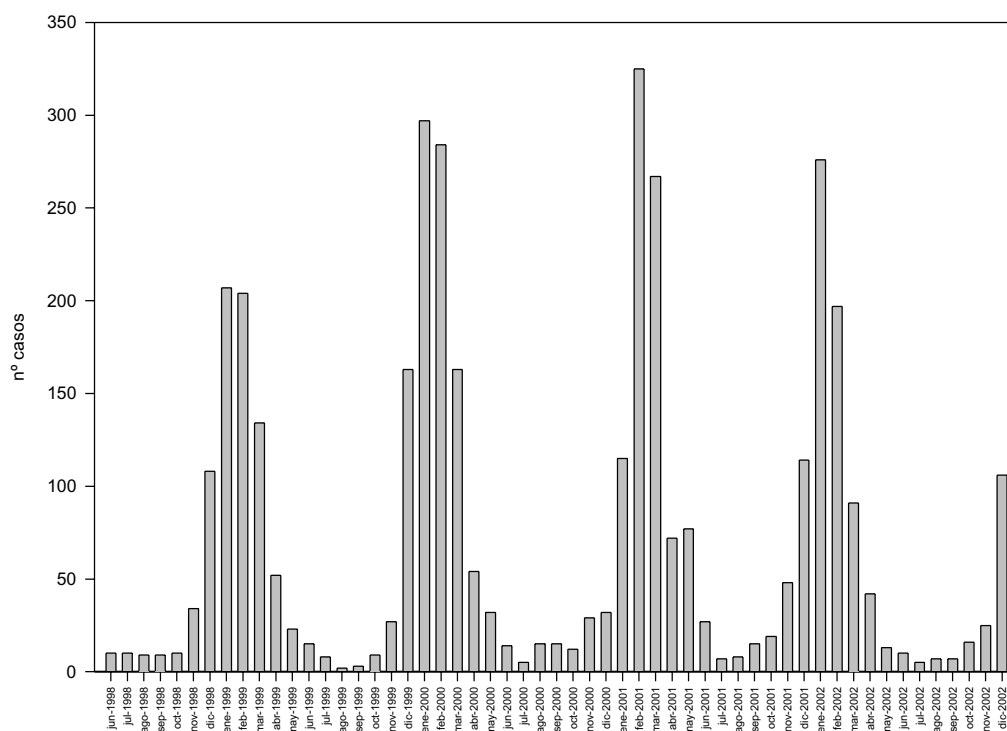


FIGURA 2.3.2.6. Número de casos mensuales declarados entre junio de 1998 hasta diciembre de 2002. Datos facilitados por la Generalitat de Catalunya, Departament de Sanitat i Seguretat Social.

Dado que los rotavirus presentan una clara estacionalidad clínica y una cierta estacionalidad ambiental, no en su presencia pero sí en su concentración, nos propusimos buscar si existía algún tipo de relación entre el número de casos declarados y la carga viral presente en el agua residual (figura 2.3.2.7.). Para ello en un mismo mes se intentó relacionar la carga viral presente en el agua residual con el número de casos clínicos declarados (ver figura 2.3.2.8.) esperando que a mayor número de casos clínicos mayor sería la carga viral presente en el agua residual, y viceversa.

En el gráfico 2.3.2.8. se muestra el coeficiente de correlación r obtenido a partir del análisis de regresión ($r = 0.430$ y $r^2 = 0.184$). Aplicando los análisis no paramétricos de Spearman, Gamma y Kendall Tau, se observa una correlación significativa entre ambas variables, obteniéndose un coeficiente r -Spearman de 0.444 con un p valor de 0.0020, un valor Gamma de 0.289 con un p valor de 0.0047 y un coeficiente Kendall de 0.287 con un p valor de 0.0047. Dichos análisis tratan de probar la significación de la asociación entre las dos variables.

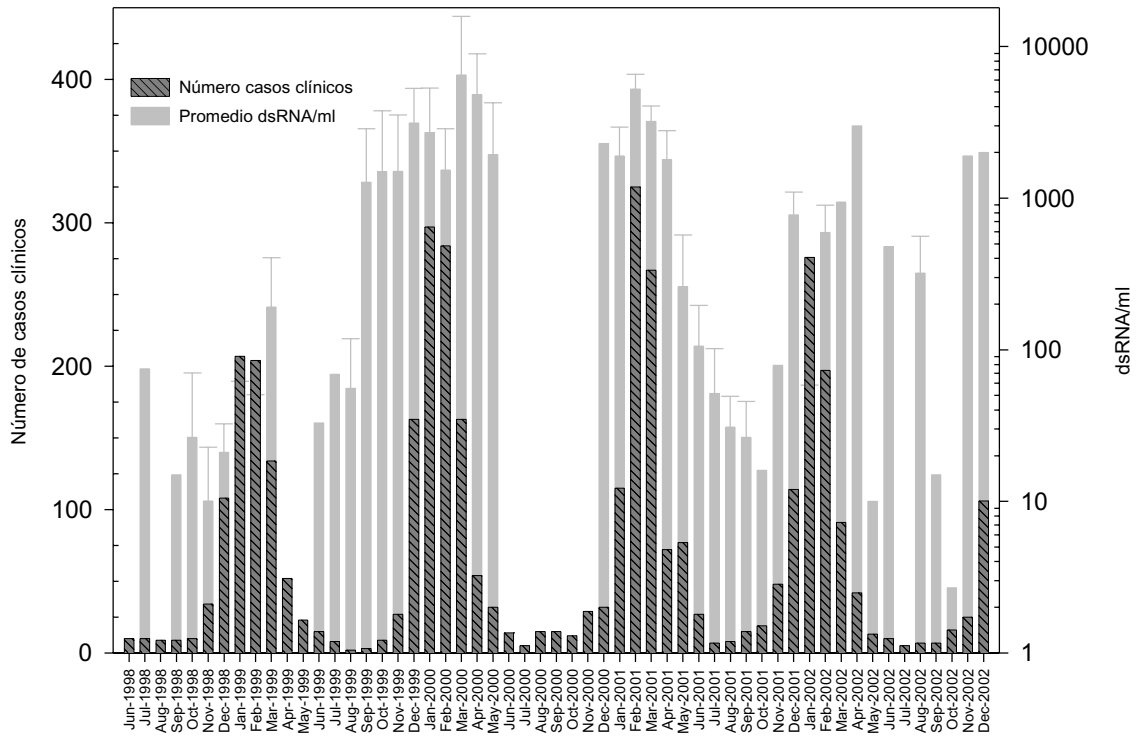


FIGURA 2.3.2.7. Histograma representando el número de casos clínicos promedios mensuales declarados al Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya y la concentración vírica promedio mensual encontrada en el agua residual de Barcelona. La barra vertical de error representa la desviación estándar.

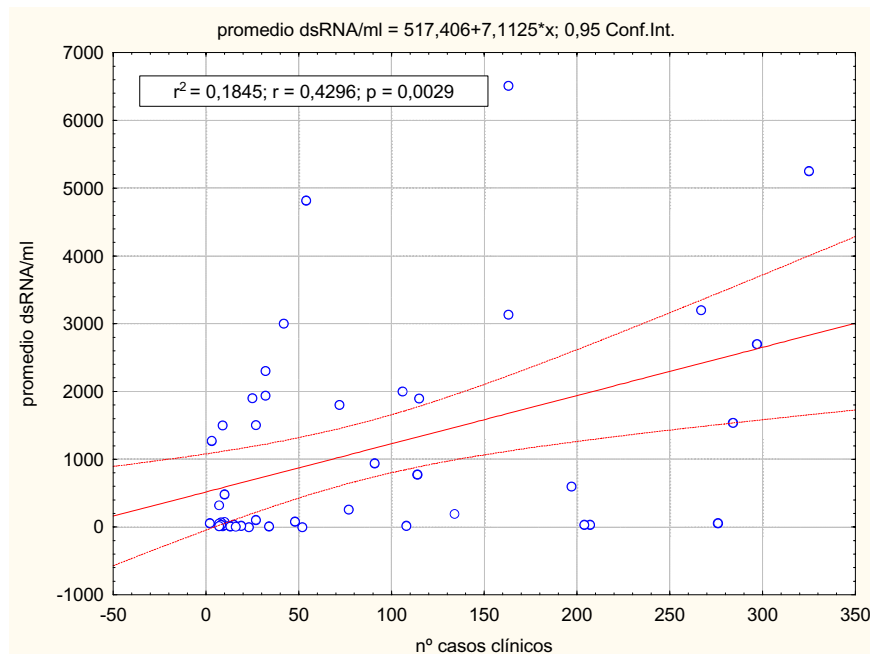


FIGURA 2.3.2.8. Correlación existente entre el número de casos clínicos declarados y el número de virus presente en el agua residual durante el período de estudio (n=47).

Con estos datos parece ser que realmente existe una correlación estadísticamente significativa entre la carga viral presente en el agua residual de Barcelona y el número de casos clínicos declarados al Departament de Sanitat i Seguretat Social. Ello nos condujo a pensar si tal premisa se cumplía en cada uno de los años de estudio. Tomando los valores de cada uno de los periodos anuales respetando las divisiones anuales de la tabla 2.3.2.2., se observó que sólo se cumplía en dos de los periodos anuales: 05/1999-04/2000 y 05/2001-04/2002. Éstos mostraban una correlación significativa con un valor r-Spearman de 0,6923 y 0,6364 respectivamente ($p= 0.0126$ y $p= 0.0261$). Casualmente, tales periodos anuales coincidían con aquellos que presentaban mayores diferencias en la carga vírica presente en el agua residual entre el periodo cálido y el periodo frío. Por tanto, a mayores diferencias en la concentración de virus presente en el agua residual de un determinado año, mayor es la correlación con el número de casos clínicos declarados en ese mismo año.

En cambio, relacionando sólo los valores clínicos con los valores ambientales del periodo categorizado "cálido" no se observa tal correlación. Igualmente ocurre con los valores categorizados "frío".

Emparejando el número de casos clínicos de un mes determinado con la carga viral del agua residual del mes posterior (expresada en dsRNA/ml) se observa una correlación similar ($r= 0.4209$) con coeficientes de r-Spearman de 0.396 ($p=0.0071$), de Gamma 0.271 ($p= 0.0091$) y de Kendall Tau 0.269 ($P= 0.0091$) estadísticamente significativos (ver gráfica 2.3.2.9.).

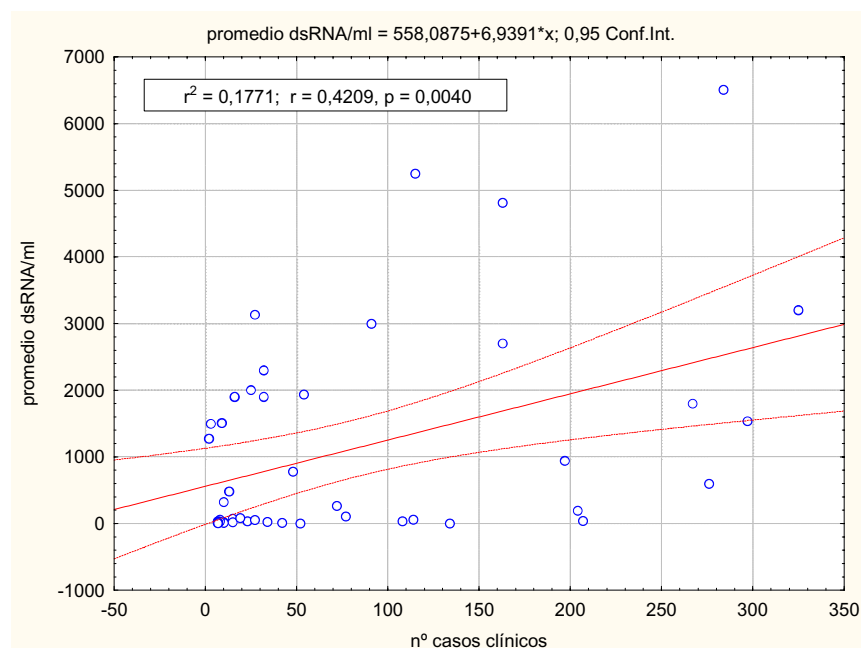


FIGURA 2.3.2.9. Correlación existente entre el número de casos clínicos declarados para cada mes y la concentración de rotavirus presente en las muestras de agua residual del mes posterior, expresada en dsRNA/ml ($n=46$).

Por lo tanto, es difícil establecer si la carga viral presente en el agua residual de Barcelona es directamente un espejo del número de casos clínicos declarados. Es evidente que existe una correlación entre ambos parámetros, y parece ser que el pico máximo de casos clínicos precede a la carga viral máxima en el agua residual. Considerando que el tiempo máximo de permanencia del virus en el agua residual es de 2 horas, es fácil pensar que la correlación será máxima emparejando las variables mes a mes. Pero emparejando el número de casos clínicos con el mes posterior correlacionan similarmente. Ello podría ser debido a la duradera excreción de los rotavirus después de la infección, incluso no presentando ya sintomatología.

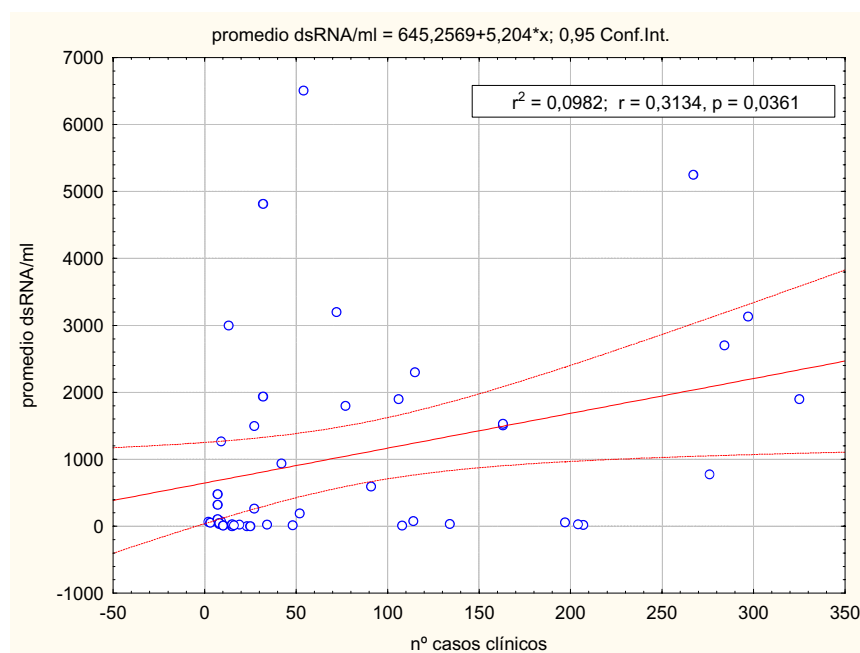


FIGURA 2.3.2.10. Correlación existente entre el número de casos clínicos declarados para cada mes y la concentración de rotavirus presente en las muestras de agua residual del mes anterior, expresada en dsRNA/ml (n=46).

En cambio, emparejando el número de casos clínicos con la carga viral del agua residual del mes anterior se observa una menor correlación ($r = 0.3134$) aunque siga existiendo una correlación estadísticamente significativa con valores del coeficiente de r-Spearman de 0.360 ($p = 0.015$), de Gamma 0.221 ($p = 0.032$) y de Kendall Tau 0.220 ($P = 0.032$) -ver gráfica 2.3.2.10.-.

El hecho de una menor correlación entre el número de casos clínicos con la carga viral presente en el agua residual del mes anterior, demuestra la sucesión temporal de los sucesos. Parece ser que los números máximos de casos clínicos preceden las cantidades máximas de rotavirus en el agua residual. En caso contrario, si hubiera habido una mayor

correlación de los casos clínicos con la carga viral del agua residual del mes anterior, significaría la circulación entre la población de cepas asintomáticas. Con la aparición de cepas más virulentas empezarían a surgir los casos clínicos.

2.4. DISCUSIÓN

Los virus entéricos mayoritarios en el agua residual urbana doméstica de Barcelona son los rotavirus. Se ha detectado en la gran mayoría de muestras recogidas entre junio de 1998 y enero de 2003. Así, es difícil establecer si es observable una estacionalidad a lo largo del año desde un punto de vista meramente cualitativo. Pero cuantificando la concentración vírica a lo largo del año, es observable una mayor concentración vírica durante los meses fríos (de noviembre a abril) respecto a los meses cálidos (de mayo a octubre). Esta diferencia correlaciona con el número de casos clínicos declarados al Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya durante el mismo período de tiempo. Según el Sistema de Información Microbiológica (SIM) el agente vírico mayoritario responsable de gastroenteritis aguda desde el año 1989 es rotavirus, y en Cataluña se ha observado un aumento de declaración, al igual que en País Vasco. Según el SIM, la distribución estacional de los casos demuestra una mayor incidencia en los meses de invierno (García *et al.*, 1999). La estacionalidad clínica de rotavirus ha sido

previamente documentada en España (Visser *et al.*, 1999; García *et al.* 1999) encontrándose el mayor número de gastroenteritis agudas causadas por rotavirus declaradas en invierno. Ello también ha sido advertido en otros países de clima templado donde el mayor número de brotes causados por rotavirus se ha observado en la estación fría (Ansari *et al.*, 1991; Koopmans y Brown, 1999). La estacionalidad de la presencia de rotavirus en agua residual también ha sido previamente documentada en Houston, Texas (Hejkal *et al.*, 1984; Mehnert y Stewien, 1993) y en Sao Paulo (Mehnert y Stewien, 1993) donde la menor concentración vírica se encontraba entre los meses más cálidos, y la mayor durante el invierno y primavera.

Los resultados de este estudio han revelado una estacionalidad en la cantidad de rotavirus presentes en el agua residual urbana del área de Barcelona. Los meses de invierno han sido los que han presentado mayor concentración de rotavirus, situándose el máximo entre los meses de diciembre a abril. Estudios previos a partir de muestras recogidas en la misma planta depuradora entre noviembre de 1985 y julio de 1986 con el fin de comparar el nivel de rotavirus infecciosos en ambos meses, demostraron la no existencia de estacionalidad de rotavirus en Barcelona (Bosch *et al.*, 1988b). Pero el presente estudio llevado a cabo durante un periodo de tiempo mucho más largo y con una recolección de muestras más numerosa y homogénea a lo largo del año, revela que es necesario un mayor tiempo de estudio para observar la estacionalidad de rotavirus en agua residual. Los niveles de rotavirus encontrados entonces oscilaron entre 153-158 unidades infecciosas/l. En el estudio actual se ha detectado una media de **2.292** \pm 3.871,3 dsRNA/ml de agua residual, es decir, unos 3 o 4 órdenes de magnitud de unidades de genoma viral más. Estos datos no son realmente comparables ya que desconocemos la relación existente entre número de unidades infecciosas y unidades de genoma viral en el agua residual. En suspensiones de rotavirus adaptados a cultivo celular se ha observado una relación de 'partículas infecciosas' respecto 'partículas físicas' de hasta 4 órdenes de magnitud diferente.

Analizando los datos anualmente no parece existir tal estacionalidad en todos los años de estudio. La clara estacionalidad existente en el número de casos clínicos declarados no siempre correlaciona con la carga viral presente en el agua residual. Posiblemente la existencia de gran número de individuos asintomáticos y la mayor o menor virulencia de las cepas circulantes explique esta no perfecta correlación entre datos de un mismo año. Se conoce que un individuo infectado puede excretar gran cantidad de partículas de rotavirus, 10^{10} - 10^{11} partículas de rotavirus por gramo de heces (Flewett y Woode, 1978). Asimismo, Richardson y colaboradores (Richardson *et al.*, 1998) demostraron la prolongada duración de la excreción (hasta 57 días después de manifestarse la sintomatología) en niños hospitalizados. Adicionalmente, también se encuentra bien documentada la excreción de rotavirus tanto por personas que han superado los episodios de diarrea pero que continúan excretando rotavirus (Pickering *et al.*, 1988; Richardson *et*

al., 1998) como por personas asintomáticas (Barnes *et al.*, 2003). En este estudio hemos observado que existe una correlación similar si relacionamos el número de casos clínicos con la carga viral presente en el agua residual en un mes determinado que relacionándolos con la carga viral presente en el agua residual del mes posterior. Muy posiblemente, podría ser un reflejo de la prolongada excreción de rotavirus y de la existencia de gran cantidad de individuos asintomáticos. En cambio, si emparejamos los casos clínicos con la carga viral del agua residual del mes anterior los valores estadísticos de correlación empeoran. Ello confirmaría que los casos clínicos preceden a los valores máximos de carga viral en el agua residual, y no al revés. En conclusión, un pico de casos de gastroenteritis causadas por rotavirus en una población como Barcelona se encuentra reflejado en el agua residual de tal población, visible incluso un mes después de haberse producido.

Las diferencias existentes en la carga viral de rotavirus en el agua residual en cada uno de los períodos no puede explicarse por factores ambientales que afectaran a su estabilidad. El tiempo máximo de permanencia de los virus en el agua residual antes de su recolección no superaba las 2 horas. Factores climáticos como la temperatura o la intensidad de radiación solar no podían afectar al virus durante el tiempo de permanencia de éste en el agua residual hasta su llegada a la planta depuradora (donde se realizaba el muestreo) ya que la temperatura del afluente de agua residual era casi constante a lo largo del año y los conductos, exceptuando la entrada a la planta, eran subterráneos. Los efectos de la propia composición química del agua sobre rotavirus no son claros. Parece ser que los detergentes iónicos los desestabilizan dependiendo del pH del medio, pero en cambio, los detergentes no-iónicos lo estabilizan (Ward y Ashley, 1980).

Los otros virus entéricos analizados no parecen seguir un patrón de estacionalidad tan evidente como el de rotavirus, exceptuando astrovirus los cuales parecen emerger durante los meses de diciembre-enero. Ello concuerda con datos de otros lugares próximos (sur de Francia) donde se ha detectado mayor presencia de astrovirus en marisco contaminado en diciembre y enero entre los años 1995 y 1998 (Le Guyader *et al.*, 2000). Cabe mencionar que la casi completa ausencia de aislamientos de HAV en el agua residual en los años 2000-2002 pudiera ser debida a un programa piloto de vacunación masiva en las escuelas contra dicho virus.

Frente los resultados obtenidos se concluye que la simple detección de rotavirus en el agua residual de Barcelona no presenta estacionalidad alguna, pero sí que la presenta la cantidad de moléculas dsRNA genómicas de rotavirus presente a lo largo del año. Dicha estacionalidad coincide con la estacionalidad observada en los casos clínicos declarados en el Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya.

CAPÍTULO 3

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE
ROTAVIRUS DEL GRUPO A EN AGUA
RESIDUAL DE BARCELONA:
EMERGENCIA DE GENOTIPOS POCO
COMUNES**

3.1. ANTECEDENTES

El desarrollo de una vacuna frente rotavirus es altamente prioritario. Los beneficios de una segura y eficiente vacunación frente rotavirus reduciría la morbilidad y, especialmente, la mortalidad de niños en países en vías de desarrollo debido a gastroenteritis causadas por dicho virus (Jiang *et al.*, 2002). Asimismo, el análisis de los costes de dicha gastroenteritis en los países desarrollados justificaría la vacunación rutinaria dentro del período de inmunización infantil (Noel *et al.*, 1994; Cunliffe *et al.*, 2002b).

Diversas vacunas han sido propuestas pero sólo una, RotaShield (RRV-TV), de los laboratorios Wyeth (Marietta, Pennsylvania), fue autorizada en Estados Unidos en agosto de 1998 tras diversos ensayos clínicos por su efectiva protección después de la administración de la tercera dosis (Bernstein *et al.*, 1995; Kapikian *et al.*, 1996; Lanata *et al.*, 1996; Linhares *et al.*, 1996; Rennels *et al.*, 1996; Joensuu *et al.*, 1997; Pérez-Schael *et al.*, 1997; Santosham *et al.*, 1997; Perez-Mato *et al.*, 2002). Se trataba de una vacuna viva

atenuada tetravalente (G1, G2, G3 y G4) diseñada a partir de *reassortants* de rotavirus humano (segmento 9) y simio (el resto de segmentos genómicos) (Kapikian *et al.*, 1996; Parashar *et al.*, 1998). El "Advisory Committee on Immunization Practices" -ACIP-, la academia americana de pediatría y la academia americana de médicos de familia recomendaron la vacunación rutinaria con RRV-TV de niños sanos. Desde septiembre de 1998 hasta julio de 1999 fueron declarados 15 casos de intususcepción (obstrucción del intestino debido a una invaginación de éste) a la "Vaccine Adverse Event Reporting System" -VAERS- entre los niños que habían recibido dicha vacuna. El uso de la vacuna fue suspendido en julio de 1999 para estudiar su relación con dicho fenómeno.

En Venezuela, donde también distribuyeron dicha vacuna para un ensayo clínico en 2207 niños, se detectó imprevistamente transmisión horizontal natural de la vacuna (Hoshino *et al.*, 2003). Ello refleja la fácil propagación de rotavirus persona a persona. Por otro lado, no está claro que nivel de protección ofrecen las vacunas diseñadas frente a determinados serotipos. A niños vacunados con la vacuna RotaShield (RRV-TV), ésta había conferido protección frente cepas G1P[8] pero parecía no ser efectiva frente a los otros serotipos para los cuales fue diseñada (Mascarenhas *et al.*, 2002). Así pues, quedan muchas cuestiones por resolver.

Paralelamente a los estudios de las posibles vacunas frente rotavirus se ha ido conociendo más sobre la biología del virus. Diferentes observaciones sugieren que la diversidad de los rotavirus es mayor y más compleja de lo que se sospechaba en un principio. Los rotavirus disponen de un gran número de mecanismos que les permite aumentar su diversidad: mutaciones puntuales, intercambio de segmentos de RNA entre diferentes cepas (*reassortment*), duplicaciones y deleciones de secuencia dentro de un mismo segmento, fenómenos de recombinación y la introducción de rotavirus animales en la población humana. La propensión de los rotavirus a producir *reassortants* y a atravesar la barrera interespecífica se halla reflejada en los descubrimientos de serotipos típicamente animales en humanos (G5 en Brasil, G8 en Malawi y G9 en India y Blangadesh). También se observa cada vez más la emergencia de serotipos poco comunes como son G9 y G12 (Cubitt *et al.*, 2000; Araujo *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2001; Kirkwood *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2003). Dado que estos serotipos pueden convertirse en serotipos dominantes en el futuro, deberían ser considerados en las nuevas generaciones de vacunas (Cunliffe *et al.*, 2002a).

Se sabe que las dos proteínas de la cubierta más externa del virus, la glicoproteína VP7 y la proteína sensible a proteasas VP4 pueden ser neutralizadas serológicamente, evitando así la infección (Estes, 2001). Estas proteínas se clasifican mediante ensayos con anticuerpos neutralizantes. Hasta ahora se conocen 15 serotipos de VP7 o G-tipos (Rao *et al.*, 2000), de los cuales 10 (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8, G9, G10 y G12) se han aislado en humanos, y todos ellos presentan una buena correlación entre serotipo y genotipo. En el caso de la proteína VP4, esta correlación no es tan clara. Se conocen 13 serotipos o P-

tipos y al menos 21 genotipos (Rao *et al.*, 2000), de los cuales 8 (P[3], P[4], P[6], P[8], P[9], P[10], P[11] y P[14]) infectan humanos.

Anticuerpos monoclonales diseñados contra la glicoproteína VP7 han sido muy útiles en los estudios de distribución de los 4 G-serotipos más comunes. Pero la falta de anticuerpos monoclonales específicos para otros G-serotipos y para todos los P-serotipos dejaba en muchos estudios un gran número de aislados sin poder ser caracterizados. El genotipado molecular ha solventado gran parte de este problema, y además, ha permitido identificar diversos aislados en una misma muestra (Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1992).

Cada vez son más los esfuerzos por conocer que serotipos afectan a humanos. Dado que los rotavirus presentan una gran variabilidad se debería diseñar una vacuna que cubriese los serotipos circulantes en el momento y lugar donde se desea realizar un programa de vacunación infantil. Diversos estudios se han llevado a cabo en diferentes lugares del mundo para conocer los serotipos circulantes, y sobre todo, aquellos responsables de la diarrea severa causante de la hospitalización del paciente (Kirkwood *et al.*, C., 2002). Por el momento no se ha podido correlacionar mayor virulencia con un determinado serotipo o combinación de serotipos (Noel *et al.*, 1994).

Las combinaciones más comunes mundialmente son P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 y P[8]G4, aunque también están emergiendo P[8]G9 y P[6]G9. La distribución de las diferentes cepas de rotavirus varía dependiendo de la región geográfica, del nivel socioeconómico y del periodo de años del estudio. Un profundo conocimiento de esta distribución conducirá a predecir la eficacia de una potencial vacuna para esa región.

El análisis del agua residual urbana nos ofrece una buena visión de las cepas circulantes entre la población, donde conoceremos tanto las cepas causantes de infecciones sintomáticas como asintomáticas. La alta sensibilidad de las técnicas moleculares las hace idóneas para el estudio del agua residual. Así, la caracterización molecular de los genes que codifican para VP7 y VP4 de rotavirus se realizó mediante los sistemas previamente descritos por Gouvea y colaboradores (Gouvea *et al.*, 1990) y Gentsch y colaboradores (Gentsch *et al.*, 1992), aunque también se incluyeron *primers* descritos en otros trabajos (Das *et al.*, 1994; Gouvea *et al.*, 1994a; Gouvea *et al.*, 1994b).

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. GENOTIPADO DE LA GLICOPROTEINA VP7 (G) MEDIANTE RT-PCR-*SEMINESTED*

En primer lugar se realizó una retrotranscripción y posterior amplificación de la mayor parte del gen 9 (1062 pb) con *primers* comunes a todos los genotipos conocidos (Beg 9 y End 9) según Gouvea y colaboradores (Gouvea *et al.*, 1990). Posteriormente se amplificó un fragmento concreto del gen mediante *primers* específicos de genotipo de la región hipervariable del gen (Gouvea *et al.*, 1990; Das *et al.*, 1994; Gouvea *et al.*, 1994a; Gouvea *et al.*, 1994b). Así, se utilizó un *primer* común a todos ellos (RVG9) y uno específico (aBT1, aCT2, aET3, aDT4, cFT5, aAT8 y aFT9) para cada uno de los genotipos de interés (G1, G2, G3, G4, G5, G8 y G9 respectivamente) que generaron un tamaño exclusivo de cada genotipo (ver figura 3.2.1.).

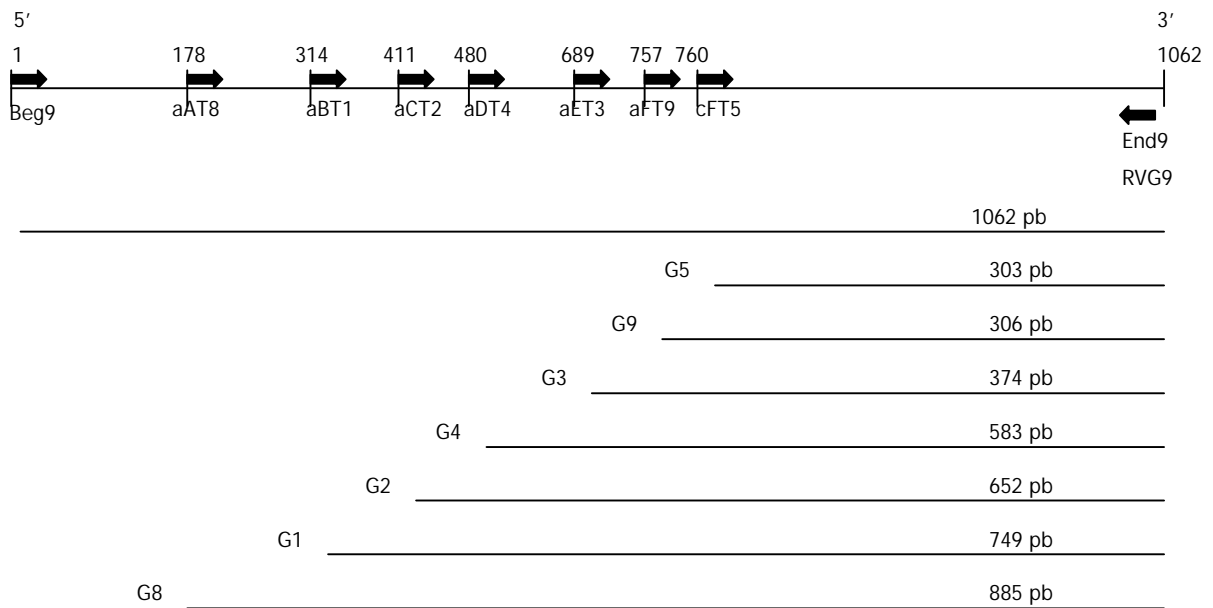


FIGURA 3.2.1. Esquema del gen codificante de la glicoproteína VP7 y el lugar de unión de los diferentes *primers* que se utilizaron para el genotipado. También se muestran los tamaños resultantes esperables del gen entero y para cada uno de los genotipos después de la amplificación mediante PCR.

Empleando este conjunto de *primers* en la segunda amplificación fue posible distinguir incluso diferentes genotipos presentes en una misma muestra simplemente por la diferencia de tamaño de los amplímeros resultantes.

A partir de los extractos de ácidos nucleicos de las muestras analizadas en el capítulo 2, en las que se detectó presencia de rotavirus mediante la RT-PCR del fragmento del gen codificante de VP6, se llevó a cabo el siguiente protocolo.

0.5 µl extracto ácidos nucleicos + 4.5 µl H ₂ O Choque térmico 5' a 99°C Colocado inmediatamente en hielo		
Preparación de la mezcla de reacción para la RT		
Componente	Volumen	Concentración final
5X Tampón de RT Expand	2 µl	1X
100 mM DTT	1 µl	10 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	1 µl	0.2 mM
0.1 mM <i>primer</i> Beg 9	0.1 µl	1 µM
0.1 mM <i>primer</i> End 9	0.1 µl	1 µM
50 U/µl Transcriptasa Reversa Expand	0.05 µl	2.5 U
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	0.75 µl	
Extracto ácidos nucleicos 1/10	5 µl	
Volumen total	10 µl	
Incubación 1h 50°C		

Preparación de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR de 1062 pb del gen 9			
Componente	Volumen	Concentración final	
10X Tampón de PCR Expand	5 µl	1X	
15 mM MgCl ₂		1.5 mM	
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	5 µl	0.2 mM	
0.1 mM <i>primer</i> Beg 9	0.25 µl	0.5 µM	
0.1 mM <i>primer</i> End 9	0.25 µl	0.5 µM	
3.5 U/µl HF PCR Expand polimerasa	0.15 µl	0.5 U	
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	29.35 µl		
Producto de la reacción RT	10 µl		
Volumen total	50 µl		
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	9'	95°C	1X
Desnaturalización	1'	94°C	
Hibridación	2'	47°C	40X
Extensión	5'	72°C	
Extensión final	10'	72°C	1X

Preparación de la mezcla de reacción para la <i>seminested</i> PCR detección G1, G2, G3, G4, G5, G8			
Componente	Volumen	Concentración final	
10X Tampón de PCR Expand	5 µl	1X	
15 mM MgCl ₂		1.5 mM	
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	2.5 µl	0.1 mM	
0.1 mM <i>primer</i> RVG9	0.25 µl	0.5 µM	
0.1 mM <i>primer</i> aBT1	0.25 µl	0.5 µM	
0.1 mM <i>primer</i> aCT2	0.25 µl	0.5 µM	
0.1 mM <i>primer</i> aET3	0.25 µl	0.5 µM	
0.1 mM <i>primer</i> aDT4	0.25 µl	0.5 µM	
0.1 mM <i>primer</i> cFT5	0.25 µl	0.5 µM	
0.1 mM <i>primer</i> aAT8	0.25 µl	0.5 µM	
3.5 U/µl HF PCR Expand polimerasa	0.15 µl	0.5 U	
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	38.6 µl		
Producto de la PCR del gen 9	2 µl		
Volumen total	50 µl		
Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	9'	95°C	1X
Desnaturalización	1'	94°C	
Hibridación	2'	45°C	40X
Extensión	3'	72°C	
Extensión final	10'	72°C	1X

Debido a que la temperatura de fusión del *primer* específico para G9 (aFT9) era sustancialmente diferente al resto de *primers*, se diseñó una PCR diferente con una temperatura de hibridación sensiblemente menor.

Preparación de la mezcla de reacción <i>seminested</i> PCR detección G9		
Componente	Volumen	Concentración final
10X Tampón de PCR Expand	5 µl	1X
15 mM MgCl ₂		1.5 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	2.5 µl	0.1 mM
0.1 mM <i>primer</i> RVG 9	0.25 µl	0.5 µM
0.1 mM <i>primer</i> aFT9	0.25 µl	0.5 µM
3.5 U/µl HF PCR Expand polimerasa	0.15 µl	0.5 U
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	39.85 µl	
Producto de la PCR del gen 9	2 µl	
Volumen total	50 µl	

Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	9'	95°C	1X
Desnaturalización	1'	94°C	
Hibridación	2'	42°C	40X
Extensión	3'	72°C	
Extensión final	10'	72°C	1X

Se visualizaron los amplímeros mediante electroforesis en un gel al 2 % de agarosa en tampón TBE 1X durante 3 ó 4 horas a 100 voltios de 10 µl del producto de la segunda PCR. Transcurrido este tiempo, los fragmentos resultantes se tiñeron con bromuro de etidio o GelStar y se visualizaron mediante luz UV.

Para la confirmación del G-tipado de algunos aislados los amplificados fueron secuenciados. Se realizó una purificación del producto de PCR con el kit "High Pure PCR product Purification kit" (Roche). En el caso de partir de un producto de PCR en el que había más de un fragmento amplificado, previamente a la purificación, se realizaba una electroforesis con todo el producto de PCR en un gel de agarosa (1.5-2%) con TAE 1X, se recortaba la banda de interés y se prosiguió con el protocolo de secuenciación descrito en el apartado 1.2.5. del capítulo 1 con los *primers* correspondientes.

3.2.2. GENOTIPADO DE LA PROTEINA SENSIBLE A PROTEASAS VP4 (P) MEDIANTE RT-PCR-SEMINESTED

La estrategia del genotipado de VP4 fue muy similar a la del genotipado de VP7. Primero se retrotranscribió y amplificó parte del gen 4 (876 pb) mediante *primers* comunes para todas las cepas de rotavirus (Con 3 y Con 2) según Gentsch y colaboradores (Gentsch *et*

al., 1992). Una vez obtenido el producto, se sometió a una segunda PCR con *primers* específicos de genotipo de la región hipervariable del gen. Se utilizó un *primer* común a todos ellos (Con 3) y uno específico de genotipo (1T-1 y 1T-1D para P1A[8], 2T-1 para P1B[4], 3T-1 para P2[6], cpGott para P2B[6]; 4T-1 para P3[9], cpOSU para P9[7] y 501-P[13] para P[13]) generándose tamaños exclusivos de genotipo.

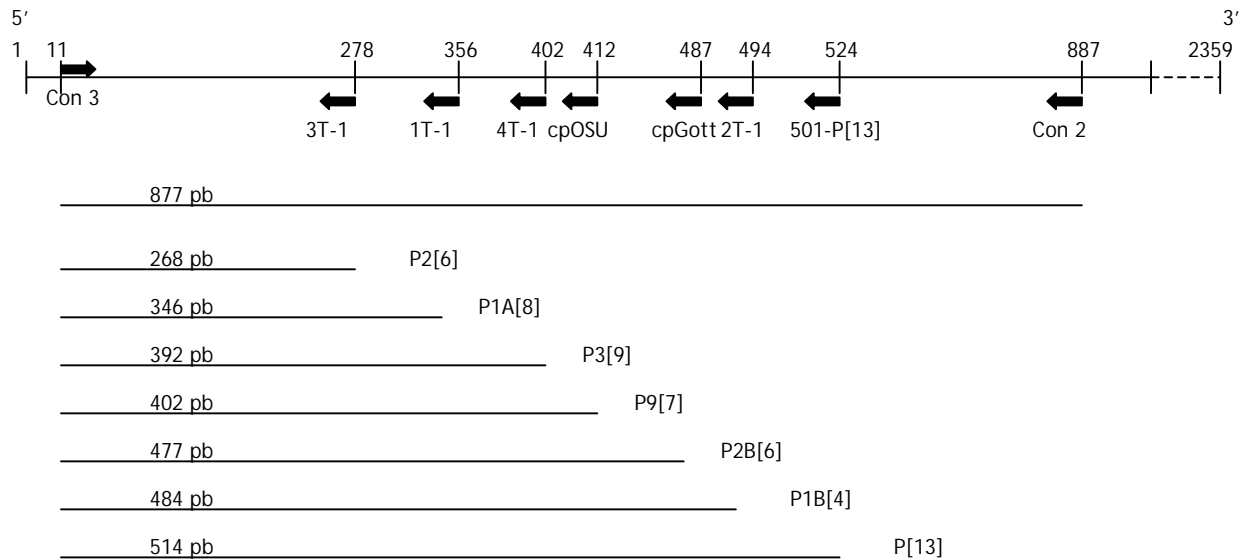


FIGURA 3.2.2. Esquema del gen codificante de la glicoproteína VP4 y el lugar de unión de los diferentes *primers* que se utilizaron para el genotipado. También se muestra los tamaños resultantes esperables del fragmento de la primera PCR y para cada uno de los genotipos después de la *seminested* PCR.

Al igual que en el genotipado de VP7, fue posible distinguir diferentes genotipos en una misma muestra, debido a la diferencia de tamaño de los fragmentos resultantes de cada una de las combinaciones de *primers*.

A partir de los extractos de ácidos nucleicos de las muestras analizadas en el capítulo 2, en las que se detectó presencia de rotavirus mediante la RT-PCR del fragmento del gen codificante de VP6, se llevó a cabo el siguiente protocolo.

0.5 µl extracto ácidos nucleicos + 4.5 µl H ₂ O		
Choque térmico 5' a 99°C		
Colocado inmediatamente en hielo		
Preparación de la mezcla de reacción		
Componente	Volumen	Concentración final
5X Tampón de RT Expand	2 µl	1X
100 mM DTT	1 µl	10 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	1 µl	0.2 mM
0.1 mM <i>primer</i> Con 3	0.1 µl	1 µM
0.1 mM <i>primer</i> Con 2	0.1 µl	1 µM
50 U/µl Transcriptasa Reversa Expand	0.05 µl	2.5 U
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	0.75 µl	
Extracto ácidos nucleicos 1/10	5 µl	
Volumen total	10 µl	
Incubación 1h 50°C		

Preparación de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR de 876 pb del gen 4		
Componente	Volumen	Concentración final
10X Tampón de PCR Expand	5 µl	1X
25 mM MgCl ₂	4 µl	2 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	5 µl	0.2 mM
0.1 mM <i>primer</i> Con 3	0.5 µl	1 µM
0.1 mM <i>primer</i> Con 2	0.5 µl	1 µM
3.5 U/µl HF PCR Expand polimerasa	0.15 µl	0.5 U
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	24.85 µl	
Producto de la reacción RT	10 µl	
Volumen total	50 µl	

Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	9'	95°C	1X
Desnaturalización	1'	94°C	
Hibridación	2'	47°C	40X
Extensión	5'	72°C	
Extensión final	10'	72°C	1X

Preparación de la mezcla de reacción <i>seminested</i> PCR detección P[8],P[4],P[6] y P[9]		
Componente	Volumen	Concentración final
10X Tampón de PCR Expand	5 µl	1X
25 mM MgCl ₂	5 µl	2.5 mM
2 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP	2.5 µl	0.1 mM
0.1 mM <i>primer</i> Con 3	0.25 µl	0.5 µM
0.1 mM <i>primer</i> 1T-1/1T-1D	0.25 µl	0.5 µM
0.1 mM <i>primer</i> 2T-1	0.25 µl	0.5 µM
0.1 mM <i>primer</i> 3T-1	0.25 µl	0.5 µM
0.1 mM <i>primer</i> 4T-1	0.25 µl	0.5 µM
3.5 U/µl HF PCR Expand polimerasa	0.15 µl	0.5 U
H ₂ O desionizada libre DNAsas y RNAsas	35.6 µl	
Producto de la PCR del gen 9	0.5 µl	
Volumen total	50 µl	

Fases de la PCR	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	9'	95°C	1X
Desnaturalización	1'	94°C	
Hibridación	2'	44°C	40X
Extensión	3'	72°C	
Extensión final	10'	72°C	1X

Se visualizaron los amplímeros mediante electroforesis en un gel del 2.5 % de agarosa en tampón TBE 1X durante 4 ó 5 horas a 100 voltios de 10 µl del producto de la segunda PCR. Transcurrido este tiempo, los fragmentos resultantes se tiñeron con bromuro de etidio o GelStar y se visualizaron mediante luz UV.

Para la confirmación del P-tipado de algunas cepas los amplímeros fueron secuenciados.

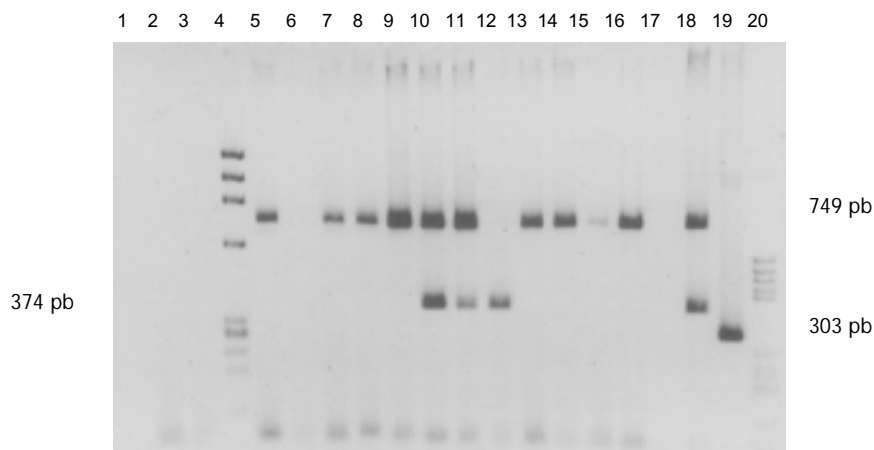
3.2.3. CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS G5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La secuencia nucleotídica resultante de la secuenciación del fragmento resultante de la seminested a partir del gen codificante de la proteína VP7 (256 pb) de las cepas G5 fue comparada con las cepas de referencia utilizando el programa BLAST (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, Estados Unidos). Las alineaciones de múltiples secuencias se llevaron a cabo mediante el programa CLUSTAL W (*European Bioinformatics Institute*, Cambridge, Reino Unido). Los árboles filogenéticos fueron construidos mediante el método “neighbor-joining”. La matriz de distancias se calculó mediante el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis 2.1 (MEGA versión 2.1, Pennsylvania, Estados Unidos; Kumar *et al.* 2001). A partir de 1000 repeticiones se obtuvo un árbol consenso sin raíz utilizando secuencias de cepas de rotavirus G5 presentes en el GenBank (AF24239, L35054, L35056, X04613, L35059, L79916 y L35058) y como outgroup cepas de rotavirus porcinos G3 (L35055, L35060, L35079 y L35057). Éste se visualizó con el programa TreeView.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. GENOTIPADO G

Sólo en el 42.3% de las 248 muestras en las que se detectó la presencia de rotavirus fue posible determinar el G-tipo. Diversos G-tipos fueron visibles si coexistían en una misma muestra (ver carril 10, 11 y 18 de la figura 3.3.1.1.). Un 38% de las muestras G tipadas (40 muestras) tenían más de un G-tipo.



Carriles 1, 2 y 3: controles sin molde de la RT, PCR y *seminested*

Carril 4: marcador pesos moleculares Φ X174/*Hae* III (1353, 1078, 872, 603, 310, 281/271, 234, 194, 118 y 72 pb)

Carriles 5 – 18: muestras rotavirus VP6 positivas. Carriles 5, 7, 8, 9, 13, 14, 15 y 16 contenían cepas G1; carril 12 contenía cepa G3; carriles 10, 11 y 18 contenían ambas; carriles 6 y 17 no pudieron ser caracterizadas.

Carril 19: control positivo (clarificado rotavirus porcino OSU)

Carril 20: marcador pesos moleculares pBR322/*Hae* III (587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124/123, 104 pb)

FIGURA 3.3.1.1. Gel de electroforesis al 2% de agarosa en TBE 1x de los productos de la *seminested* para discernir los G-tipos presentes.

Los G-tipos encontrados mayoritariamente fueron G1 en un 56.3% (85/151), seguido del G3 en un 31.8 % (48/151). En menor frecuencia, G9 en un 6% (9/151), G2 en un 4% (6/151) y G5 en un 2% (3/151). No se aisló en ninguna muestra cepas G4 ó G8.

TABLA 3.3.1.1. Distribución de los G-tipos en el agua residual de Barcelona.

Periodo tiempo	Número de muestras positivas								
	G1	G2 ^a	G2 ^b	G2 total	G3	G4	G5	G8	G9
6/98 – 04/99	7	0	2	2	4	0	0	0	1
05/99 – 04/00	53	0	0	0	28	0	2	0	3
05/00 – 04/01	20	0	4	4	13	0	0	0	2
05/01 – 04/02	3	0	0	0	1	0	0	0	0
05/02 – 01/03	2	0	0	0	2	0	1	0	3
Total	85	0	6	6	48	0	3	0	9

^a Resultado obtenido con los *primers* RVG9 y aCT2 analizando todas las muestras.

^b Todas las muestras que contenían aislados P[4] pero en los que no fue posible detectar el genotipo G2 fueron reanalizadas con los *primers* 9 Con1 y 9T1-2.

La distribución de los G-tipos a lo largo del período de estudio se muestra en la figura 3.3.1.2. No se apreció una emergencia destacable de ningún G-tipo, exceptuando las cepas G5 y la abundancia relativa de G9 en el último año. En números absolutos, el número de muestras G-tipadas fue destacablemente inferior en los dos últimos años, pero también lo fue el número de muestras analizadas (ver tabla 3.3.1.1.).

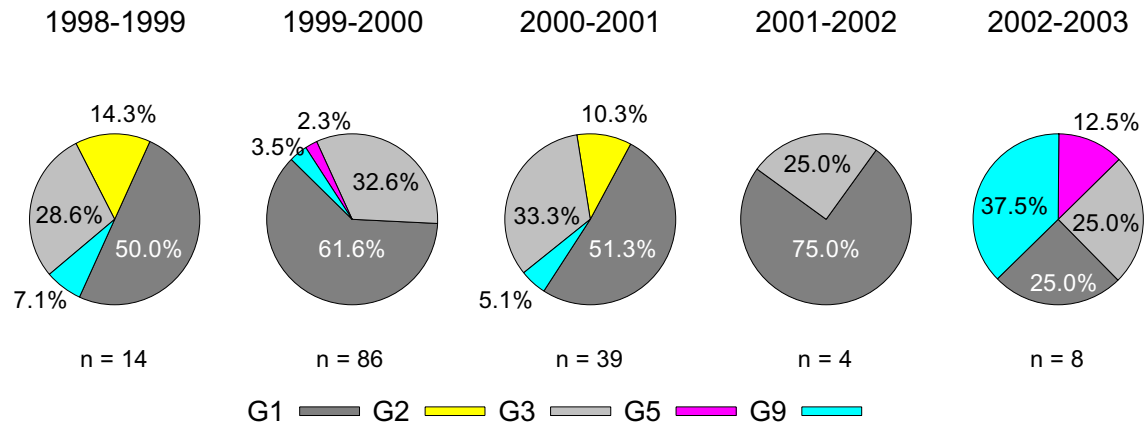
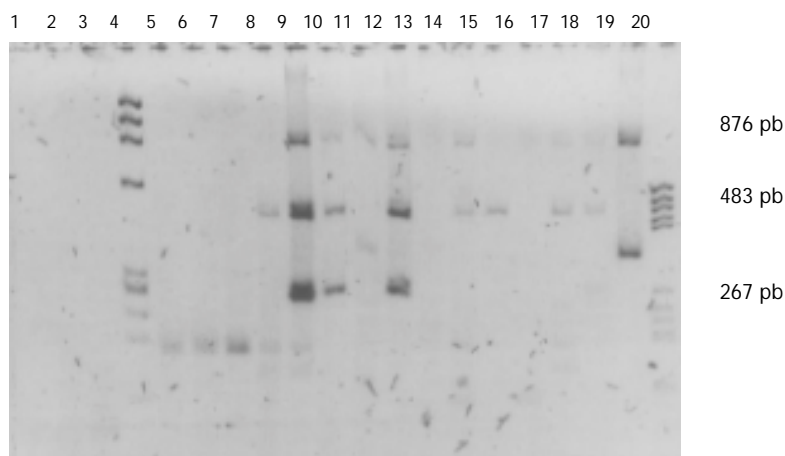


FIGURA 3.3.1.2. Distribución porcentual de G-tipos en las aguas residuales de Barcelona, 1998-2002, respecto al total de muestras G-tipadas de cada año.

En un primer tipaje de las muestras no se encontró ningún aislado G2. Fue con la utilización de la pareja de *primers* 9 Con1/9T2-1 descritos por Das y colaboradores (Das *et al.*, 1994) que pudieron detectarse 6 cepas G2. Cuatro de ellas escogidas al azar fueron confirmadas mediante secuenciación.

3.3.2. GENOTIPADO P

En el 71% de las 248 muestras en las que se detectó la presencia de rotavirus fue posible conocer el P-tipo. Diversos P-tipos fueron detectados si coexistían en una misma muestra (ver carril 12 en la figura 3.3.2.1.). En el 64.2% de las muestras P tipadas (113 muestras) existía más de un P-tipo.



Carriles 1, 2 y 3: controles sin molde de la RT, PCR y *seminested*.
 Carril 4: marcador pesos moleculares Φ X174/*Hae* III (1353, 1078, 872, 603, 310, 281/271, 234, 194, 118 y 72 pb)
 Carriles 5 - 18: muestras rotavirus VP6 positivas. 8, 14, 15, 17 y 18 contenían cepas P[4]; 11 contenía una cepa P[8]; 9, 10, y 12 contenían cepas P[4] y P[6]; 5, 6, 7, 13 y 16 no pudieron ser caracterizadas.
 Carril 19: control positivo (clarificado rotavirus humano VA70 -P[8]-)
 Carril 20: marcador pesos moleculares pBR322/*Hae* III (587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124/123, 104 pb)

FIGURA 3.3.2.1. Gel de electroforesis al 2.5% de agarosa en TBE1x de los productos de la seminested para discernir los P-tipos presentes.

Los P-tipos encontrados mayoritariamente fueron P[8] en un 49.7% (153/308), seguido de P[4] en un 37% (114/308). En menor frecuencia también se encontraron P[6] y P[9] en un 9.1% (28/308) y 4.2% (13/308) respectivamente. El número de muestras P-tipadas fue destacablemente menor en los dos últimos años pero también lo fue el número de muestras analizadas (ver tabla 3.3.2.1.).

TABLA 3.3.2.1. Distribución de los P-tipos en el agua residual de Barcelona.

Periodo tiempo	Número de muestras positivas					
	P[4]	P[6]	P[8] ^a	P[8] ^b	P[8] total	P[9]
6/98 – 04/99	18	3	6	15	21	1
05/99 – 04/00	68	13	20	70	90	5
05/00 – 04/01	20	6	14	14	28	1
05/01 – 04/02	6	3	1	4	5	4
05/02 – 01/03	2	3	3	6	9	2
Total	114	28	44	109	153	13

^a Resultado obtenido con los *primers* 1T-1 y Con 3 analizando todas las muestras.

^b Todas las muestras que no contenían aislados P[8] fueron reanalizadas con los *primers* 1T-1D y Con 3.

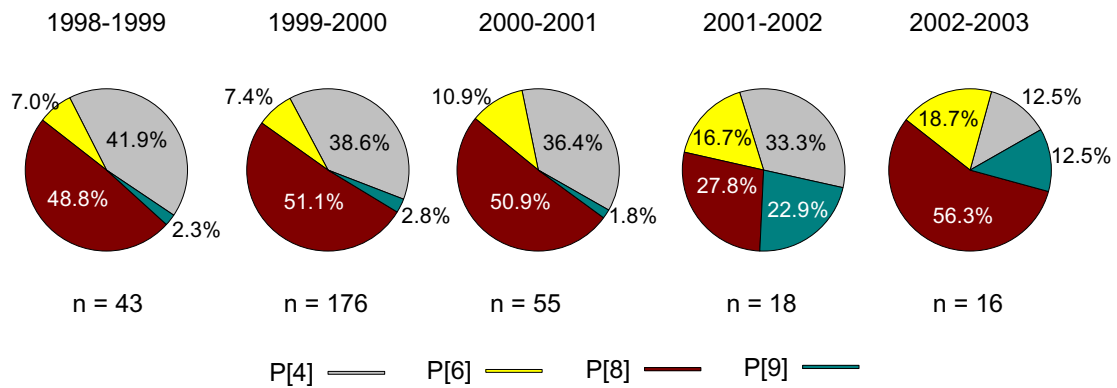


FIGURA 3.3.2.2. Distribución porcentual de P-tipos en las aguas residuales de Barcelona, 1998-2002, respecto el total de muestras P-tipadas de cada año.

La distribución de los P-tipos a lo largo del período de estudio se muestra en la figura 3.3.2.2. En un primer tipaje de las muestras se detectó una baja frecuencia de P[8] (un 22.1% del total). Utilizando el *primer* degenerado 1T-1D en lugar de 1T-1 (Iturriza-Gómara *et al.*, 2000) se incrementó la detección de aislados P[8] a un 49.7%. Es decir, un 71.2% de los aislados P[8] del agua residual de Barcelona no pudieron ser detectados con el *primer* 1T-1. Ante la sospecha de que se trataran de falsos positivos, un 15% de los aislados P[4] y un 7% de los aislados P[8] fueron confirmados por secuenciación.

3.3.3. COMBINACIONES G-TIPO/ P-TIPO

Dado que una misma muestra de agua residual podía presentar varias cepas, sólo las muestras que contenían un único G-tipo o un único P-tipo fueron utilizadas para el estudio de las posibles combinaciones G-tipo/P-tipo (125 muestras). Para el resto de muestras, o sólo se determinó el G-tipo (11 muestras) ó el P-tipo (128 muestras), o contenían varios G-tipos y P-tipos en la misma muestra no pudiendo ser emparejados (30 muestras). En 63 muestras que contenían rotavirus no se consiguió determinar ni el G-tipo ni el P-tipo (el 25.4% de las muestras positivas para rotavirus).

Durante los casi 5 años de estudio la combinación mayoritaria fue G1P[8], seguida de G1P[4] y G3P[8]. En menor proporción apareció G1P[6], G3P[4], G3P[6], G1P[9], y esporádicamente G2P[4], G5P[8], G9P[6] y G9P[8] (ver tabla 3.3.3.1.). Éstas últimas combinaciones se encontraron en períodos de tiempo concretos: G2P[4] en diciembre del 1998, G5P[8] en agosto del 2002, G9P[6] y G9P[8] ambos en noviembre y diciembre del 2002.

TABLA 3.3.3.1. Frecuencia de las combinaciones G-tipo/P-tipo de las cepas de rotavirus encontradas en las aguas residuales de Barcelona durante los 5 periodos anuales estudiados (6/1998-01/2003).

	Porcentaje de muestras positivas %				Total
	P[4]	P[6]	P[8]	P[9]	
G1	29.6 (n=37)	5.6 (n=7)	39.2 (n=49)	1.6 (n=2)	76.0 (n=95)
G2	0.8 (n=1)	0.0	0.0	0.0	0.8 (n=1)
G3	6.4 (n=8)	1.6 (n=2)	12.8 (n=16)	0.0	20.8 (n=26)
G4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
G5	0.0	0.0	0.8 (n=1)	0.0	0.8 (n=1)
G8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
G9	0.0	0.8 (n=1)	0.8 (n=1)	0.0	1.6 (n=2)
Total	36.8 (n=46)	8.0 (n=10)	53.6 (n=67)	1.6 (n=2)	100.0 (n=125)

3.3.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS G5

Se compararon 256 pb del gen 9 (el fragmento resultante de la *seminested*) de dos de las cepas G5 encontradas en el agua residual urbana de Barcelona (BCN241 (diciembre de 1999) -número de acceso AY227359- y BCN316 (marzo de 2000) -número de acceso AY227360-) con las secuencias G5 existentes en el banco de datos GenBank.

Las dos muestras presentaban entre ellas un 92% de homología. Las cepas más cercanas a ellas fueron la cepa Po/OSU con un 94% de homología a BCN241 y 92% a BCN316, seguida de la cepa Po/A34 con un 92 y 91% de homología respectivamente (ver figura 3.3.4.). Ambas cepas (Po/OSU y Po/A34) son de origen porcino.

Ante la sospecha del origen porcino de BCN241 y BCN316, y la aparición de P-tipos humanos no descritos anteriormente asociados a cepas G5, se procedió al análisis del genotipo de su VP4. Los P-tipos asociados a las cepas G5 son el P9[7] (Po/OSU, Eq/H-1), el P13[13] (Po/A46) y el P1A[8] (Hu/IAL-28). Existe alguna cepa (Po/A34) de la cual aún no se conoce su P-tipo. Así, con *primers* específicos de P[8], P[7], P[13] y P[6]2B se trató de amplificar el segmento 4 de las muestras BCN241 y BCN316 sin éxito.

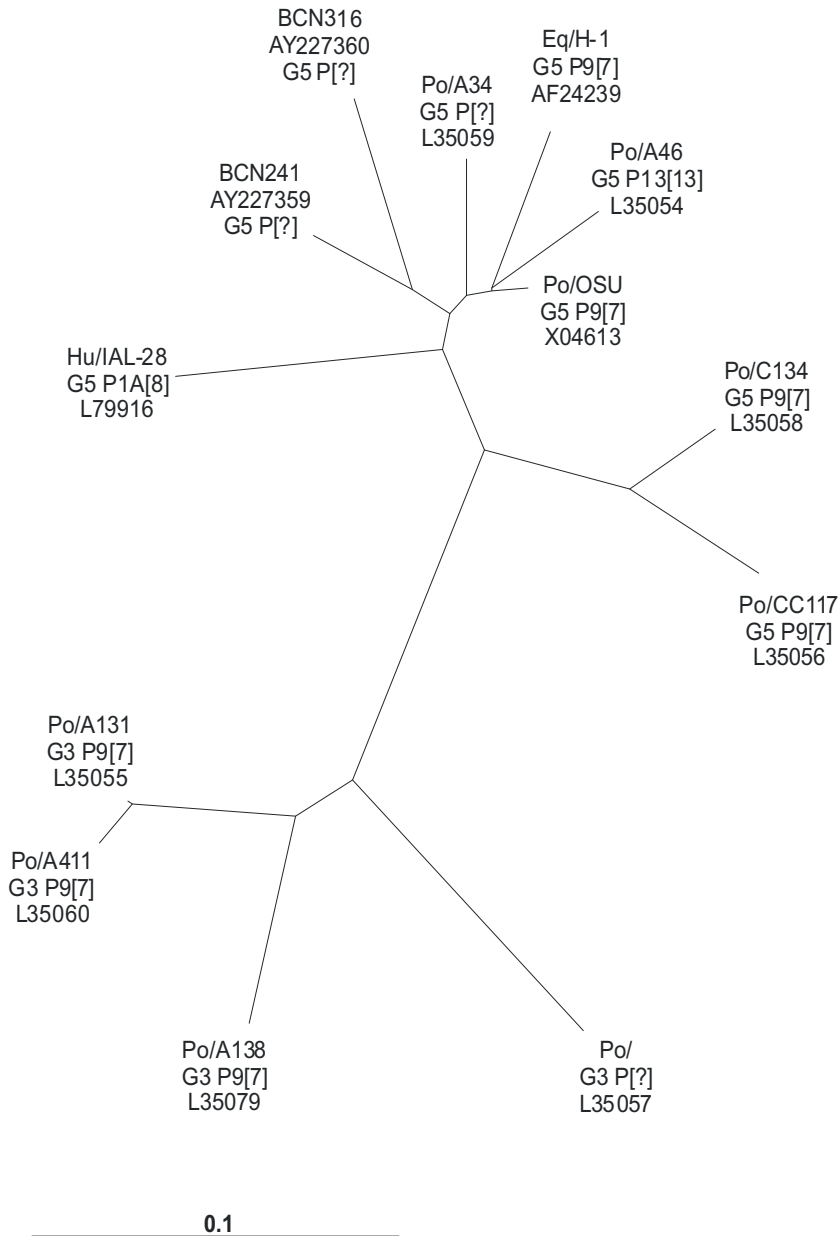


FIGURA 3.3.4. Árbol filogenético construido a partir de una secuencia nucleotídica de 256 pb del gen 9 de las cepas G5 aisladas en el agua residual de Barcelona y las cepas G5 depositadas en el GenBank, mediante el programa MEGA2. Se ha utilizado como *outgroup* algunas cepas porcinas G3. La suma de las longitudes de las ramas entre 2 determinadas cepas es directamente proporcional a la distancia filogenética que existe entre ellas. La barra indica la distancia que representa un 0.1% de divergencia.

Entre las muestras del último año de estudio apareció una tercera muestra G5, la cual pudo ser asociada al genotipo P[8].

3.4. DISCUSIÓN

El objetivo del presente capítulo fue conocer qué serotipos de rotavirus humanos circulaban en Barcelona durante el período de estudio. Habitualmente el serotipado se realiza mediante anticuerpos neutralizantes de la infectividad del virus, pero debido a la dificultad de obtener suficiente carga vírica y a la necesidad de una técnica sensible, rápida y fiable, realizamos la clasificación mediante métodos publicados que predicen el serotipo utilizando la técnica de PCR con *primers* específicos (Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1992).

Aún disponiendo de la eficiente técnica de la liofilización para la concentración de virus presentes en agua residual, hemos de tener en cuenta que la carga vírica en las aguas residuales no es comparable con la carga vírica presente en las heces de una persona infectada. De las 248 muestras en las que se había detectado presencia de rotavirus (mediante RT-PCR y Southern de VP6), sólo fue posible conocer el G-tipo en el 42.3% de

ellas y el P-tipo del 71%, ya que la sensibilidad de las RT-PCR de VP7 y VP4 eran claramente inferiores (datos no mostrados). También es posible que el elevado número de muestras no tipadas se debiera a la existencia de genotipos no ensayados y/o a la presencia de inhibidores en las propias muestras. Sin embargo, las aguas analizadas eran de origen claramente urbano; por tanto se hace difícil pensar en la existencia de muestras positivas de origen animal. Por otro lado, en estudios previos, la liofilización mostró ser un buen sistema de eliminación de inhibidores de técnicas moleculares (Gajardo *et al.*, 1995).

Durante los 4 años y medio de estudio se observó un claro y homogéneo predominio de G1, siguiendo en importancia G3, y existiendo una cierta incidencia de cepas G9, particularmente en el último año. Esporádicamente se detectaron cepas G2 y G5.

La ausencia de cepas G4 y G8 en las aguas residuales de Barcelona es un dato interesante, ya que G4 fue uno de los genotipos más comunes encontrados en estudios previos en Barcelona (Octubre 1996-Octubre 1997) por Wilhelmi y colaboradores (Wilhelmi *et al.*, 1999) y Valencia (Septiembre 1996-Mayo 1999) por Buesa y colaboradores (Buesa *et al.*, 2000). Sin embargo, en este último estudio, la frecuencia de G4 fue disminuyendo a lo largo del periodo de estudio. La alta prevalencia de G3 es comparable a la presencia de este G-tipo en estudios llevados a cabo en China (Fang *et al.*, 2002), Méjico (Rodríguez *et al.*, 2001), Brasil (Rosa *et al.*, 2002), Ghana (Asmah *et al.*, 2001) y Malawi (Cunliffe *et al.*, 2001). En cambio, la inicial ausencia de G2 fue sorprendente y coincidente con los análisis de aguas residuales del Cairo llevados a cabo en el mismo laboratorio (Villena *et al.*, 2003). Bajo la sospecha de encontrarnos frente un problema técnico, se llevó a cabo una *seminested* monoplex utilizando los *primers* descritos por Gouvea (RVG9 y aCT2) y, simultáneamente, otra monoplex con otros *primers* (9 Con 1 y 9T1-2) ya descritos previamente (Das *et al.*, 1994). Seis muestras G2 fueron detectadas con la segunda pareja de *primers*. En Guipúzcoa (País Vasco), en un estudio llevado a cabo entre 1984 y 1997 en el que analizaban heces infantiles, el serotipo G1 fue el más frecuente, seguido de G4. En cambio, G2 y G3 se encontraban muy esporádicamente (Cilla *et al.*, 2000).

En cuanto a los datos de P-tipo en Barcelona, existe una proporción similar entre cepas P[8] y P[4], seguida de la existencia de otras cepas P[6] y P[9]. Esta distribución es bastante homogénea a lo largo de todo el periodo estudiado. En Valencia, a sólo 300 Km de Barcelona, Buesa y colaboradores (Buesa *et al.*, 2000) describieron un patrón un tanto diferente (82% cepas P[8], 5.5 % cepas P[4] y 12.4 % cepas no P-tipadas) durante 1996-1999. En Olot, una localidad rural a 100 Km al norte de Barcelona, Wilhelmi y colaboradores (Wilhelmi *et al.*, 1999) describían entre octubre de 1996 y octubre de 1997 un 100% de cepas P[8]. Los altos niveles de P[4] encontrados en Barcelona han sido también descritos en China (Fang *et al.*, 2002), India (Kang *et al.*, 2002), Túnez (Trabelsi *et al.*, 2000), Brasil (Araujo *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2002) y Argentina (Argüelles *et al.*, 2000).

En un primer análisis de las muestras, el número de muestras positivas P[8] fue bajo. Cuando se repitió la seminested con el *primer* degenerado 1T-1D (Iturriza-Gómara *et al.*, 2000), el número de aislados P[8] se incrementó notablemente. Por tanto, existen aislados P[8] que realmente escapan al *primer* 1T-1, tal y como ya indicaban Iturriza y colaboradores (Iturriza-Gómara *et al.*, 2000).

Cuando se trató de averiguar que combinaciones eran las más abundantes en Barcelona se seleccionaron aquellas muestras en las que se podía discernir el G-tipo y el P-tipo simultáneamente. Fueron descartadas aquellas muestras en que no se había podido caracterizar ambos genes, y aquellas que presentaban múltiples genotipos P y G. La igual incidencia de combinaciones consideradas comunes (52.8 %) con las consideradas inusuales (47.2 %) fue un resultado inesperado. Parece existir una sustitución de la combinación G2P[4], una de las combinaciones considerada común (Gentsch *et al.*, 1996), por las consideradas menos comunes G1P[4] y G3P[4]. Éstas últimas han sido detectadas en muchas partes del mundo como Estados Unidos (G1P[4] Ramachandran *et al.*, 1998; G1P[4] Griffin *et al.*, 2000; G1P[4] Abdel-Had *et al.*, 2003), Méjico (G1P[4] y G3P[4] Rodríguez *et al.*, 2001), Reino Unido (G1P[4] Iturriza-Gómara *et al.*, 2001), Irlanda (G1P[4] O'Halloran *et al.*, 2000), Francia (G1P[4] Bon *et al.*, 2000), Sudáfrica (G3P[4] Fischer *et al.*, 2000) y China (G1P[4] y G3P[4] Fang *et al.*, 2002), e incluso en algunos países como Túnez (G1P[4] Trabelsi *et al.*, 2000), Argentina (G1P[4] Argüelles *et al.*, 2000), India (G1P[4] Kang *et al.*, 2002), Ghana (G3P[4] Asmah *et al.*, 2001) y Brasil (G3P[4] Rosa *et al.*, 2002) se consideran combinaciones muy comunes o emergentes.

Recientemente ha sido publicado un estudio donde se caracterizaron 100 aislados de muestras fecales de niños del Children's Hospital de Detroit (Michigan), durante el periodo de mayor incidencia de gastroenteritis causadas por rotavirus (febrero y marzo de 2001). La combinación G-tipo y P-tipo más prevalente fue G1P[4] (41%), seguida de G1P[8] (16%) y G4P[4] (14%) (Abdel-Haq *et al.*, 2003). Así, parece existir una clara emergencia de cepas con la combinación G1P[4] en varias partes del mundo, observada también en nuestro estudio realizado en Barcelona.

TABLA 3.4.1. Distribución de cepas de rotavirus comunes y no comunes en diferentes países y Barcelona.

Cepas	% de cepas											
	Estados Unidos ^a 1996-1999/ 2001	Méjico ^b 1994-1997	Brasil ^c 1998-1999	Argentina ^d 1996-1998	India ^e 1996-1998/ 1995-1999	China ^f 1998-2000	Túnez ^g 1995-1999	Egipto ^h 1998-1999	Irlanda ⁱ 1997-1999	Reino Unido ^j 1995-1996/ 1995-1999	España ^k Valencia 1996-1999	España Barcelona 1998-2003
<i>Comunes</i>												
G1P[8]	76/16	39.6	6.4	12/23	15/12	29	50	38.5	32.1	55/77.5	43	39.2
G2P[4]	11/0	16.3	0	43/30	22/12.7	31	8	0	28.5	39.9	6	0.8
G3P[8]	2/0	19	0	0/0.2	0/0.8	13	0	11.5	0	1/2.7	2	12.8
G4P[8]	1/1	0	0	4/11	6/12	2	0	0	11.2	17/5.4	32	0
Total	90/17	74.9	6.4	59/64	43/37.5	75	58	50	71.8	76/95.4	83	52.8
<i>Raras</i>												
G1P[4]	0.1/41	3.1	1	14/2.7	0/11.1	4.1	21	11.5	5.8	0/0.9	0	29.6
G3P[4]	-/0	1.5	19.1	0/-	0/0	4.1	0	0	0	0/0	0	6.4
G1P[6]	0.5/0	0	0	-1.4	0/0.8	2.4	0	27	0	1/0.1	0	5.6
G1P[9]	-/0	-	0	-	-/-	2.8	0	0	0	0/0.1	0	1.6
G3P[6]	-/0	0	0	-	0.7/0	1.7	0	0	0	6/0.3	0	1.6
G5P[8]	-/-	-	0	-0.4	-/-	-	0	0	-	-/0	-	0.8
G9P[6]	3.2/0	0	0	-0.4	9/3.2	3.8	0	0	0	13/0.7	-	0.8
G9P[8]	1/0	0	0	-	5/0	0.3	0	3.8	0	0/1.9	-	0.8
G4P[6]	-/0	0	1	-0.2	0.7/0	2.8	21	7.7	0	0/0.03	0	0
G3P[9]	0.2/0	-	0	-	-/-	0	0	0	0	0/0.03	0	0
G4P[4]	0/14	0	0	0/0.4	0/0	0.7	0	0	0.6	0/0.2	0	0
Total	5/55	4.6	21.1	14/5.1	15.4/15.1	24	42	50	6.4	20/4.3	0	47.2

^a Datos obtenidos de Griffin *et al.*, 2000 (1996-1999) y Abdel-Haq *et al.*, 2003 (2001).

^b Datos obtenidos de Rodriguez *et al.*, 2000.

^c Datos obtenidos de Rosa *et al.*, 2002.

^d Datos obtenidos de Argüelles *et al.*, 2000/Bok *et al.*, 2001

^e Datos obtenidos de Jain *et al.*, 2001/Kang *et al.*, 2002.

^f Datos obtenidos de Fang *et al.*, 2002.

^g Datos obtenidos de Trabelsi *et al.*, 2000.

^h Datos obtenidos de Villena *et al.*, 2003.

ⁱ Datos obtenidos de O'Halloran *et al.*, 2000.

^j Datos obtenidos de Cubitt *et al.*, 2000/Iturriza-Gómara *et al.*, 2001.

^k Datos obtenidos de Buesa *et al.*, 2000.

Dato no disponible (-)

Una posible explicación pudiera ser el incremento de inmigración procedente de otros países en estos últimos años en Barcelona (ver figura 3.4.1.). Tal efecto no fue observado en el estudio llevado a cabo en Valencia por Buesa y colaboradores (Buesa *et al.*, 2000) durante los años 1996-1999, quizás porque el fenómeno de inmigración ha sido más acusado posteriormente. En el año 1999, la población inmigrante en el País Valenciano representaban un 2% de la población total, mientras que en Cataluña ya representaban un 3%. En España el número de extranjeros regularizados se ha doblado desde el año 1998 al 2003 de alrededor de 700.000 inmigrantes a 1.449.000, mientras que en Barcelona se ha cuadruplicado durante este mismo periodo de tiempo. Del total de extranjeros en el estado español, el 22.91% se encuentran residiendo en Cataluña, convirtiéndola en la comunidad autónoma con mayor porcentaje de población de origen extranjero.

La mayor parte de estos inmigrantes provienen de Marruecos, Ecuador, Reino Unido, Colombia, Perú, Gambia, Republica Dominicana, Alemania, Francia, China, Filipinas, Pakistán y Senegal con porcentajes que varían según el año y la región geográfica española (datos obtenidos de <http://estaticos.elmundo.es> y del Institut Català de la Mediterrànea). En la provincia de Barcelona destacan los extranjeros procedentes de Marruecos, Perú, China, Francia, República Dominicana, Alemania, y en estos dos últimos años se ha incrementado mucho la inmigración desde Ecuador, Pakistán, Argentina e Italia (datos facilitados por el Institut d'Estadística de Catalunya, IDESCAT). En enero de 2003 la población inmigrante en Barcelona ya alcanzó el 10.7% de la población total (ver tabla 3.4.2.).

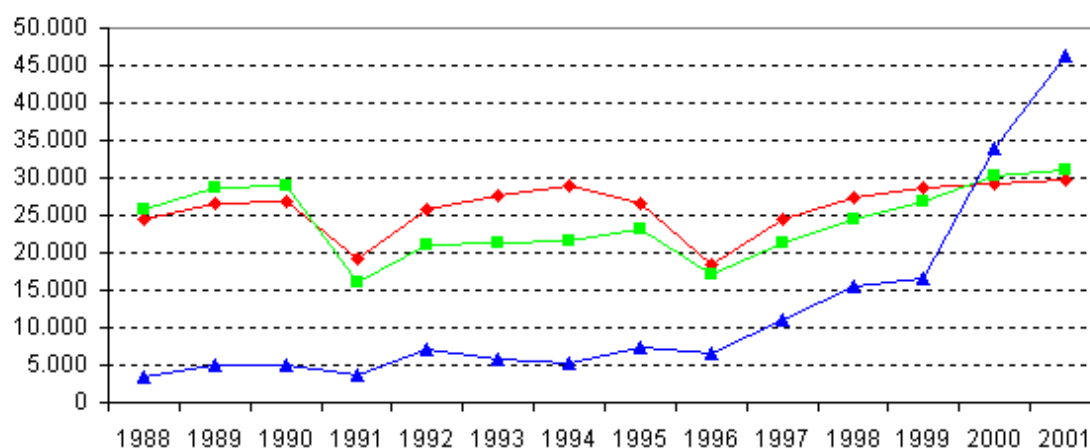


FIGURA 3.4.1. Evolución de las migraciones interiores en Cataluña desde el año 1988 hasta el 2000. (Fuente: estadística de variaciones residenciales, CED). En verde (?) se representa la inmigración procedente del resto de España, en azul (?) la inmigración extranjera y en rojo (?) la emigración al resto de España.

TABLA 3.4.2. Evolución de la población extranjera en la ciudad de Barcelona: 1996-2003. (Información facilitada por el Departament d'Estadística de l'Ajuntament de Barcelona).

	1996	1999	2000	2001	2002	2003
Total nacionalidad extranjera	29.354	40.903	53.428	74.019	113.809	163.046
% sobre la población total	1,9 ^a	2,7	3,5	4,9	7,6	10,7
EUROPA	9.407	11.289	13.316	16.286	22.924	33.111
Unión Europea	8.412	9.851	11.185	12.712	16.211	21.873
Europa central y oriental	384	884	1.542	2.953	6.006	10.425
Resto de Europa	611	554	589	621	707	813
ÁSIA	5.576	7.164	9.326	12.175	17.934	26.412
Oriente Medio	672	569	687	893	1.147	1.346
Ásia central	1.998	3.428	4.933	7.012	11.604	18.528
Sudeste asiático	2.103	2.639	3.062	3.534	4.302	5.435
Japón	803	528	644	736	881	1.103
ÁFRICA	4.044	6.365	8.181	10.044	13.893	17.002
África del Norte y Magreb	3.510	5.487	6.786	8.242	11.291	13.939
África subsahariana	451	726	1.180	1.525	2.244	2.638
África central y meridional	83	152	215	277	358	425
AMÉRICA	10.213	15.972	22.488	35.378	58.944	86.364
América del norte	824	891	1.031	1.170	1.413	1.930
América central	2.113	4.376	5.470	6.985	9.003	11.978
América del sur	7.276	10.705	15.987	27.223	48.528	72.456
OCEANIA	76	81	85	99	114	157

^a Porcentaje calculado a partir de la cifra oficial de población en la ciudad de Barcelona.

Otras cepas infrecuentes detectadas en Barcelona fueron G1P[6], G1P[9], G3P[6], G9P[6], G9P[8] y G5P[8]. Éstas han sido también detectadas en otros países cada vez en mayor número. Por ejemplo, **G1P[6]** ha sido también detectado en Nigeria (Adah *et al.*, 2001), China (Fang *et al.*, 2002), Sudáfrica (Fischer *et al.*, 2000), Malawi (Cunliffe *et al.*, 2001), Estados Unidos (Ramachandran *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 2000), Argentina (Bok *et al.*, 2001), India (Kang *et al.*, 2002), Francia (Bon *et al.*, 2000) y Reino Unido (Iturriza-Gómara *et al.*, 2000); **G1P[9]** en China (Fang *et al.*, 2002) y Reino Unido (Iturriza-Gómara *et al.*, 2001); **G3P[6]** en Ghana (Asmah *et al.*, 2001), Malawi (Cunliffe *et al.*, 2001), Brasil (Araujo *et al.*, 2002), China (Fang *et al.*, 2002), India (Jain *et al.*, 2001), Sudáfrica (Fischer *et al.*, 2000) y Reino Unido (Cubitt *et al.*, 2000; Iturriza-Gómara *et al.*, 2001); **G9P[6]** en Holanda (Widdowson *et al.*, 2000), India (Jain *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002), Estados Unidos (Ramachandran *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 2000), China (Fang *et al.*, 2002), Brasil (Araujo *et al.*, 2001), Malawi (Cunliffe *et al.*, 2001), Reino Unido (Cubitt *et al.*, 2000; Iturriza-Gómara *et al.*, 2001) y Argentina (Bok *et al.*, 2001); **G9P[8]** en Brasil (Araujo *et al.*, 2001), India (Jain *et al.*, 2001), Reino Unido (Iturriza-Gómara *et al.*, 2001), Estados Unidos (Ramachandran *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 2000) y China (Fang *et al.*, 2002) y **G5P[8]** en Brasil (Araujo *et al.*, 2002) y Argentina (Bok *et al.*, 2001). Así pues, parece ser que existe una circulación de nuevas cepas o emergencia de cepas hasta ahora desconocidas. Por

otro lado, cada vez son más los genotipos conocidos y los incluidos en los análisis de vigilancia. Pero parece claro que el patrón de combinaciones comunes y no comunes está cambiando (ver tabla 3.4.1.).

La detección de 3 cepas G5 fue también inesperada. G5 está considerado un G-tipo típicamente porcino, aunque también se ha detectado en humanos (Gouvea *et al.*, 1994c) y en equinos (Gouvea *et al.*, 1994b). Se intentó discernir el origen ya que sólo se conoce cepas de origen humano de serotipo G5 en aislados infantiles de Brasil (Gouvea *et al.*, 1994c). También se investigó que no se tratara de una contaminación dado que se había utilizado habitualmente la cepa porcina G5P[7] OSU como control positivo para algunas PCR. Para ello secuenciamos dos de las muestras y las alineamos con la cepa Po/OSU de nuestro laboratorio y con otros aislados G5 existentes en los bancos de datos. Sólo se pudo incluir una secuencia nucleotídica G5 de origen humano debido a que no se dispone de la región amplificada por los *primers* RVG9/cFT5 de las cepas G5 de origen humano disponibles en el banco de datos. Tampoco fue posible secuenciar el gen entero dada la muy poca señal del producto de la primera PCR y a la existencia de otros G-tipos en éstas mismas muestras. Ambos aislados barceloneses presentaron una homología del 92% entre sí, similar a sí las comparamos con los aislados Po/OSU y Po/A34. Concluimos que se trataban de aislados G5 porque presentaron mayor homología con las cepas G5 que con el resto de cepas de otros serotipos, pero no disponíamos de suficiente información para conocer qué cepa G5 eran. Las cepas G5 disponibles en el Genbank presentaron un grado de homología entre el 96 y 84% entre sí en esta región nucleotídica (los casos extremos fueron: Po/A46 –L35054- y Po/OSU –X04613- quienes presentaron un grado de homología del 96% y en el caso contrario se encontraron las cepas Eq/H-1 –AF24239- y Po/CC117 –L35056- quienes sólo presentaron un 84% de homología). En conclusión, se confirmó que se trataba de cepas G5 y se descartó la posibilidad de una contaminación con el control positivo.

Posteriormente se investigó el P-tipo de estas cepas G5. Una de ellas se asoció a P[8], al igual que otras cepas descritas de origen humano descritas en Brasil (Timenetsky *et al.*, 1997; Mascarenhas *et al.*, 2002), pero para las otras dos no se consiguió determinar. A pesar de que su P-tipo no pudo ser descifrado, la observación del árbol filogenético de un fragmento de 256 pb de todas las cepas conocidas G5 disponibles en el banco de datos permitió conocer que eran cercanas a las cepas porcinas OSU y A34, pero se descartó la posibilidad de que fueran P[7], P[8] o P[13]. Tampoco se amplificó con un *primer* específico del P-tipo porcino P[6]2B. Así, su P-tipo no pudo ser descifrado.

La importancia de conocer los rotavirus circulantes en una zona geográfica concreta y/o en un periodo de tiempo concreto estriba en su utilidad como herramienta indispensable para el diseño de una vacuna efectiva contra rotavirus. Ello es aplicable tanto en países en vías

de desarrollo como en los considerados desarrollados, ya que la emergencia de serotipos inusuales e incluso desconocidos puede darse en cualquier parte del mundo.

Estos estudios ambientales pueden dar la visión necesaria y global de cuales son estas cepas circulantes en un momento dado, aunque es cierto que pueden verse distorsionadas por una mayor supervivencia de ciertas cepas en un mismo ambiente. Pero dado el tipo de muestra analizada parece lógico pensar que detectaremos aquello más abundante, es decir, lo más excretado, y por tanto, lo más prevalente en la población. Así pues, la caracterización molecular de rotavirus en el agua residual puede proporcionarnos una visión panorámica de los serotipos de rotavirus circulantes en la población, así como revelar la existencia de infecciones asintomáticas.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de cada uno de los capítulos del presente trabajo son las siguientes:

1.1. El proceso de liofilización es un buen sistema de concentración de virus entéricos a partir de agua residual y de eliminación de inhibidores para las posteriores técnicas moleculares.

1.2. El método de detección molecular de rotavirus del grupo A basado en la retrotranscripción y amplificación por PCR de una región del sexto segmento altamente conservada entre todas las cepas de rotavirus del grupo A conocidas presenta una buena eficiencia y es capaz de detectar 200 moléculas de dsRNA/ml.

1.3. El proceso de cuantificación molecular mediante RT-PCR a tiempo real de la misma región es capaz de detectar y cuantificar 150 moléculas de dsRNA/ml.

2.1. Rotavirus es el virus entérico RNA más frecuentemente detectado en el agua residual de Barcelona desde junio de 1998 hasta enero de 2003.

2.2. Existe estacionalidad en la cantidad de virus presente en el agua residual de Barcelona, siendo la carga viral mayor durante el periodo de tiempo comprendido entre noviembre y abril. Ha sido posible correlacionarlo con la estacionalidad existente en el número de casos clínicos declarados.

3.1. El agua residual urbana puede ser una herramienta útil para conocer qué cepas de rotavirus se encuentran circulando por la población humana, ofreciendo información muy valiosa para el diseño de vacunas.

3.2. Las cepas de rotavirus circulantes en la población de Barcelona entre junio de 1998 y enero de 2003 han sido mayoritariamente G1P[8], G1P[4] y G3P[8]. Se ha observado una presencia similar de combinaciones G-tipo/P-tipo consideradas comunes (52.8%) y de cepas consideradas raras (47.2%) en el agua residual de Barcelona durante el período de estudio.

APÉNDICE I: SOLUCIONES Y TAMPONES

SOLUCIONES Y TAMPONES

A continuación se detalla la composición de tampones, soluciones y medios de cultivo empleados en este trabajo. En el caso de ser esterilizados se anota el método, así como la temperatura de almacenamiento, en el caso de ser diferente a la del ambiente.

SOLUCIONES DE CULTIVO CELULAR

PBS

NaCl	8 g/l
KCl	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1.15 g/l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/l
en agua bidestilada y ajustado a pH 7.2	
Esterilización por autoclave	
Almacenamiento a 4°C	

Tripsina-EDTA

Tripsina 1:250 (Difco)	0.25% (p/v)
EDTA	0.5 mM
Penicilina/Estreptomicina	100 U/ml-100 µg/ml
en PBS	
Esterilización por filtración	
Almacenamiento a -20°C	

Tripsina infección de rotavirus

Tripsina SIGMA GIX	10 mg/ml
Penicilina/Estreptomicina	100 U/ml-100 µg/ml
en PBS	
Esterilización por filtración	
Almacenamiento a -20°C	

MEM 10% FCS

FCS	10% (v/v)
L-Glutamina (200 mM)	2 mM
NEAA (100X)	1X
HEPES 1M	15 mM
Bicarbonato (7.5 % p/v)	0.15% (p/v)
Penicilina/Estreptomicina	100 U/ml-100 µg/ml
en MEM 1x con sales de Earle y en H ₂ O Milli-Q	
Almacenamiento a 4°C	

Medio post-infección

L-Glutamina (200 mM)	2 mM
NEAA (100X)	1X
HEPES 1M	15 mM
Bicarbonato (7.5 % p/v)	0.15% (p/v)
Penicilina/Estreptomicina	100 U/ml-100 µg/ml
en MEM 1x con sales de Earle y en agua bidestilada	
Almacenamiento a 4°C	

MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANOS

Medio S. O. C.

Bactotripton	2 g
Extracto de levadura	0.55 g
NaCl 1M	1 ml
KCl 1 M	1 ml
en 97 ml agua bidestilada	
Esterilización por autoclave	
A 1 ml de medio S. O. C. se añade 10 µl de una solución 1 M MgCl ₂ y 1 M MgSO ₄ , y 10 µl de Glucosa 2 M.	

LB líquido

Peptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
en agua bidestilada	
Esterilización por autoclave	

LB agar

Peptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
agar	15 g/l
en agua bidestilada	
Esterilización por autoclave	

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Tampón L2

Tiocianato de Guanidina	1.2 g/ml
en Tris-HCl 0.1 M pH 6.4	
Calentar a 60-65°C para ayudar a su disolución	
Almacenamiento a temperatura ambiente y en oscuridad	
Estable durante 3 semanas	

Tampón L6

Tampón L2	100 ml
EDTA 0.2 M pH 8.0	11 ml
Tritón X-100	1.22 ml
Almacenamiento a temperatura ambiente y en oscuridad	
Estable durante 3 semanas	

SiO₂

SiO ₂ (SIGMA)	60 g
en 500 ml de H ₂ O Milli-Q	
Sedimentación durante 24 horas a temperatura ambiente. Succionar 430 ml del sobrenadante y añadir 500 ml agua bidestilada. Resuspensión vigorosa y sedimentación durante 5 horas mínimo. Succionar 450 ml y añadir 600 µl de 32% HCl. Alicuotar y autoclavar durante 45' a 121°C 1atm de sobrepresión.	
Almacenamiento a temperatura ambiente en oscuridad.	
Estable durante 6 meses.	

TE

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
en agua bidestilada pH 8.0	
Esterilización por autoclave	
Almacenamiento a temperatura ambiente	

PURIFICACIÓN PRODUCTO DE PCR

Kit High Pure PCR Product Purification Kit (ref.1 732 676, Roche)

Binding Buffer

Tiocianato de guanidina	3 M
Tris-HCl	10 mM
Etanol	5% (v/v)
pH 6.6 (25°C)	

Elution Buffer

Tris-HCl	10 mM
pH 8.5 (25°C)	

Wash Buffer

NaCl	20 mM
Tris-HCl	2 mM
Etanol	1:4
pH 7.5 (25°C)	

ELECTROFORESIS

Gel 8% Acrilamida

	A	B
30 % Acrilamida/0.8 % Bisacrilamida	1.34ml	10.6ml
Agua bidestilada	3.1 ml	25 ml
10X TBE	0.5 ml	4 ml
10% Persulfato amónico	50 µl	400 µl
N, N, N', N' Tetrametil-etilenodiamina (TEMED)	5 µl	40 µl

**A. Mini PROTEAN® II BioRad separadores
0.75 mm (8.3*7.3 cm)**

**B. Sturdier SE 400 unidad vertical Hoefer
separadores 1.5 mm (18*16 cm)**

Tampón TBE 10x

Tris	108 g/l
Ácido bórico	55 g/l
EDTA 0.05 M (pH 8.0)	2% (v/v)
en agua bidestilada	
Esterilización por autoclave	

HIBRIDACIÓN

SSC 20X

NaCl	3 M
Citrato trisódico	0.3 M
en agua bidestilada y pH 7.0	
Esterilización por autoclave	

Solución estándar

SSC	5X
N-Laurosylosarcosina (SIGMA)	0.1% (p/v)
SDS	0.02% (p/v)
Agente bloqueante (Roche)	1% (p/v)
en agua bidestilada	
Esterilización por autoclave	
Alicuotado y almacenado a -20°C	

Solución de prehibridación

DNA de espermatozoos de arenque (desnaturalizado previamente mediante ebullición durante 10 minutos)	
100 µg/ml en solución estándar	

Solución hibridación

Sonda marcada con digoxigenina	5 pmol/ml
en solución de prehibridación	

Tampón TAE 10x

Tris	48.4 g/l
Ácido acético glacial	1.14 % (v/v)
EDTA 0.05 M (pH 8.0)	2% (v/v)
en agua bidestilada	
Esterilización por autoclave	

Tampón de carga

Glicerol	30 % (v/v)
Azul de bromofenol	0.25 % (p/v)
en agua bidestilada	

Tampón I

Ácido maleico	100 mM
NaCl	150 mM
en agua bidestilada	
Esterilización por autoclave	
Almacenado a 4°C	

Tampón de lavado

Tween® 20	0.3 %
en tampón I	
Preparado al momento	

Solución bloqueante

Agente bloqueante (Roche)	1 % (p/v)
en tampón I	
Esterilización por autoclave	
Almacenado a 4°C	

Solución anticuerpo

Anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina 150U/200 µl (Roche). 1:25000 en solución bloqueante.	
Preparación en el momento de usar	

Tampón fosfatasa

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM
en agua bidestilada pH 9.5	
Esterilización por autoclave	
Almacenamiento a 4°C	

Solución CSPD

CSPD® (Roche)	1:100
en tampón fosfatasa	
Preparación en el momento de usar	

REVELADO FOTOGRÁFICO

Solución reveladora

Revelado manual G150 (AGFA)	1:5
en H ₂ O	

Solución fijadora

Fijador manual G350 (AGFA)	1:5
en H ₂ O	

APÉNDICE II: OLIGONUCLEÓTIDOS

En las siguientes tablas se detalla la secuencia nucleotídica de cada uno de los oligonucleótidos empleados a lo largo de este trabajo. También se muestra la posición dentro de la secuencia nucleotídica de una cepa de rotavirus de referencia publicada en el Genbank junto con la longitud, temperatura de fusión y la fuente bibliográfica si procede.

ROTAVIRUS

Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición	Nº acceso	nt	Tm	
VP6-3	GCT TTA AAA CGA AGT CTT CAA C	2-23	K02086 ¹	22	58.6	Villena <i>et al.</i> , 2003
VP6-4	GGT AAA TTA CCA ATT CCT CCA G	187-166	K02086	22	60.1	Villena <i>et al.</i> , 2003
VP6-4bis	GGT AAA TTA CCA ATT CCT CCA GTC TGA	187-151	K02086	37	73	No publicado
Probe	AGA TCA TTT C CAA ATG ATA GTT ACT ATG AAT GG	129-151	K02086	23	46.9	Villena <i>et al.</i> , 2003
Beg 9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1-28	K02086	28	69.6	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
End 9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062-1036	K02086	27	59.7	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
RVG 9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC T	1062-1044	K02086	19	51.7	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
aBT1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	314-335	K02086	22	58.5	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
aCT2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	411-435	K02086	25	58.9	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
aET3	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG	689-709	K02086	21	62.3	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
aDT4	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	480-498	K02086	19	60.9	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
cFT5	GAC GTA ACA ACG AGT ACA TG	760-779	X04613 ²	20	55.5	Gouvea <i>et al.</i> , 1994
aAT8	GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG	178-198	K02086	21	59.3	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
aFT9	CTA GAT GTA ACT ACA ACT AC	757-776	K02086	20	42.2	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
CON 2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887-868	M21014 ³	20	56.8	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
CON 3	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32	M21014	22	63.4	Gouvea <i>et al.</i> , 1994
1T-1	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	356-339	M21014	18	53.3	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
1T-1D	TCT ACT GGR TTR ACN TG	356-340	M21014	17	44.4	Iturriza-Gómara <i>et al.</i> , 2000
2T-1	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	494-474	M21014	21	48.9	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
3T-1	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	278-259	M21014	20	55.5	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
4T-1	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	402-385	M21014	18	57.9	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
cpOSU	GTG ACG TAT TCT CCA CCG ATA AAG	412-389	M21014	24	64.4	Gouvea <i>et al.</i> , 1994
cpGott	CTG ATG TTA AAG GAC GTT GAA GC	487-465	M21014	23	63.6	Gouvea <i>et al.</i> , 1994
501-P[13]	CCT CCR TAT TTC ATT GCA GCT TG	524-501	L07886 ⁴	23	65.5	No publicado
9con1	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	37-56	K02086	20	53.6	Das <i>et al.</i> , 1994
9T1-2	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	262-281	K02086	20	52.1	Das <i>et al.</i> , 1994

¹ número de acceso de la secuencia nucleotídica del Rotavirus humano Wa

² número de acceso de la secuencia nucleotídica del Rotavirus porcino OSU

³ número de acceso de la secuencia nucleotídica del Rotavirus humano KU

⁴ número de acceso de la secuencia nucleotídica del Rotavirus porcino MDR-13

ASTROVIRUS

Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición	Nº acceso	nt	Tm	
A2	GTA AGA TTC CCA GAT TGG TGC	2534-2554	L23513 ⁵	21	62.2	Guix <i>et al.</i> , 2002
A1	CCT GCC CCG AGA ACA ACC AAG C	2384-2363	L23513	22	74.5	Guix <i>et al.</i> , 2002
Probe	GAA GAA AGA GAA ACA ACC AG	2433-2454	L23513	20	53.2	Guix <i>et al.</i> , 2002
Probe uni-HAsV	CCR TAR GTY TGT GAR TAT GG	2529-2510	L23513	20	54.4	No publicado
A2bis	ATA GGA CTC CCA TAT AGG TGC	2534-2554	L23513	21	58.4	No publicado
A1bis	CCT GCC CCC CGT ATA ATT AAA C	2384-2363	L23513	22	65.7	No publicado

⁵ número de acceso de la secuencia nucleotídica del Astrovirus humano serotipo 1

CALICIVIRUS

Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición	Nº acceso	nt	Tm	
JV13I	TCA TCA TCA CCA TAG AAI GAG	4858-4878	M87661 ⁶	21	57.4	Comunicación personal
JV12Y	ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA	4552-4572	M87661	21	53.7	Comunicación personal
JV13b	TCA TCA TCA CCA TAG AAA GAG	4858-4878	M87661	21	56.7	Vinjé <i>et al.</i> , 1997
JV12a	ATA CCA CTA TGA TGC AGA TTA	4552-4572	M87661	21	53.7	Vinjé <i>et al.</i> , 1997
JV12BH	GTT TCA TTA TGA TGC TGA CTA	4552-4572	M87661	21	54.3	Comunicación personal
GGIa	ATG GAT GTA GGT GAY TAY GT	4685-4704	M87661	20	53.2	Vinjé y Koopmans,
GGIb	ATG GAY GTT GGY GAY TAT GT	4685-4704	M87661	20	54.2	Vinjé y Koopmans,
GGII	GGA AYT CCA TYR CMC AYT G	4494-4512	M87661	19	55.6	Vinjé y Koopmans,

⁶ número de acceso de la secuencia nucleotídica de Norwalk

VIRUS DE LA HEPATITIS A

Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición	Nº acceso	nt	Tm	
HAV 240	GGA GAG CCC TGG AAG AAA GA	241-222	M14707 ⁷	20	69	Sánchez <i>et al.</i> , 2002
HAV 68	TCA CCG CCG TTT GCC TAG	68-85	M14707	18	67.3	Sánchez <i>et al.</i> , 2002
HAV probe	TTA ATT CCT GCA GGT TCA GG	150-169	M14707	20	61.5	Sánchez <i>et al.</i> , 2002

⁷ número de acceso de la secuencia nucleotídica del Virus de la hepatitis A humano HM175

pCAP^s (PCR Cloning kit, Boehringer Mannheim)

Nombre	Secuencia 5'-3'	nt	Tm
P1	GAT CCT AAT ACG ACT CAC TAT AGA ACC GCC TGT GAA GTG GCT GAA AT	47	79.9
P2	GAT CCA TTT AGG TGA CAC TAT AGT GTG CGG AGA TCA GGT TCT GAT CCT C	49	81.8

BIBLIOGRAFÍA

Abad, F. X., Pintó, R. M. and Bosch, A. 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology* 60:3704-3710.

Abbaszadegan, M., Stewart, P. and LeChevallier, M. 1999. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65:444-449.

Abdel-Haq, N. M., Thomas, R. A., Asmar, B. I., Zacharova, V. and Lyman, W. D. 2003. Increased prevalence of G1P[4] genotype among children with rotavirus-associated gastroenteritis in metropolitan Detroit. *Journal of Clinical Microbiology* 41:2680-2682.

Adah, M. I., Wade, A. and Taniguchi, K. 2001. Molecular epidemiology of rotaviruses in Nigeria: detection of unusual strains with G2P[6] and G8P[1] specificities. *Journal of Clinical Microbiology* 39:3969-3975.

Affranchino, J. L. and Gonzalez, S. A. 1997. Deletion mapping of functional domains in the rotavirus capsid protein VP6. *Journal of General Virology* 78:1949-1955.

Ansari, S. A., Springhorpe, V. S. and Sattar, S. A. 1991. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Reviews of Infectious Diseases* 13:448-461.

Araujo, I. T., Ferreira, M. S. R., Fialo, A. M., Assis, R. M., Cruz, C. M., Rocha, M. and Leite, J. P. G. 2001. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 39:1999-2001.

Araujo, I. T., Fialo, A. M., Assis, R. M., Rocha, M., Galvao, M., Cruz, C. M., Ferreira, M. S. and Leite, J. P. G. 2002. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. *Journal of Tropical Pediatrics* 48:214-218.

Argüelles, M. H., Villegas, G. A., Castello, A., Abrami, A., Ghiringhelli, P. D., Semorile, L. and Glikmann, G. 2000. VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *Journal of Clinical Microbiology* 38:252-259.

Arias, C. F., López, S. and Espejo, R. T. 1982. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *Journal of Virology* 41:42-50.

Arias, C. F., Romero, P., Alvarez, V. and López, S. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of Virology* 70:5832-5839.

Arista, S. L., Giovannelli, L., Pistoia, D., Cascio, A., Parea, M. and Gerna, G. 1990. Electropherotypes, subgroups and serotypes of human rotavirus strains causing gastroenteritis in infants and young children in Palermo, Italy, from 1985 to 1989. *Research in Virology* 141:435-448.

Asmah, R. H., Green, J., Armah, G. E., Gallimore, C. I., Gray, J. J., Iturriza, M., Anto, F., Oduro, A., Binka, F. N., Broen, D. W. G. and Cutts, F. 2001. Rotavirus G and P genotypes in rural Ghana. *Journal of Clinical Microbiology* 39:1981-1984.

Baggi, F. and Peduzzi, R. 2000. Genotyping of rotaviruses in environmental water and stool samples in southern Switzerland by nucleotide sequence analysis of 189 base pairs at the 5' end of the VP7 gene. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3681-3685.

Barnes, G. L., Callaghan, S. L., Kirkwood, C. D., Bogdanovic-Sakran, N., Johnston, L. J. and Bishop, R. F. 2003. Excretion of serotype G1 rotavirus strains by asymptomatic staff: a possible source of nosocomial infection. *The Journal of Pediatrics* 142:722-725.

Beards, G. M., Desselberg, U. and Flewett, T. H. 1989. Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes, 1983-1988. *Journal of Clinical Microbiology* 27:2827-2833.

Bern, C., Martines, J., de Zoysa, I. and Glass, R. I. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bulletin of the World Health Organization* 70:705-714.

Bernstein, D. I., Glass, R. I., Rodgers, G., Davidson, B. L., Sack, D. A., U. S. Rotavirus vaccine efficacy group. 1995. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in U. S. children. *The Journal of the American Medical Association* 273:1191-1196.

Bernstein, D. I., Sack, D. A., Rothstein, E., Reisinger, K., Smith, V. E., O'Sullivan, D., Spriggs, D. R. and Ward, R. L. 1999. Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomized placebo-controlled trial. *The Lancet* 354:287-290.

Bican, P., Cohen, J., Charpilienne, A. and Scherrer, R. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *Journal of Virology* 43:1113-1117.

Bier, M. and Cooper, F. C. 1967. *Principles and applications of water chemistry*. Faust, S. D. and Hunter, J. V. Eds. Wiley, New York.

Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I.H. and Ruck, B. J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet* 2:1281–1283.

Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. and Ruck, B. J. 1974. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *The Lancet* 1:149–151.

Bitton, G. 1980. *Introduction to environmental virology*. Eds. John Wiley & Sons, Inc.

Bitton, G. and Mitchell, R. 1974. The removal of *Escherichia coli* bacteriophage T7 by magnetic filtration. *Water Research and Technology* 8:549.

Blacklow, N. R. and Greenberg, H. B. 1991. Viral gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine* 325:252-264.

Black, R. E., Dykes, A. C. and Anderson, K. E. 1981. Handwashing to prevent diarrhea in day-care centers. *The American Journal of Epidemiology* 113:445-451.

Blake, K. 1993. Cell cultures. En: *Virology*. The LABFAX series. Harper, D. R. Ed. BIOS Scientific Publisher Limited, Oxford, Gran Bretaña.

Bok, K., Castagnaro, N., Borsa, A., Nates, S., Espul, C., Fay, O., Fabri, A., Grinstein, S., Miceli, I., Matson, D. O. and Gómez, J. A. 2001. Surveillance for rotavirus in Argentina. *Journal of Medical Virology* 65:190-198.

Bon, F., Fascia, P., Dauvergne, M., Tenenbaum, D., Planson, H., Petion, A. M., Pothier, P. and Kohli, E. 1999. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3055-3058.

Bon, F., Fromantin, C., Aho, S., Pothier, P., Kohli, E. and the Azay Group. 2000. G and P genotyping of rotavirus strains circulating in France over a three-year period: detection of G9 and P[6] strains at low frequencies. *Journal of Clinical Microbiology* 38:1681-1683.

Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E. and van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28:495-503.

Bosch, A. 1998. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *International Microbiology* 1:191-196.

Bosch, A., Pintó, R. M., Blanch, A. R. and Jofre, J. 1988a. Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures. *Water Research* 22:343-348.

Bosch, A., Pintó, R. M. and Jofre, J. 1988b. Non-seasonal occurrence of rotavirus in Barcelona raw sewage. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene* B186:273-277.

Buesa, J., de Souza, C. O., Asensi, M., Martínez, C., Prat, J. and Gil, M. T. 2000. VP7 and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from children with gastroenteritis over a 3-year period in Valencia, Spain. *European Journal of Epidemiology* 16:501-506.

Burns, J. W., Greenberg, H. B., Shaw, R. D. and Estes, M. K. 1988. Functional and topographical analyses of epitopes on the hemagglutinin (VP4) of the simian rotavirus SA11. *Journal of Virology* 62:2164–2172

Butz, A. M., Fosarelli, P., Dick, J., Cusak, T. and Yolken, R. 1993. Prevalence of rotavirus on high-risk fomites in day-care facilities. *Pediatrics* 92:202-205.

Canada Communicable Disease Report. 2003. Rotavirus vaccines, an update. *Weekly Epidemiological Record* 78, 1/2.

Cao, X. R., Akihara, S., Fang, Z. Y., Nakagomi, O. and Ushijima, H. 1999. Genetic variation in the VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. *Microbiology and Immunology* 43:171-175.

Casas, N. and Sunen, E. 2002. Detection of enterovirus, hepatitis A virus and rotaviruses in sewage by means of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay. *Microbiological Research* 157:169-175.

Caul, E. O., Ashley, C. R., Darville, J. M. and Bridger, J. C. 1990. Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. *Journal of Medical Virology* 30:201-205.

Cilla, G., Pérez-Trallero, E., López-Lopategui, M. C., Gilsetas, A. and Gomáriz, M. 2000. Incidence, seasonality and serotypes of rotavirus in Guipúzcoa (Basque Country), Spain. A 14-year study. *Epidemiology and Infectious* 125:677-683.

Clark, H. F., Offit, P. A., Ellis, R. W., Eiden, J. J., Krah, D., Shaw, A. R., Pichichero, M. and Treanor, J. J. 1996. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *The Journal of Infectious Diseases* 174:S73-S80.

Clark, H. F., Offit, P. A., Ellis, R. W., Krah, D., Shaw, A. R., Eiden, J. J., Pichichero, M. and Treanor, J. J. 1996. WC3 reassortant vaccines in children. *Archives of Virology* 12(Suppl):187-198.

Clark, S. M., Roth, J. R., Clark, M. L., Barnett, B. B. and Spendlove, R. S. 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: Mechanism of enhancement. *Journal of Virology* 39:816–822.

Conner, M. E., Estes, M. K. and Graham, D.Y. 1988. Rabbit model of rotavirus infection. *Journal of Virology* 62:1625–1633.

Coulson, B. S., Fowler, K. J., Bishop, R. F. and Cotton, R. G. 1985. Neutralizing monoclonal antibodies to human rotavirus and indications of antigenic drift among strains from neonates. *Journal of Virology* 54:14–20.

Crawford, S. E., Labbe, M., Cohen, J., Burroughs, M. H., Zhou, Y. J. and Estes, M. K. 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *Journal of Virology* 68:5945–5952

Cubitt, W. D., Steele, A. D. and Iturriza, M. 2000. Characterisation of rotavirus from children treated at a London hospital during 1996: emerge of strains G9P2A[6] and G3P2A[6]. *Journal of Medical Virology* 61:150-154.

Cunliffe, N. A., Bresee, J. S., Gentsch, J. R., Glass, R. I. and Hart, C. A. 2002a. The expanding diversity of rotaviruses. *The Lancet* 359:640-641.

Cunliffe, N. A., Bresee, J. S. and Hart, C. A. 2002b. Rotavirus vaccines: development, current issues and future prospects. *Journal of Infection* 45:1-9.

Cunliffe, N. A., Gondwe, J. S., Graham, S. M., Thindwa, B. D. M., Dove, W., Broadhead, R. L., Molyneux, M. E. and Hart, C. A. 2001. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology* 39:836-843.

Das, M., Dunn, S. J., Woode, G. N., Greenberg, H. B. and Rao, C. D. 1993. Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (I321) have high levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 bovine rotavirus. *Virology* 194:374-379.

Das, B. K., Gentsch, J. R., Cicirello, H. G., Woods, P. A., Gupta, A., Ramachandran, M., Kumar, R., Bhan, M. K. and Glass, R. I. 1994. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *Journal of Clinical Microbiology* 32:1820-1822.

Das, S., Varghese, V., Chaudhury, S., Barman, P., Mahapatra, S., Kojima, K., Bhattacharya, S. K., Krishnan, T., Ratho, R. K., Chotray, G. P., Phukan, A. C., Kobayasi, N. and Naik, T. N. 2003. Emergence of novel human group A rotavirus G12 strains in India. *Journal of Clinical Microbiology* 41:2760-2762.

Davidson, G. P., Bishop, R. F., Townley, R. R, Holmes, I. H. and Ruck, B. J. 1975. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *The Lancet* 1:242-246.

Deetz, T. R, Smith, E. M., Goyal, S. M., Gerba, C. P., Vollet, J. J., Tsai, L., Dupont, H. L. and Keswick, B. H. 1984. Occurrence of rotavirus and enterovirus in drinking and environmental waters in developing countries. *Water Research* 18:567-572.

Dubois, E., Le Guyader, F., Haugarreau, L., Kopecka, H., Cormier, M. and Pommeputy, M. 1997. Molecular epidemiology survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1794-1800.

England, B. 1972. Concentration of reovirus and adenovirus from sewage and effluents by protamine sulfate (salmino) treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 24:510.

Engleberg, N. C., Holburt, E. N. and Barret, T. J., 1982. Epidemiology of diarrhea due to rotavirus on an Indian reservation: risk factors in the home environment. *The Journal of Infectious Diseases* 145:894-898.

Espejo, R. T., Lopez, S. and Arias, C. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *Journal of Virology* 37:156-160.

Estes, M. K. 2001. Rotaviruses and their replication. In D. M. Knipe. P. M. Howley (ed) *Fields Virology* 4rd edition vol 2:1747-1785. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Estes, M. K., Crawford, S. E., Peñaranda, M. E., Petrie, B. L., Burns, J. W., Chan, W. K., Ericson, B., Smith, G. E. and Summers, M. D. 1987. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *Journal of Virology* 61:1488-1494.

Estes, M. K., Graham, D. Y. and Mason, B. B. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: Molecular mechanisms. *Journal of Virology* 39:879-888.

Estes, M. K., Graham, D. Y., Smith, E. M. and Gerba, C. P. 1979. Rotavirus stability and inactivation. *Journal of General Virology* 43:403-409.

Fang, Z. Y., Yang, H., Qi, J., Zhang, J., Sun, L. W., Tang, J. Y., Ma, L., Du, Z. Q., He, A., Xie, J. P., Lu, Y. Y., Ji, Z. Z., Zhu, B. Q., Wu, H. Y., Lin, S. E., Xie, H. P., Griffin, D. D., Ivanoff, B., Glass, R. I. and Gentsch, J. R. 2002. Diversity of rotavirus strains among children with acute diarrhea in China: 1998-2000 surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology* 40:1875-1878.

Farrah, S. R., Goyal, S. M., Gerba, C. P., Conklin, R. H. and Smith, E. M. 1978. Comparison between adsorption of poliovirus and rotavirus by aluminium hydroxide and activated sludge flocs. *Applied and Environmental Microbiology* 35:360-363.

Fattal, B. 1974. *Virus survival in water and wastewater systems*. J. F. Malina and B. P. Sagik. Eds. University of Texas, Austin.

Fischer, T. K., Steinsland, H., Molbak, K., Ca, R., Gentsch, J. R., Valentiner-Branth, P., Aaby, P. and Sommerfelt, H. 2000. Genotype profiles of rotavirus strains from children in a suburban community in Guinea-Bissau, Western Africa. *Journal of Clinical Microbiology* 38:264-267.

Flewett T.H., Bryden A.S. and Davies H. 1973. Virus particles in gastroenteritis [letter]. *The Lancet* 2:1497.

Flewett, T. H. and Woode, G. N. 1978. The rotaviruses. *Archives of Virology* 57:1-23.

Freeman, W. M., Walker, S. J. and Vrana, K. E. 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *BioTechniques* 26:112-125.

Fukuhara, N., Yoshie, O., Kitaoka, S. and Konno, T. 1988. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. *Journal of Virology* 62:2209-2218.

Gajardo, R., Bouchriti, N., Pintó, R. M. and Bosch, A. 1995. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3460-3462.

Gajardo, R., Díez, J. M., Jofre, J. and Bosch, A. 1991. Adsorption-elution with negatively and positively-charged glass powder for the concentration of hepatitis A virus from water. *Journal of Virological Methods* 31:345-352.

García, R., Hernández, G., Velasco, L., Cano, R. y Tello, O. 1999. Infecciones gastrointestinales víricas notificadas al Sistema de Información Microbiológica. España, 1989-1999. *Boletín Epidemiológico Semanal* 21:233-235.

Gentsch, J. R., Glass, R. I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B. K. and Bhan, M. K. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polimerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1365-1373.

Gentsch, J. R., Woods, P. A., Ramachandran, M., Das, B. K., Leite, J. P., Alfieri, A., Kumar, R., Bhan, M. K. and Glass, R. I. 1996. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vacine development. *The The Journal of Infectious Diseases* 174 (suppl 1):S30-S36.

Georges-Courbot, M. C., Beraud, A. M., Beards, G. M., Campbell, A. D., Gonzalez, J. P., Georges, A. J. and Flewett, T. H. 1988. Subgroups, serotypes, and electropherotypes of rotavirus isolated from children in Bangui, Central African Republic. *Journal of Clinical Microbiology* 26:668-671.

Gerba, C. P. 1983. Methods for recovering viruses from the water environment. *Viral Pollution of the Environment*. Ed. Berg, G. CRC Press, Inc.

Gil, M. T., de Souza, C. O., Asensi, M. and Buesa, J. 2000. Homotypic protection against rotavirus-induced diarrhea in infant mice breast-fed by dams immunized with the recombinant VP8* subunit of the VP4 capsid protein. *Viral Immunology* 13:187-200.

Gilgen, M., Germann, D., Luthy, J. and Hubner, P. 1997. Three step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *International Journal of Food Microbiology* 37:189-199.

Gironés, R., Jofre, J. and Bosch, A. 1989. Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *Journal of Environmental Quality* 18:34-39.

Goodgame, R. M. 2003. *Gastroenteritis, Viral*. EMedicine, Inc.

Gorziglia, M., Green, K., Nishikawa, K., Taniguchi, K., Jones, R., Kapikian, A. Z. and Chanock, R. M. 1988. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *Journal of Virology* 62:2978-2984.

Gouvea, V., de Castro, L., Timenetsky, M. C., Greenberg, H. and Santos, N. 1994c. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *Journal of Clinical Microbiology* 32:1408-1409.

Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B. and Fang, Z. Y. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 28:276-282.

Gouvea, V. and Santos, N. 1999. Rotavirus serotype G5: An emerging cause of epidemic childhood diarrhea [letter]. *Vaccine* 17:1291-1292.

Gouvea, V., Santos, N. and Timenetsky, M. C. 1994a. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32:1333-1337.

Gouvea, V., Santos, N. and Timenetsky, M. C. 1994b. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32:1338-1340.

Graham, D. Y. and Estes, M. K. 1985. Proposed working serologic classification system for rotaviruses. *Ann Inst Pasteur* 136:5-12.

Gratacap-Cavallier, B., Genoulaz, O., Brengel-Pesce, K., Soule, H., Innocenti-Francillard, P., Bost, M., Goffi, L., Zmirou, D. and Seigneurin, J. M. 2000. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2690-2692.

Green, D. H. and Lewis, G. D. 1995. Enzymatic amplification of enteric viruses from wastewaters. *Water Science and Technology* 31:329-336.

Greenberg, H. B., Valdesuso, J., van Wyke, K., Midthun, K., Walsh, M., McAulife, V., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Flores, J. and Hoshino, Y. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *Journal of Virology* 47:267-275.

Griffin, D. D., Kirkwood, C. D., Parashar, U. D., Woods, P. A., Bresee, J. S., Glass, R. I., Gentsch, J. R. and the national rotavirus strain surveillance system collaborating laboratories. 2000. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of unusual strains. *Journal of Clinical Microbiology* 38:2784-2787.

Grimwood, K., Abbott, G. D., Fergusson, D. M., Jennings, L. C. and Allan, J. M. 1983. Spread of rotavirus within families: a community based study. *British Medical Journal* (Clinical research ed) 287:575-577.

Guix, S., Caballero, S., Villena, C., Bartolomé, R., Latorre, C., Rabella, N., Simó, M., Bosch, A. and Pintó, R. M. 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 40:133-139.

Gurwith, M., Wenman, W., Hinde, D., Feltham, S. and Greenberg, H. 1981. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *The Journal of Infectious Diseases* 144:218-224.

Guttman-Bass, N. and Armon, R. 1983. Concentration of simian rotavirus SA11 from tap water by membrane filtration and organic flocculation. *Applied and Environmental Microbiology* 45:850-855.

Hamano, M., Kuzuya, M., Fujii, R., Ogura, H., Mori, T., Nakayama, E., Yuen, E., Katayama, K., Mitsunobu, Y. and Inoue, K. 1999. Outbreak of acute gastroenteritis caused by human group C rotavirus in a primary school. *The Journal of Infectious Diseases* 52:170-171.

Hejkal, T. W., Smith, E. M., and Gerba, C. P. 1984. Seasonal occurrence of rotavirus in sewage. *Applied and Environmental Microbiology* 47:588-590.

Hopkins, R. S., Gaspard, B., Williams, F. P., Karlin, R. J., Cukor, G. and Blacklow, N. R. 1984. A community waterborne gastroenteritis outbreak: evidence for rotavirus as the agent. *American Journal of Public Health* 74:263-265.

Hoshino, Y., Jones, R. W., Chanock, R. M. and Kapikian, A. Z. 2002. Generation and characterization of six single VP4 gene substitution reassortant rotavirus vaccine candidates: each bears a single human rotavirus VP4 gene encoding P serotype 1A[8] or 1B[4] and the remaining 10 genes of rhesus monkey rotavirus MMU18006 or bovine rotavirus UK. *Vaccine* 20:3576-3584.

Hoshino Y. and Kapikian, A. Z. 1994. Rotavirus antigens. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 185:179–227.

Hoshino Y. and Kapikian, A. Z. 1996. Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Archives of Virology* 12:99–111.

Hoshino Y., Sereno M. M., Midthun K, Flores, J., Kapikian, A. Z. and Chanock, R. M. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:8701–8704.

- Hoshino, Y., Wagner, M., Yan, X. P., Pérez-Schael, I. and Kapikian, A. Z.** 2003. Horizontal transmission of rhesus monkey rotavirus-based quadrivalent vaccine during a phase 3 clinical trial in Caracas, Venezuela. *The Journal of Infectious Diseases* 187:791-800.
- Hoshino, Y., Wyatt, R. G. and Greenberg, H. B.** 1984. Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *The Journal of Infectious Diseases* 149:694-702.
- Hundley, F., McIntyre, M. and Clark, B.** 1987. Heterogeneity of genome rearrangements in rotaviruses isolated from a chronically infected immunodeficient child. *Journal of Virology* 61:3365-3372.
- Hung, T., Chen, G. M., Wang, C. G., Chou, Z., Chao, T., Ye, W., Yao, H., and Meng, K. H.** 1983. Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhoea in China. *The Lancet* ii:1078-1079.
- Hung, T., Chen, G., Wang, C., Yao, H., Fang, Z., Chao, T., Chou, Z., Ye, W., Chang, X., Den, S., Liang, X. and Chang, W.** 1984. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *The Lancet* i:1139-1142.
- Hurst, C. J. and Gerba, C. P.** 1980. Stability of simian rotavirus in fresh and estuarine water. *Applied and Environmental Microbiology* 39:1-5.
- Iturriza-Gómara, M., Green, J., Brown, D. W. G., Desselberger, U. and Gray, J. J.** 2000. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 38:898-901.
- Iturriza-Gómara, M., Isherwood, B., Desselberger, U. and Gray, J.** 2001. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *Journal of Virology* 75:3696-3705.
- Iturriza-Gómara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U. and Gray, J.** 2002. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *Journal of Virology* 76:6596-6601.
- Jain, V., Das, B. K., Bhan, M. K., Glass, R. I., Gentsch, J. R. and the Indian strain surveillance collaborating laboratories.** 2001. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. *Journal of Clinical Microbiology* 39:3524-3529.

Jiang, B., Dennehy, P. H., Spangenberg, S., Gentsch, J. R. and Glass, R. I. 1995. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *The Journal of Infectious Diseases* 172:45-50.

Jiang, B., Gentsch, J. R. and Glass, R. I. 2002. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clinical Infectious Diseases* 34:1351-1361.

Joensuu, J., Koskenniemi, E., Pang, X. L. and Vesikari, T. 1997. Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *The Lancet* 350:1205-1209.

Jothikumar, N., Khana, P., Paulmurugan, R., Kamatchiammal, S. and Padmanabhan, P. 1995. A simple device for the concentration and detection of enterovirus, hepatitis E virus and rotavirus from water samples by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 55:401-415.

Jourdan, N., Maurice, M. and Delautier, D. 1997. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *Journal of Virology* 71:8268-8278.

Kalica, A. R., Flores, J. and Greenberg, H. B. 1983. Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology* 125:194-205.

Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H. and Greenberg, H. B. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *Journal of Virology* 62:1136-1144.

Kang, G., Green, J., Gallimore, C. I. and Brown, D. W. G. 2002. Molecular epidemiology of rotaviral infection in South Indian children with acute diarrhea from 1995-1996 to 1998-1999. *Journal of Medical Virology* 67:101-105.

Kantharidis, P., Dyal-Smith, M. L. and Holmes, I. H. 1987. Marked sequence variation between segment 4 genes of human RV-5 and simian SA 11 rotaviruses. *Archives of Virology* 93:111-121.

Kapikian, A. Z. 1975. *Enteroviral diseases*. Beeson, P. B., McDermot, W. and Wyngaarden, J. B. eds. Cecil textbook of medicine. 14th ed. Philadelphia: W. B. Saunders.

Kapikian, A. Z. 1993. Viral gastroenteritis. *The Journal of the American Medical Association* 269:627–629.

Kapikian, A. Z. 1994. Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea in infants and young children: an introduction. In: Kapikian, A. Z., editor. New York: Marcel Dekker. *Viral Infections of the gastrointestinal tract*. 2:409-417.

Kapikian, A. Z., Hoshino, Y. and Chanock, R. M. 2001. Rotaviruses. In D. M. Knipe, P. M. Howley (ed) *Fields Virology* 4rd edition vol 2:1787-1883. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Kapikian, A. Z., Hoshino, Y., Chanock, R. M. and Perez-Schael, I. 1996. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *The Journal of Infectious Diseases* 174 (suppl 1):S65-S72.

Kapikian, A. Z., Kim, H. W., Wyatt, R. G., Cline, W. L., Arrobio, J. O., Brandt, C. D., Rodriguez, W. J., Sack, D. A., Chanock, R. M. and Parrott, R. H. 1974. Reovirus-like agent in stools: Association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* 185:1049–1053.

Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin R, Thornhill, T. S., Kalica, A. R. and Chanock, R. M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology* 10:1075–1081.

Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Levine, M. M., Yolken, R. H., VanKirk, O. H., Dolin, R., Greenberg, H. B. and Chanock, R. M. 1983a. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *The Journal of Infectious Diseases* 147:95-106.

Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G. and Levine, M. M. 1983b. Studies in volunteers with human rotaviruses. *Developments in Biological Standardization* 53:209-218.

Katayama, H., Shimasaki, A. and Ohgaki, S. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1033-1039.

Katzenelson, E. 1974. Virologic and engineering problems in monitoring viruses in water. In: *Viruses in water*. G. Berg *et al.* Eds. American Public Health Association, Washington, D. C.

Katzenelson, E., Fattal, B. and Hostovesky, T. 1976. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Applied and Environmental Microbiology* 32: 638-639.

Keswick, B. H., Gerba, C. P., Dupont, H. L. and Rose, J. B. 1984. Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 47:1290-1254.

Keswick, B. H., Pickering, L. K., Dupont, H. L. and Woodward, W. E. 1983. Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centers. *Applied and Environmental Microbiology* 46:813-816.

Kirkwood, C., Bogdanovic-Sakran, N., Clark, R., Masendycz, P., Bishop, R. and Barnes, G. 2002. Report of the Australian rotavirus surveillance program, 2001/2002. *Communicable Disease Intelligence* 26:537-540.

Kitamoto, N., Ramig, R. F., Matson, D. O. and Estes, M. K. 1991. Comparative growth of different rotavirus strains in differentiated cells (MA104, HepG2 and CaCo-2). *Virology* 184:729-737.

Kitaoka, S., Fukuhara, N. and Tazawa, F. 1986. Characterization of monoclonal antibodies against human rotavirus hemagglutinin. *Journal of Medical Virology* 19:313–323.

Kittigul, L., Khamoun, P., Sujirarat, D., Utrarachkij, F., Chitpirom, K., Chaichantanakit, N. and Vathanophas, K. 2001. An improved method for concentrating rotavirus from water samples. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96:815-821.

Klein, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8:257-260.

Koopmans, M. and Brown, D. 1999. Seasonality and diversity of group A rotaviruses in Europe. *Acta Paediatrica Suppl* 426:14-19.

Krishnan, T., Sen, A. and Choudhury, J. S., 1999. Emergence of adult diarrhoea rotavirus in Calcutta, India [letter]. *The Lancet* 353:380-381.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. and Nei, M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* 17:1244-1245.

Lanata, C. F., Midthun, K., Black, R. E., Lazo, F., Butron, B. and Linares, A. 1996. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of one and three doses of the trivalent

rhesus rotavirus vaccine in infants in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases* 174:268-275.

Larralde, G. and Gorziglia, M. 1992. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *Journal of Virology* 66:7438–7443.

Larralde, G., Li, B., Kapikian, A. Z. and Gorziglia, M. 1991. Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein. *Journal of Virology* 65:3213–3218.

Leisinger, M. and Metzler, A. 1997. Use of silica as a carrier to recover and prepare waterborne enteric viruses for detection by RT-PCR. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 200(4):283-296.

Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E. and Pommeypuy, M. 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3241-3248.

Lewis, G. D. and Metcalf, T. G. 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oysters, water and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* 54:1983-1988.

Li, J. W., Wang, X. W., Rui, Q. Y., Song, N., Zhang, F. G., Ou, Y. C. and Chao, F. H. 1998. A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *Journal of Virological Methods* 74:99-108.

Linhares, A. C., Gabbay, Y. B., Mascarenhas, J. D. P., de Freitas, R. B., Oliveira, C. S., Bellesi, N., Monteiro, T. A. F., Ramos, F. L. P. and Valente, S. A. 1996. Immunogenicity, safety, and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belem, Brazil. *Bulletin of the World Health Organization* 74:491-500.

Liu, M., Offit, P. A. and Estes, M. K. 1988. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* 163:26-32.

Lloyd-Evans, N., Springthorpe, V. S. and Sattar, S. A. 1986. Chemical disinfection of human rotavirus-contaminated inanimate surfaces. *American Journal of Hygiene* 97:163-173.

López, S., Espinosa, R., Greenberg, H. B. and Arias, C. F. 1994. Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virology* 204:153-162.

Lund, E. and Hedstrom, C. E. 1966. The use of an aqueous polymer phase system for enterovirus isolation from sewage. *American Journal of Epidemiology* 84:287.

Mackay, I. A., Arden, K. E. and Nitsche, A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30:1292-1305.

Mackow, E. R. 1995. Group B and C rotaviruses. En Blaser, M. J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., *et al.* *Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, 983-1008.

Mackow, E. R., Shaw, R. D., Matsui, S. M., Vo, P. T., Broome, R., Bass, D. and Greenberg, H. B. 1988. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: Location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:645–649.

Mackow, E. R., Vo, P. T., Broome, R., Bass, D. and Greenberg, H. B. 1990. Immunization with baculovirus-expressed VP4 protein passively protects against simian and murine rotavirus challenge. *Journal of Virology* 64:1698–1703.

Malherbe, H. and Harwin, R. 1963. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *South African Medical Journal* 37:407-411.

Mansell, E. A., Ramig, R. F. and Patton, J. T. 1994. Temperature-sensitive lesions in the capsid proteins of the rotavirus mutants tsF and tsG that affect virion assembly. *Virology* 204:69–81

Marie-Cardine, A., Goullain, K., Mouterde, O., Castignolles, N., Hellot, M. F., Mallet, E. and Buffet-Janvresse, C. 2002. Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Rouen, France. *Clinical Infectious Diseases* 34:1170-1178.

Mascarenhas, J. D., Leite, J. P., Gabbay, Y. B., Almeida, M. L. and Linhares, A. C. 2002. Tetravalent rhesus-human rotavirus vaccine (RRT-TV) in Belem, Brazil: efficacy against prevailing P and G genotypes. *Journal of Tropical Pediatrics* 48:300-302.

Mascarenhas, J. D., Linhares, A. C., Gabbay, Y. B. and Leite, J. P. 2002. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97:113-117.

Mason, B. B., Graham, D. Y. and Estes, M. K. 1980. *In vitro* transcription and translation of simian rotavirus SA11 gene products. *Journal of Virology* 33:1111–1121.

Matsumoto, K., Hatano, M., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Yamazaki, S., Nakata, S., Chiba, S. and Kimura, Y. 1989. An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren. *The Journal of Infectious Diseases* 160:611-615.

Mattion, N. M., Cohen, J. and Estes, M. 1994. The rotavirus proteins. In: Kapikian, A. Z., ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. New York: Marcel Dekker 169-249.

McCarthy, M. 2003. Project seeks to “fast track” rotavirus vaccine. *The Lancet* 361:582.

Mc Crae, M. A. and Mc Corquodale, J. G. 1982. The molecular biology of rotaviruses. II. Identification of the protein-coding assignments of calf rotavirus genome RNA species. *Virology* 117:435–443.

Mc Daniels, A. E., Cochran, K. W., Gannon, J. J. and Williams, G. W. 1983. Rotavirus and reovirus stability in microorganism-free distilled and wastewaters. *Water Research* 17:1349-1353.

Mebus, C., Underdahl, N., Rhodes, M. and Twiehaus, M. 1969. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Research Bulletin* 233:1-16.

Mehnert, D. U. and Stewien, K. E. 1993. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 59:140-143.

Mehnert, D. U., Stewien, K. E., Hársi, C. M., Queiroz, A. P. S., Candeias, J. M. G. and Candeias, J. A. N. 1997. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92:97-100.

Metcalf, T. G. 1961. Use of membrane filters to facilitate the recovery of virus from aqueous suspensions. *Applied and Environmental Microbiology* 9:376.

Metcalf, T. G., Melnick, J. L. and Estes, M. K. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years. *Annual reviews of Microbiology* 49:461-487.

Middleton, P. J., Szymanski, M. T., Abbott, G. D., Bortolussi, R. and Hamilton, J. R. 1974. Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. *The Lancet* 1:1241–1244.

Mignotte, B., Maul, A. and Schwartzbrod, L. 1999. Comparative study of techniques used to recover viruses from residual urban sludge. *Journal of Virological Methods* 78:71-80.

Moe, K. and Shirley, J. A. 1982. The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Archives of Virology* 72:179-186.

Mohammed, K. A., el Assouli, S. M. and Banjar, Z. M. 1994. Human rotavirus subgroups and serotypes in children with acute gastroenteritis in Saudia Arabia from 1988 to 1992. *Journal of Medical Virology* 44:237-242.

Moore, B. E., Sagik, B. P. and Sorber, C. A: 1979. Porcedure for recovery of airborne human enteric viruses during spray irrigation of treated wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 38:688

Morris, C. A., Flewett, T. H., Bryden, A. S. and Davies, H. 1975. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *The Lancet* 1:4-5.

Murray C.J. and Lopez A.D. 1997a. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 349:1436–1442.

Murray C.J. and Lopez A.D. 1997b. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 349:1498–1504.

Nagesha, H. S., Huang, J., Hum, C. P. and Holmes, I. H. 1990. A porcine rotavirus strain with dual VP7 serotype specificity. *Virology* 175:319-322.

Nakagomi, O. and Nakagomi, T. 1993. Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. *Microbiology and Immunology* 37:337-348.

Nakagomi, O. and Nakagomi, T. 1996. Mlecular epidemiology of human rotaviruses: genogrouping by RNA-RNA hybridization. *Archives of Virology Suppl* 12:93-98.

Nilsson, M. Svenungsson, B., Hedlund, K. O., Uhnnoo, I., Lagergren, A., Akre, T and Svensson, L. 2000. Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. *The Journal of Infectious Diseases* 182:678-684.

Noel, J. S., Parker, S. P., Choules, K., Phillips, A. D., Walker-Smith, J. and Cubitt, W. D. 1994. Impact of rotavirus infection on a paediatric hospital in the East End of London. *Journal of Clinical Pathology* 47:67-70.

O'Halloran, F., Lynch, M., Cryan, B., O'Shea, H. and Fanning, S. 2000. Molecular characterization of rotavirus in Ireland: detection of novel strains circulating in the population. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3370-3374.

Offit, P. A. and Blavat, G. 1986a. Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. *Journal of Virology* 57:376–378.

Offit, P. A., Blavat, G., Greenberg, H. B. and Clark, H. F. 1986b. Molecular basis of rotavirus virulence: Role of gene segment 4. *Journal of Virology* 57:46–49.

Offit, P. A., Clark, H. F., Blavat, G. and Greenberg, H. B. 1986c. Reassortant rotaviruses containing structural proteins VP3 and VP7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *Journal of Virology* 60:491–496.

Offit, P. A., Shaw, R. D. and Greenberg, H. B. 1986d. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *Journal of Virology* 58:700–703.

Otsu, R. 1998. A mass outbreak of gastroenteritis associated with group C rotaviral infection in schoolchildren. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 21:75-80.

Parashar, U. D., Bresee, J. S., Gentsch, J. R. and Glass, R. I. 1998. Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases* 4(4):561-570.

Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A. and Glass, R. I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases* 9(5):565-572.

Penaranda, M. E., Cubitt, W. D., Sinarachatanant, P., Taylor, D. N., Likanonsakul, S., Saif, L. and Glass, R. I. 1989. Group C rotavirus infection in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. *The Journal of Infectious Diseases* 160:392-397.

Pérez-Mato, S., Perrin, K., Scardino, D. and Begur, R. E. 2002. Evaluation of rotavirus vaccine effectiveness in a pediatric group practice. *American Journal of Epidemiology* 156(11):1049-1055.

Perez-Schael, I., Guntinas, M. J., Perez, M., Pagone, V., Rojas, A. M., Gonzalez, R., Cunto, W., Hoshino, Y. and Kapikian, A. Z. 1997. Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *The New England Journal of Medicine* 337:1181-1187.

Pickering, L. K., Bartlett, A. V., Reves, R. R. and Morrow, A. 1988. Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers. *The Journal of Pediatrics* 112:361-365.

Pintó, R. M., Villena, C., Le Guyader, F., Guix, S., Caballero, S., Pommepuy, M. and Bosch, A. 2001. Astrovirus detection in wastewater samples. *Water Science and Technology* 12:73-76.

Pöyry, T., Stenvik, M. and Hovi, T. 1988. Viruses in sewage waters during and after poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Applied and Environmental Microbiology* 54:371-374.

Queiroz, A. P., Santos, F. M., Hársi, C. M., Candeias, J. M. G., Monezi, T. A. and Mehnert, D. U. 2000. Factors that can interfere with virus concentration from wastewater when using Zeta Plus 60S filter membranes. *Memories do Instituto Oswaldo Cruz* 95(5):713-716.

Queiroz, A. P., Santos, F. M., Sassaroli, A., Harsi, C. M., Monezi, T. A. and Mehnert, D. U. 2001. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 67(10):4614-4618.

Ramachandran, M., Gentsch, J. R., Parashar, U. D., Jin, S., Woods, P. A., Holmes, J. L., Kirkwood, C. D., Bishop, R. F., Greenberg, H. B., Urasawa, S., Gerna, G., Coulson, B. S., Taniguchi, K., Bresee, J. S., Glass, R. I. and the national rotavirus strain surveillance system collaborating laboratories. 1998. Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 36(11):3223-3229.

Ramia, S. and Sattar, S. A. 1980. Concentration of seeded simian rotavirus SA11 from potable waters by using talc-celite and hydroextraction. *Applied and Environmental Microbiology* 39:493-499.

Ramia, S. 1985. Transmission of viral infections by the water route: implications for developing countries. *Reviews of Infectious Diseases* 7:180-188.

Rao, C. D., Gowda, K. and Reddy, Y. 2000. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology* 276:104-113.

Raphael, R. A., Sattar, S. A. and Springthorpe. 1985. Rotavirus concentration from raw water using positively charged filters. *Journal of Virological Methods* 11:131-140.

Rennels, M. B., Glass, R. I., Dennehy, P. H., Bernstein, D. I., Pichichero, M. E. and Zito, P. T. 1996. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines –report of the national multicenter trial. United States rotavirus vaccine efficacy group. *Pediatrics* 97:7-13.

Richardson, S., Grimwood, K., Gorrell, R., Palombo, E., Barnes, G. and Bishop, R. 1998. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *The Lancet* 351:1844-1848.

Rodger, S. M., Bishop, R. F. and Holmes, I. H. 1982. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *Journal of Clinical Microbiology* 16:724-726.

Rodger, S. M. and Holmes, I. H. 1979. Comparison of the genomes of simian, bovine and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *Journal of Virology* 30:839-846.

Rodriguez, A., Velasco, A., Ramírez, J. E., Mayén, E., Melo, M., Díaz, B., Olivera, H. and García, H. 2000. VP4 and VP7 genotyping by reverse transcription-PCR of human rotavirus in Mexican children with acute diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 38(10):3876-3878.

Rosa, E., Pires, I. and Gouvea, V. 2002. 1998-1999 rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of an unusual G3P[4] epidemic strain. *Journal of Clinical Microbiology* 40(8):2837-2842.

Ruggeri, F. M. and Greenberg, H. B. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8* neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *Journal of Virology* 65:2211–2219.

Saif, L. J., Terrett, L. A., Miller, K. L. and Cross, R. F. 1988. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in a continuous cell line and characterization of the passaged virus. *Journal of Clinical Microbiology* 26:1277-1282.

Sánchez, G., Pintó, R. M., Vanaclocha, H. and Bosch, A. 2002. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 40:4148-4155.

Sandino, A. M., Jashes, M., Faundez, G. and Spencer, E. 1986. Role of the inner protein capsid on *in vitro* human rotavirus transcription. *Journal of Virology* 60:797–802.

Sanekata, T., Kuwamoto, Y. Akamatsu, S., Sakon, N., Oseto, M., Taniguchi, K., Nakata, S. and Estes, M. K. 1996. Isolation of group B porcine rotavirus in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology* 34:759-761.

Santosham, M., Moulton, L. H., Reid, R., Croll, J., Weatherholt, R., Ward, R., Forro, J., Mack, M., Brenneman, G. and Davidson, B. L. 1997. Efficacy and safety of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in Native American populations. *Journal of Pediatrics* 131:632-638.

Sarrette, B., Danglot, C. and Vilagines, R. 1977. A new and simple method for recuperation of enterovirus from water. *Water Research* 11:355-358.

Sattar, S. A. and Ramia, S. 1979. Use of talc-celite layers in the concentration of enterovirus from large volumes of potable waters. *Water Research and Technology* 13:637.

Sattar, S. A. and Westwood, J. C: N. 1976. Comparasion of talc-celite and polyelectrolyte 60 in virus recovery from sewage: development of tecniques and experiments with poliovirus (type 1, Sabin) -contaminated samples. *Cannadian Journal of Microbiology* 22:1620.

Schwartzbrod, L. and Lucena, F. 1978. Concentration des enterovirus par adsorption-élution sur poudre de verre. Proposition d'un appareillage simplifié. *Microbia* 4:55-68.

Schwarz, B. A., Bange, R., Vahlenkamp, T. W, Johne, R. and Müller, H. 2002. Detection and quantitation of group A rotavirus by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 105:277-285.

Shaw, R. D., Fong, K.J., Losonsky, G. A., Levine, M. M., Maldonado, Y., Yolken, R., Flores, J., Kapikian, A. Z., Vo, P. T. and Greenberg, H. B. 1987. Epitope-specific immune responses to rotavirus vaccination. *Gastroenterology* 93:941–950.

Shen, S., Burke, B. and Desselberger, U. 1994. Rearrangement of the VP6 gene of a group A rotavirus in combination with a point mutation affecting trimer stability. *Journal of Virology* 68:1682–1688.

Sheth, R., Anderson, J., Sato, T., Oh, B., Hempson, S. J., Rollo, H., Mackow, E. R. and Shaw, R. D. 1996. Rotavirus stimulates IL-8 secretion from cultured epithelial cells. *Virology* 221:251–259.

Shields, P. A. and Farrah, S. R. 1986. Concentration of viruses in beef extract by flocculation with ammonium sulfate. *Applied and Environmental Microbiology* 51:211-213.

Shinozaki, K., Yamanaka, T., Tokieda, M., Shirasawa, H. and Simizu, B. 1996. Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in a cell line (CaCo-2). *Journal of Medical Virology* 48:48-52.

Shuval, H. I., Fattal, B., Cymbalista, S. and Goldblum, N. 1969. The phase separation method for the concentration and detection of viruses in water. *Water Research and Technology* 3:225.

Simpson, R., Aliyu, S., Iturriza-Gómara, M., Desselberg, U. and Gray, J. 2003. Infantile viral gastroenteritis: on the way to closing the diagnostic gap. *Journal of Medical Virology* 70:258-262.

Smith, E. M. and Gerba, C. P. 1982. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Applied and Environmental Microbiology* 43:1440-1450.

Sobsey, M. D. and Glass, J. S. 1980. Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Applied and Environmental Microbiology* 40:201-210.

Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1986. *Introducción a la bioestadística*. Serie de Biología Fundamental. Editorial Reverté.

Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1995. *Biometry*. W. H. Freeman and company, New York.

Soule, H., Genoulaz, O., Gratacap-Cavallier, B., Mallaret, M. R., Morand, P., François, P., Luu Duc Bin, D., Charvier, A., Bostbru, C. and Seigneurin, J. M. 1999. Monitoring rotavirus environmental contamination in a pediatric unit using polymerase chain reaction. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 20:432-434.

Su, C. Q., Wu, Y. L. and Shen, H. K., 1986. An outbreak of epidemic diarrhoea in adults caused by a new rotavirus in Anhui Province of China in the summer of 1983. *Journal of Medical Virology* 19:167-173.

Stirzaker, S. C., Whitfeld, P. L., Christie, D. L., Bellamy, A. R. and Both, G. W. 1987. Processing of rotavirus glycoprotein VP7: implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* 105:2897-2903.

Svensson, L., Sheshberadaran, H., Vene, S., Norrby, E., Grandien, M. and Wadell, G. 1987. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *Journal of General Virology* 68:643–651.

Tang, B., Gilbert, J. M., Matsui, S. M. and Greenberg, H. B. 1997. Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-direct mutagenesis. *Virology* 237:89-96.

Taniguchi, K., Maloy, W. L., Nishikawa, K., Green, K. Y., Hoshino, Y., Urasawa, S., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M. and Gorziglia, M. 1988. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *Journal of Virology* 62:2421-2426.

Taniguchi, K., Urasawa, S. and Urasawa, T. 1985. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *Journal of General Virology* 66:1045–1053.

Timenetsky, M. D., Gouvea, V., Santos, N., Carmona, R. C. and Hoshino, Y. 1997. A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. *Journal of General Virology* 78:1373-1378.

Toranzos, G. A. and Gerba, C. P. 1989. An improved method for the concentration of rotaviruses from large volumes of water. *Journal of Virological Methods* 24:131-140.

Tosser, G., Delaunay, T., Kohli, E., Grosclaude, J., Pothier, P. and Cohen, J. 1994. Topology of bovine rotavirus (RF strain) VP6 epitopes by real-time biospecific interaction analysis. *Virology* 204:8–16.

Tosser, G., Labb, M., Brémont, M. and Cohen, J. 1992. Expression of the major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses. *Journal of Virology* 66:5825–5831.

Trabelsi, A., Peenze, I., Pager, C., Jeddi, M. and Steele, D. 2000. Distribution of rotavirus VP7 serotypes and VP4 genotypes circulating in Sousse, Tunisia, from 1995 to 1999: emergence of natural human reassortants. *Journal of Clinical Microbiology* 38(9): 3415-3419.

Vesikari, T., Isolauri, E. and d'Hondt, E. 1984. Protection of infants against rotavirus diarrhea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *The Lancet* 1:977-981.

Vilaginès, Ph., Sarrette, B., Husson, G. and Vilaginès, R. 1993. Glass wool for virus concentration at water pH level. *Water Science and Technology* 27:299-306.

Vilaginès, Ph., Sarrette, B., Champsaur, H., Hugues, B., Dubrou, S., Joret, J. C., Laveran, H., Lesne, J., Paquin, J. L., Delattre, J. M., Oger, C., Alame, J., Grateloup, I., Perrollet, H., Serceau, R., Sinègre, F. and Vilaginès, R. 1997. Round robin investigation of glass wool method for poliovirus recovery from drinking waer and sea water. *Water Science and Technology* 35:445-449.

Villena, C., El-Senousy, W. M., Abad, F. X., Pintó, R. M. and Bosch, A. 2003. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7):3919-3923.

Villena, C, Gabrieli, R., Pintó, R. M., Guix, S., Donia, D., Buonomo, E., Palombi, L., Cenko, F., Bino, S., Bosch, A. and Divizia, M. 2003b. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiology and Infection*. En prensa.

Vinje, J., Altena, S. A. and Koopmans, M. P. G. 1997. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands *The Journal of Infectious Diseases* 176:1374-1378

Vinje, J. and Koopmans, M. P. G. 2000. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *Journal of Clinical Microbiology* 38(7):2595-2601.

Visser, L. E., Cano, R., Gay, N. J. and Martínez, J. F. 1999. Impact of rotavirus disease in Spain: an estimate of hospital admissions due to rotavirus. *Acta Paediatrica* suppl 426:72-76.

Vollet, J. I., DuPont, H. L. and Pickering, L. K. 1981. Nonenteric sources of rotavirus in acute diarrhea. *The Journal of Infectious Diseases* 144:495.

Wallis, C. and Melnick, J. L. 1967. Concentration of viruses from sewage by adsorption on Millipore membranes. *Bulletin World Health Organization* 36:219.

Wallis, C. and Melnick, J. L. 1967. Concentration of viruses on aluminium and calcium salts. *American Journal of Epidemiology* 85:459.

Wallis, C. Grinstein, S., Melnick, J. L. and Fields, J. E. 1969. Concentration of viruses from sewage and excreta on insoluble polyelectrolytes. *Applied and Environmental Microbiology* 18:1007.

Wang, S., Cai, R., Chen, J., Li, R. and Jiang, R. 1985. Etiologic studies of the 1983 and 1984 outbreaks of epidemic diarrhea in Guangxi. *Intervirology* 24:140-146.

Ward, R. L. and Ashley, C. S. 1980. Effects of wastewater sludge and its detergents on the stability of rotavirus. *Applied and Environmental Microbiology* 39(6):1154-1158.

Ward, R. L., Bernstein, D. I. and Knowton, D. R., 1991. Prevention of surface-to-human transmission of rotaviruses by treatment with disinfectant spray. *Journal of Clinical Microbiology* 29:1991-1996.

Wellings, F. M., Lewis, A. L. and Mountain, C. W. 1976. Demonstration of solids-associated virus in wastewater and sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 31:354.

Welter, M. W., Welter, C. J., Chambers, D. M. and Svensson, L. 1991. Adaptation and serial passage of porcine group C rotavirus in ST-cells, an established diploid swine testicular cell line. *Archives of Virology* 120:297-304.

Widdowson, M. A., van Doornum, G. J. J., van der Poel, W. H. M., Boer, A S., Mahdi, U. and Koopmans, M. 2000. Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea. *The Lancet* 356:1161-1162.

Wilde, J., Van, R., Pickering, L., Eiden, J. and Yolken, R. 1992. Detection of rotaviruses in the day care environment by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases* 166:507-511.

Wilhelmi, I., Mier, C., Roman, E., Colomina, J., Prat, J. and Sanchez-Fauquier, A. 1999. Epidemiología molecular de rotavirus en niños españoles. Grupo de estudio de rotavirus. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 17(10):509-514.

Wilhelmi, I., Roman, E. and Sánchez-Fauquier, A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 9:247-262.

World Health Organization. The World Health Report 1999. *Report on Infectious Diseases: Removing Obstacles to Healthy Development*, 1-68.

World Health Organization. The World Health Report 1998: Life in the 21st century. A vision for all. *Report of the Director General*. Geneva, Switzerland, 1–241.

Yolken, R. and Wilde, J. 1994. Assays for detecting human rotavirus. In: Kapikian, A. Z., ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. New York: Marcel Dekker 251-278.

Yolken, R., Arango-Jaramillo, S., Eiden, J. and Vonderfetch, S. 1988. Lack of genomic reassortment following infection of infant rats with group A and group B rotaviruses. *The Journal of Infectious Diseases* 158:1120-1123.

Yow M. D., Melnick J. L., Blattner R. J., Stephenson, W. B., Robinson, N. M. and Burkhardt, M. A. 1970 The association of viruses and bacteria with infantile diarrhea. *American Journal of Epidemiology* 92:33–39.

Zheng, B. J., Chang, R. X., Ma, G. Z., Xie, J. M., Liu, Q. and Liang, X. R. 1991. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *Journal of Medical Virology* 34:29-37.