

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Identificación de cepas de Coronavirus y Rotavirus presentes en
muestras fecales diarreicas de bovinos y niños en Costa Rica.**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Lisbeth Ramírez Carvajal

**Campus Pbro. Benjamín Núñez
2007**

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Identificación de cepas de *Coronavirus* y *Rotavirus* presentes en muestras fecales diarreicas de bovinos y niños en Costa Rica

Autora: Lisbeth Ramírez Carvajal

Dr. Jorge Quirós

Decano



Dr. Carlos Jiménez S.

Director y Tutor



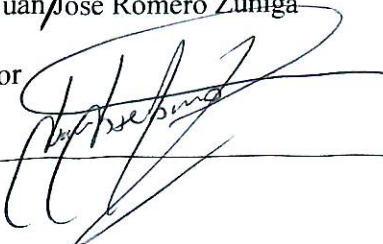
Dra. Caterina Guzmán Verri

Lectora



Dr. Juan José Romero Zúñiga

Lector



Fecha: 12 de Febrero de 2008.

DEDICATORIA

A mi Dios, mi guía y mi resguardo.

A mis padres Carmen Ligia Carvajal Castro y Franklin Ramírez Vargas, (mi público incondicional) gracias por la formación que me brindaron, su buen ejemplo y el apoyo en éste y muchos otros proyectos.

A mis hermanas Heylin y Shirley Ramírez Carvajal, por construir juntas un verdadero sentimiento de amor y apoyo en la familia.

A Elías (Tito) por ser mi compañero y mi amigo, el cual con paciencia, palabras de amor y esperanza me ha apoyado incondicionalmente en este camino.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi mayor gratitud a mi tutor el Dr. Carlos Jiménez Sánchez (el Doctorcillo) por todo su apoyo, comprensión y confianza. La fe que depositó en mí me permitió finalizar este trabajo y continuar aspirando a nuevos objetivos profesionales.

Además agradezco a la Dra. Caterina Guzmán Verri y el Dr. Juan José Romero, por su apoyo, comprensión y su valioso tiempo. Su asesoría me permitió crecer profesionalmente.

Muy especialmente expreso mi gratitud al Dr. Álvaro Vargas funcionario del Hospital Dr. Carlos Sáenz Herrera (Hospital Nacional de Niños, HNN) y a la Dra. Hilda Bolaños del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), con su ayuda fue posible la recolección de muestras de fecales de niños.

Además quiero agradecer a mis compañeros en el laboratorio Lurys Bourdett, José Luis Bonilla y Luis Romero por su colaboración en el laboratorio, pero sobretodo por su amistad y paciencia, espero perdure a través de los años. Los momentos que compartimos juntos hicieron más amenas las largas horas de trabajo en el laboratorio.

Agradezco al personal del laboratorio de virología Rocío Cortés y Jorge Prendas por su tiempo, consejos y paciencia.

También agradezco a profesores y técnicos de la Escuela de Medicina Veterinaria, particularmente la Dra. Gaby Dolz, el Dr. Jorge Quirós, a Dafne Garita, Reynaldo Pereira (Rey) y al señor Retana.

Agradezco a los propietarios de las fincas que me abrieron las puertas de sus propiedades, a todas las personas que contribuyeron en la recolección de muestras, particularmente a los médicos veterinarios Dr. Julio Murillo, Dr. Andrés Martínez y al Dr. Edgar Bonilla.

Agradezco a la red Netropica y a CYTED por los fondos para esta investigación y al laboratorio de virología de la Escuela de Medicina veterinaria de la Universidad Nacional por los reactivos, instrumentos y materiales suministrados para la presente investigación

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Aprobación del tribunal examinador	I
Dedicatoria.....	III
Agradecimientos	IV
Índice de contenidos	V
Índice de cuadros	VI
Índice de figuras	VII
Lista de abreviaturas y símbolos	VIII
Abstract.....	IX
Resumen	X
1 Introducción:.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación	3
1.2.1 Importancia.....	3
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo general	6
1.3.2 Objetivos específicos.....	6
1.4 Revisión bibliográfica	7
1.4.1 <i>Coronavirus</i>	7
1.4.2 <i>Rotavirus</i>	8
2 Materiales y Métodos	11
2.1 Grupo de estudio y Toma de la muestra.	11
2.2 Detección antigénica de <i>Coronavirus</i>	12
2.2.1 Aislamiento viral en células hrt-18.....	12
2.2.2 Inmunofluorescencia directa.....	12
2.2.3 SDS-PAGE.....	12
2.2.4 Extracción de ARN.....	13
2.2.5 (RT)-PCR	13
3 Resultados.....	15
4 Discusión	25
5 Conclusiones.....	33
6 Recomendaciones	34
7 Referencias bibliográficas	35
8 Anexos.....	42
Anexo 1. Formulario de recolección de información básica de la muestra.....	42
Anexo 2. Secuencia de primers de genotipificación y consenso g y p.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Distribución de muestras según procedencia y ensayos realizados para la identificación de <i>Coronavirus</i> entéricos en muestras fecales de niños y bovinos	16
Cuadro 2	Genotipos G y P encontrados en las 38 muestras fecales de niños positivas a <i>Rotavirus</i> , de acuerdo al sistema binomial de clasificación	21
Cuadro 3	Distribución de muestras de heces de niños de acuerdo a procedencia, combinaciones G y P, pruebas de tamización para <i>Rotavirus</i> y <i>Coronavirus</i>	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura del Rotavirus y segmentos que componen el ARN.	9
Figura 2.	Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación parcial del gen <i>pol</i> de los Coronavirus en los controles.	17
Figura 3.	Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación parcial del gen <i>pol</i> de los Coronavirus en distintas muestras	18
Figura 4.	SDS-PAGE de ARN de cuatro muestras distintas positivas a <i>Rotavirus</i> humano grupo A.	20
Figura 5.	Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación en el PCR anidado de los genotipos G1, G10, P[4] y P[8].	23
Figura. 6.	Electroforesis en gel de agarosa de amplificación de G3 y G10 utilizando iniciadores específicos en una misma muestra proveniente de Siquirres, Limón	24

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADNc: ácido desoxiribonucleico copia

ARN: Ácido ribonucleico

DMEM: Medio esencial mínimo modificado por Dulbecco

(DOT-) ELISA: ensayo inmunoenzimático

HNN: Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera.

IBV: *Coronavirus* causante de la bronquitis infecciosa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

(RT)-PCR: Retro-transcripción y reacción en cadena la polimerasa

NSP: Proteínas no estructurales

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMP: Organización Panamericana de la Salud

ORF: Marcos abiertos de lectura

SDS-PAGE: Electroforesis del en gel de poliacrilamida

PBS: Tampón de fosfatos

PM: Marcador de peso molecular.

pol: Polimerasa

SARS: Síndrome Respiratorio Agudo Severo

Cepa Smith: cepa bovina de referencia de *Coronavirus*

VP: Proteína (s) estructural (es) de *Rotavirus*

ABSTRACT

Diarrheic stool samples from calves (n= 115) and children (n=116) were recollected during the period between October, 2006 and July, 2007. Using a commercial immunochromatographic assay, 3.5 % of bovine samples were positive to enteric *Coronavirus* and 20.6 % of human samples were positive to in-house DOT-ELISA.

Samples from both species (n= 23) were used for molecular characterization through (RT)-PCR. *Coronavirus*-like PCR amplification was detected in 2 human (1.7%) and 3 bovine (2.6%) samples. One bovine sample showed amplification with two set of primers, each one provides *Coronavirus* specific-group amplification. The other 4 samples showed amplification only with group II specific primer set.

Then, HRT-18 culture isolation was performed for PCR positive samples. After third passage, weak citopatic effect was identified in 2.5% of the samples. After that, direct fluorescent-antibody test was performed using anti-BCV-fluorescein conjugate. Two human samples showed fluorescence in few cells from monolayer; probably result of cross antigenic reaction with anti-BCV conjugate. All 5 samples are good candidates for gene sequencing and future phylogenetic studies.

Some children diarrheic stool samples (n=116) were available for Group A *Rotavirus* characterization by genotype of the two outer capsid proteins, VP7 and VP4. ARN migration pattern (electroferotype) was also determined. Short (n= 2) and long (n=38) e-types were determined in 34.5% samples positive to SDS-PAGE. The predominant genotype was GNTp[8] (34.0%). For the first time in Costa Rica, G3P[4](2.5%) and G10P[8] (10.5%) unusual combination, as well as, G3+10 P[4] (2.5%) and G3+10 P[4+8](2.5%) mixed infection were reported, suggesting recent changing patterns of *Rotavirus* genotypes.

Rotavirus local strains surveillance is an invaluable tool to determinate whether the prevalent strains are covered by the antigens found in current vaccines. Futhermore, molecular characterization of both, *Rotavirus* and *Coronavirus*, can provide new approaches to the understanding of interspecies transmission and human-animal viral reassortment process.

RESUMEN

En el periodo comprendido entre Octubre del 2006 hasta Julio del 2007 se recolectaron 115 muestras de heces diarreicas de ternero y 116 de niño. Utilizando un ensayo inmunocromatográfico comercial 3.5 % de las muestras de bovino fueron positivas a *Coronavirus* entéricos y 20.6% de las muestras de heces de humano fueron positivas en un DOT-ELISA estandarizado en el laboratorio.

Mediante la técnica de (RT)-PCR, 23 muestras de ambas especies fueron probadas y se obtuvieron amplificaciones compatibles con las esperadas para una sección del gen *pol* de los *Coronavirus* en 2 (1.7%) muestras de origen humano y 3 (2.6%) de origen bovino. Una de las muestras de origen bovino mostró amplificación con los dos juegos de cebadores utilizados para diferenciar entre los linajes específicos de los *Coronavirus*, las otras cuatro mostraron amplificación con el juego de iniciadores específicos para el grupo II.

Posteriormente se realizó cultivo celular de las muestras positivas el PCR en la línea celular HRT-18. Después del tercer pasaje, se observó un efecto citopático leve en algunas muestras. A continuación, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un conjugado anti-BCV-fluoresceína. Dos muestras de humano mostraron fluorescencia específica en algunas de las células de la monocapa probablemente resultante de la reacción antigénica cruzada con el conjugado anti-BCV. Las 5 muestras son buenas candidatas para la secuenciación y futuros estudios filogenéticos.

Por otro lado, las mismas muestras de heces de niños (n=116) fueron utilizadas para la caracterización del genotipo de las dos proteínas externas de cápside VP7 y VP4 de Rotavirus A y la determinación del patrón de migración electroforético del genoma viral. En 34.5% de las muestras positivas al SDS-PAGE, se determinó el patrón corto (n= 2) y largo (n=38). Así mismo, el genotipo predominantemente encontrado fue GNTp[8](34.0%) y por primera vez en Costa Rica se determinaron las combinaciones inusuales G3P[4](2.5%) y G10P[8] (10.5%), así como las infecciones mixtas G3+10 P[4] (2.5%), G3+10 P[4+8](2.5%), G1+10 P[8] (2.5%) y G1+10 P[8] (2.5%) lo cual sugiere variaciones en los patrones de genotipos de *Rotavirus* respecto a los resultados de años recientes.

La vigilancia de las cepas de *Rotavirus* circulantes en una región o país es una herramienta importante para determinar si las cepas prevalentes localmente están cubiertas por los antígenos disponibles en las actuales vacunas. Además, la caracterización molecular de *Rotavirus* y *Coronavirus* puede proveer nuevos acercamientos a la comprensión de los procesos de transmisión entre especies y a la incorporación de genes virales de origen humano y animal en nuevos patógenos.

1 INTRODUCCIÓN:

1.1 Antecedentes

El género *Coronavirus* pertenece a la familia *Coronaviridae*, el cual incluye virus envueltos, redondos o pleomórficos y cuyo nombre deriva de su morfología visible al microscopio electrónico. Estos virus causan una amplia gama de enfermedades respiratorias agudas y crónicas, entéricas, hepáticas y nerviosas en muchas especies incluidos los seres humanos (Hoet y Buscan, 2002; Weiss y Navas-Martin., 2005).

Por otra parte, el género *Rotavirus* pertenece a la familia *Reoviridae*, tiene una morfología circular distintiva. Es un virus desnudo, constituido por una triple cápside proteica que contiene el ácido ribonucleico (ARN) doble cadena segmentado y una ARN polimerasa (Parashar et al., 1998). Los *Rotavirus* son patógenos comunes que causan gastroenteritis severa en niños y es reconocido como el agente viral causante de diarrea de mayor relevancia médica en animales jóvenes (Cruz, 2005).

Las primeras descripciones de ambos virus en Costa Rica se hicieron utilizando la microscopía electrónica como herramienta fundamental para el diagnóstico y valiéndose de las características morfológicas de los mismos. Durante 1977, Hernández publicó la descripción de la primera epidemia de diarrea causada por *Rotavirus* en niños atendidos en el HNN y en 1987 Oviedo detectó por primera vez el *Coronavirus* en bovinos y lo reconoció como uno de los principales agentes causantes de diarrea en terneros entre 31 a 60 días de nacidos (Hernández, 2002; Oviedo, 1987).

Mientras los estudios utilizando microscopía electrónica se perfeccionaban, se introdujo el ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de *Rotavirus*, considerándose una técnica más simple, barata y más sensible (Simhon et al., 1979).

El primer aislamiento viral en el país de *Coronavirus* bovino (BCV) asociado a la diarrea neonatal se realizó en 1991 en el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (Jiménez et al., 1993). Desde ese entonces, y hasta 1997 se realizaron alrededor de 21 aislamientos de distintas cepas en el banco de muestras del mismo laboratorio (Martínez, 2001).

Pérez et al. (1998), en un estudio caso control que se llevó a cabo en la región de Tilarán (Costa Rica), detectaron algunos agentes infecciosos asociados a diarreas en terneros menores de tres meses. El *Coronavirus*, al igual que el *Rotavirus*, apareció en baja frecuencia, 9% y 7 % respectivamente.

Sin embargo, en un estudio en niños realizado por González et al. (1997) para determinar la presencia de diversos agentes infecciosos en heces diarreicas, se encontró *Rotavirus* en el 33% de las muestras y *Coronavirus* en el 27% de las mismas.

Martínez (2001) comparó el gen de la hemaglutinina de las cepas de *Coronavirus* provenientes de los aislamientos del periodo 1991-1997, con algunas cepas reportadas en la literatura y concluyó que existe una estrecha relación genética entre ambos grupos y que las diferencias se deben a mutaciones puntuales (Martínez, 2001).

Bourdett (2003) determinó la presencia de *Rotavirus*, *Coronavirus* y *Torovirus* humano en heces de niños con diarrea atendidos en el HNN. En las 205 muestras analizadas, fue reportada una alta frecuencia de *Rotavirus* (27.3%) y *Coronavirus* (38%). Con respecto a los *Rotavirus* se obtuvieron los 2 genotipos y un único patrón de migración del ARN.

Los hallazgos de Bourdett (2003) sugieren que existe cercanía antigénica y genética entre los *Coronavirus* aislados en muestras de humanos y animales, esto debido a la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Coronavirus* de origen humano usando el mismo juego de cebadores que amplifican para el *Coronavirus* Entérico del Pavo y la Encefalitis Hemaglutinante Porcina.

Recientemente, Cruz (2005) continuó la investigación de la gastroenteritis causada por rotavirus al caracterizar molecularmente cepas de *Rotavirus* en niños y animales domésticos (cerdos, perros). En humanos, se encontraron tres combinaciones de genotipos distintos, y nuevamente se constató un único patrón de migración del ARN.

1.2 Justificación

1.2.1 Importancia

La gastroenteritis aguda es una de las enfermedades más comunes en animales y seres humanos, además es una de las causas más frecuentes de enfermedad y muerte de niños en los países en desarrollo. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ocurren alrededor de 1000 millones de episodios diarreicos y entre 4-5 millones de muertes anuales en niños menores de cinco años, la mayoría en países en desarrollo (OMS, 1998; Wilhelmi de Cal., 2001).

Las enfermedades diarreicas también representan una carga económica importante para los hospitales debido a que los pacientes deben ser tratados con terapias de fluidos y muchas veces se utilizan costosos medicamentos poco efectivos (OMS, 1998).

Desde la década de 1950 los virus entéricos han sido reconocidos como una causa importante de diarrea de interés en el ámbito veterinario. Fue hasta 1973, cuando Ruth Bishop y sus colegas observaron por primera vez el *Rotavirus* en el epitelio duodenal de un niño con diarrea en Australia (Parashar et al., 1998). Antes de este descubrimiento solo se diagnosticaba la etiología viral, bacteriana o parasitaria entre 10 y 30% de los niños con diarrea.

En los años siguientes y hasta la actualidad, el *Rotavirus* se ha reconocido como la causa más común de diarrea en niños menores de 5 años y la tercera mayor causa de muerte (Glass et al., 2006; Candy, 2007) . También se ha generado ha nivel mundial una gran cantidad de información sobre las propiedades biológicas y epidemiológicas de estos virus (Parashar et al., 1998). Éste virus, ocasiona vómito y diarrea, que en algunos casos es tan severa que si el niño no recibe atención médica inmediata produce deshidratación, shock hipovolémico y muerte (Parashar et al., 1998).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) estimó durante el 2007 que este virus causa la muerte de 600 000 niños anualmente, siendo la causa del 40 % de las hospitalizaciones por diarrea y 5 % del total de muertes en niños menores de 5 años (Glass, 2006). En América, el *Rotavirus* causa alrededor de 75 000 hospitalizaciones y 15 000 muertes anuales (OPS, 2007). Las mejoras en los sistemas sanitarios, en la calidad del agua y de los alimentos parecen reducir poco la incidencia, más aún las características epidemiológicas de

este virus indican que puede ser mejor controlado a través de la vacunación (Parashar *et al.*, 1998).

Los *Coronavirus* también han sido implicados como causa de enterocolitis necrosante, acompañada de diarrea principalmente en niños (Buesa *et al.*, 2002). La frecuencia de aparición de gastroenteritis agudas solamente es superada por las infecciones víricas respiratorias agudas en las cuales los *Coronavirus* también han sido implicados (Bourdett, 2003).

Hasta hace unos años, el estudio de los *Coronavirus* en humanos tenía relativamente poca importancia, probablemente debido a que ninguna enfermedad grave podía ser atribuida exclusivamente a estos virus. Sin embargo en el 2003, cuando se esclareció que una nueva forma de *Coronavirus* humano era la responsable del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), la importancia de esta familia se reconoció, y hoy en día son considerados importantes patógenos emergentes (Weiss y Navas-Martín., 2005).

En la pandemia ocurrida por éste virus más de 8 000 pacientes fueron afectados con alrededor de 774 muertes y estudios posteriores determinaron que la diarrea es una de las presentaciones clínicas no respiratorias más frecuentes del SARS, esto muestra que la eliminación en heces podría ser una forma importante de transmisión (Cheng *et al.*, 2004).

El origen del *Coronavirus* responsable del SARS no es claro aún, se considera una forma mutante proveniente de una cepa animal con capacidad de infectar células humanas o como recombinante de *Coronavirus* humano y animal (Valero *et al.*, 2005). El aislamiento del virus en civetas de Himalaya provenientes de los mercados de animales en China, incrementa la tendencia a considerar que animales silvestres son el reservorio del origen de la epidemia de SARS. Sin embargo, otras evidencias sugieren que las civetas funcionan únicamente como hospedero para la amplificación del virus y proveen un ambiente eficiente para la transmisión entre especies (Lau *et al.*, 2005).

El gran tamaño del genoma de los *Coronavirus*, su alta frecuencia de recombinación entre ellos mismos y con otros miembros de la familia y sus altas tasas de mutación; hacen pensar que mutantes de los *Coronavirus* con alta transmisión, morbilidad y patogenicidad se podrían convertir en una amenaza sanitaria, en especial cuando existen fallas en los sistemas de vigilancia epidemiológica (Valero *et al.*, 2005).

En el caso particular del *Coronavirus* bovino, se ha demostrado que ha extendido rápidamente su rango de hospederos naturalmente (potros, alces, venados, pavos) lo que evidencia la alta tasa de mutagénesis de este agente (Majhdi et al., 1997; Guy et al., 2000; Holmes, 2003; Drosten et al., 2003). Por estas razones, son necesarios más estudios que determinen el verdadero significado clínico de los *Coronavirus* asociados con enfermedad diarreica en animales como virus emergentes en la etiología de la gastroenteritis en niños. (Wilhelmi de Cal, 2001).

En el caso de los *Rotavirus* los estudios de epidemiología molecular son necesarios para la planificación y vigilancia de las vacunas que han sido introducidas al mercado. Dada la selección que puede inducir la vacunación sobre las cepas circulantes, podrían emerger nuevas mutantes que escapan a la inmunidad de la población, es por esto que los programas de vigilancia epidemiológica del *Rotavirus* deben detectar la diversidad de cepas antes, durante y posterior a la introducción de una vacuna (Parra & Espinola, 2006).

Además la vigilancia epidemiológica de las cepas de *Rotavirus* en humanos y animales provee nuevos acercamientos a procesos de transmisión entre especies (Rahman et al., 2003).

La presente investigación intenta dar continuidad a los estudios de epidemiología del *Rotavirus* que se ha estado realizando desde las últimas tres décadas en el país, en el contexto de la reciente introducción en el mercado nacional de las nuevas vacunas contra éste agente.

Por otro lado, el estudio también pretende contribuir al seguimiento de los *Coronavirus* asociados con diarrea en bovinos como posibles virus asociados a la gastroenteritis en humanos, mediante la identificación de algunas cepas circulantes en ambas especies.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Identificar cepas de *Coronavirus* presentes en heces de bovinos y de niños en Costa Rica y caracterizar los genotipos de *Rotavirus* circulantes en heces diarreicas de niños en Costa Rica.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar *Coronavirus* entéricos en heces de bovinos mediante el uso de una prueba inmunocromatográfica y en niños mediante la prueba inmunoenzimática de DOT- ELISA.
- Diferenciar distintas cepas de *Coronavirus* presentes en heces diarreicas mediante un ensayo consenso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Identificar y caracterizar los electroferotipos del ARN genómico de *Rotavirus* presentes en muestras de heces diarreicas de niños utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
- Genotipificar las muestras de niños positivas a *Rotavirus* mediante el uso de cebadores específicos en el PCR que amplifican para distintas regiones de los genes que codifican para las proteínas estructurales virales 4 y 7 (VP4 y VP7).

1.4 Revisión Bibliográfica

1.4.1 Coronavirus

El genoma de los *Coronavirus* es complejo, consiste en una sola hebra ARN positiva y es considerado el genoma viral conocido de mayor tamaño (20-30 kb) (Guy et al., 2000). El ARN genómico del *Coronavirus* bovino posee 13 marcos abiertos de lectura (ORF) y cinco genes que codifican las proteínas estructurales: la glicoproteína de superficie (ORF4), la proteína integral de membrana (ORF9), la proteína hemaglutinina esterasa (ORF3), la proteína de nucleocápside (ORF10) y una pequeña proteína de membrana (ORF8). Además el ORF1a y 1b codifican subunidades de la ARN polimerasa madura (King & Brian, 1982; Lihong et al. 2006).

La estructura y función viral de la polimerasa es muy conservada, particularmente parte de la secuencia del ORF1b del gen *pol*. Esta característica convierte la región genómica en una secuencia de elección para desarrollar comparaciones filogenéticas e identificar nuevos *Coronavirus* mediante PCR (Stephensen et al., 1999; Moës et al. 2005).

El género *Coronavirus* se divide en tres grupos según la reacción serológica, antigénica. Esta agrupación ha sido confirmada mediante análisis de las secuencias genómicas. En el grupo I se ubican patógenos como el Virus de las Gastroenteritis Transmisible del Cerdo (TGEV), el Virus de las Diarrea Epidémica del Cerdo (PEDV), el Virus de la Peritonitis Infecciosa Felina (FIPV) y los *Coronavirus* Humano HCoV- 229E y HCoV-HKU1, los cuales causan infecciones respiratorias (Guy et al., 2000; Weiss y Navas-Martin., 2005).

Los virus del grupo II también incluyen patógenos de relevancia veterinaria como el Coronavirus bovino (BCV), el Virus de la Encefalomiелitis Hemaglutinante del Cerdo, el Coronavirus Equino y los Coronavirus Humanos HCoV-OC43 y HCoV-NL63 que causan infecciones respiratorias. También se incluyen virus que afectan ratas y ratones como el Coronavirus murino de la hepatitis del ratón (MHV) que se utiliza como modelo para estudio de la enfermedad en humanos (Weiss y Navas-Martin., 2005).

Existe controversia en cuanto a si el virus responsable del Síndrome Respiratorio Agudo Severo en humanos (SARS-CoV) pertenece a un único y nuevo grupo o si es un miembro distante del grupo II (Weiss y Navas-Martin., 2005).

Por último, en el grupo III se incluyen *Coronavirus* de las aves como el virus causante de la Bronquitis Infecciosa (IBV) y el *Coronavirus* del Pavo (TCoV) (Weiss y Navas-Martin., 2005).

1.4.2 Rotavirus

Existen varios grupos de *Rotavirus* dependiendo de sus características antigénicas; hasta ahora se han descrito siete grupos de *Rotavirus* (A al G), los cuales difieren en sus características epidemiológicas, la especie donde más frecuentemente se encuentran y el grupo de edad en la que son más prevalentes (Parashar et al., 1998).

Los grupos A, B y C se han encontrado tanto en animales como en humanos, y los D, E, F y G sólo se han aislado de especies animales (Parashar et al., 1998).

La basta mayoría de los estudios se ha realizado en *Rotavirus* pertenecientes al grupo A. Éstos fueron los primeros en descubrirse y además representan el principal grupo de importancia médica y veterinaria (Parashar et al., 1998).

El genoma viral comprende 11 segmentos de ARN doble hélice, cuya electroforesis en SDS-PAGE produce un patrón de migración característico llamado electroferotipo (Amarilla et al. 2005). Los tamaños de los segmentos varían entre 660 pares de bases (pb), hasta aproximadamente 3300 pb para el gen más grande y codifican para cada una de las proteínas estructurales (VP) o no estructurales (NSP) (Figura 1). El genoma tiene la capacidad de reacomodarse durante infecciones mixtas (Parashar et al., 1998; Maunula & von Bonsdorff, 2002).

Como se observa en la figura 1, la cápside viral tiene tres capas. La capa interna compuesta por la proteína VP2, la cual tiene capacidad de unión al ARN, contiene además del genoma, la enzima ARN polimerasa (VP1) y la (VP3) guanilinatransferasa-metilasa (Parashar et al., 1998; Maunula & von Bonsdorff, 2002).

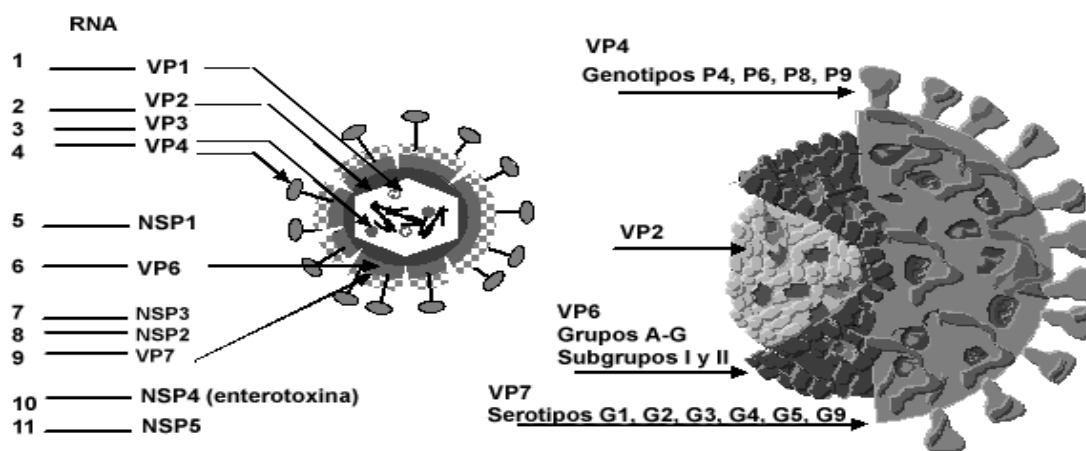


Figura 1. Estructura del Rotavirus y segmentos que componen el ARN. Tomada de Pérez et al., 2003. (Los detalles se describen en el texto)

Más externamente presenta dos capas proteicas, la media compuesta por VP6 y la externa compuesta por VP7 y la proteína de espícula VP4. El corte de la proteína de espícula por enzimas proteolíticas como la tripsina produce VP5 y VP8, lo cual aumenta la capacidad infectante del virus (Maunula & von Bonsdorff, 2002).

Las dos proteínas de cápside VP7 y VP4 inducen anticuerpos neutralizantes independientemente y son la base del sistema binario de clasificación de serotipos y genotipos (Rahman et al., 2003).

Los Rotavirus que afectan animales y seres humanos se han clasificado con base a la glicoproteína VP7 en 14 serotipos G y 15 genotipos. Con base a la proteína VP4, se han clasificado en 11 serotipos P con 21 genotipos (Rahman et al., 2003).

Como VP4 y VP7 son codificadas por diferentes segmentos de ARN, se pueden observar distintas combinaciones (Rahman et al., 2003). Aunque no existen restricciones para el reacomodo de los segmentos, algunas combinaciones de segmentos no ocurren naturalmente, sin embargo el número de combinaciones detectadas ha incrementado a lo largo del tiempo (Maunula & von Bonsdorff, 2002; Gentsch et al., 2005).

Recientemente, dos vacunas han sido introducidas en el mercado. La Glaxo-SmithKline ofrece una vacuna monovalente G1[P8] (Rotarix®) derivada enteramente de una cepa humana atenuada (RIX4414) (Ruiz-Palacios et al., 2006). Los resultados de los ensayos

clínicos indicaron que la vacuna es altamente protectora contra gastroenteritis severa por *Rotavirus*, disminuye en 85 % las hospitalizaciones (Ruiz-Palacios et al., 2006). Esta vacuna fue aprobada para la distribución en el país, en Febrero del 2007(Cantero, 2007).

Por otra parte, la Merck ofrece otra vacuna pentavalente derivada de cinco recombinantes de humano y bovino (cepa WC3), que incluye los serotipos humanos G1, G2, G3 G4 y P[8] (Vesikari et al., 2006).

Los resultados de los estudios clínicos sugieren que la intususcepción no es un riesgo específico de la vacuna. Además, la vacunación se redujo en 86% las visitas clínicas relacionadas con gastroenteritis y su eficacia contra cualquiera de los serotipos G1– G4 es de 74 %. Esta vacuna fue aprobada e introducida al país, en octubre del 2007(Cantero, 2007).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Grupo de estudio y toma de la muestra.

El periodo de recolección de muestras comprendió desde Octubre del 2006 hasta Julio del 2007.

Dentro del grupo de estudio se incluyeron terneros menores de un mes con heces diarreicas acuosas o sanguinolentas con o sin signos sistémicos. Además, se incluyeron vacas adultas de más de tres lactaciones con cuadro clínico compatible a disentería de invierno y con diarrea acuosa o mucosanguinolenta (McArthur, D. 1997).

Con respecto a las muestras de bovino, para detectar la presencia del virus en al menos una muestra, se debió recolectar al menos 125 muestras basados en una prevalencia esperada de 9% (Pérez et al., 1998), nivel de confianza de 95% y error aceptado 5% (Noordhuizen et al., 1997; Thrusfield et al., 2001). Las muestras que permanecieron por períodos prolongados a temperatura ambiente y/o en cantidad insuficiente para realizar las pruebas diagnósticas, no se consideraban aptas para el estudio.

Las muestras de heces de bovino se recolectaron directamente de fincas o fueron remitidas por los propietarios, los cuales fueron previamente informados del proyecto vía comunicación personal o escrita, del periodo de recolección de muestras y los criterios de selección de las mismas.

Por otra parte, se procesaron muestras de heces diarreicas de niños menores de cinco años las cuales se remitieron del HNN, de la Clínica Integrada de Tibás y del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA).

En el caso de las muestras de heces de niños, para detectar la presencia del virus en al menos una muestra, se debió recolectar aproximadamente 145 muestras diarreicas; considerando el método de estimación de tamaño de muestra (Noordhuizen et al., 1997; Thrusfield et al., 2001), basado en una prevalencia esperada de 16 % (Christensen, 1989), un nivel de confianza de 90% y un error aceptado de 5%.

Para el transporte y la preservación de las muestras de heces, éstas se vertieron en un tubo cónico rotulado de 15 ml con Medio Esencial Mínimo Modificado por Dulbecco (DMEM) y se

colocaron en una hielera a una temperatura aproximada de 4-7°C. Se recolectó información básica de cada muestra en un formulario (Anexo 1).

Posteriormente, en el Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria se separaron las muestras en alícuotas de volumen variable (de acuerdo a la cantidad de muestra), se clarificaron por centrifugación y se almacenó el sobrenadante a -70°C (mínimo dos alícuotas).

2.2 Detección antigénica de *Coronavirus*

Con las heces frescas de bovino se realizó la prueba inmunocromatográfica comercial (Strip test) para la detección de antígenos de *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Cryptosporidium* sp., y *Escherichia coli* según el protocolo de la casa comercial (Coris BioConcept, 2005).

Para la evaluación de las muestras frescas de heces de niños se utilizó la técnica del DOT-ELISA (Voller y Bidwell, 1986) según el protocolo descrito por Jiménez (1990). Se utilizó una disolución de 10µg/ml de anticuerpo policlonal ratón contra *Coronavirus* gentilmente cedido por el Dr. Carlos Jiménez.

2.2.1 Aislamiento viral en células HRT-18

El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo descrito por Jiménez (1990) utilizando la línea celular HRT-18. A las muestras seleccionadas se les realizó tres pasajes.

2.2.2 Inmunofluorescencia directa

Se utilizó el protocolo descrito por Jiménez (1990), en la misma línea celular HRT-18. Se utilizó una disolución de 15µg/ml el conjugado anti-BCV- fluoresceína gentilmente cedido por el Dr. Carlos Jiménez.

2.2.3 SDS-PAGE

La técnica de SDS-PAGE se realizó siguiendo la técnica descrita por Svensson et al., (1986). La separación se efectuó a 100 V por 15 minutos y luego a 130 V por 90 minutos. Para la tinción con plata se utilizó el kit comercial Silver Stain Plus y se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.2.4 Extracción de ARN

Para el SDS-PAGE, el ARN doble cadena de *Rotavirus* se extrajo a partir de 250 µl de heces utilizando una solución de disrupción la cual consiste en proteinasa K (1 mg/ml), 10 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA y SDS 0.5% y posteriormente con fenol y cloroformo. (Svensson et al., 1986).

Para el PCR, el ARN viral se extrajo a partir de 250 µl de heces utilizando TRIzol LS reagent siguiendo las instrucciones del fabricante (INVITROGEN, 2007) y posterior al protocolo el ARN precipitado se resuspendió en 15 µl de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC).

2.2.5 (RT)-PCR

La identificación de los grupos de *Coronavirus* se realizó como fue previamente descrito por Stephensen et al. (1999). El (RT)-PCR se llevó a cabo utilizando el kit Superscript III one-step system partir de ARN extraído de las muestras positiva a la prueba inmocromatográfica y al DOT-ELISA. Para la determinación de *Coronavirus* del grupo II se amplificó un fragmento de 965 pb del gen de la polimerasa con el primer sentido 1Ap (5'-GATAAGAGTGCTAGGCTATCCC-3') y el reverso 7m (5'-ACTAGCATTGTAGTGTGATGAACA-3'). Para la determinación de los grupos I y III se utilizó el juego 8p (5'-TATGAGAGGTCGGGCTGTATACC-3') y el mismo cebador reverso 7m para amplificar una región de 1013 pb correspondiente al mismo gen.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador con un paso inicial de reverso transcripción a 55°C por 30 min seguido de desnaturalización del PCR a 94°C por 2 min, 35 ciclos de amplificación (15 s a 94°C, 1 min a 45 °C, 1 min a 72°C y una extensión final a 72°C por 5 min.

El ARN de las muestras fecales de niños positivas a Rotavirus a través de SDS-PAGE fue desnaturalizado a 97°C por 5 min. El (RT)-PCR concenso para los grupos G y P se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente por Gouvea et al. (1990) y Gentsch et al. (1992).

Se utilizaron los reactivos de la casa comercial Fermentas y siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto concenso esperado para el grupo G consistió en un fragmento de 881 pb del gen VP7. Mientras que el amplicón concenso esperado para el grupo P consistió en un fragmento de 870 pb del gen VP4 . La secuencia de los iniciadores se puede ver en el Anexo 2.

La reacción se llevó a cabo en el mismo termociclador con un paso inicial de reverso transcripción a 42°C por 60 min seguido de activación del PCR a 94°C por 5 min, 30 ciclos de amplificación (1 min a 94°C, 1 ó 2 min a 42 °C, 1 min a 72°C y una extensión final a 72°C por 5 min.

A partir del producto del (RT)-PCR concenso, se realizó un PCR anidado de genotipificación como fue descrito por Gentsch et al. (1992), Gouvea et al. (1990) y con algunas adaptaciones en la secuencias de “primers” realizadas por Iturriza-Gómara (2004) para los diferentes tipos G (G1, G2, G3, G8, G9 y G10) y P (P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] y P[11]). Cada iniciador sentido es específico y derivado de una región distinta del gen VP7 y VP4. Las temperaturas, tiempos y ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa fueron las mismas descritas anteriormente para el (RT)-PCR.

Del volumen total de reacción de PCR (50 µl), 10 µl de cada producto se fue corrido en un gel de agarosa (1%), teñido con bromuro de etidio y visualizados en el transluminador de luz ultravioleta. (Sambrook et al. 1989).

3 RESULTADOS

Con el fin de identificar *Coronavirus* y *Rotavirus* entéricos en heces de bovinos y niños, se generó un banco de 131 muestras fecales de bovino y 120 de niño durante el período comprendido entre Octubre 2006 hasta Julio 2007. De estas 251 muestras diarreicas de heces, 115 muestras de bovino y 116 de niño fueron seleccionadas de acuerdo a la disponibilidad de muestra necesaria para la identificación antigénica y molecular de de ambos virus.

Para la identificación de *Coronavirus* en niños, se emplearon 116 muestras fecales, las cuales fueron evaluadas a través de una prueba inmunoenzimática DOT-ELISA. Se obtuvieron 20.6 % de muestras positivas (Cuadro1).

Al correlacionar el origen con de las muestras positivas, se observa que las muestras positivas al DOT-ELISA provinieron principalmente de San José, seguido por Heredia y algunas muestras de origen desconocido (Cuadro1).

Por su parte, para evaluar la presencia o ausencia de *Coronavirus* bovinos en las 115 muestras de heces recolectadas, se utilizó la prueba la prueba inmunocromatográfica comercial

El 84% de las muestras fecales de bovino provinieron de fincas ubicadas en los principales sectores lecheros de la provincia de Alajuela. Otras provincias contribuyeron en baja proporción al total de muestras procesadas: San José (1%), Heredia (3.5%), Cartago (10.5%), Puntarenas (1%) y Limón (0%) (Cuadro 1).

Al evaluar cada muestra fecal fresca de bovino con la prueba inmunocromatográfica, el 3.5% resultaron positivas. Estas provinieron de en su totalidad Alajuela (Pital y Póas). Ninguna de las muestras positivas conocida compartió procedencia con las positivas a *Coronavirus* en niños (Cuadro1).

Cuadro 1. Distribución de muestras según procedencia y ensayos realizados para la identificación de Coronavirus entéricos en muestras fecales de niños y bovinos.

Procedencia	Muestras de heces de Bovinos					Muestras de heces de niños						
	Total Analizadas		Positivas Strip-test	Positivas PCR	Positivas Cul. Cel ¹	Positivas IF	Total analizadas		Positivas DOT-ELISA	Positivas PCR	Positivas Cul. Cel ²	Positivas IF
<i>Alajuela</i>	97	84.0%	4	3	2	0	4	3.5%	0	-	-	-
<i>San José</i>	1	1.0%	0	-	-	-	53	46.0%	12	2	1	2
<i>Heredia</i>	4	3.5%	0	-	-	-	7	6.0%	5	-	-	-
<i>Limón</i>	0	0.0%	0	-	-	-	3	2.5%	1	-	-	-
<i>Puntarenas</i>	1	1.0 %	0	-	-	-	3	2.5%	0	-	-	-
<i>Cartago</i>	12	10.5%	0	-	-	-	3	2.5%	0	-	-	-
<i>Guanacaste</i>	0	0	0	-	-	-	0	0.0%	0	-	-	-
<i>Desconocido</i>	0	0	0	-	-	-	43	37.0%	6	-	-	-
Total	115	100%	4	3	2	0	116	100.0%	24	2	1	2
<i>Porcentaje de aparición</i>			3.5%	2.6%	1.7%	0			20.6%	1.7 %	0.8%	1.7%

¹Cul.Cel : Cultivo Celular.

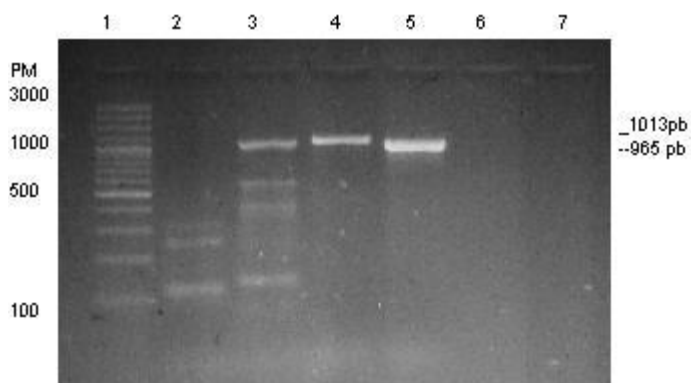
Una vez determinadas las muestras positivas a las pruebas de tamización inicial, se realizó un ensayo consenso de PCR con el fin de identificar molecularmente los *Coronavirus*. Esta prueba también permitió clasificar las muestras positivas de acuerdo a su cercanía con los grupos I y III o con el grupo II por medio de la utilización de dos juegos de iniciadores específicos de cada linaje.

Para determinar la funcionalidad del ensayo de PCR se utilizaron un control negativo (DMEM estéril) y dos controles positivos, la cepa Smith y la cepa vacunal del *Coronavirus* responsable de la bronquitis infecciosa, ambas cepas gentilmente otorgadas por el Dr. Carlos Jiménez.

La cepa Smith es una cepa de referencia de origen bovino, por lo cual se espera que amplifique únicamente con el juego de iniciadores del grupo II, como se observa en la figura 5 (carril 3).

En el caso del *Coronavirus* responsable de la bronquitis infecciosa, Stephensen (1999) reporta amplificación con ambos juegos de iniciadores al diseñar el ensayo de PCR y los iniciados. En la figura 2 (carriles 4 y 5) se reproducen éstos resultados utilizando el ARN extraído de una cepa vacunal.

Como se observa en la figura 2, en el control negativo no se observó amplificación con ninguno de los dos juegos de iniciadores (carriles 6 y 7).



Carril 1. Marcador de peso molecular
 Carril 2. Control negativo. Cepa de origen bovino que no debe amplificar con el juego de iniciadores del grupo I y III.
 Carril 3. Control positivo. Amplificación de cepa de origen bovino (Smith) con el juego de iniciadores del grupo II. (PM 965 pb).
 Carril 4. Control positivo cepa vacunal IBV con juego de iniciadores del grupo I y III. PM 1013 pb.
 Carril 5. Cepa vacunal IBV con juego de iniciadores del grupo II. PM 965pb

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación parcial del gen pol de los Coronavirus en los controles.

Una vez corroborada la funcionalidad del ensayo de PCR, se procedió a evaluar cuatro muestras positivas y cuatro sospechosas de origen bovino. Se evaluaron además, quince de las muestras de niños que habían resultado positivas al DOT-ELISA (Cuadro 1).

Se obtuvieron bandas con pesos moleculares similares a los esperados en 2.6% de las muestras de origen bovino y en 1.7% de las de origen humano (Cuadro 1).

En las muestras consideradas positivas, existió una única banda de un peso molecular similar al esperado y al control positivo mientras que en las muestras consideradas negativas existió amplificación de bandas de distintos tamaños (no concordante con el peso molecular esperado) o no se observó amplificación. Los amplificones observados en electroforesis de agarosa sugirieron que se existía una baja concentración de ADN.

Una de las muestras de origen bovino (Figura 3, carriles 3 y 10) amplificó específicamente con los dos juegos de iniciadores utilizados para la identificación de los grupos en que se divide el género de los *Coronavirus*. Además, no se evidenció relación geográfica entre las muestras de origen bovino y de origen humano que amplificaron específicamente para *Coronavirus*.

Carriles superiores 1 al 8, electroforesis de muestras evaluadas con juego de iniciadores para el grupo I y III de los *Coronavirus*

Carril 1. Marcador de Peso Molecular
Carril 2, 4, 5, 6 y 7. Muestras negativas.
Carril 3. Muestra de origen bovino.
Carril 8. Control negativo cepa Smith.

Carriles inferiores 9 al 16, electroforesis de muestras evaluadas con juego de iniciadores para el grupo II de los *Coronavirus*

Carriles 9 y 12. Muestras negativas.
Carril 10 y 11. Leve banda PM aproximado 1000 pb. Posibles amplificaciones de dos muestras de origen bovino.
Carril 13. Leve banda de tamaño similar al control positivo, PM 1000 pb. aproximado. Posible amplificación de muestra de origen humano
Carril 14. Amplificación inespecífica
Carril 15. Control positivo.
Carril 16. Marcador de peso molecular.

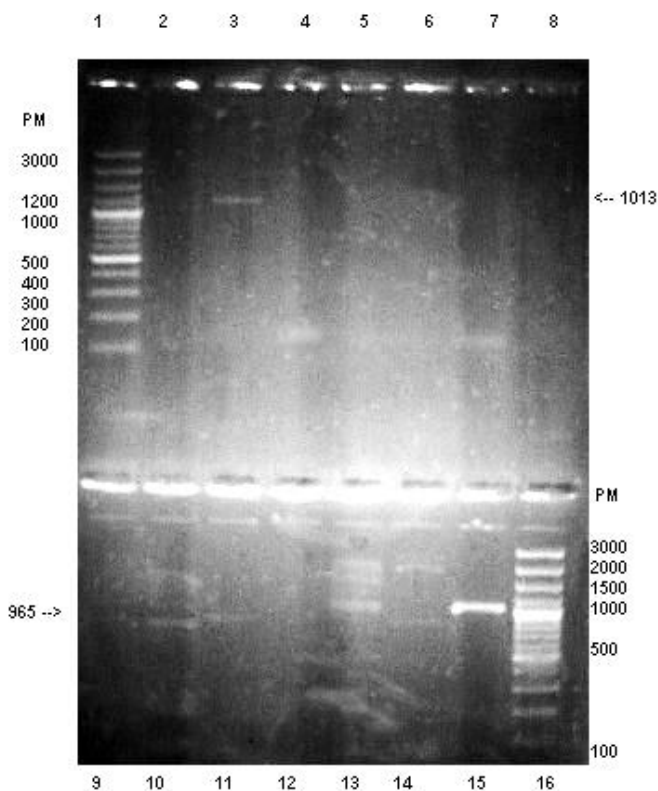


Fig. 3. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación parcial del gen pol de los Coronavirus en muestras

Las muestras de origen humano que amplificaron con en juego de iniciadores del grupo II de los *Coronavirus* procedían de la provincia de San José (Cuadro 1) pero de ubicaciones geográficas distantes (Desamparados y Ciudad Colón). La historia clínica no reporta contacto cercano entre niños y animales domésticos ni la presencia de signos respiratorios.

En la muestra proveniente de Ciudad Colón, se identificó una infección conjunta con *Rotavirus* G3 P[NT], además la historia clínica reporta una infección unos meses atrás con Citomegalovirus humano (Cuadro 3).

Para evitar la degradación del ARN viral en heces y disminuir la inespecificidad observada en algunas amplificaciones del PCR, se realizó cultivo celular de tres muestras de origen bovino y tres de origen humano de las cuales existía la cantidad necesaria.

Posterior al segundo pasaje, se observó efecto citopático similar al descrito para *Coronavirus*, es decir formación de sincitios y pérdida de adherencia. Dicho efecto se observó en 2 muestras de origen bovino y una de origen humano.

Con el fin de confirmar la presencia de *Coronavirus* en cultivo, se realizó una inmunofluorescencia a las muestras con amplificaciones de PCR del tamaño esperado para *Coronavirus*.

El control positivo mostró un patrón de fluorescencia difuso en la monocapa, mientras que en dos muestras de origen humano se observó fluorescencia sólo en algunas células y en los cuatro cultivos restantes no se observó fluorescencia.

Las mismas muestras fecales de niños fueron utilizadas para la caracterización de genotipos de *Rotavirus*. Dichas muestras fueron remitidas de los centros hospitalarios mencionados anteriormente. El 45% de las muestras provino de la provincia de San José, principalmente del cantón central. Otras áreas geográficas contribuyeron en baja proporción al total de muestras procesadas: desconocida (34.0%), Heredia (6.0%), Alajuela (3.4%), Cartago (2.5%), Puntarenas (2.5%) y Limón (2.5%) (Cuadro 2).

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para caracterizar los patrones de migración electroforética del ARN genómico de *Rotavirus* presentes en las extracciones de las 116 muestras fecales de niño seleccionadas. El SDS-PAGE también permitió la determinación de la distribución de segmentos con el patrón 4,2,3,2 (Figura 4).

El electroferotipo largo fue predominante en 95 % de las muestras y el patrón corto se identificó en 5% de las muestras, ambas de origen desconocido y con genotipo G2P[4]. El electroferotipo largo se detectó en muestras de las seis provincias incluidas en el estudio. (Figura 4)

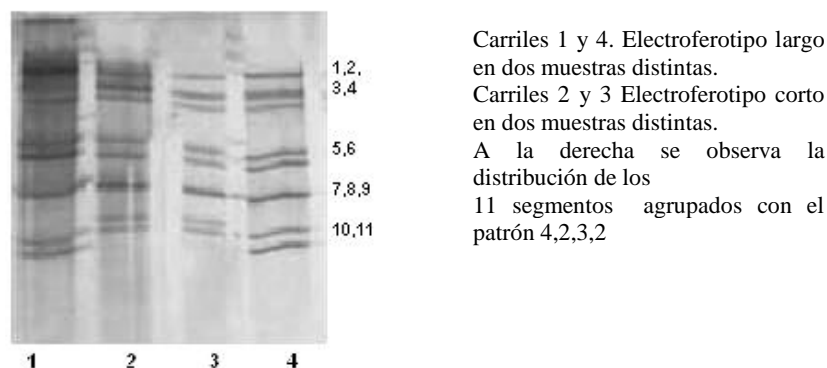


Figura 4. SDS-PAGE de ARN de cuatro muestras distintas positivas a Rotavirus humano grupo A. Se observan los dos patrones de migración encontrados en el estudio.

Posteriormente, el ARN de las muestras positivas al SDS-PAGE fue utilizado para genotipificar, por medio del PCR, las cepas de Rotavirus presentes en las muestras utilizando cebadores específicos para los genotipos G y P. Las amplificaciones obtenidas en las muestras funcionaron como controles positivos de la reacción y se utilizó medio DMEM estéril como control negativo.

En el 95% de las muestras con electroferotipo largo predominaron las combinaciones GNTP[8] (34%) seguido por G3P[8](18%) y G10 P[8] (10.5%) (Cuadro2).

Adicionalmente, se correlacionó la información clínica del paciente con los genotipos de *Rotavirus* detectados. En los casos donde fue posible tener acceso a la historia clínica, se observó la presencia de un cuadro clínico característico de gastroenteritis aguda. Los signos clínicos incluyeron vómito y diarrea de variable número de episodios por día, acompañados de deshidratación y en algunos casos fiebre (Cuadro 3).

Además, se relacionó la procedencia de las muestras positivas a *Rotavirus* con los genotipos encontrados. Como se observa en el cuadro 3, el 52.0 % de las muestras positivas del estudio provinieron de San José. El porcentaje de muestras positivas respecto al total en cada provincia es alto: Heredia (57.%), Alajuela (50%), Cartago (66%), Puntarenas (100 %) y Limón (33%).

Cuadro 2. Genotipos G y P encontrados en las 38 muestras fecales de niños positivas a Rotavirus, de acuerdo al sistema binomial de clasificación

Genotipo G	Genotipo P				Total	%
	P[4]	P[8]	P[4]P[8]	No tipificable(NT) ^C		
G1	0	0	0	1	1	2.5
G2	3	1	0	1	5	13.0
G3	1	7	0	3	11	29.0
G9	0	0	0	1	1	2.5
G10	0	4	0	0	4	11.0
No tipificable (NT) ^A	0	13	0	0	13	34.0
Mixtas ^B	1	1	1	0	3	8.0
Total	5	26	1	6	38	100.0
%	13.0	68.0	3.0	16.0	100.0	

^A Genotipos G que no fueron G1, G2, G3, G8, G9 Y G10 ^B Combinaciones de genotipos G3+G10

^C Genotipos P que no fueron P4, P6, P8, P9, P10 y P11.

Se observó un incremento en la variabilidad de combinaciones G y P encontradas proporcional al incremento en el número de muestras procesadas por cantón. Así por ejemplo, San José reporta la presencia del mayor número de combinaciones (G9P[NT], GNTP[8], G3P[8], G3 P[NT], G3+G10 P[4] y G2P[8]) y además reporta el mayor número de muestras colectadas y positivas.

Cuadro 3. Distribución de muestras de heces de niños de acuerdo a procedencia, combinaciones de los grupos G, P y pruebas de tamización para Rotavirus.

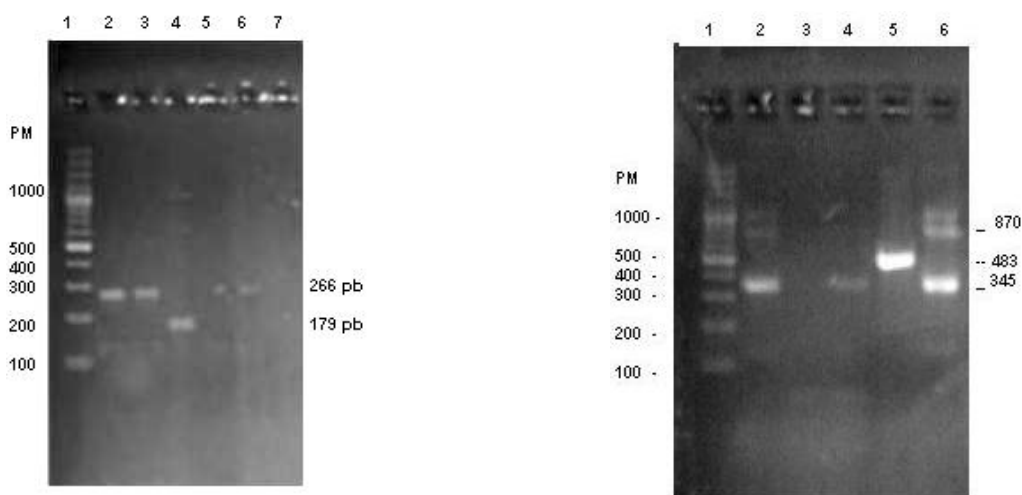
Procedencia		Total muestras	SDS-PAGE	Electro-Ferotipo	+ PCR	Combinación G y P	Datos clínicos
Alajuela n=4	Alajuela Central	3	2	Largo	2	G-P[8], G3P[8]	
	Grecia	1	0		0		
Cartago n=3	Cartago Central	3	2	Largo	2	G10P[8], G-P[8]	CCRV
	San José Central	20	9	Largo	9	G9P[-], G-P[8], G3P[8], G3 P[-], G3+G10 P[4], G2P[8]	CCRV
	Mora (Ciudad Colón)	1		Largo	1	G3 P[-]	CCRV. Antecedentes de signos por CMV
San José n=53	Aserrí	1	1	Largo	1	G-P[8]	CCRV
	Curridabat	2		Largo	2	G10P[8], G3+G10 P[4]P[8]	G3+G10 P[4]P[8]: EDA Severa
	Goicoechea	4	2	Largo	1	G-P[8]	CCRV
	Desamparados	7	2	Largo	3	G3P[4], G2P[-], G3 P[-]	CCRV, sin signos respiratorios.
	Alajuelita	6	4	Largo	1	G-P[8]	
	Tibás	4	1		0		
	Zapote	1	0		0		
	Moravia	3	0	Largo	1	G10P[8]	
	Coronado	1	2		0		
	Santa Ana	2	0	Largo	1	G3 P[-]	
Puriscal	1	1		0			
Puntarenas n=3	Puntarenas Central	2	2	Largo	2	G2 P[4], G3P[8]	
	Golfito	1	1		1	G-P[8]	
Heredia n=7	Heredia Central	4	2	Largo	2	G3P[8], G-P[8]	
	Barva	1	0		1	G-P[8]	
	San Pablo	1	1	Largo	1	G3P[8]	CCRV
Limón n=3	Sta Bárbara	1	1	Largo	1	G10P[8]	
	Limón Central	1	0		0		
	Siquirres	1	0	Largo	1	G3+G10 P[8]	EDA Severa.
	Talamanca	1	1		0		
	Desconocida	43	5	3 Largo 2 Corto	13	G2 P[4], G1P[-] G3P[8], G-P[8]	
TOTAL MUESTRAS		116 (100.0%)	40 (34.4%)	Largo Corto	38 (32.7%)		

EDA=Enfermedad diarreica aguda CCRV= Cuadro Clínico característico de Rotavirus CMV= Citomegalovirus humano

El genotipo G3 (29%) se presentó en mayor frecuencia y se distribuyó en todas las provincias incluidas en el estudio, excepto Cartago. El Genotipo G10 se distribuyó en cantones

del área metropolitana como Curridabat, Cartago central, Moravia y Santa Bárbara (Figura 5A). Adicionalmente, este genotipo fue encontrado en el cantón central de San José y Siquirres en combinación con G3 también (Cuadros 2 y 3). Para G3 y G10, el electroferotipo asociado fue el largo, incluso cuando se observó combinación de ambos genotipos.

La figura 6 muestra las amplificaciones utilizando cebadores específicos para los tipos G3, y G10 en una misma muestra. Esta combinación mixta de genotipos se presentó en 8 % de las muestras positivas a Rotavirus. Inicialmente el primer aET3 mostró inespecificidad en la detección del genotipo G3. No obstante, al cambiar el iniciador por uno más específico publicado por Iturriza-Gómara (2004), se redujo el número de amplificaciones a las que verdaderamente correspondían al genotipo G3 y al G10. Dos de las tres infecciones mixtas G3+G10 reportan una gastroenteritis severa (Cuadro 2).



A **B**
 Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación en el PCR anidado de los genotipos G1, G10, P[4] y P[8].

<i>A.. Genotipos G</i>	<i>B.. Genotipos P</i>
Carril 1. Marcador de peso molecular	Carril 1. Marcador de peso molecular
Carril 2, 3 y 6 Genotipo G10. PM 266 pb.	Carril 2, 4 y 6. Genotipo P[8]. PM: 345 pb.
Carril 4. Genotipo G9. PM 179 pb	Carril 6 producto del (RT)-PCR. PM 870 pb.
Carril 5 y 7. Muestras negativas.	Carril 3 Muestra negativa
	Carril 5. Genotipo P[4] PM: 345 pb

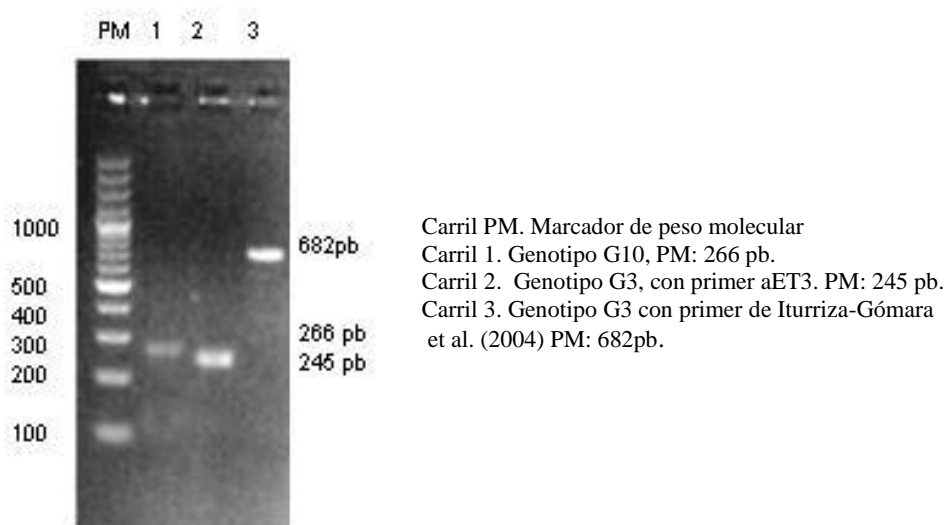


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de Amplificación de G3 y G10 utilizando iniciadores específicos en una misma muestra proveniente de Siquirres, Limón

Como se observa en el cuadro 1, el tipo G9 sólo se reconoció en 3% de las muestras positivas (Figura 5A) al igual que el genotipo G1. El patrón electroforético largo se asocia a ambos genotipos.

El genotipo G2 se presentó en 13% de las muestras positivas a Rotavirus, las cuales procedían de los cantones de San José central, Desamparados, Puntarenas y dos muestras de procedencia desconocida. El genotipo P[8] presente en 68 % de las muestras positivas a *Rotavirus* se distribuyó en todas las provincias incluidas en el estudio (Figura 5B).

El genotipo P[4] (Figura 4B) fue encontrado en menor frecuencia (13%) y se distribuyó en Curridabat, Desamparados, Puntarenas y San José cantón central. Se observó en 75% de las muestras en combinación con G2 (Figura 5B).

Se reportó infección con los dos genotipo P[4] P[8] G3+G10 en 3% de las muestras positivas, procedentes del cantón de Curridabat, la historia clínica asociados a esta infección reporta una gastroenteritis severa con alta frecuencia de vómito y deposiciones .

4 DISCUSIÓN

Los cuadros clínicos originados por *Rotavirus* y los *Coronavirus* son importantes problemas sanitarios que afectan a seres humanos y animales en alta frecuencia, además se asocia con significativas pérdidas económicas (Glass, 2006; Jackwood, 2006).

Los *Coronavirus* han sido reconocidos como agentes etiológicos de enfermedades entéricas y respiratorias en humanos y animales (Weiss y Navas- Martin, 2005; Han et al., 2006). En los últimos años han aparecido interrogantes respecto a la evolución genética y sobre la especificidad de éstos, particularmente en el contexto del crecimiento acelerado de la población, las características culturales y las prácticas zootécnicas que han puesto en contacto el ser humano con reservorios virales con potencial zoonótico (Jackwood, 2006; Han et al., 2006).

Por su parte, los *Rotavirus* del grupo A han sido reconocidos como una de las principales causa de diarrea causante de deshidratación severa a nivel mundial. Los signos clínicos asociados a la diarrea causan la muerte de miles de niños anualmente (Mota-Hernández et al. 2003).

En éste trabajo, se conformó un banco de 116 muestras de heces de niños y 115 muestras de heces de bovino con el fin de identificar molecularmente estos virus en muestras fecales de ambas especies.

Según el método de estimación de tamaño de muestra expuesto por Noordhuizen et al. (1997) y Thrusfield et al. (2001), se debieron procesar 145 muestras de fecales de niño y 125 muestras de bovino con el fin de encontrar al menos una muestra positiva a *Coronavirus* en ambas especies, ya que éste virus es menos prevalente que el *Rotavirus*.

El número de muestras procesadas no fue el estimado ya que una gran cantidad de muestras remitidas no reunieron los requisitos de necesarios para su procesamiento. Además, en otras muestras de origen humano, la cantidad remitida era insuficiente para completar todos los ensayos necesarios. A pesar de procesar un número de muestras menor al debido, se detectaron muestras positivas a ambos virus en las especies de interés.

Con respecto a los *Coronavirus* en bovinos, en este estudio se encontraron mediante la prueba inmunocromatográfica 3.4 % muestras bovinas positivas. Ésta frecuencia de aparición es menor a las reportadas anteriormente. Oviedo (1987) reporta una frecuencia de aparición de

20% utilizando microscopía electrónica y Pérez et al. (1998) reporta un porcentaje de aparición del 9% utilizando un DOT-ELISA.

Las diferencias pueden deberse al uso de distintas pruebas diagnósticas en los estudios. La prueba inmunocromatográfica utilizada en éste estudio es muy específica (100%) y sensible (92.6- 100%) lo cual disminuye los falsos positivos que pueden ser detectados con otras técnicas como la microscopía electrónica.

En éste estudio se reportó 20.6 % de las muestras positivas a *Coronavirus* en humanos. Éste porcentaje es similar al reportado por Gonzáles et al. (1997), pero se considera elevado en relación con 16% reportada por Christensen (1989) utilizando microscopía electrónica.

A través de PCR solo se observó amplificación en el 1.7% de las muestras de niños, lo cual es ligeramente inferior con el 3% reportado por Fouchier et al. (2004) y el 2.1% reportado por Lau et al. (2005), esto pudo ser efecto de la disminución en el tamaño de muestra procesado.

En el DOT-ELISA, pudo existir determinación de falsos positivos durante el procesamiento debido a la excesiva pigmentación de las muestras fecales de niño, ya que la coloración pudo confundirse con el cambio de color posterior a la reacción de la peroxidasa del conjugado con el sustrato AEC que se observó en las muestras y controles positivos.

Por otro lado, también existe la posibilidad de que el PCR fallara en la detección del virus debido a alteraciones en la hibridación específica de los cebadores con la secuencia para la cual fueron diseñados, por variaciones en la temperatura óptima de alineamiento (Singh y Kumar, 2001).

Sin embargo, las muestras positivas al DOT-ELISA y las muestras sospechosas en la inmunofluorescencia, sugieren una relación antigénica cruzada entre *Coronavirus* bovinos y humanos, ya que se utilizó un conjugado policlonal anti-*Coronavirus* bovino para la detección de un *Coronavirus* en humanos y posteriormente se obtuvo amplificación con el PCR consenso para el género de los *Coronavirus*. Esta relación ha sido previamente supuesto por Gerna (1981) y fue descrita por Zhang et al. (1994) con la cepa HECV-4408 aislada de un niño con diarrea.

Aunque un considerable número de las muestras resultaron positivas a la prueba inmunocromatográfica y el DOT- ELISA, sólo se obtuvo un producto de tamaño compatible con el esperado en 3 muestras de bovino y 2 de humano. Esta diferencia pudo deberse a disrupción del virion con consecuente degradación del ARN por la manipulación durante el procesamiento además a la presencia de ARNasas en las heces.

La degradación viral pudo afectar en alto grado la identificación molecular y aislamiento del *Coronavirus*, ya que éstos son virus envueltos y por lo tanto son más termolábiles. Por su parte, el *Rotavirus* es un virus desnudo, más resistente al almacenamiento y a variaciones en la temperatura. (Murphy et al., 1999).

En algunas muestras se observó productos de amplificación con tamaños distintos a los esperados. Bourdett (2003) reporta el mismo resultado y señala que podría ser producto de la degradación parcial del genoma por el origen fecal de la muestra, alteraciones posteriores a la extracción del ARN, presencia de inhibidores de la Taq polimerasa o por la alta variabilidad genética de una cepa (Singh y Kumar, 2001; Sarmiento et al.1999).

No obstante, si se comparan los dos controles positivos, se observa que la amplificación es muy específica en el ARN purificado de la cepa vacunal y con algunas bandas inespecíficas cuando se usa la cepa Smith proveniente de cultivo celular, como se muestra en la figura 5. Lo anterior podría sugerir que el método de extracción, así como la purificación del ARN *Coronavirus* influye altamente en la calidad y especificidad de la amplificación o que es necesaria mayor estandarización de las condiciones de termociclado.

En ésta investigación, la obtención de productos compatibles con amplificaciones parciales del gen de la polimerasa para el grupo II de los *Coronavirus* en muestras de humanos es un importante hallazgo en el monitoreo de *Coronavirus* emergentes, debido a la alta tasa de mutagénesis de algunos miembros de este linaje (Jackwood, 2006).

En el presente estudio la causa primaria de la consulta médica de ninguno de los pacientes humanos en los cuales se logró detectar amplicones para *Coronavirus* fue la sintomatología respiratoria, por los que estos datos no sugieren relación con otros *Coronavirus* respiratorios como el SARS-CoV o el HCoV-HKU1.

La historia clínica de uno de los pacientes sospechosos de infección por *Coronavirus* en el cual se constató una infección mixta con *Rotavirus*, indica la presencia previa de signos respiratorios asociados a un *Citomegalovirus*. Esto podría sugerir cierto grado de inmunosupresión o la presencia de un ambiente con un desafío viral importante, ya que las infecciones por Citomegalovirus tienden a ser asintomáticas.

Con respecto a los bovinos la presencia de signos respiratorios concomitantes con enfermedad gastroentérica es frecuente durante la recolección de las muestras para éste estudio (datos no mostrados). Esta observación es congruente con los recientes hallazgos de Park et al. (2007) en los que se ha demostrado que el *Coronavirus* causante de la disentería de invierno en bovinos (WD-BCoV) posee un doble tropismo e induce cambios patológicos en los tractos digestivos y respiratorios de terneros (Park et al. 2007).

No se determinó correlación geográfica entre los casos de bovino y niño que mostraron amplificación en el PCR de *Coronavirus*. De hecho, la gran mayoría de muestras de niño provinieron de distintos lugares del área metropolitana (principalmente San José), mientras que las muestras fecales de bovino provinieron casi en su totalidad de las zonas lecheras de Alajuela, donde se reportó alta prevalencia de diarreas.

Limitaciones relacionadas con el agotamiento de la muestra y de los reactivos imposibilitó la continuación de los estudios filogenéticos en las muestras que mostraron amplificación para los *Coronavirus*.

Por estas razones, en las muestras con amplificación positiva se intentó el aislamiento viral. Se observó formación de sincitios y desprendimiento celular, compatible con el efecto citopático esperado. Sin embargo, en la inmunofluorescencia tres muestras resultaron negativas y dos con luminiscencia muy baja. Al respecto, Saif et al., (1988) afirman que la mayoría de las cepas de campo de *Coronavirus* crecen poco en cultivo celular y no producen un efecto citopático claro hasta que se realizan varios pasajes, por lo tanto es probable que el virus no haya adaptado a cultivo celular o la luminiscencia observada puede ser poca o nula como se observó en la muestras evaluadas.

Existe evidencia reciente respecto a fallos en la detección de *Coronavirus* humanos utilizando los iniciadores utilizados diseñados por Stephensen (utilizados en éste estudio)

debido a algunas diferencias dentro de la secuencia, específicamente (Moës et al. 2005). Gerna et al. (2006) también reporta fallos similares y sugiere la utilización de cebadores específicos para cada cepa humana.

Para el estudio de *Rotavirus* en niños, se utilizaron las mismas 116 muestras fecales de niños que provinieron en su mayoría del HNN ubicado en el cantón central de San José. La zona de atracción de dicho centro hospitalario es el área metropolitana. Sin embargo, en 34% de las muestras la procedencia no pudo ser determinada lo cual afectó la verdadera correlación que se puede realizar entre casos positivos y origen geográfico.

La frecuencia de aparición reportada en el presente estudio para *Rotavirus* en heces de niños es de 32.7%, utilizando el RT-PCR. Este porcentaje es ligeramente mayor al 27.3 % reportado por Bourdett (2003) pero inferior al 60.3% reportado por Cruz (2005), ambos utilizando un DOT-ELISA.

En esta investigación se constató la disposición característica (4, 2, 3, 2) de los segmentos del ARN del *Rotavirus* grupo A utilizando el SDS-PAGE, ya que otros grupos de *Rotavirus* presentan una disposición distinta la cual esta determinada por la movilidad de los genes 10 y 11 (Espinoza et al.1997).

Se reporta la presencia del electroferotipo largo asociado con los genotipos G1, G3, G9, G10 y sus combinaciones con P[4] y P[8] . Esto concuerda con la literatura, pero existen algunos reportes en donde se asocia una variante del genotipo G10 asociado a un patrón corto.

Las dos muestras con patrón de migración corto pertenecen al genotipo G2 P[4] lo cual es similar con lo reportado por Page & Steele (2004) para esta misma combinación. No se puede correlacionar la presencia del patrón de migración corto con la procedencia ya que se desconoce el origen de las muestras con éste electroferotipo.

Dos muestras que se clasificaron como positivas en el SDS-PAGE y resultaron negativas al PCR, pudieron representar falsos positivos debido a contaminación entre muestras al colocarlas dentro del pocillo en el gel de electroforesis. Por otro lado, también existe la posibilidad de que la degradación de ARN viral y/o la presencia de inhibidores de enzimas en heces hayan limitado la detección a través del (RT)-PCR.

Se pueden observar variaciones epidemiológicas en los genotipos prevalentes en esta investigación y en estudios realizados por Bourdett (2003) y Cruz (2005). Anteriormente se reporta la presencia de G1 y G2, mientras que en la presente investigación se reportan además G3, G9 y G10.

En este estudio, se reporta la presencia del genotipo G10 por primera vez en el país y su asociación con diarrea en niños, además se describe la diseminación de este genotipo en al menos seis cantones del área metropolitana.

El G3 es uno de los genotipos de mayor frecuencia a nivel mundial, junto con G1, G2, y G4 (Rahman et al., 2003; Iturriza-Gómara et al. 2004), pero la combinación con G10 no había sido previamente descrito a nivel nacional.

Respecto al grupo P, en la presente investigación los genotipos P[8] y P[4] fueron encontrado en la gran mayoría de las muestras tipificables. Estos mismos serotipos fueron reportados en el país por Bourdett (2003) y Cruz (2005) reporta además el tipo P[6]. La combinación P[4]P[8] en una misma muestra no había sido reportada previamente.

De las combinaciones G y P totalmente tipificadas en éste estudio, G2P[4], G3P[8] son consideradas comunes (Laird et al., 2003). Las combinaciones G3P[4], G10P[8] son menos comunes y las infecciones mixtas G3+10 P[4], G1+10 P[8] y G1+10 P[8] no han sido reportadas previamente en el país. No se observa asociación entre la procedencia geográfica de las muestras y una combinación de genotipos específica.

En términos generales, en la historia clínica de algunos de los pacientes que padecieron gastroenteritis por las cepas descritas en éste estudio se reporta sintomatología similar a la literatura. La excepción se presentó en dos casos con la infección mixta (G3+G10) en los cuales se reportó una gastroenteritis severa, uno presentaba además los genotipos P[4+8].

Esto concuerda parcialmente con los datos reportados en estudio realizado en México donde se asoció la severidad de la diarrea a diferentes tipo P más que a diferentes tipos G (Mota-Hernández et al. 2003).

La variabilidad de los genotipos encontrados, puede deberse a que durante infecciones mixtas, los *Rotavirus* pueden reacomodar independientemente sus segmentos, lo cual puede producir diferentes tipos de combinaciones G y P (Iturriza-Gómara et al. 2004).

Se determinó un importante porcentaje de muestras no tipificables (NT) lo cual pudo ocurrir debido a la acumulación de mutaciones puntuales en las regiones específicas de genotipificación para VP7 y/o VP4, lo cual produce pérdida de la complementariedad con los cebadores y conlleva a fallos en la caracterización (Iturriza-Gómara et al., 2004)

En la presente investigación, inicialmente se utilizó el cebador G3 (aET3) pero presentó problemas de alta complementariedad con el genotipo G10, por lo que se utilizó el primer G3 propuesto por Iturriza-Gómara (2004). Al realizar este cambio se logró identificar los genotipos G3 verdaderos, los G10 y la combinación de ambos.

Es importante la comprobación de la inespecificidad de los cebadores ya que evita la sobreestimación de la prevalencia real de G3. Los fallos en la tipificación debido a variaciones naturales en los sitios de hibridación de los cebadores se han reportado previamente (Martella et al., 2004) y para evitarlos se ha sugerido la modificación constante de los juegos de iniciadores, cambio del sitio de hibridación de los mismos y la comparación directa de las secuencias (Martella et al., 2004).

El G10 ha sido frecuentemente detectado en bovinos y ocasionalmente en caballos, cerdos, ovejas y seres humanos. Santos et al. (1998) detectaron una variante con electroferotipo corto que sospechan podría ser exclusiva de humanos. Las mismas investigaciones sugieren que el genotipo G10 con patrón largo puede aparecer en humanos producto del reacomodo de genes con cepas de bovino (Santos et al. 1998).

Aunque los factores que promueven la transmisión entre humanos y animales son poco conocidos, se ha especulado que el contacto cercano entre niños y animales puede conllevar a infecciones entre especies o coinfecciones de *Rotavirus* de origen humano y animal resultando en reacomodo de genes entre cepas (Laird et al., 2003).

Además, el mejoramiento de las técnicas de caracterización molecular, ha permitido la determinación de otros genotipos como P[6], P[9], P[11], G5, G6, G8, G9 y G12, originalmente asociados a infecciones en animales han sido detectados en muestras de origen humano (Laird et al., 2003).

Estudios epidemiológicos en las décadas anteriores han tradicionalmente reconocido los genotipos G1, G2, G3, G4 en combinación con P[4] y P[8] como los tipos más frecuentes

asociados con diarrea y han sido utilizados como blancos para el desarrollo de las vacunas (Hoshino & Kapikian, 2000 ; Gentsch et al. 2005). Las vacunas Rotateq® (Merk) y Rotarix® (GlaxoSmithKline Biological) recientemente introducidas en el mercado nacional fueron diseñadas y evaluadas para proteger contra la gastroenteritis producida por éstos genotipos

La inmunidad primaria contra infecciones de campo es predominantemente específica de cada serotipo, por lo tanto, múltiples serotipos de *Rotavirus* significa múltiples oportunidades para la infección (Page & Steele. 2004).

La vacuna pentavalente Rotateq®, no incluye antígenos para el genotipo P[4], ampliamente reconocido como causante de gastroenteritis. Por otro lado, la efectividad de Rotarix® sustancialmente en serotipos que no comparten ningún antígeno de cápside con el virus vacunal como es el G2P[4] (Gentsch et al., 2005).

En éste contexto, la presencia de genotipos G2P[4], G10P[8], G3P[4], infecciones mixtas de G3+G10 P[4+8] y G1+10 P[8], constatados en éste estudio (21.6% de las muestras tipificadas) son de gran relevancia en el cuestionamiento de la efectividad y aplicabilidad en nuestro país de las vacunas disponibles en el mercado.

5 CONCLUSIONES

- La frecuencia de aparición *Coronavirus* entérico en muestras fecales de bovinos fue de 3.5 % con la prueba inmunocromatográfica y 2.6% con el PCR.
- La frecuencia de aparición *Coronavirus* entérico en muestra fecales de niños menores de 5 años fue de 20.6% en el DOT-ELISA y 1.7% en el PCR.
- Las técnicas utilizadas en éste estudio sugieren la relación antigénica entre *Coronavirus* entéricos bovinos y humanos al utilizar conjugados anti-BCV en el DOT-ELISA y la inmunofluorescencia para la detección de *Coronavirus* humano.
- Se obtuvo amplificaron de cuatro muestras con el juego de iniciadores para el grupo II de los *Coronavirus* y una muestra de origen bovino amplificó con los iniciadores para los grupos I, II y III.
- La frecuencia de aparición de *Rotavirus* en niños menores de 5 años fue de 34.4% con la técnica SDS-PAGE y 32.7% con el PCR.
- El 95% de las muestras en las cuales se determinó el electroferotipo, presentaron el patrón de migración largo, el restante 5% presentó el patrón corto.
- Se observó variaciones en los electroferotipos encontrados en el país respecto a estudios anteriores, pues se reporta la circulación del patrón de migración corto en dos muestras asociados al genotipo G2 P[4].
- Se observan variaciones en los genotipos G circulantes durante el actual periodo (G1,G2, G3,G9,G10) y años anteriores (G1,G2,G3) y además existen variaciones respecto al genotipo G encontrado con mayor frecuencia.
- Se constató la presencia 34% de muestras no tipificables y se reporta por primera vez en el país, la presencia de los genotipos G10P[8], infecciones mixtas de G3+G10 P[4+8] y G3+G10 P[8].
- Se comprobó la presencia de los genotipos P[4] y P[8] distribuidos por distintos cantones del país y por primera vez la combinación de ambos en una infección mixta.
- El presente estudio reportó la circulación de cepas que no comparten o comparten parcialmente los antígenos de cápside con alguna de las cepas vacunales lo que permite

el cuestionamiento de la efectividad y aplicabilidad en nuestro país de las vacunas disponibles.

6 RECOMENDACIONES

- Se recomienda la optimización de las condiciones de preservación de las muestras, de los protocolos de extracción y purificación del ARN viral y los protocolos de amplificación para la detección de *Coronavirus* a partir de heces.
- Se recomienda además, ampliar el área de recolección, el número de muestras de heces de niños y uniformar la distribución de muestras por lugar geográfico para lograr una mayor representatividad del panorama epidemiológico a nivel nacional.
- Realizar futuros estudios que involucren la utilización de nuevas secuencias o diseños de iniciadores, así como protocolos mejorados de (RT)-PCR para poder detectar variaciones en los *Coronavirus* y nuevas cepas circulantes de *Rotavirus*.
- Realizar estudios futuros en el país para asociar los serotipos de *Rotavirus* infectantes con los niveles de severidad de la gastroenteritis (incluir la frecuencia de episodios diarreicos, vómito, grado de deshidratación, etc).
- Se recomienda la secuenciación y análisis filogenéticos de las muestras de *Rotavirus* no tipificables encontradas en la presente investigación.
- Se requieren realizar más investigaciones en el país donde se evalúe la verdadera efectividad de la vacuna contra las cepas de campo circulantes.
- Realizar análisis filogenéticos de las cepas virales identificadas.
- Analizar cepas virales de distintas especies para obtener un panorama más claro de los fenómenos de transmisión.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amarilla, A., N. Fariña, G. Russomando & G.I Parra. 2005. Electroferotipos cortos de *Rotavirus* detectados en adultos con diarrea en Paraguay. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, 3: 47-50.
- Bourdett, L. 2003. Determinación de la presencia de *Rotavirus*, *Coronavirus* y *Torovirus* humano en heces de niños con diarrea atendidos en el hospital Dr. Carlos Sáenz Herrera (Hospital Nacional de Niños). Tesis de Maestría, Universidad Nacional, Heredia, C.R.
- Buesa, J., P. López & J. Rodríguez. 2002. Diagnóstico de las infecciones víricas gastrointestinales. [en línea]. s.n. España. http://www.seimc.org/control/revi_viro/rotavir.htm (Consulta: 2 dic., 2006)
- Candy D.C.A. 2007. *Rotavirus*: a systemic illness. Plos Med. 4:117.
- Cantero, M. 2007. Vacuna contra diarrea llega a Costa Rica. La Nación. 22 oct., pp.. 8A.
- Cantero, M. 2007. Vacuna para evitar diarreas en niños llegó al país. La Nación. 14 feb., pp.. 11A.
- Cruz, M. 2005. Identificación y caracterización molecular de cepas de rotavirus en niños y animales domésticos (cerdos, perros). Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional, Heredia, C.R.
- Cheng, V. C. C., I. F. N. Hung, B. S. F. Tang, C. M. Chu, M. M. L. Wong, K. H. Chan, A. K. L. Wu, D. M. W. Tse, K. S. Chan, B. J. Zheng, J. S. M. Peiris, J. J. Y. Sung, & K. Y. Yuen. 2004. Viral replication in the nasopharynx is associated with diarrhea in patients with severe acute respiratory syndrome. Clin. Infect. Dis. 38:467–475.
- Coris Bioconcept. 2005. QuatroVet Unit Strip Kit. Corisbio, Bélgica.
- Christensen, M. 1989. Human viral gastroenteritis. Clin. Microbiol. Rev. 2: 51-89.
- Drosten, C., S. Günther, W. Preiser, S. van der Werf, H. Reinhard, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolesnikova, R. Fouchier, A. Berger, A.M. Burguière, J. Cinatl, M. Eickmann, N. Escriou, K. Grywna, S. Kramme, J.C. Manuguerra, S. Müller, V. Rickerts, M. Stürmer, S. Vieth, H. Klenk, A. Osterhaus, H. Schmitz & H.W. Doerr.

2003. Identification of a novel *Coronavirus* in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348: 1967- 1976.
- Espinoza, F., M. Panigua, H. Hallander, L. Svensson & O. Strannegard. 1997. *Rotavirus* infections in young Nicaraguan children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16: 564-571.
- Fouchier, R, N.G. Hartwig, T.M. Bestebroer, B. Niemeyer, J.C. de Jong, J.H. Simon & A. D. M. E. Osterhaus. 2004. A previously undescribed *Coronavirus* associated with respiratory disease in humans. *PNAS* 101: 6212–6216
- Gentsch, J.R, R.I Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B.K Das & M.K. Bhan. 1992. Identification of group A *Rotavirus* gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:1365 – 1373.
- Gentsch, J. R., A.R. Laird, B. Bielfelt, D.D. Griffin, K. Banyai, M. Ramachandran, V. Jain, N.A. Cunliffe, O. Nakagomi, C.D. Kirkwood, T. K. Fischer, U.D. Parashar, J. S. Bresee, B. Jiang & R.I. Glass. 2005. Serotype diversity and reassortment between human and animal *Rotavirus* strains: implications for *Rotavirus* vaccine programs. *J. Infect. Dis* 192: 146-159.
- Gerna, G., P.M. Cereda, M.G. Revello, E. Cattaneo, M. Battaglia & M.T Gerna. 1981. Antigenic and biological relationships between human *Coronavirus* OC43 and neonatal calf diarrhoea *Coronavirus*. *J.Gen. Virol.* 54: 91-102.
- Gerna, G., G. Campanini, F. Rovida, E. Percivalle, A. Sarasini, A. Marchi & F. Baldanti 2006. Genetic variability of human *Coronavirus* OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients. *J. Med. Virol.* 78:938-949
- Glass, R. I. 2006. New hope for defeating *Rotavirus* [en línea]. *Scientific American*, EE.UU. <http://www.sciam.com>. (Consulta: 22 ago. 2007).
- González, P., A. Sánchez, P. Rivera & C. Jiménez. 1997. *Rotavirus* and *Coronavirus* outbreak: etiology of annual diarrhea in Costa Rica children. *Rev. Biol. Trop.* 45: 989-991.
- Gouvea, V., R.I. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H.F. Clark, B. Forrester & Z.Y Fang .1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of *Rotavirus* nucleic acids from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28:276 – 282.

- Guy, J. S., J. Breslin, B. Bresuhaus, S. Vivrette, & L. G. Smith. 2000. Characterization of a *Coronavirus* isolated from a diarrheic foal. *J. Clin. Microbiol.* 8: 4523 -4526.
- Han M. G, D.S Cheon, X. Zhang & L. J. Saif. 2006. Cross-Protection against a human enteric *Coronavirus* and a virulent bovine enteric *Coronavirus* in gnotobiotic calves . *J.Virol.* 80:12350–12356.
- Hernández, F. 2002. Una visión de la biología tropical a través del microscopio electrónico. *Rev. Biol. Trop.* 50: 927-940.
- Hoet, A. & L. Buscan, L. 2002 Complejo diarreico bovino. [en línea]. s.n, Ven. <http://www.geocities.com/asoevefas/Complejo-diarreico.doc> (Consulta 31 oct., 2006).
- Holmes, K. 2003. *Coronavirus* biology and pathogenesis [en línea]s.n, Coló., EE.UU. http://www.niaid.nih.gov/SARS/meetings/05_30_03/PDF/holmes.pdf (Consulta: 29 ene., 2007).
- Hoshino, Y., A.Z. Kapikian. 2000. *Rotavirus* serotypes: classification and importance in *Rotavirus* epidemiology, immunology and vaccine development. *J. Health. Popul. Nutr.* 18: 5-14.
- INVITROGEN. 2007. Product information TRIZOL reagent [en línea]. s.n, C.R <http://www.invitrogen.com:80/content/sfs/manual/15596026.pdf>. (Consulta 1 nov, 2006)
- Iturriza- Gómara, M., Cubitt D., Desselberger U. & Gray J. 2001. Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 Rotavirus strains associated with failure to serotype. *J. Clin. Microbiol.* 39:3796–3798.
- Iturriza-Gómara, M., G. Kang & J. Gray. 2004. *Rotavirus* genotyping: keeping up with an evolving population of human *Rotaviruses*. *J. Clin.Virol.* 31: 259-265.
- Jackwood. M. 2006.The Relationship of severe acute respiratory syndrome *Coronavirus* with avian and other *Coronaviruses* . *Avian Dis.* 50:315–320.
- Jiménez, C. 1990. Vergleichende labordiagnostische Untersuchungen von Kotproben (EM, virusisolierung, immunologische Verfahren) zum Nachweis einer Bovine *Coronavirus*-Infektion bei durchfallkranken Kälbern. *Vet. Med. Diss.*170.
- Jiménez, C., G Dolz, M. Caballero, J. Prendas, & G. Hernández. 1993. Aislamiento de *Coronavirus* Bovino y *Salmonella spp.* en un brote de diarrea epizootica en bovinos

- adultos en Costa Rica. pp. 29-32. *In IX Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica.* San José, C. R.
- King, B. & D.A. Brian. 1982. Bovine *Coronavirus* structural proteins. *J.Virol.* 42: 700-707.
- Laird, A.R., V. Ibarra, G.Ruiz, M.L Guerrero, R.I Glass & J.R Gentsch. 2003. Unexpected detection of animal VP7 genes among common *Rotavirus* by multiplex capture and type specific primer extention. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4400-4403.
- Lau, S., P.Y. Woo, K.S. M. Li, Y. Huang, H-W Tsoi, B.H. L. Wong, S. S. Y. Wong, S-Y Leung, K-H Chan & K-Y Yuen. 2005. Severe acute respiratory syndrome *Coronavirus*-like virus in Chinese horseshoe bats. *PNAS*, 102: 14040 -14045
- Lihong, L., S. Hägglund, M. Hakhverdyan, S. Alenius, L.E. Larsen, & S. Belák. 2006. Molecular epidemiology of bovine *Coronavirus* on the basis of comparative analyses of the S gene. *J. Clin. Microbiol.* 44: 957 – 960.
- Majhdi F., H. C. Minocha, & S. Kapil. 1997. Isolation and characterization of a *Coronavirus* from elk calves with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2937–2942.
- Martella, V, V. Terio, S. Arista, G. Elia, M. Corrente, A.Madio, A. Pratelli, M. Tempesta, A.Cirani & C. Buonavoglia. 2004. Nucleotide variation in the VP7 gene affects PCR genotyping of G9 *Rotaviruses* identified in Italy. *J. Med. Virol.* 72:143-148.
- Martínez, A.O. 2001. Variabilidad genética de las glicoproteínas hemaglutinina-esterasa (HE) y de la espícula (S) de cepas de *Coronavirus* Bovino aisladas en Costa Rica. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica, San José, C.R.
- Maunula, L. & C.H von Bonsdorff. 2002. Frequent resorment may explain the genetic heterogeneity of *Rotaviruses*: analysis of finnish *Rotavirus* strains. *J.Virol.* 76:11793-11800.
- McArthur, D. 1997. Bovine *Coronavirus* Infection [en línea]: clinical syndromes in adult cattle and calves. n.s, EE.UU. <http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1997/spring/bcis.html> (Consulta 31 oct., 2006).
- Mota-Hernández, F., J.J Calva, C. Gutiérrez-Camacho, S. Villa-Contreras, C.F Arias, L. Padilla-Noriega, H. Guiscafré-Gallardo, M.L Guerrero, S. López, O. Muñoz, J.F

- Contreras, R. Cedillo, I. Herrera & F. Puerto. 2003 .Rotavirus diarrhea severity is related to the VP4 type in mexican children. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3158-3162.
- Murphy, F., E.P.J Gibbs, M. Horzinek & M. Studdert. 1999. *Veterinary Virology* . 3 era. Ed. Academic Press, EE.UU.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1998. Medical education [en línea]: teaching medical students about diarrheal diseases. Organización Mundial de la Salud, EE.UU.http://www.who.int/child-adolescent-health/New_Publications/CHILD_HEALTH/Meded/medperf.htm (Consulta: 29 ene., 2007).
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2007. Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus: guía práctica. (Publicación Científica y Técnica No. 623).
- Oviedo, M T. 1987. Detección de agentes bacterianos, parasitarios y virales involucrados en la etiología de la diarrea de los terneros. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional, Heredia, C.R.
- Page N.A. & A.D. Steele. 2004. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 *Rotavirus* strains from African continent. *J. Clin. Microbiol.* 42: 595-600.
- Park S.J., G.Y. Kim, H.E. Choy, Y.J Hong, L.J Saif, J.H Jeong, S.I Park, H.H Kim, S.K Kim, S.S Shin, M.I Kang & K.O Cho. 2007. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine *Coronavirus* in calves. *Arch. Virol.* 152:1885-900.
- Parra, G. & E. Espinola. 2006. Nucleotide mismatches between the VP7 gene and the primer are associated with genotyping failure of a specific lineage from G1 *Rotavirus* strains. *Vir. J.*3:35.
- Parashar, U.D., J.S. Bresee, J.R. Gentsch & R.I Glass. 1998 .Synopsis: *Rotavirus*. *Emerg. Infec. diss.* 4: 561-570.
- Pérez, E., A. Kummeling, M.M.H. Janssen, C. Jiménez, R. Alvarado, M. Caballero, P. Donado & R.H. Dwinger. 1998. Infectious agents associated with diarrhea of calves in the canton of Tilarán, Costa Rica. *Prev. Vet. Med.* 33: 195-205.
- Pérez, I., R. Gonzáles, B. Salinas, M. Villaroel, M. Tomat & J.P Yarzabal. 2003. *Rotavirus: control y vacunas* [en línea]. <http://caibco.vcv.ve/caibco/CAIBCO/vitaeQuince/articulos/Virologia/ArchivosHTML/introduccion> (Consulta 17 jun. 2007)

- Rahman, M., K. de Leener, T. Goegebuer, E. Wollants, I. Vander Donck, L. Van Hoovels & M. Van Ranst. 2003. Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] *Rotavirus*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2088-2095.
- Ruiz-Palacios, G., I. Pérez-Schael, R. Velázquez, H. Abate, T. Breuer, S. Costa, B. Cheuvart, F. Espinoza, P. Gillard, B. Innis, Y. Cervantes, A. Linhares, P. López, M. Macías-Parra, E. Ortega-Barría, V. Richardson, D. Rivera-Medina, L. Rivera, B. Salinas, N. Pavía-Ruz, J. Salmerón, R. Rüttimann, J.C. Tinoco, P. Rubio, E. Nuñez, M. L. Guerrero, J.P. Yarzabal, S. Damaso, N. Tornieporth, X. Sáez-Llorens, R. Vergara, T. Vesikari, A. Bouckenooghe, R. Clemens, B. de Vos & M. O’Ryan. 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe *Rotavirus* gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 354: 11-22.
- Saif, L., R. Heckert, K. Miller, & M. Tarek. 1988. Cell culture propagation of bovine *Coronavirus*. *Methods in cell science.* 11: 139-145.
- Sambrook, J., E. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Sarmiento, L., P. Más Lago, I. Ávalos, R. Palomera, J. Barrios & M. Bello. 1999. Valoración de una novedosa tecnología para la detección de enterovirus en aguas negras. *Rev Cubana Med Trop.* 51:166-171.
- Singh, V & A. Kumar. 2001. PCR primer design. *Mol. Biol. Today.* 2: 27-32.
- Simhon, A., S. Amato, F. Hernández, R. Yolken & I. Mata. 1979. Diagnóstico de *Rotavirus* por microscopía electrónica y el ensayo enzimático enzima conjugada (ELISA). *Biol. Sanit. Panam.* 86: 391-397.
- Stephensen, C.B., D.B. Casebolt, & N. N Gangopadhyay. 1999. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 *Coronaviruses* and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res.* 60: 181–189.
- Svensson, L.I. Uhnoo, M. Grandien, & G. Wadell. 1986. Molecular epidemiology of *Rotavirus* infections in Uppsala, Sweden, 1981: disappearance of a predominant electropherotype. *J. Med. Virol.* 18: 101-111.

- Thrusfield, M., C. Ortega, I. de Blas, J.P. Noordhuizen, K. Frankena. 2001. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148: 567-572.
- Valero, N., Y. Larreal, J. Mosquera, & E. Rincón. 2005. Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS): lecciones y retos. *Invest. clín.* 46:75-95.
- Vesikari, T., D.O. Matson, P. Dennehy, P. Van Damme, M. Santosham, Z. Rodriguez, M.J. Dallas, J.F. Heyse, M.G. Goveia, S.B. Black, H.R. Shinefield, C.D.C. Christie, S. Ylitalo, R.F. Itzler, M.L. Coia, M.T. Onorato, B. Adeyi, G.S. Marshall, L. Gothefors, D. Campens, A. Karvonen, J.P. Watt, K.L. O'Brien, M.J. DiNubile, M.D., H. Fred Clark, J.W. Boslego, P.A. Offit, & P.M. Heaton. 2006. Safety and efficacy of a pentavalent human–bovine (WC3) reassortant *Rotavirus* vaccine. *N. Engl. J. Med.* 354: 23-33.
- Voller, A. & D. Bridwell. 1986. Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay. pp 99-109 In *Manual of clinical laboratory immunology*. American Society for Microbiology, E.E.U.U.
- Weiss, S. & S. Navas-Martin. 2005. *Coronavirus* pathogenesis and the emerging pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome *Coronavirus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:635–664.
- Wilhelmi de Cal, I. 2001. Gastroenteritis aguda en niños del área sanitaria IX de Madrid: [en línea] Análisis microbiológico, clínico y epidemiológico de la patología asociada al virus. s.n, España. <http://www.ucm.es/BUCM/tesis/med/ucm-t25538.pdf> (Consulta: 10 oct., 2006).
- Zhang X. M., W. Herbst, K. G. Kousoulas & J. Storz. 1994. Biological and genetic characterization of a hemagglutinating *Coronavirus* isolated from a diarrhoeic child. *J. Clin. Virol.* 44: 152-161.

Anexo 2. Secuencia y producto esperado para los primers de genotipificación y consenso G y P.

<i>Gen</i>	<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Amplicón (pb)</i>	<i>Referencia</i>
VP7 Consenso	VP7-R Antisentido	AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC	881	Iturriza-Gómara et al., 2001
	VP7-F Sentido	ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC		Iturriza-Gómara et al., 2001
VP7 Genotipifi cación	G1	CAA GTA CTC AAA TGA ATG G	618	Gouvea et al., 1990
	G2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	521	Gouvea et al., 1990
	G3	ACG AAC TCA ACA CGA GAG G	682	Iturriza-Gómara et al., 2004
	G3(aET-3)	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG	243	Gouvea et al., 1990
	G8	GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG	754	Gouvea et al., 1990
	G9	CTT GAT GTG ACT AY*A AAT AC	179	Iturriza-Gómara et al., 2004
	G10	ATG TCA GAC TAC AR*A TAC TGG	266	Iturriza-Gómara et al., 2004
VP4 Consenso	Con2 Antisentido	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	870	Gentsch et al. (1992)
	Con3 Sentido	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A		Gentsch et al. (1992)
VP4 genotipifi cación	P4	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	483	Gentsch et al. (1992)
	P6	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	267	Gentsch et al. (1992)
	P8	TCT ACT TGG GAT A AC GTG C	345	Gentsch et al. (1992)
	P9	TGA GAC ATG CAATTGGAC	391	Gentsch et al. (1992)
	P10	ATC ATA GTT AGT AGT CGG	583	Gentsch et al. (1992)
	P11	GTA AAC ATC CAG AAT GTG	312	Iturriza-Gómara et al., 2004

Y= C o T R= A o G N= A, G, T o C