



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSTGRADO

DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE SAPOVIRUS EN NIÑOS CON GASTROENTERITIS AGUDA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

SÁNCHEZ GARCÍA GERARDO JUNIOR

LIMA – PERÚ

2017

Asesor:

PhD Holger Mayta Malpartida

DEDICATORIA

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser parte muy importante apoyo de mi camino.

Al Dr. Holger Mayta por su apoyo en mi desarrollo profesional.

A todos mis compañeros del laboratorio donde también encontré buenos amigos, por ser parte del día a día, compartiendo momentos de mutuo aprendizaje.

A la Dra. Manuela Verástegui por ser quien me ayudo a iniciarme en la investigación recibíendome en los Laboratorios de Investigación en Enfermedades Infecciosas.

Al Dr. Gilman, por su constante apoyo y comprensión, así como por su ejemplo de una vida en investigación.

RESUMEN

Sapovirus, miembro de la familia Caliciviridae, es un agente emergente de gastroenteritis aguda que afecta principalmente a niños menores de 5 años. Se conoce muy poco sobre la epidemiología de este virus en nuestro país. Este trabajo es el primero en estudiar Sapovirus en una población de niños menores de cinco años con gastroenteritis aguda quienes requirieron de atención médica. Un total de 622 muestras de hisopados rectales fueron recolectados, 490 “casos” (niños con diarrea o vómitos que acudieron a la Unidad de Rehidratación Oral-URO) y 132 “controles” (niños sin diarrea ni vómitos que acudieron a otros servicios médicos), todas las muestras fueron recolectadas en el Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN) en Lima, Perú. El RNA fue extraído empleando QIAamp® Viral RNA Mini kit y el cDNA sintetizado con Superscript III kit . La detección de Sapovirus se realizó mediante la prueba de PCR en tiempo real que amplifica una región del gen que codifica la proteína viral VP1. Las muestras positivas fueron posteriormente amplificadas mediante la prueba de PCR convencional y el producto de amplificación fue secuenciado con fines de genotipificación. De los 490 casos, 48 (9,80%) resultaron positivas a Sapovirus mediante la prueba de PCR de tiempo real; 44 de estas muestras pudieron ser tipificadas mediante secuenciamiento. De las 44 muestras genotipificadas, 18 fueron clasificadas como SaV - GI, 18 como SaV - GII, 6 como SaV GIV y 2 como SaV - GV. Los resultados del presente estudio sugieren que Sapovirus es un agente etiológico importante de diarrea en niños menores de 5 años.

Palabras clave: Sapovirus, gastroenteritis aguda, epidemiología, virus.

ABSTRACT

Sapovirus, a member of the Caliciviridae family, is an important cause of acute gastroenteritis in children under five. Little is known about the epidemiology of this virus in Peru. This work is the first study of Sapovirus on a population of children under 5 with acute gastroenteritis that needed a medical attention. A total of 622 rectal swabs, obtained from 490 “cases” (children with diarrhea or vomits attending the Oral Rehydration Unit) and 132 “control” (from children without diarrhea or vomits attending other services of the Child Health Institute in Lima, Peru). RNA was extracted from stool samples using the QIAamp® Viral RNA Mini kit (QIAGEN) and converted to cDNA using SuperScript III kit (Invitrogen). A real time PCR targeting a region from VP1 gene was used to detect Sapovirus. All positive samples were further amplified by conventional PCR and sequenced for genotyping. From 490 cases, a total of 48 (9,80%) samples tested positive for Sapovirus. Only 44 samples, out of the 48 were successfully sequenced. Eighteen samples were identified as genogroup GI, 18 as genogroup GII, 6 as genogroup GIV and 2 as genogroup GV. Sapovirus seems to be an important etiological agent of acute gastroenteritis in children under five.

Keywords: Sapovirus, acute gastroenteritis, epidemiology, virus.

TABLA DE CONTENIDOS

<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
CAPÍTULO I.....	2
MARCO TEÓRICO	2
1.1. <i>Sapovirus</i>	2
1.2 <i>Detección</i>	3
1.3. <i>Clasificación de Sapovirus</i>	4
1.4. <i>Transmisión</i>	5
1.5. <i>Epidemiología</i>	5
1.6 <i>Generalidades del análisis Filogenético</i>	6
CAPÍTULO II	8
<i>Planteamiento de la Investigación</i>	8
2.1.- <i>Planteamiento del problema</i>	8
2.2.- <i>Justificación e importancia del estudio</i>	9
OBJETIVOS	11
CAPÍTULO III	12
MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. <i>Diseño del estudio</i>	12
3.2. <i>Población de estudio</i>	12
3.3. <i>Análisis de severidad</i>	14

3.4 Muestras	14
3.5 Extracción de RNA	15
3.6 Síntesis de cDNA	15
3.7 Prueba de cuantitativa en tiempo real	16
3.8 Prueba de PCR convencional tipo anidada	16
3.9 Determinación de la carga viral	17
3.10 Límite de cuantificación, límite de detección y expresión de resultados....	18
3.11 Detección de otros virus mediante PCR en tiempo real.....	18
3.12 Análisis de secuencias y análisis filogenético.....	18
3.13 Análisis estadístico.....	19
3.14 Consideraciones éticas	20
CAPÍTULO IV	21
RESULTADOS	21
4.1. Población de estudio	21
4.2. Prueba de RT-qPCR para Sapovirus	21
4.2.1. Rango dinámico, repetibilidad y reproducibilidad de la prueba.	21
4.2.2. Detección mediante PCR en tiempo Real	22
4.2.3. Genotipificación basada en Análisis de Secuencias.....	23
4.2.4 Correlación entre cuadro clínico y Sapovirus	24
4.2.5. Análisis de Secuencias y análisis Filogenético	24
CAPITULO V	26
<i>Discusión</i>	26

<i>Conclusiones</i>	31
<i>Recomendaciones</i>	32
<i>Limitaciones del estudio</i>	33
LISTA DE TABLAS	34
LISTA DE FIGURAS	34
LISTA DE ABREVIATURAS	52
<i>Figuras</i>	36
<i>Tablas</i>	45
<i>Referencias bibliográficas</i>	52
<i>Anexos</i>	65

INTRODUCCIÓN

Sapovirus es un virus de cadena simple de RNA de sentido positivo, perteneciente a la familia Caliciviridae (Cartsens, 2010). Sapovirus es una de las causas principales de gastroenteritis en niños menores de 5 años, aunque existen reportes de brotes por este virus que afectaron a poblaciones adultas, por ejemplo a profesores en un colegio en Estados Unidos (Noel *et al*, 1997) y a pacientes y personal médico de un hospital en Suecia (Johansson *et al.*, 2005).

Sapovirus tiene una distribución mundial afectando a poblaciones tanto de países en vías de desarrollo y como de países desarrollados. La mayor parte de los estudios se han realizado en Asia, donde se reportan prevalencias de 4 - 18%. En Sudamérica se ha estudiado Sapovirus en Brasil, prevalencia 4.6% (Mendanha de Oliveira, 2012), Venezuela, 11% (Bucardó *et al*, 2012) y Argentina con una prevalencia de 2% (Martinez *et al*, 2002; Gomes *et al*, 2007). En el Perú sólo existe un trabajo que utilizó un subgrupo de muestras de una cohorte de recién nacidos de una comunidad de San Juan de Miraflores, Lima, en el que se halló una prevalencia de 9%, sin embargo este estudio contiene muestras recolectadas del domicilio de niños de una misma comunidad, y ninguno de ellos requirió atención médica (Liu *et al*, 2015).

El presente estudio tuvo como objetivo detectar y caracterizar Sapovirus, mediante PCR y secuenciamiento, presentes en muestras de hisopados rectales de niños menores de cinco años con gastroenteritis aguda que requirieron de atención médica y acudieron a la URO del INSN de la ciudad de Lima, comparado a Sapovirus presente en niños sin gastroenteritis aguda que acudieron a otros servicios del mismo Instituto.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Sapovirus

Sapovirus es un virus RNA de cadena simple de sentido positivo, perteneciente a la familia Caliciviridae. Esta familia está constituida de cinco Géneros: Sapovirus, Norovirus, Lagovirus, Vesivirus y Nebovirus (Cartsens, 2010), de los cuales Norovirus y Sapovirus afectan a humanos.

El genoma de Sapovirus tiene aproximadamente 7.3-7.5 kb y presenta 2 o 3 marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en inglés), el ORF 1 codifica una poliproteína que contiene las proteínas no estructurales: NS1, NS2, NS 3, NS 4, NS 5, NS 6-7 (Oka *et al*, 2005) (Figura 1) además de la proteína mayor de la cápside, VP1, el ORF 2 codifica la proteína menor de la cápside, VP2, el ORF 3 está presente en algunas cepas humanas y de murciélagos, sin embargo su función aún es desconocida (Farkas *et al*, 2004). Sapovirus está dividido en siete genogrupos, tres que afectan a animales (GIII, GVI y GVII) y cuatro que afectan a Humanos (GI, GII, GIV and GV). Los genogrupos GI y GII esta subdivididos en 7 genotipos, mientras que los genotipos GIV y GV presentan un único genotipo cada uno.

1.2 Detección

Sapovirus fue detectado por primera vez utilizando microscopia electrónica, en un brote que afectó a infantes de 2 a 20 meses de edad (Chiba *et al*, 1979) y sigue siendo la prueba de oro (“gold standard”) para el diagnóstico de sapovirus, sin embargo debido a que se trata de una técnica tediosa y que necesita además de un personal técnico especializado, distintos grupos desarrollaron diversos ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA para evaluar anticuerpos contra Sapovirus (Nakata *et al*, 1983), empleando anti-sueros hiperinmunes de ratón o cobayo desarrollados contra Partículas Parecidas a Virus (VLP por sus siglas en inglés) los cuales fueron expresados en un sistema de Baculovirus. Estas pruebas de ELISA alcanzan un 100% de especificidad pero solo un 25-60% de sensibilidad (Hansman *et al*, 2005-2006). De forma similar se han desarrollado anticuerpos monoclonales para diferentes genotipos de Sapovirus (Kitamoto *et al*, 2012).

Después de la introducción de las técnicas moleculares, el método más usado para la detección de Sapovirus es la prueba de PCR que sigue a una transcripción reversa inicial (RT-PCR) que permite además el análisis genético y la tipificación de estos virus. La detección se basa en el uso de cebadores dirigidos a amplificar diversas regiones del genoma del virus, principalmente las regiones que codifican para la polimerasa, la cápside, la región de unión entre el gen de la polimerasa y el gen de la cápside (Hansman, 2004; Vinje, 2000; Okada, 2002, 2006). De estos juegos de

cebadores, los diseñados por Okada, presentan la ventaja de detectar y genotipificar Sapovirus utilizando PCR convencional tipo anidado y multiplex respectivamente.

Además de la simple detección, la cuantificación de la carga viral es un aspecto importante para entender aspectos clínicos de la infección por este virus, más aun cuando no se dispone de ninguna forma de cultivar Sapovirus. Se han desarrollado diferentes pruebas de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) usando sondas de hidrólisis y cebadores para una región del gen de la cápside altamente conservada (Oka, 2006) así como para una región conservada del gen de la RNA polimerasa (Gunson *et al*, 2006). Igualmente se han diseñado pruebas de PCR de tiempo real para la detección simultánea de virus como Adenovirus, Rotavirus, Astrovirus, y Sapovirus (Maarseveen *et al*, 2010).

1.3. Clasificación de Sapovirus

La Clasificación de Sapovirus ha cambiado desde su primer reporte en 1977. Los Virus Tipo Norwalk (NLVs por sus siglas en inglés) y los Virus Tipo Sapporo (SLVs por sus siglas en inglés) eran considerados simplemente como genogrupos I y II (NLVs) y III (SLVs) de los Calicivirius Humanos (Vinjé, 2000). Luego, debido a las marcadas diferencias epidemiológicas y genéticas, así como la creciente detección de nuevos genotipos para NLVs y SLVs obligó a los especialistas a cambiar la clasificación en el año 2001, esta clasificación utilizó 11 secuencias disponibles de SLVs y se demostró que se podría realizar una clasificación uniforme en función de la secuencia entera del gen de la cápside, organizándose así en 3 genogrupos y 5 subgrupos (Schuffenecker, 2001).

La clasificación aceptada más reciente de Sapovirus se basa en 106 secuencias completas del gen de la cápside, la cual tiene 1700 nt aproximadamente, estableciéndose 5 genogrupos GI, GII, GIII, GIV, and GV, clasificando a su vez a los genogrupos humanos, GI y GII en siete genotipos y GIV y GV en 1 genotipo (Oka *et al*, 2012).

1.4. Transmisión

Sapovirus se transmite principalmente vía fecal-oral, además posiblemente a través de alimentos contaminados y a través de contacto entre personas. Cuando alcanzan los cuerpos de agua, los animales filtradores como diferentes especies de almejas y mariscos son reservorio de Sapovirus (Hansman, 2007; Izuka, 2010). Sin embargo la información sobre la presencia de Sapovirus en almejas y mariscos es limitada. Al igual que Norovirus, el mecanismo de infección no está esclarecido y se investiga el rol de algunas proteínas estructurales y no estructurales determinantes moleculares que facilitarían la infección (Karst, 2010).

1.5. Epidemiología

Además de Rotavirus, el agente viral más común causante de gastroenteritis, Norovirus y Sapovirus son considerados también como enteropatógenos de gran importancia a nivel mundial, sobre todo en la población de niños menores de cinco años. En años recientes, los Calicivirus Humanos (HuCVs) han emergido como un agente etiológico importante en los casos de diarreas esporádicas y epidémicas en todos los grupos etarios (Dove *et al.*, 2005).

Sapovirus está distribuido mundialmente, la prevalencia de los anticuerpos contra Sapovirus varía entre un 70 y 100% en adultos de Japón, Canadá, Estados Unidos, China, Singapur, Indonesia, y Papua Nueva Guinea (Soli, 2014). La adquisición de estos anticuerpos empieza a temprana edad; por ejemplo, en Kenia los anticuerpos fueron detectados en niños de 1 y 2 años (Green, 2006). Los brotes por Sapovirus son comunes en guarderías, colegios, casas de asilo para ancianos y en reclutas militares, siendo seropositivos para los cuatro genogrupos (Phan *et al*, 2004).

Los genogrupos predominantes son GI y GII, con un 95% en Japón (Okada *et al.*, 2006) y un 85% de GI.1 y GII.1 en el Reino Unido en los años de 1984-2004 (Martinez *et al.*, 2002). También son comunes las infecciones mixtas de Sapovirus con Astrovirus y Norovirus en niños con gastroenteritis aguda en diverso países (Vasickova *et al.*, 2005).

Los estudios en Sapovirus no están tan avanzados como en Norovirus, posiblemente debido a que se ha reportado que los síntomas tienen una menor intensidad comparada con norovirus y que son pocos los laboratorios que estudian este virus.

1.6 Generalidades del análisis Filogenético

El análisis filogenético trata de encontrar la relación evolutiva entre especies, puede realizarse basándose en características morfológicas como en sus inicios (Linneaus, 1758). Todos los organismos han evolucionado de un ancestro común y todos los organismos están sujetos a mutaciones en la secuencia de nucleótidos

(sustituciones, inserciones y deleciones), las cuales son utilizadas para inferir relaciones entre genes. Básicamente, los métodos filogenéticos consideran la similitud entre genes asumiendo que comparten un ancestro común reciente, es decir son homólogos.

Un análisis filogenético adecuado se inicia con un alineamiento de secuencias, del cual dependerá la calidad del árbol filogenético, por esto, una edición manual del alineamiento optimizará los resultados. En un árbol filogenético, los nodos externos representan los taxones existentes, llamados también Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs por sus siglas en inglés). Para identificar cual es el ancestro de dos o más especies en un árbol filogenético, este debe tener raíz, para lo que se necesita de un grupo externo (outgroup) el cual se asume como el más distante en relación a los OTUs restantes.

Para la construcción del árbol filogenético a partir del alineamiento de nucleótidos o aminoácidos existen diferentes métodos, los más comunes para el análisis de virus son el Neighbor-Joining y el Maximum Likelihood. El método de Neighbor-joining (NJ) construye un árbol encontrando secuencialmente pares de vecinos, que son los pares de OTUs conectadas por un único nodo interior. Este método no intenta agrupar las OTUs más estrechamente relacionadas, sino más bien reduce al mínimo la longitud de todas las ramas internas y por lo tanto la longitud de todo el árbol. El Neighbor-Joining junto con la técnica de re-muestreo denominada “bootstrap” comprenden un método bastante rápido y adecuado para un conjunto de datos grande (Lemey *et al*, 2009).

CAPÍTULO II

Planteamiento de la Investigación

2.1.- Planteamiento del problema

La introducción de la vacuna contra Rotavirus en el esquema nacional de vacunación en el Perú, ha permitido que Norovirus y Sapovirus (ambos de la familia Caliciviridae) empiecen a tomar el rol etiológico principal. Sapovirus, el menos estudiado de los Calicivirus que infectan humanos, fue descrito por primera vez en los años 70 en Japón (Chiba et al., 1979). Aunque se han logrado avances significativos en la epidemiología, genética y patología, Sapovirus aún no podido cultivarse hasta el día de hoy, lo que limita el desarrollo de vacunas y de pruebas de diagnóstico.

El avance en técnicas de expresión para la producción de Partículas Tipo Virus (VLP, por sus siglas en inglés) ha permitido desarrollar algunas pruebas serológicas, que si bien permiten detectar anticuerpos contra sapovirus con gran especificidad (Hansman *et al*, 2005), no permiten distinguir a los individuos con infección actual de los que estuvieron infectados, ya que gran porcentaje de la población es seropositiva. Hace una década un grupo de investigadores japoneses desarrollaron una prueba basada en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite mejorar el estudio de la epidemiología de este virus (Oka *et al.*, 2006); el estudio de este virus aún es escaso debido principalmente al acceso limitado a pruebas moleculares sofisticadas.

El presente trabajo se enfocó en detectar y caracterizar Sapovirus, empleando la prueba de PCR y secuenciamiento, en una población de niños menores de cinco

años con gastroenteritis aguda que acudieron a la Unidad de Rehidratación Oral (URO) del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN) de la ciudad de Lima.

2.2.- *Justificación e importancia del estudio*

La gastroenteritis es un problema de salud pública mundial, con una alta tasa de mortalidad y morbilidad, las poblaciones más susceptibles son los niños menores de cinco años y los adultos mayores de 65 años. No solo afecta la salud de las personas sino que también tiene un impacto socioeconómico importante, ya que se sabe que los continuos episodios de gastroenteritis afectan al desarrollo del niño (Checkley *et al*, 2008). La gastroenteritis puede ser de origen parasitario, bacteriano o viral; sin embargo más de un 40% de casos de gastroenteritis son de origen viral, siendo Rotavirus junto a Norovirus y Sapovirus los principales agentes causales de origen viral (Ramani *et al*, 2009).

A pesar del desarrollo de pruebas moleculares para el diagnóstico y la tipificación, la información existente sobre Sapovirus sigue siendo escasa; sobre todo en Sudamérica, donde solo existen investigaciones sobre Sapovirus en tres países, Brasil, Venezuela y Argentina (dos Anjos, 2012; Bucardó *et al*, 2012; Martínez *et al*, 2002; Gomes *et al*, 2007). En el Perú no existen antecedentes sobre la prevalencia ni la diversidad de Sapovirus.

El presente es el primer estudio de Sapovirus en el Perú, donde se reporta la prevalencia y la diversidad de Sapovirus en una población de niños menores de cinco años que debido al cuadro de gastroenteritis aguda recibieron atención médica

especializada, además es el primero en evaluar la severidad de la gastroenteritis aguda con la infección por sapovirus.

Objetivos

I. HIPOTESIS

La prevalencia de sapovirus en niños con gastroenteritis aguda que requieren atención médica es mayor que en niños sin gastroenteritis aguda que acuden al Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima, Perú.

II. OBJETIVO GENERAL

Detectar y caracterizar Sapovirus, mediante qPCR, PCR y secuenciamiento, presentes en muestras de hisopados rectales de niños menores de cinco años con gastroenteritis aguda que acudieron a la Unidad de Rehidratación Oral del Instituto Nacional de Salud del Niño de Lima

III. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Detectar Sapovirus mediante la prueba de PCR de tiempo real.
- Tipificar Sapovirus mediante PCR convencional de tipo anidado y Secuenciamiento.
- Determinar la filogenia de las secuencias parciales de cápside de las distintas cepas de Sapovirus detectadas en el estudio.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

El presente es un estudio transversal en el cual se empleó una prueba de RT-qPCR para la detección de Sapovirus en muestras (n= 622) de hisopados rectales de niños con y sin gastroenteritis aguda menores de cinco años.

A cada muestra positiva, a la prueba de PCR de tiempo real, se realizó la prueba de PCR convencional tipo anidado (PCR anidado). El producto de amplificación de las muestras con resultado positivo en la prueba de PCR anidado fue secuenciado mediante el método de Sanger (Macrogen, Maryland). Finalmente, con las secuencias obtenidas se pudo elaborar un árbol filogenético utilizando el método de Neighbor Joining.

3.2. Población de estudio

Las muestras fueron obtenidas a partir de 622 niños menores de 5 años que acudieron al Instituto Nacional de Salud del Niño de la ciudad de Lima durante los meses comprendidos entre Noviembre del 2013 y Noviembre del 2014.

Un total de 490 niños fueron considerados como casos y 132 como controles bajo los siguientes criterios de inclusión/exclusión

Criterios de inclusión casos

- Acudir a servicio de la Unidad de Rehidratación Oral (URO) del INSN
- Ser menores de 5 años

- Presentar diarrea (dentro de los últimos 30 días, mínimo tres deposiciones líquidas en un periodo de 24 hrs) o vómitos (dentro de los últimos 30 días)
- Autorización del padre o apoderado para participar en el estudio (firma del consentimiento informado)

Criterios de exclusión casos

Ser mayor de 5 años

Sufrir de alguna condición que implique un riesgo para la salud del niño.

Criterios de inclusión Controles

Acudir a algún servicio distinto a URO (emergencia, odontología, traumatología, etc) del INSN.

Ser menor de 5 años.

No presentar diarrea ni vómitos en los últimos 30 días.

Consentimiento informado firmado por padre o apoderado

Criterios de exclusión controles

Mayores de 5 años.

Presentar diarrea o vomito.

3.3. Análisis de severidad

Se utilizó el índice de Vesikari para determinar la severidad del episodio de gastroenteritis de cada individuo, para esto se construye una tabla donde se asigna un valor a diferentes parámetros como: la duración y máximo número de diarrea al mes, duración y máximo número de vómito, temperatura corporal y grado de deshidratación, la suma de dichos valores genera un puntaje que es considerado para asignar si el episodio fue “leve, moderado o severo” (Anexo A1-A2) (Lewis, 2011).

3.4 Muestras

El personal técnico de la URO recolectó las muestras , que fueron obtenidas de la región rectal de cada niño empleando un hisopo (Pur-Wraps, West Sussex, UK) los cuales fueron inmediatamente transferidos a crioviales estériles conteniendo 500uL de buffer fosfato salino (PBS, NaCL 150 mM, PO₄ 10mM, pH 7.3-7.5(Life Technologies) y refrigerados a -20°C.

Las muestras recolectadas en un recipiente acondicionado para mantener la cadena de frío a 4°C, y transportadas el mismo día de recolección de muestra (intervalo de 6-8 horas) al Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI) del Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, donde fueron almacenadas a -70°C hasta su procesamiento.

3.5 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA viral se procesó 140 μ L de la suspensión que contenía el hisopado. El RNA fue extraído empleando el kit de extracción QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, California, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El -RNA se eluyó en un volumen total de 70uL Buffer AVE (H₂O de grado molecular, 0.04% NaN₃) y almacenado a -70°C hasta la síntesis del cDNA respectivo.

3.6 Síntesis de cDNA

Debido a que la integridad del RNA viral extraído no se ve afectada durante el primer mes de almacenamiento (datos no publicados) y razones logísticas, la síntesis de cDNA se realizó dentro de la primera semana de extracción del RNA. La síntesis de cDNA se realizó empleando el kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher, Massachusetts) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se realizó en un volumen inicial de 10 uL conteniendo 7uL de RNA, 1uL de hexámeros aleatorios 5 ng/ μ L, 1uL de dNTPs 1mM y 1uL de agua. La mezcla fue incubada a 65°C durante 5 minutos, e inmediatamente transferida a un recipiente con hielo durante al menos 1 min. Luego se le añadió 10uL de la mezcla anterior a un tubo que contenía 2uL de RT Buffer (Tris-HCl 250 mM pH 8.3 KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 4uL MgCl₂ 25mM, 2uL DTT 0.1M, 1uL RNase OUT (40U/uL), 1uL SuperStrand III (200U/uL). El tubo con la mezcla final fue incubado bajo las siguientes condiciones, 25°C por 10 min, 50°C por 50 min, 85°C por 5 min, y luego en hielo por 1min, finalmente ,1uL de RNase H fue añadido a la mezcla final la cual fue incubada a 37°C

por 20 min. La muestra de cDNA fue almacenada a -20°C hasta su uso en las distintas pruebas de PCR.

3.7 Prueba de cuantitativa en tiempo real

La prueba de qPCR, diseñada para amplificar 104 pares bases, se realizó en un volumen final de 10 uL. El tubo de reacción consistió 1uL de cDNA, 5uL de Fast Advanced Master Mix (5x, Thermo Fisher, Massachusetts), 10pmol de cada cebador (SaV124F, SaV1F, SaV5F, y SaV1245R) y 10pmol de cada sonda (SaV124TP y SaV5TP) según lo descrito por Oka *et al*, 2006. La secuencia de cada primer esta descrita en la Tabla 1. La amplificación se realizó en el equipo Step One plus (Thermo Fisher, Massachusetts, EEUU) usando las siguientes condiciones de reacción: 50°C por 2 min, 95°C por 15 min, 45 ciclos de 95°C 30 seg y 60°C 30 seg, y paso final a 60°C por 2 min. En cada placa se utilizaron 5 pozos como blancos sin cDNA, y 14 pozos para la curva estándar que comprendía 7 puntos por duplicado, y las muestras de cDNA.

Los resultados fueron analizados empleando el software del equipo (Step One Software, V2.1). A fin de verificar la calidad de nuestros resultados, un grupo de muestras fueron procesadas siguiendo el mismo protocolo en la Universidad de Tohoku (Japón).

3.8 Prueba de PCR convencional tipo anidada

Para la detección de Sapovirus mediante la prueba de PCR anidada se siguió el protocolo descrito por Okada (Okada, 2006). Cada mezcla de reacción del PCR

externo e interno, contenía lo siguiente: 0.5mM de cada cebador (externo SV-F14/13-SV-R14/13 o interno SV-F22, SV- R2) (Tabla 2), Buffer Taq Platinum 1x (Life Technologies), 0.2mM dNTPs, 2mM MgCl₂, y 1uL de cDNA o 1ul de producto de reacción del PCR externo. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 94°C por 2 min, seguido de 45 ciclos cada uno de 94°C por 30seg, 52°C 30seg, y 72°C por 45 seg, y un paso final a 60°C por 2 min. Todos los ciclos de amplificación se realizaron en el termociclador Mycycler (Biorad, California, EEUU). El producto final de amplificación de la prueba de PCR anidada fue analizado mediante electroforesis empleando un gel de agarosa al 1.5% en TAE 0.5X conteniendo 0.01ug/ml de bromuro de etidio a 100V por 1h20m. Para evitar contaminación se corrieron en grupos de 10 muestras incluyendo 10 controles negativos en cada gel. Los productos de amplificación fueron visualizados empleando un transluminador de luz UV (UVP, California, EEUU) y se capturó la imagen con una cámara digital Kodak. La muestra fue considerada positiva si se visualizaba una banda de amplificación de 400 pb (Anexo A3)

3.9 Determinación de la carga viral

La curva estándar para la determinación de la carga viral se realizó utilizando una dilución seriada (1:10) del plásmido que contenía 437 pares de nucleótidos (bp) que corresponden a una región parcial del gen de la cápside de Sapovirus, 5154-5591 insertados en el vector pGEM-T Easy. Durante la estandarización de los ensayos de RT-qPCR se evaluó el efecto del DNA humano en el desempeño del ensayo

(sensibilidad y especificidad de amplificación), para lo cual se utilizó agua de grado molecular con 10ng de DNA genómico.

3.10 Límite de cuantificación, límite de detección y expresión de resultados

Se definió como el límite de cuantificación (LOQ) a la dilución más alta de la curva estándar y su valor de Cq según cada corrida. Las muestras fueron consideradas como positivas si cumplían los siguientes criterios:

- Valores de Cq más bajas que el LOQ (detección cualitativa).
- Curva de amplificación típica, de forma sigmoidea.
- Resultado positivo por duplicado.
-

3.11 Detección de otros virus mediante PCR en tiempo real

Todas las muestras fueron procesadas mediante PCR en tiempo real para la detección: Norovirus GI, Norovirus GI, Rotavirus, Astrovirus y Aichivirus. Estas pruebas fueron parte de otros proyectos de tesis y de investigación que se vienen realizando en el LIEI.

3.12 Análisis de secuencias y análisis filogenético

El producto de amplificación del PCR convencional tipo anidado fue enviado a secuenciar a la empresa MACROGEN. El secuenciamiento fue realizado empleando los cebadores de sentido F22 y anti-sentido R2. Los archivos en formato ABIF

proporcionadas por MACROGEN, fueron analizados utilizando el software SeqTrace, (Stucky, 2012) el cual permite corregir las secuencias según su respectivo cromatograma y alinear las secuencias sentido y anti-sentido obtenidas para generar una secuencia consenso. Para la identificación del genogrupo se utilizó el software BLAST, buscando las secuencias de mayor similitud con las secuencias consenso, considerándose un mínimo de similitud de 90% para considerar que la secuencia pertenezca a un determinado genogrupo.

Para el análisis filogenético las secuencias fueron agrupadas según el genogrupo, luego alineadas empleando el software Clustal mediante la plataforma bioinformática Geneious R8 (Kearse *et al*, 2012). En esta plataforma se agruparon todas las secuencias consenso obtenidas a partir de las muestras de niños junto a las secuencias de referencia (Tabla 3), una vez alineadas todas las secuencias, se realizó una edición manual a fin de eliminar las secuencias de cebadores. Finalmente se elaboró un árbol filogenético utilizando el modelo de Neighbor Joining utilizando bootstrap de 2000 repeticiones como técnica de re muestreo.

3.13 Análisis estadístico

Para analizar la validez de la curva estándar, se siguieron las pautas propuestas por el MIQE (Bustin *et al*, 2009) que indica que los valores de eficiencia y generó un diagrama de box plot, se utilizaron los valores de promedio, valor mínimo, valor máximo, desviación estándar.

Se usó una prueba exacta de Fisher para evaluar los resultados de PCR en tiempo real, en las muestras de los casos versus las muestras de los controles.

3.14 Consideraciones éticas

Este trabajo se realizó con muestras de pacientes reclutados en el proyecto “Variantes genéticas de Norovirus en niños menores de 5 años con y sin diarreas y su relación con la Severidad Clínica de la Gastroenteritis, en un hospital peruano” (código de ética 59222). El presente estudio obtuvo aprobación para el trabajo con dichas muestras, del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con el código de inscripción: 65915

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Población de estudio

El promedio de edad de los niños incluidos en el presente estudio fue de 24.8 meses, 53.7% fueron del sexo masculino. El promedio de edad del grupo de los casos fue de 22.8 meses siendo el 53.9% del sexo masculino mientras que en los controles el promedio de edad fue de 26.8 y el 53% pertenecía al sexo masculino (Tabla 4).

4.2. Prueba de RT-qPCR para Sapovirus

4.2.1. Rango dinámico, repetibilidad y reproducibilidad de la prueba.

Al realizar la prueba de RT-qPCR para Sapovirus, se observaron curvas sigmoideas en los 7 puntos de la curva. El rango dinámico del ensayo fue de 7 órdenes (10^7 a 10^1 copias/uL), cada punto de la curva se corrió por duplicado, con una desviación estándar entre repeticiones de 0.1 a 0.3 ciclos, el coeficiente de determinación fue de $R^2=0.997$, una eficiencia de 93.14% y una pendiente de -3.498 (Figura 2 y 3).

La variación intra-ensayo (repetibilidad) de la prueba determinada calculando los coeficientes de variación (CV) en una misma placa que fueron de 0.010 - 0.06, siendo el valor más alto correspondiente a los estándar más diluidos (10^1 - 10^2 copias/uL). La variación Inter-ensayo (reproducibilidad) de la prueba, fue calculada empleando los coeficientes de variación en diferentes placas, mostrando

valores de 0.03 – 0.06, siendo el valor más alto del estándar más diluido (10^1 - 10^2 copias/uL) (Anexo A4, Tabla 5).

No se observó ningún efecto del DNA humano sobre la detección del blanco de amplificación en el PCR de tiempo real (Figura 2). Al diluir las diferentes concentraciones de plásmido de la curva estándar en una mezcla de DNA humano el rango dinámico se mantuvo en los 7 órdenes, la desviación estándar entre repeticiones fue de 0.06-0.15 ciclos, el coeficiente de determinación fue de $R^2=0.971$, una eficiencia de 107% y una pendiente de -3.149. No se detectó amplificación del control negativo o del blanco, en ninguna placa bajo las condiciones establecidas.

4.2.2. Detección mediante PCR en tiempo Real

De las 490 muestras, provenientes de niños caso, analizadas un total de 48 muestras resultaron positivas a la prueba de-qPCR para la detección de Sapovirus, lo que representa una prevalencia en la población analizada de 9.80% (Figura 4). Al compararse la distribución, según el índice de Vesikari, de los casos positivos y casos negativos para la PCR en tiempo real, se halló una distribución similar en ambos grupos, sin encontrar diferencias significativas ($p=0.50$, Figura 5). Los valores de Cq se encuentran en los rangos de 18.04–38.21, con un valor promedio de 29.65 (Anexo A4, A6). En el grupo de muestras provenientes de niños controles solo se detectó una muestra positiva (Cq = 32.26) lo que representa una prevalencia de 0.75%. La prueba exacta de Fisher arrojó un $p=$

0.0006 al evaluar la tabla de contingencia de los resultados de las muestras positivas a Sapovirus mediante qPCR en los grupos controles y casos (Tabla 7).

Aunque la cuantificación de la carga viral no es uno de los objetivos principales de este trabajo, gracias a la curva estándar se puede aproximar los valores de carga viral máxima a 10^6 copias/uL y de la carga viral mínima a 10^1 copias/uL (Anexo A5).

Al analizar la frecuencia de casos positivos al PCR en tiempo real según el mes en que se recolectaron las muestras, existe una ligera tendencia a que existan mayor número de casos durante la temporada de verano (Figura 6).

Entre las muestras positivas para Sapovirus se detectaron 8 co-infecciones, 2 con Rotavirus, 2 con Norovirus GI, 2 con Norovirus GII, 1 con Astrovirus y 1 con Rotavirus y Norovirus GI (datos no publicados pertenecientes a otros proyectos del laboratorio).

4.2.3. Genotipificación basada en Análisis de Secuencias

La prueba de PCR anidado fue positiva para 45 muestras de las 49 muestras positivas mediante qPCR. El análisis por secuenciamiento permitió genotipificar 44 de las 45 muestras positivas al PCR anidado. La muestra positiva mediante qPCR en el grupo control, resultó ser del genogrupo GI genotipo 2 según el análisis por secuenciamiento.

El análisis mediante el software BLAST identificó 18 de las secuencias obtenidas como genogrupo GI, 18 fueron asignadas como Sapovirus del genogrupo

GII, 6 secuencias fueron asignadas como genogrupo GIV y 2 como genogrupo GV (Figura 8). En el análisis de BLAST todas mostraron una similitud mayor al 90%. Con la cepa de referencia para cada genogrupo Dentro de los genogrupos identificados se encontró diversidad de genotipos; así entre los Sapovirus del genogrupo GI se hallaron 9 con el genotipo GI.1, 5 con el genotipo GI.2 y 2 con el genotipo GI.3, dos secuencias con genotipo indeterminado. Dentro de las 17 muestras con genogrupo GII, se hallaron: 1 con el genotipo GII.2, 11 con el genotipo G.II.4 y 6 con el genotipo GII.5. Para los genogrupos GIV y GV solo se hallaron los genotipos GIV.1 y GV.1 (Figura 8).

4.2.4 Correlación entre cuadro clínico y Sapovirus

El análisis de severidad de las muestras positivas en el grupo de casos (n=48) mediante el índice de Vesikari identificó 4 (8.16% de positivas) clasificadas como “Leve”, 21 (38.78% de positivas) clasificadas como “Moderado” y 23 (44.90% de positivas) clasificadas como “Severo. (Figura 6). Luego al identificarse el genogrupo de cada muestra, se halló la distribución de cada genogrupo según la Severidad (Figura 8).

4.2.5. Análisis de Secuencias y análisis Filogenético

De las 49 muestras positivas La caracterización mediante secuenciamiento y mediante BLAST asignó 20 de las secuencias como Sapovirus del genogrupo GI, 16 como Sapovirus del genogrupo GII, 5 como genogrupo GIV y 2 como genogrupo GV

(Figura 8 y 9 El árbol filogenético permitió identificar por similitud a aquellas muestras que no fueron identificadas adecuadamente por el análisis BLAST. Así, las de las tres secuencias sin genotipo asignado una fue asociada al genotipo GI.2, la segunda fue asociada al genotipo GI.3. y una tercera al genotipo GII.4.

CAPITULO V

Discusión

La prueba de PCR en tiempo real se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas en biología, sobre todo en epidemiología molecular, debido a que permite una detección rápida, previene la contaminación y tiene una alta especificidad (Bustin et al, 2009). Los valores de eficiencia y de linealidad obtenidos en la estandarización de la prueba de PCR de tiempo real en el presente estudio, cumplen con los parámetros mínimos requeridos para este tipo de experimentos (Bustin *et al*, 2009), además los valores de Cq de los estándares utilizados fueron similares a los reportados por el laboratorio en la Universidad de Tohoku (datos no mostrados).

Sapovirus en el Perú ha sido reportado previamente en una investigación que utilizó muestras de una población de Lima (Liu *et al*, 2015), sin embargo, este difiere del presente trabajo en lo siguiente: Utilizó un subgrupo de muestras de una cohorte de recién nacidos de una comunidad peri urbana (asentamiento humano ubicado San Juan de Miraflores, Lima); ningún niño en el estudio requirió de atención médica y en el estudio no se analizó la severidad de los episodios de gastroenteritis.

En el presente trabajo se detectó y caracterizó a Sapovirus mediante técnicas moleculares, en muestras de hisopado rectal de niños menores de cinco años que fueron colectadas en el Instituto Nacional de Salud del Niño, un grupo de estos niños presentaron un cuadro clínico de gastroenteritis aguda y requirieron tratamiento médico hospitalario a

este grupo se denominó grupo “casos”, otro grupo estaba conformado por niños que no presentaron gastroenteritis, estos fueron el grupo “control”.

Es por eso que el presente trabajo, significa un aporte importante en comprender la etiología de la gastroenteritis aguda así como conocer más sobre la severidad de la infección por Sapovirus pues las muestras “casos” necesitaron de atención médica. Teniendo en cuenta que ya que en la actualidad Sapovirus es considerado como el segundo agente viral más importante causante de gastroenteritis después de Norovirus (Tam *et al*, 2012). Después de la introducción de la vacuna contra Rotavirus hace menos de 10 años, existe un incremento en los casos de gastroenteritis ocasionados por Norovirus y Sapovirus (Bucardó *et al*, 2014), lo cual se ve reflejado en el presente estudio.

Nuestros resultados muestran una prevalencia de 9.8% en niños con gastroenteritis aguda, la cual es superior a la prevalencia reportada en estudios realizados con poblaciones similares en China (Lu *et al*, 2015), Tailandia (Malasao *et al*, 2008), Australia, (Kirkwood, 2005) Estados Unidos (Zintz *et al*, 2005), incluso al compararlos con las investigaciones realizadas en Sudamérica, por ejemplo: en Brasil donde se reporta una prevalencia de 4.6% (Mendanha de Oliveira, 2014), en Argentina y Venezuela donde se reporta una prevalencia del 2% (Gomes *et al*, 2009- Rodríguez-Guillén *et al*, 2005). Esta mayor prevalencia podría deberse a que la secuencia diana para la prueba de tiempo real en el presente estudio (una región conservada de unión entre el gen de la cápside y de la polimerasa) es distinta a la utilizada en trabajos anteriores que tuvieron como diana una región de la RdRp (RNA Polimerasa dependiente de RNA). Sin embargo el 91.84% de las

muestras positivas en nuestro estudio también fueron positivas al PCR convencional que tiene como diana una región del gen VP1 distinta al blanco de amplificación del qPCR.

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman reportes previos que afirman que Sapovirus es una causa importante de gastroenteritis aguda en niños. Solo una muestra proveniente del grupo de controles resultó positiva a la prueba de PCR de tiempo real, con un Cq considerado como positivo. La posibilidad de una contaminación fue descartada debido a que el análisis de la muestra fue repetida desde la extracción inicial del RNA y el uso de controles de extracción y reacción de PCR. Es probable que este niño, si bien no presentó diarrea o vómito al momento del reclutamiento, haya estado iniciando o terminando un episodio de diarrea, ya que el periodo de excreción de Sapovirus en heces se extiende en promedio de 1 mes (Harada *et al*, 2012) que significaría una infección asintomática, además la prevalencia de sapovirus en niños asintomáticos de comunidad entre los 18 y 23 meses de edad puede alcanzar el 7.7% (Liu *et al.*, 2015)

En el presente estudio, se utilizó el Índice de Vesikari, sistema que fue desarrollado inicialmente para determinar la severidad de un episodio de gastroenteritis en una infección por Rotavirus basado en un sistema de 20 puntos (Ruuska *et Vesikari*, 1990), este sistema fue posteriormente adoptado para evaluar la eficacia de los candidatos a vacuna contra rotavirus (Vesikari, 1991-1992-1993) y en la actualidad grupos que investigan diversos virus entéricos como Norovirus, Astrovirus, y Sapovirus lo utilizan. Identificar el grado de severidad de la diarrea es un aspecto importante en la gastroenteritis aguda, sobre todo en niños menores de cinco años donde este dato ayuda a un tratamiento adecuado del niño. La

severidad de los síntomas causados por Sapovirus ha sido evaluada previamente, (Pang *et al*, 2000- Sakai *et al*, 2001) estos reportes mencionan que los síntomas suelen ser menos severos que Norovirus y Rotavirus, sin embargo, estos no han sido detallados por cada genogrupo, nuestros resultados sugieren que no existe asociación entre la infección por Sapovirus y la severidad del episodio de gastroenteritis pues la distribución de episodios “leves”, “moderados”, y “severos” tuvieron una distribución muy similar en los Sapovirus positivos y negativos detectados por PCR en tiempo real. Los resultados además muestran que el grado de severidad es similar entre los distintos genogrupos (Figura 8).

El pico más alto de Sapovirus se alcanzó en la estación de verano, en los meses de Diciembre a Marzo (Figura 6). Esta estacionalidad concuerda con un reporte de China, donde también se observó la mayor frecuencia en verano (Chen *et al*, 2013) pero difiere a lo reportado en Japón, donde el pico más alto se alcanzó en la estación de invierno, correspondiente a los meses de Noviembre a Marzo (Dey *et al*, 2012). Sin embargo, los resultados de estacionalidad no deberían ser considerados como concluyentes ya que para determinar la estacionalidad se necesita un mayor periodo de observación; así un estudio realizado en Canadá con muestras de tres años consecutivos reportó que la estacionalidad de Sapovirus varió en los diferentes años entre las estaciones de otoño y primavera (Pang *et al*, 2009).

Del total de niños positivos a Sapovirus 8 presentaron coinfecciones con otros virus que representa un 16.3% de los positivos, estas coinfecciones con Norovirus GI y GII, Rotavirus y Astrovirus que coinciden con un estudio reportado previamente con una

prevalencia de 1.6 % al 19% (Lu *et al*, 2015). Sin embargo, no existen estudios que demuestren el orden de infección con estos virus, la importancia de los mismos en el cuadro de enteritis aguda y sobre todo si estas coinfecciones conllevan a un cuadro clínico de mayor gravedad.

Mediante el análisis filogenético se pudieron identificar 8 genotipos, lo cual muestra la variabilidad genética existente. Los genotipos más prevalentes en diversos trabajos, al igual que los observados en el presente estudio, pertenecen a los genogrupos GI y GII (Bucardó *et al*, 2014- Mendanha de Oliveira *et al*, 2014). Las secuencias encontradas de GI muestran una alta similitud con las cepas de referencia; mientras que las muestras que pertenecen al genotipo de GII.4 se agrupan en un clado distinto a la cepa de referencia utilizada para el análisis, estos resultados sugieren que el genotipo GII.4 observado en el presente estudio sea denominado como una variante distinta del genotipo reportado.

El presente estudio es el primero en evaluar el rol de Sapovirus como agente causal de gastroenteritis aguda en niños que requieren de atención médica en el Perú. Los resultados confirman estudios previos que asocian a Sapovirus con los casos de gastroenteritis aguda, además muestra una diversidad que comprende 12 genotipos distribuidos en los 4 genogrupos que causan infecciones en humanos. Aparentemente el genotipo GII.4 circulante es propia y única de la población evaluada.

Conclusiones

- La prevalencia de Sapovirus asociado a niños menores de 5 años con gastroenteritis aguda que acudieron a la Unidad de Rehidratación Oral del Instituto Nacional del Niño, durante el periodo de Diciembre 2014 a Junio 2015 detectada mediante PCR en tiempo real fue mayor a la de niños sin gastroenteritis que acudieron al mismo instituto.
- La prueba de PCR en tiempo real puede detectar Sapovirus correctamente, obteniendo una buena concordancia comparada con la prueba de PCR convencional.
- No existe correlación entre la severidad de una infección por Sapovirus y el genotipo.
- Todos los genogrupos de Sapovirus que afectan a Humanos se observaron en la población estudiada, siendo los genogrupos SaV GI y SaV GII los de mayor frecuencia.

Recomendaciones

1. Realizar un estudio de seguimiento que permita determinar el período de diseminación viral en niños menores de cinco años, que además permitiría conocer si existe o no reinfección con el mismo genotipo.
2. Secuenciar la cápside (VP1) completa (1700 pb aproximadamente), lo que permitiría clasificar mejor el genotipo al cual pertenece cada muestra.
3. Secuenciar la región de unión entre el gen de la cápside y la polimerasa, permitiría identificar las cepas recombinantes.
4. Detectar y tipificar Sapovirus en población adulta y anciana, lo cual permitiría conocer la prevalencia en diferentes grupos etarios.
5. Para determinar con mejor precisión la estacionalidad se necesita tener muestras de un periodo de tiempo más largo.

Limitaciones del estudio

- El volumen de muestra no permite realizar más de dos extracciones de RNA.
- El buffer de elución de RNA contiene azida de sodio, lo que impide la cuantificación del RNA.
- Los pacientes no pueden ser ubicados geográficamente, debido a que el acceso a la información domiciliaria no fue facilitada, además en muchas ocasiones, los pacientes no brindan información autentica para poder ser atendidos en el INSN.
- La clasificación solo pudo realizarse hasta genogrupo, debido a que solo se secuenció una región del gen VP1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	36
Figura 2.....	37
Figura 3.....	38
Figura 4.....	39
Figura 5.....	40
Figura 6.....	41
Figura 7.....	42
Figura 8.....	43
Figura 9.....	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.....	45
Tabla 2.....	46
Tabla 3.....	47
Tabla 4.....	48
Tabla 5.....	49
Tabla 6.....	50
Tabla 7.....	50
Tabla 8.....	51

Figuras

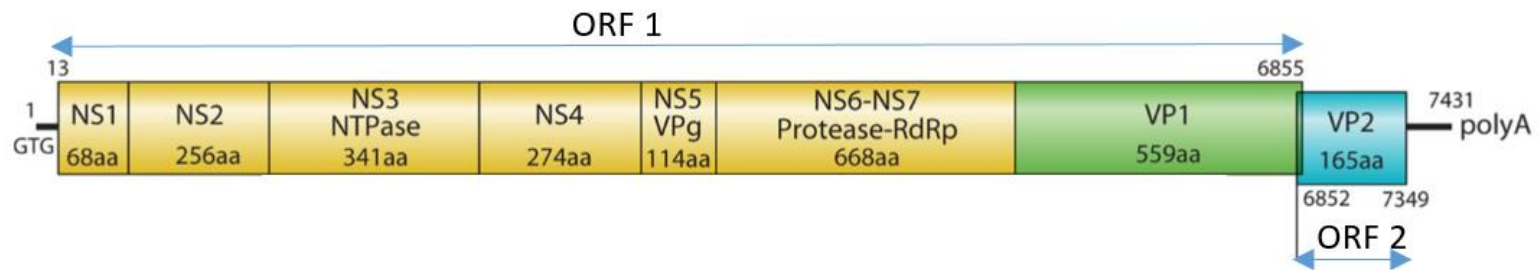


Figura 1- Organización del Genoma de Sapovirus (cepa Manchester GI.1- X86560) El esquema presenta el ORF 1 conteniendo las proteínas No Estructurales (NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, NS6-NS7) y la proteína “Estructural Principal”(VP1), el ORF 2 conteniendo la proteína “Estructural Secundaria” (VP2). Además está indicado la cantidad de aminoácidos (aa) que forman cada proteína. En el extremo 3’ se aprecia la cola poli Adenilada. (Oka, 2015)

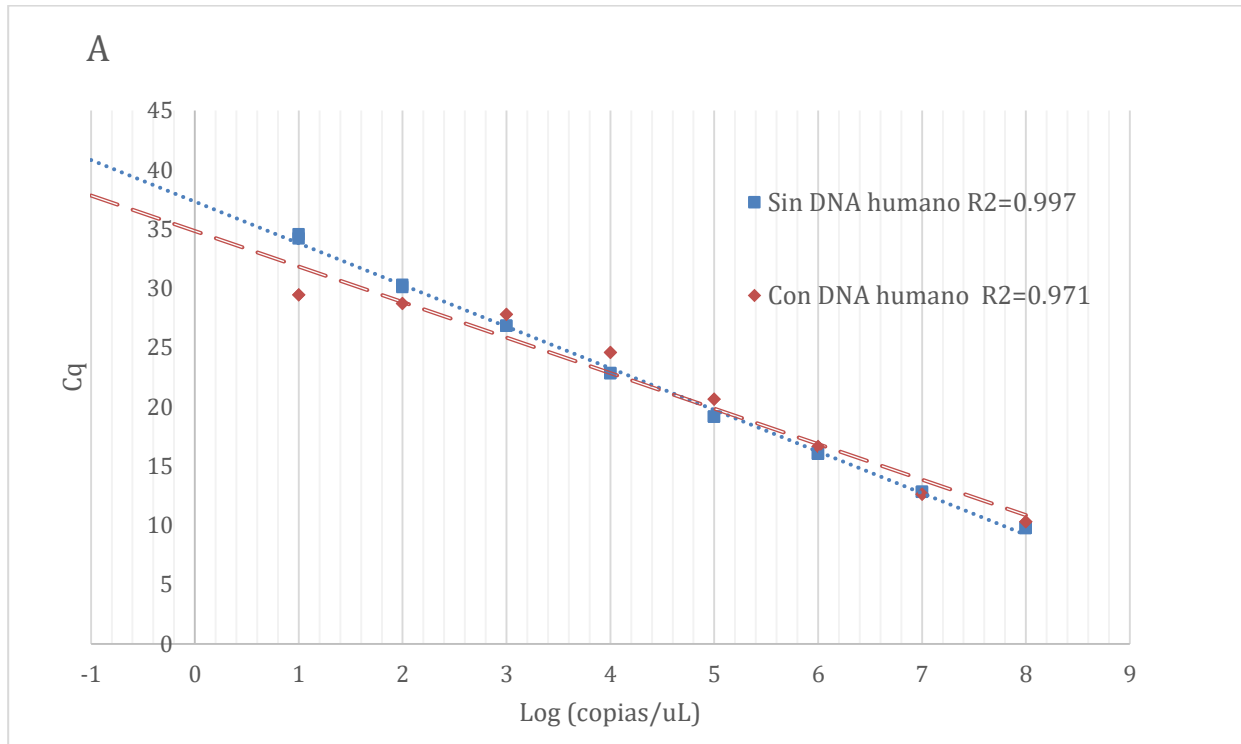


Figura 2.-Rango dinámico lineal de la prueba de RT-qPCR para la detección de Sapovirus y determinación del efecto del DNA genómico en el proceso. Cada punto equivale a cada estandar (10^1 - 10^8 copias/uL). La curva sin DNA humano es plasmido diluido en H₂O PCR y la curva con DNA humano es el plásmido con 20ng de DNAG diluido en H₂O PCR

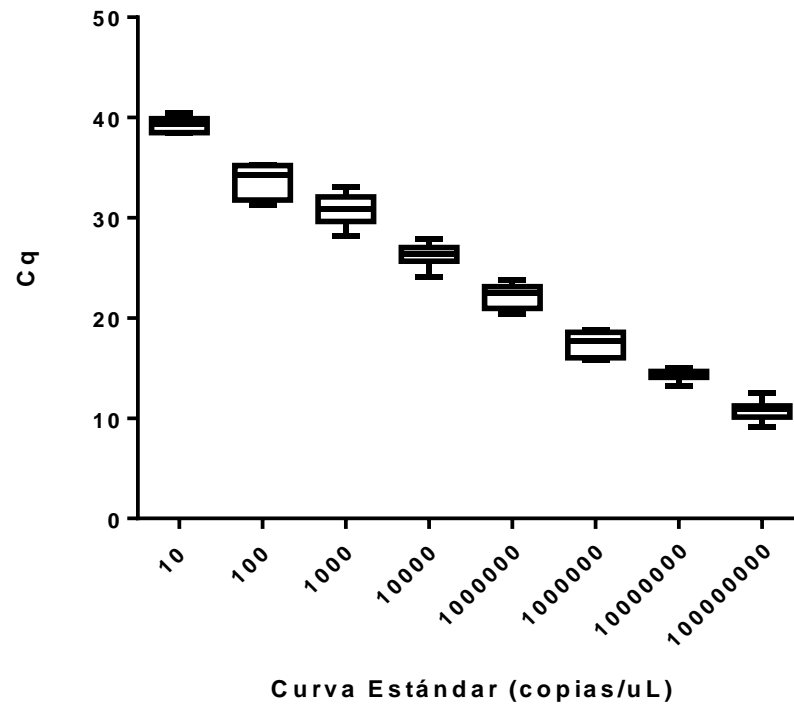


Figura 3 Diagrama de caja de la curva estándar. Cada caja corresponde a los valores obtenidos en las diferentes placas que se usaron para correr las 622 muestras, resumidos en la Tabla 3.

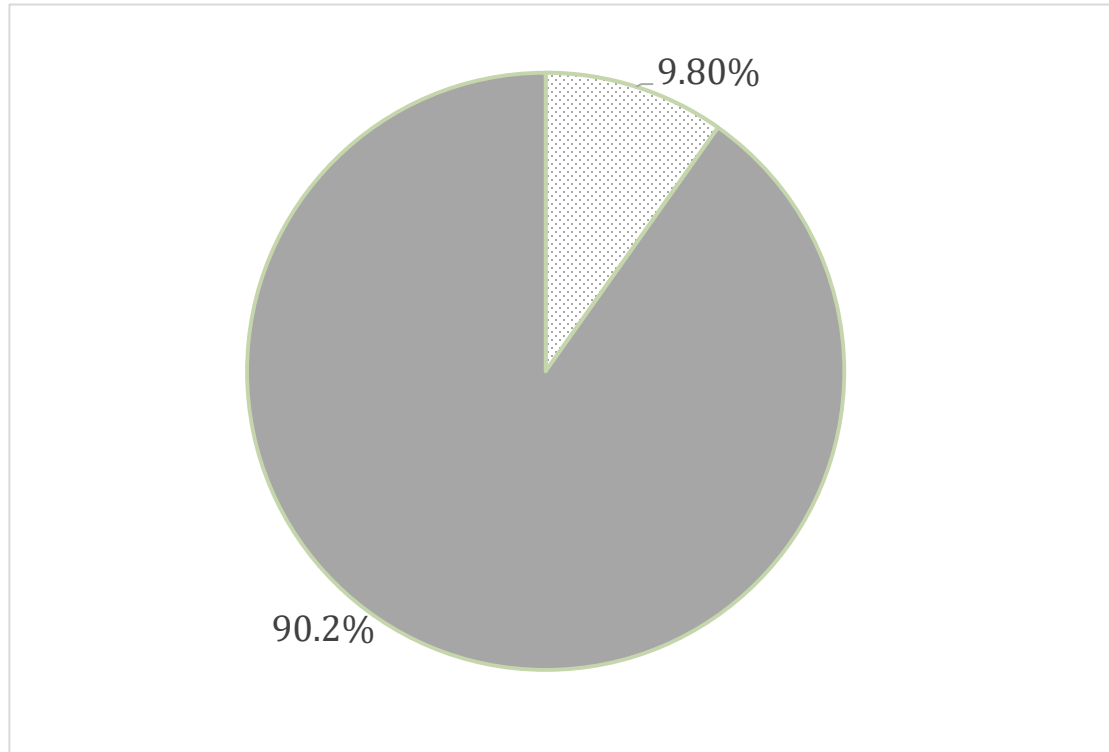


Figura 4 Resultado de la prueba PCR en tiempo real Prevalencia de Sapovirus detectada mediante PCR de tiempo real. La prueba se basó en la amplificación de una región del gen que codifica VP1. El relleno punteado representa el porcentaje de muestras positivas(n=48) mientras que el relleno sólido representa el porcentaje de muestras negativas (n=442)

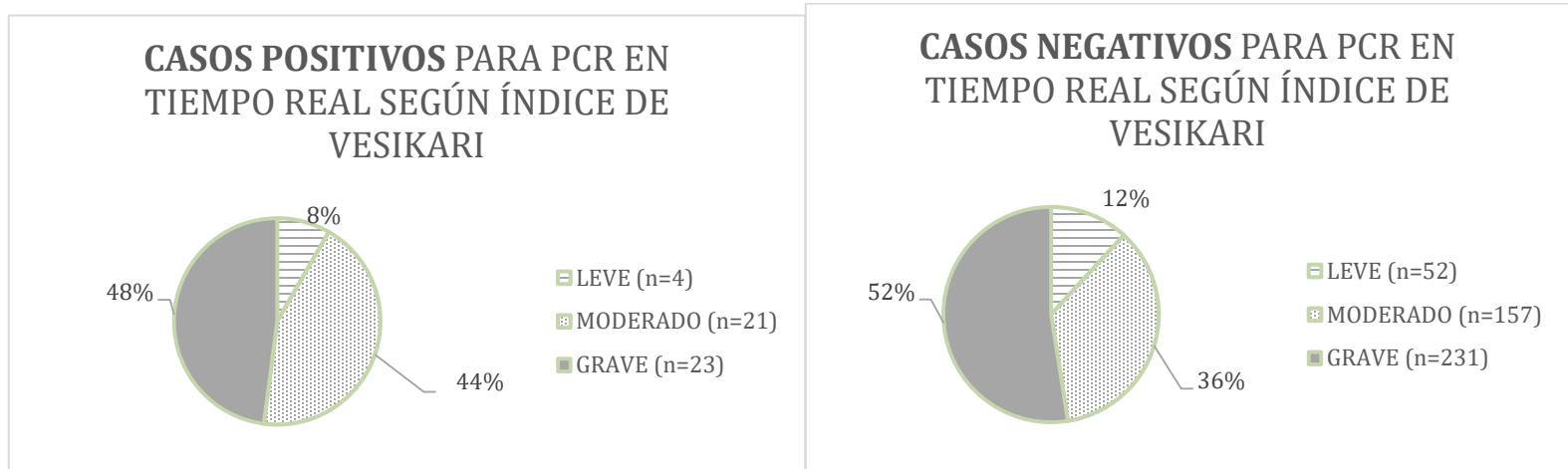


Figura 5 Sapovirus Positivos (n=48) según Índice de Vesikari El Índice de Vesikari, clasifica la severidad tomando en cuenta, la duración y el máximo número de diarrea al mes, duración y el máximo número de vómito, temperatura corporal y grado de deshidratación, de acuerdo a ello se le asigna como: Leve, Moderado y Severo. Hubo mayor número de Casos Positivos para la PCR en tiempo Real calificados como “Moderado y “Severo”, sin embargo al compararlo con los Casos Negativos mediante una prueba de chi cuadrado no se evidenció diferencia significativa.(p=0.653)

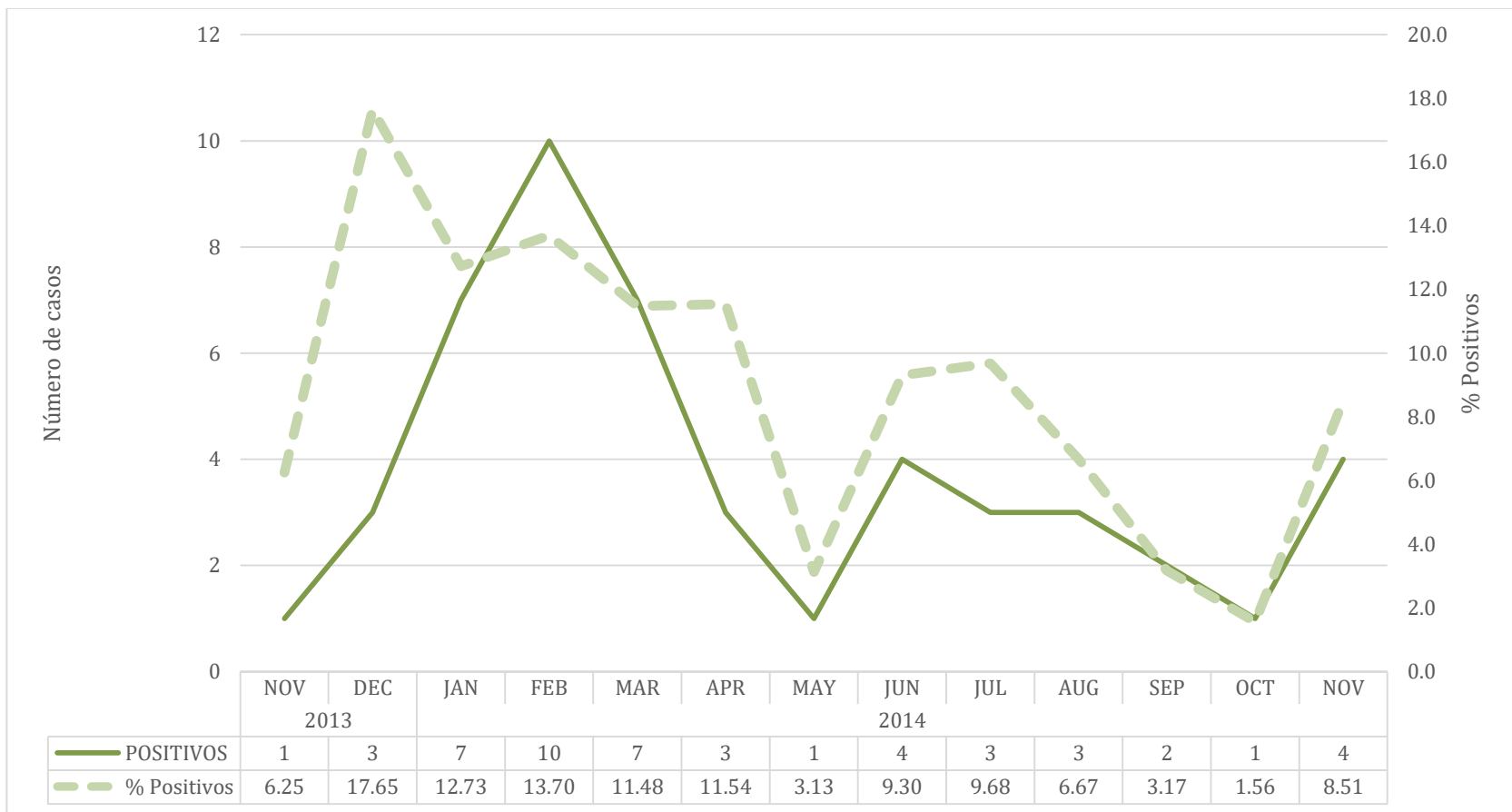


Figura 6 Frecuencia de casos de Sapovirus positivos por cada mes del estudio. Frecuencia mensual de casos de Sapovirus detectados por PCR de tiempo real durante un año (Nov 2013-Nov 2014). Se aprecia una tendencia a mayor aparición de casos en la estación de verano.,

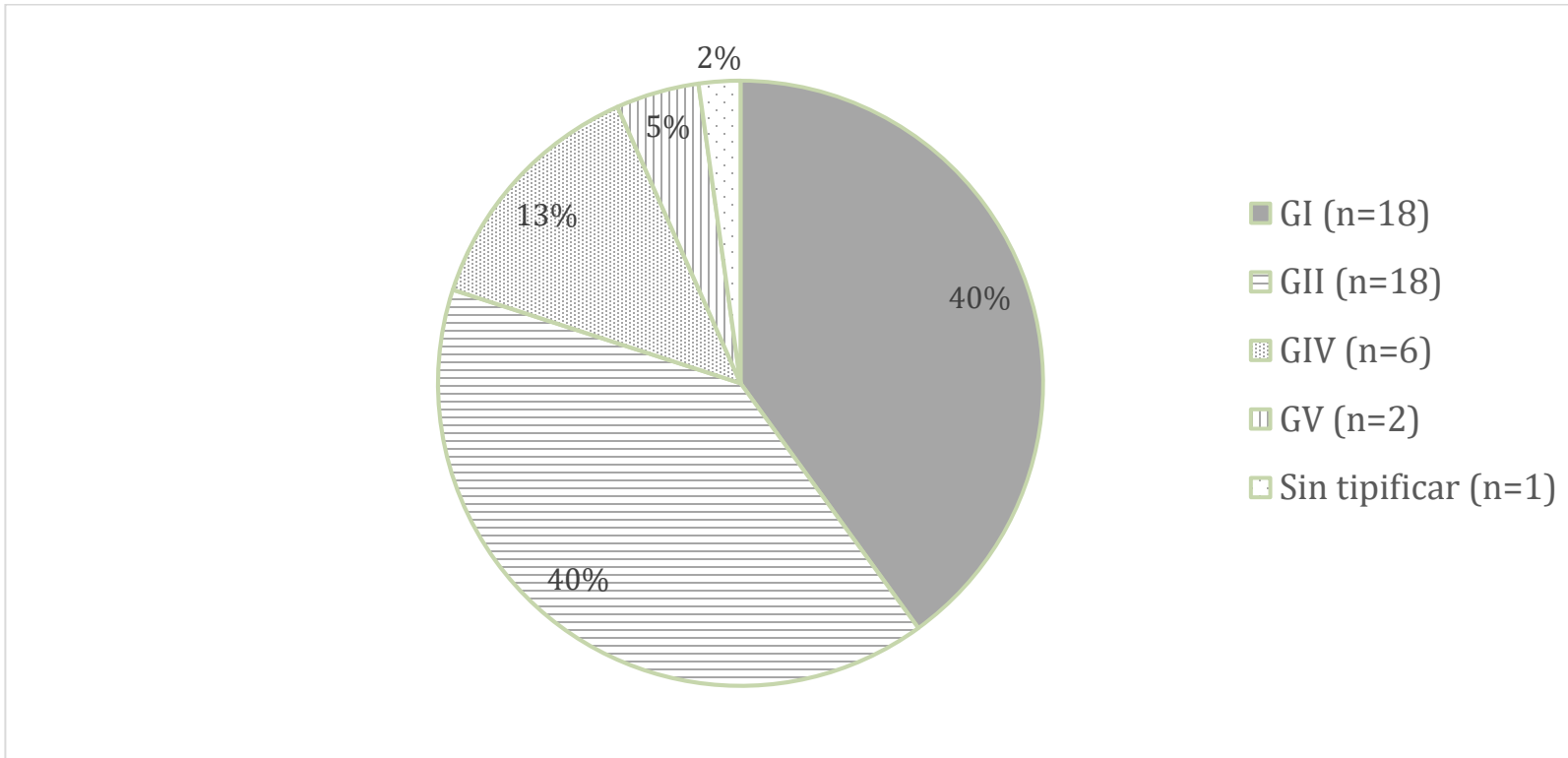


Figura 7 Genotipos de Sapovirus Genotipos de Sapovirus Identificados según Análisis de Secuencias (n=44). Las secuencias fueron obtenidas a partir de los productos de amplificación de los cebadores F22-R2 (400nt).

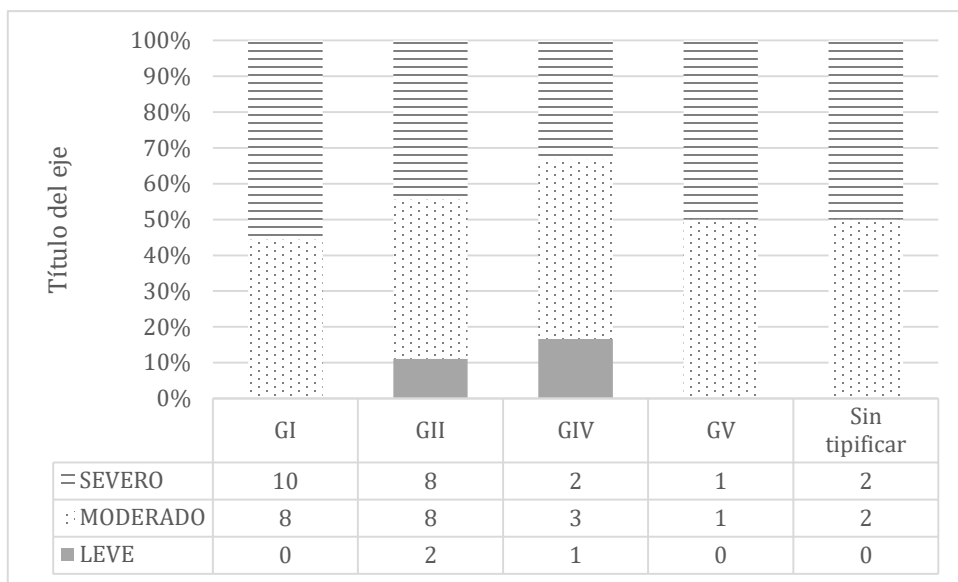


Figura 8 Sapovirus Positivos según genogrupo e Índice de Vesikari

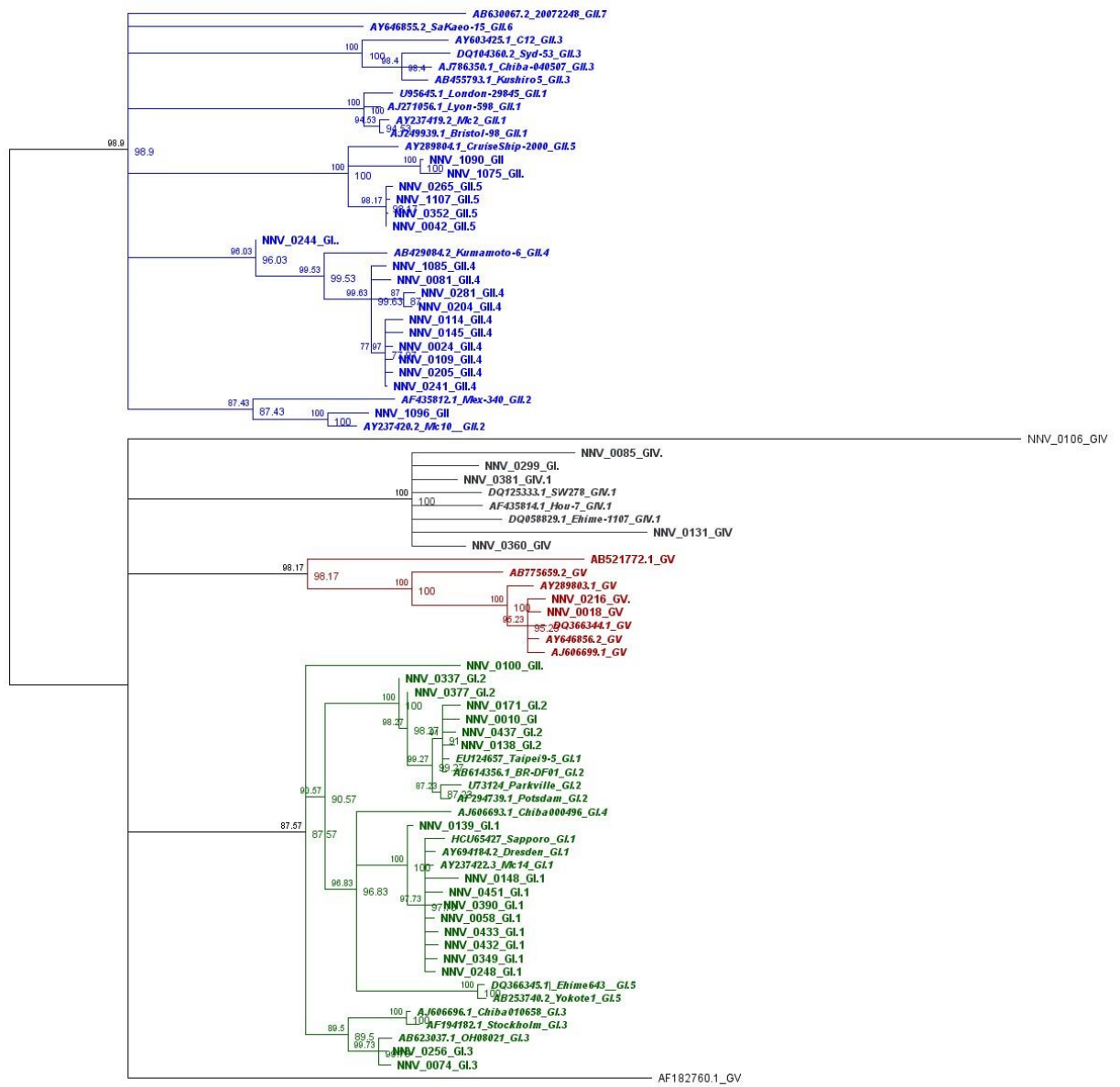


Figura 9 **Árbol Filogenético de Sapovirus del estudio** Se construyó el árbol filogenético basados en el alineamiento de nucleótidos de 44 secuencias obtenidas de muestras de hospital y 47 secuencias de referencia. El árbol fue construido por Neighbor Joining con bootstrap=3000. Códigos en azul pertenecen al genogrupo GI, los códigos en Gris pertenecen al genogrupo GIV, los códigos en rojo pertenecen al genogrupo GV y los códigos en verde pertenecen al genogrupo GII.

Tablas

Nombre	Ubicación	Orientación	Secuencia
SaV 1F	5077-5094 ^a	Sentido	TTGGCCCTCGCCACCTAC
SaV 124F	5077-5097 ^b	Sentido	GAYCASGCTCTCGCYACCTAC
SaV 5F	5112-5135 ^c	Sentido	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC
SaV 1245R	5163-5181	Antisentido	CCCTCCATYTCAAACACTA
Nombre	Ubicación	Fluoróforo	Secuencia
SaV 124 TP	5105-5118	VIC	CCRCCTATRAACCA
SaV 5 TP	5142-5157	VIC	TGCCACCAATGTACCA

Tabla 1 Lista de Cebadores y sonda para PCR en Tiempo Real

^aPosición correspondiente a la secuencia de nucleótidos de AB614356.1

^bPosición correspondiente a la secuencia de nucleótidos de HM002617.1

^cPosición correspondiente a la secuencia de nucleótidos de AY646856

^dPosición correspondiente a la secuencia de nucleótidos de AY237420

Nombr	Ubicació	Orientació	Secuencia (5'→3')	Uso
SV-F13	5074– 5094	Sentido	GAYYWGGCYCTCGCYACCTAC	Universal/genogrupo
SV-F14	5074– 5094	Sentido	GAACAAGCTGTGGCATGCTAC	Universal/genogrupo
SV-R13	5876– 5861	Antisentido	GGTGANAYNCCATTKTCCAT	Universal
SV-R14	5876– 5861	Antisentido	GGTGAGMMYCCATTCTCCAT	Universal
SV-F22	5154– 5172	Sentido	SMWAWTAGTGTTTGARATG	Universal
SV-R2	5591– 5570	Antisentido	GWGGGRTCAACMCCWGGTGG	Universal
SV-G1-R	5580– 5561	Antisentido	CCCBGGTGGKAYGACAGAAG	genogrupo
SV-G2-R	5503– 5483b	Antisentido	CCANCCAGCAAACATNGCRCT	genogrupo
SV-G4-R	1052– 1033b	Antisentido	GCGTAGCAGATCCCAGATAA	genogrupo
SV-G5-R	194–174b	Antisentido	TTGGAGGWTGTTGCTCCTGTG	genogrupo

Tabla 2 Lista de Cebadores para PCR Convencional

Genogrupo	Código de Secuencia NCBI
GI	GI.1:U65427, AY237422, AY694184. GI.2: U73124, AF294739, EU124657, AB14356 GI.3: AB623037, AJ606696, AF194182 GI.4: AJ606693 GI.5: AB253740, DQ366345, GI.6: AB622435 GI.7: AB522390
GII	GII.1: U95645, AJ271056, AY237419, AJ249939 GII.2: AF435812, AY237420 GII.3: AY603425, DQ104360, AB455793, AJ786350 GII.4: AB429084 GII.5: AY289804 GII.6: AY646855 GII.7: AB630067
GIV	GIV.1: AF435814, DQ125333, DQ058829
GV	GV.1: AY289803, AJ606699, AY646856, DQ366344 GV.2: AB775659 GV.3: AB521772 GV.4: JN420370
GIII (Outgroup)	AF182760

Tabla 3 Lista de Secuencias utilizadas para Análisis Filogenético

	MASCULINO		FEMENINO		Total
	n	Promedio Edad (meses)	n	Promedio Edad (meses)	
CASOS	264	21.5	226	24.0	490
CONTROL	70	25.3	62	28.2	132
	334	22.8	288	26.8	622

Tabla 4 Descripción de la población de estudio

	Estándar (copias/uL)							
	10	100	1000	10000	1000000	1000000	10000000	100000000
Valor Mínimo	38.47	31.31	28.17	24.1	20.4	15.82	13.18	9.162
25% Percentil	38.49	31.76	29.63	25.68	20.97	16.04	14.07	10.12
Mediana	39.31	34.26	30.91	26.34	22.54	17.73	14.29	10.9
75% Percentil	39.88	35.2	32.08	27.03	23.13	18.58	14.66	11.22
Valor Máximo	40.42	35.29	33.08	27.92	23.77	18.86	14.97	12.49
Promedio	39.21	33.7	30.84	26.24	22.23	17.45	14.28	10.83
Desviación Estándar	2.625	1.697	1.666	1.121	1.156	1.207	0.5008	1.018
Coefficiente de Variación	0.064	0.050	0.054	0.043	0.052	0.069	0.035	0.054

Tabla 5 Valores estadísticos descriptivos de cada uno de los puntos obtenidos en la curva estándar de las diferentes placas que se usaron para correr las 622 muestras

	CASOS	CONTROLES	
qPCR-POS	48	1	49
qPCR- NEG	442	131	573
	490	132	622

Tabla 6 Resultados PCR en tiempo real según definición de Participación

	CASOS		CONTROL		
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	
Leve	4	52	0	38	94
Moderado	21	157	1	31	210
Severo	23	231	0	0	254
Sin síntomas	0	2	0	62	64
	48	442	1	131	622

Tabla 7 Resultados de PCR en tiempo real según definición de participación y Severidad.

		Genotipificación por PCR convencional tipo Multiplex					
		Negativos	SaV_GI	SaV_GII	SaV_GIV	SaV_GV	Total
Genotipificación por Análisis de secuencias	Negativos	578	1	0	0	0	579
	SaV_GI	2	15	0	0	0	17
	SaV_GII	3	0	13	1	0	17
	SaV_GIV	0	0	1	5	0	6
	SaV_GV	0	1	0	0	2	3
	Total	583	17	14	6	2	622

Kappa= 0.876

SE of kappa = 0.039

95% confidence interval: From 0.799 to 0.953

Tabla 8 Cuadro de concordancia para la Genotipificación por PCR y por Análisis de Secuencias

LISTA DE ABREVIATURAS

RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	Ácido Dexosirribonucleico complementario
Cq	Ciclo de cuantificación
dNTPs.....	desoxinuclotidos trifosfato
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima
INSN	Instituto Nacional de Salud del Niño
MGB.....	Sondas para ligandos de unión al surco menor
NJ	Neighbor Joining
NoV.....	Norovirus
nt.....	nucleótido
pb.....	pares de base
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR.....	PCR cuantitativo en tiempo real
RdRp	RNA Polimerasa dependiente de RNA
RT.....	Transcripción Reversa
SaV	Sapovirus
URO	Unidad de Rehidratación Oral
VIC.....	Fluoróforo registrado de Applied Biosystems
VLP	Partículas tipo virus

Referencias bibliográficas

1. Bucardo F, Carlsson B, Nordgren J, *et al.* Susceptibility of children to sapovirus infections Nicaragua, 2005-2006. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(11):1875-1878. doi:10.3201/eid1811.111581.
2. Bucardo F, Reyes Y, Svensson L, Nordgren J. Predominance of Norovirus and Sapovirus in Nicaragua after Implementation of Universal Rotavirus Vaccination. *PLoS One.* 2014;9(5):e98201. doi:10.1371/journal.pone.0098201.
3. Bustin S a., Benes V, Garson J a., *et al.* The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
4. Catchment, R., Sano, D., Pe, U., Guix, S., Pinto, R. M., Miura, T., Bosch, A. (2011). Quantification and Genotyping of Human Sapoviruses in the Llobregat, 77(3), 1111–1114. doi:10.1128/AEM.01721-10
5. Chan MCW, Sung JJY, Lam RKY, Chan PKS, Lai RWM, Leung WK. Sapovirus detection by quantitative real-time RT-PCR in clinical stool specimens. *J Virol Methods.* 2006;134(1-2):146-153. doi:10.1016/j.jviromet.2005.12.013.
6. Checkley W, Buckley G, Gilman RH, Assis AM, Guerrant RL, *et al.* (2008) Multi-country analysis of the effects of diarrhoea on childhood stunting. *International journal of epidemiology* 37: 816–830. doi: 10.1093/ije/dyn099

7. Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, Fukui S .
1979. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an
infant home. *JMedVirol*4:249–254
8. Deijl, H., Heide, R. V. A. N. D. E. R., Lewis, D., Hedlund, K., Vinje, J. A. N.,
Svensson, L., & Koopmans, M. P. G. (2000). Molecular Detection and
Epidemiology of Sapporo-Like Viruses, *38*(2), 530–536.
9. Dove *et al.*, 2005: Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL,
Molyneux ME, Nakagomi O, Hart CA. Detection and characterization of
human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in
Blantyre, Malawi. *J Med Virol.* 2005; *77*(4): 522 - 527.
10. Farkas T, Zhong WM, Jing Y, *et al.* Genetic diversity among sapoviruses.
Arch Virol. 2004;*149*(7):1309-1323. doi:10.1007/s00705-004-0296-9.
11. Gomes K a, Stupka J a, Diana a, Parra GI. [Molecular characterization of
calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis occurring in
Argentina during 2005 and 2006]. *Rev Argent Microbiol.* 2008;*40*(4):222-
228. doi:10.1002/jmv.20989.
12. Green *et al.*, 2007:Green Kim Y Caliciviridae: The Noroviruses. 950 -
979.In:Knipe David M, Howley Peter M. *Fields Virology* 5th Edition 2007.
Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia . Baltimore . New York .
London . Buenos Aires . Hong Kong . Sydney . Tokyo
13. Gunson, R. N., Collins, T. C., & Carman, W. F. (2006). The real-time
detection of sapovirus, *35*, 321–322. doi:10.1016/j.jcv.2005.11.001

14. Hansman GS, Doan LT, K Nguyen T a, *et al.* Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol.* 2004;149(9):1673-1688. doi:10.1007/s00705-004-0345-4.
15. Hansman, G. S., Doan, L. T. P., K Nguyen, T. A., Okitsu, S., Katayama, K., Ogawa, S., Ushijima, H. (2004). Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam, 1673–1688. doi:10.1007/s00705-004-0345-4
16. Hansman, G. S., Natori, K., Ushijima, H., Katayama, K., & Takeda, N. (2005). Characterization of polyclonal antibodies raised against sapovirus genogroup five virus-like particles Brief Report, 1433–1437. doi:10.1007/s00705-005-0506-0
17. Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund KO, Katayama K. Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(12):1916-1920. doi:10.3201/eid1112.050722.
18. Hansman, G. S., Guntapong, R., Pongsuwanna, Y., Natori, K., Katayama, K., & Takeda, N. (2006). Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens, 551–561. doi:10.1007/s00705-005-0630-x
19. Hansman, G. S., Oka, T., Okamoto, R., & Nishida, T. (2007). Human Sapovirus in Clams , Japan, 13(4), 5–7.

20. Harada S, Oka T, Tokuoka E, *et al.* A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. *Arch Virol.* 2012;157(10):1999-2003. doi:10.1007/s00705-012-1387-7.
21. Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T. Phylogenetic Analysis of the Nonstructural and Structural Protein Encoding Region Sequences, Indicating Successive Appearance of Genomically Diverse Sapovirus Strains from Gastroenteritis Patients. 2013:454-457.
22. Haramoto, E., Katayama, H., Phanuwan, C., & Ohgaki, S. (2008). Quantitative detection of sapoviruses in wastewater and river water in Japan, 46, 408–413. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02330.x
23. Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, *et al.* Characterization of sapoviruses detected in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2008;61(6):504-506.
24. Iwai M, Hasegawa S, Obara M, *et al.* Continuous Presence of Noroviruses and Sapoviruses in Raw Sewage Reflects Infections among Inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(5):1264-1270. doi:10.1128/AEM.01166-08.
25. Johansson, P. J. H., Bergentoft, K., Larsson, P. E. R. A., Magnusson, G., Widell, A., Thorhagen, M., & Hedlund, K. (2005). A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults, (December 2004), 200–205. doi:10.1080/00365540410020974

26. Kang L-H, Oh S, Park J-W, Won Y-J, Ryu S, Paik S-Y. Simultaneous detection of waterborne viruses by multiplex real-time PCR. *J Microbiol.* 2013;51(5):671-675. doi:10.1007/s12275-013-3199-1.
27. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
28. Kitajima M, Oka T, Haramoto E, *et al.* Detection and Genetic Analysis of Human Sapoviruses in River Water in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76 (8):2461-2467. doi:10.1128/AEM.02739-09.
29. Kitajima, M., Iker, B. C., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2014). Science of the Total Environment Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes — Identification of potential viral indicators. *Science of the Total Environment*, The, 488-489, 290–296. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.087
30. Kitamoto, N., Oka, T., Katayama, K., Li, T., Takeda, N., Kato, Y., Tanaka, T. (2012). Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles, (July), 760–770. doi:10.1111/j.1348-0421.2012.00499.x
31. Lewis Kristen. (2011) Vesikari clinical severity scoring system manual. Version 1.3 PATH.

32. Lemey P, Salemi M, Vandamme A-M. *The Phylogenetic Handbook*. Second Edi. Cambridge University Press; 2009.
33. Marques Mendanha de Oliveira D, Souza M, Souza Fiaccadori F, Pereira Santos Hugo Cesar, Dores de Paula Cardoso D. Monitoring of Calicivirus Among Day-Care Children: Evidence of Asymptomatic Viral Excretion and First Report of GI.7 Norovirus and GI.3 Sapovirus in Brazil. *J Med Virol*. 2014;86(12):1569-1575. doi:10.1002/jmv23791.
34. Maarseveen, N. M. Van, Wessels, E., Brouwer, C. S. De, Vossen, A. C. T. M., & Claas, E. C. J. (2010). Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F , Astrovirus , Rotavirus group A , Norovirus genogroups I and II , and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays, 49, 205–210. doi:10.1016/j.jcv.2010.07.019
35. Mans, J., Murray, T. Y., Kiulia, N. M., Mwenda, J. M., Musoke, R. N., & Taylor, M. B. (2014). Human Caliciviruses Detected in HIV-Seropositive Children in Kenya, 81(October 2013), 75–81. doi:10.1002/jm1
36. Murray, T. Y., Mans, J., Zyl, W. B. Van, & Taylor, M. B. (2013). Application of a Competitive Internal Amplification Control for the Detection of Sapoviruses in Wastewater, 61–68. doi:10.1007/s12560-012-9101-1
37. Nakata, Chiba . (1983). Microtiter Solid-Phase Radioimmunoassay for Detection of Human Calicivirus in Stools, 17(2), 198–201.

38. Neesanant P, Sirinarumitr T, Chantakru S, *et al.* Optimization of one-step real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for norovirus detection and molecular epidemiology of noroviruses in Thailand &. *J Virol Methods.* 2013;194(1-2):317-325. doi:10.1016/j.jviromet.2013.08.033.
39. Nidaira, M., Taira, K., Kato, T., Arakaki, E., & Kyan, H. (2014). Phylogenetic Analysis of Sapovirus Detected from an Outbreak of Acute Gastroenteritis on Ishigaki Island (Okinawa Prefecture , Japan) in 2012, 141–143.
40. Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, *et al.* Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol.* 2003;77(24):13117-13124. doi:10.1128/JVI.77.24.13117-13124.2003.
41. Niwa, S., Tsukagoshi, H., Ishioka, T., Sasaki, Y., Yoshizumi, M., Morita, Y., Kozawa, K. (2014). Triplex real - time polymerase chain reaction assay for detection and quanti fi cation of norovirus (GI and GII) and sapovirus, (August 2013), 68–71. doi:10.1111/1348-0421.12107
42. Noel, J. S., Liu, B. L., Humphrey, C. D., Rodriguez, E. M., Lambden, P. R., Clarke, I. N., Monroe, S. S. (1997). Parkville Virus : A Novel Genetic Variant of Human Calicivirus in the Sapporo Virus Clade , Associated With an Outbreak of Gastroenteritis in Adults, 178(January), 173–178.

43. Oka T, Katayama K, Ogawa S, *et al.* Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol.* 2005;79(12):7283-7290. doi:10.1128/JVI.79.12.7283-7290.2005.
44. Oka, T., Katayama, K., Hansman, G. S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F. Takeda, N. (2006). Detection of Human Sapovirus by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, 1353(May), 1347–1353. doi:10.1002/jmv
45. Oka T, Mori K, Iritani N, *et al.* Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol.* 2012;157(2):349-352. doi:10.1007/s00705-011-1161-2.
46. Okada, M., Shinozaki, K., Ogawa, T., & Kaiho, I. (2002). Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses Brief Report, 1445–1451. doi:10.1007/s00705-002-0821-7
47. Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K. Genetic variability in the sapovirus capsid protein. *Virus Genes.* 2006;33(2):157-161. doi:10.1007/s11262-005-0051-7.
48. Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Shinozaki K. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Arch Virol.* 2006;151(12):2503-2509. doi:10.1007/s00705-006-0820-1.
49. Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T. 2000. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 181(Suppl 2):S288–S294. <http://dx.doi.org/10.1086/315590>.

50. Pang, X. L., Preiksaitis, J. K., & Lee, B. E. (2014). Enhanced Enteric Virus Detection in Sporadic Gastroenteritis Using a Multi-Target Real-Time PCR Panel: A One-Year Study, 1601(October 2013), 1594–1601. doi:10.1002/jmv
51. Phan *et al.*, 2004: Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *J Med Virol.* 2004; 73(2): 256 - 261.
52. Phan TG, Khamrin P, Quang TD, *et al.* Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infect Genet Evol.* 2007;7(4):542-546. doi:10.1016/j.meegid.2007.02.004.
53. Ramani S, Kang G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22:477-482. doi:10.1097/QCO.0b013e328330662f.
54. Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chiba S. 2001. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J* 20:849–853. <http://dx.doi.org/10.1097/00006454-200109000-00005>
55. Sala, M. R., Broner, S., Moreno, A., Arias, C., Godoy, P., Minguell, S., Dom, A. (2013). Cases of acute gastroenteritis due to calicivirus in outbreaks: clinical differences by age and aetiological agent.

56. Schwab KS, Shaw RD. Viruses. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1993;7(2):307-331.
57. Schuffenecker, I., Ando, T., Thouvenot, D., Lina, B., Aymard, M., Claude, U., & Lyon, B. (2001). Genetic classification of “ Sapporo-like viruses ”, 2115–2132.
58. Soli, K. W., Maure, T., Kas, M. P., Bande, G., Bebes, S., Luang-suarkia, D., Horwood, P. F. (2014). International Journal of Infectious Diseases Detection of enteric viral and bacterial pathogens associated with paediatric diarrhoea in Goroka , Papua New Guinea. International Journal of Infectious Diseases, 27, 54–58. doi:10.1016/j.ijid.2014.02.023
59. Soli KW, Maure T, Kas MP, *et al.* Detection of enteric viral and bacterial pathogens associated with paediatric diarrhoea in Goroka, Papua New Guinea. *Int J Infect Dis.* 2014;27:54-58. doi:10.1016/j.ijid.2014.02.023.v
60. Stals A, Mathijs E, Baert L, *et al.* Molecular Detection and Genotyping of Noroviruses. *Food Environ Virol.* 2012;4(4):153-167. doi:10.1007/s12560-012-9092-y.
61. Stucky BJ. SeqTrace : A Graphical Tool for Rapidly Processing DNA Sequencing Chromatograms. 2012:90-93. doi:10.7171/jbt.12-2303-004.
62. Ueki, Y., Shoji, M., Okimura, Y., Miyota, Y., Masago, Y., Oka, T., Omura, T. (2010). Detection of Sapovirus in oysters, (May), 483–486. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00239.x

63. Usuku S, Kumazaki M. A Gastroenteritis Outbreak Attributed to Sapovirus Genogroup V in Yokohama , Japan. 2014;(June 2010):411-412.
64. Vesikari T, Ruuska T, Green KY, Flores J, Kapikian AZ. .Pediatr Infect Dis J.1992 Jul;11(7):535-42. Protective efficacy against serotype 1 rotavirus diarrhea by live oral rhesus-human reassortant rotavirus vaccines with human rotavirus VP7 serotype 1 or 2 specificity.
65. Vesikari T1, Ruuska T, Koivu HP, Green KY, Flores J, Kapikian AZ. Evaluation of the M37 human rotavirus vaccine in 2- to 6-month-old infants. Pediatr Infect Dis J. 1991 Dec;10(12):912-7.
66. Vesikari T.. Clinical trials of live oral rotavirus vaccines: the Finnish experience. Vaccine. 1993;11(2):255-61.
67. Vinjé J, Deijl H, van der Heide R, et al. Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. J Clin Microbiol. 2000;38(2):530-536.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=86140&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
68. Wang, G., Shen, Z., Qian, F., Li, Y., Yuan, Z., & Zhang, J. (2014). Genetic diversity of sapovirus in non-hospitalized adults with sporadic cases of acute gastroenteritis in Shanghai , China. Journal of Clinical Virology, 59(4), 250–254. doi:10.1016/j.jcv.2014.01.007

69. A., Saikruang, W., & Khamrin, P. (2014). Detection of diarrheal viruses circulating in adult patients in Thailand, (181), 20–24.
doi:10.1007/s00705-014-2191-3

Anexos

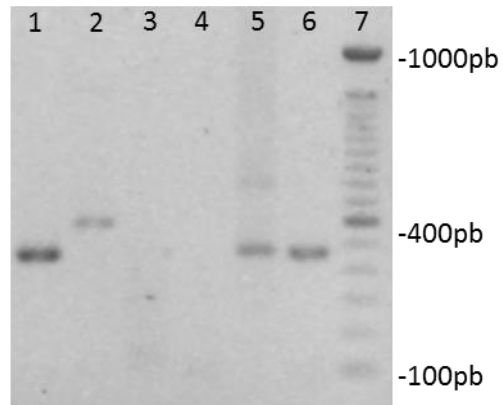
Anexo 1.- Sistema de puntaje y parámetros del Índice de Severidad de Vesikari

Parámetro	Puntaje		
	1	2	3
Diarrea			
• Máximo número de deposiciones por día	1 a 3	4 a 5	≥6
• Duración de diarrea	1 a 4	5	≥6
Vómito			
• Máximo número de vómitos por día	1	2 a 4	≥5
• Duración del vómito	1	2	≥3
• Temperatura	37.1-38.4	38.5-38.9	≥39.0
• Deshidratación	N/A	1-5%	≥6%
• Tratamiento	Rehidratación	Hospitalización	N/A

Anexo 2.- Categoría de Severidad según puntaje en el sistema de puntaje

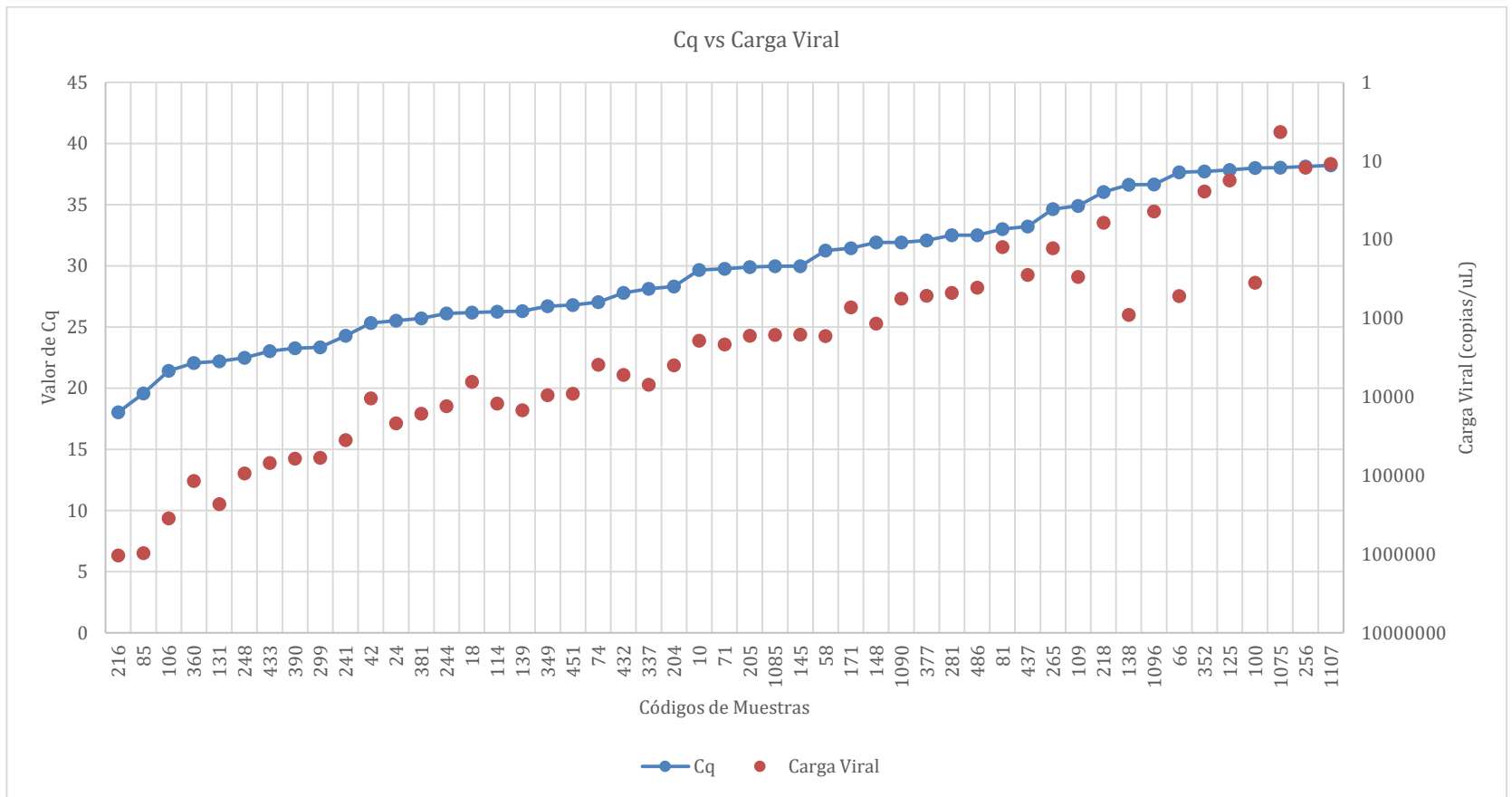
Categoría de Severidad			
Leve	Moderado	Severo	Puntaje Máximo
<7	7 a 10	≥11	20

Anexo A3 Gel de electroforesis del producto interno del PCR anidado de 400pb aproximadamente



Carril 1-5-6: muestra positiva , carril 2; muestra positiva , carril 3: control negativo, carril 4: muestra negativa,

Anexo A4 Relación de los valores de Cq con la carga viral de las muestras Sapovirus positivas mediante PCR tiempo real

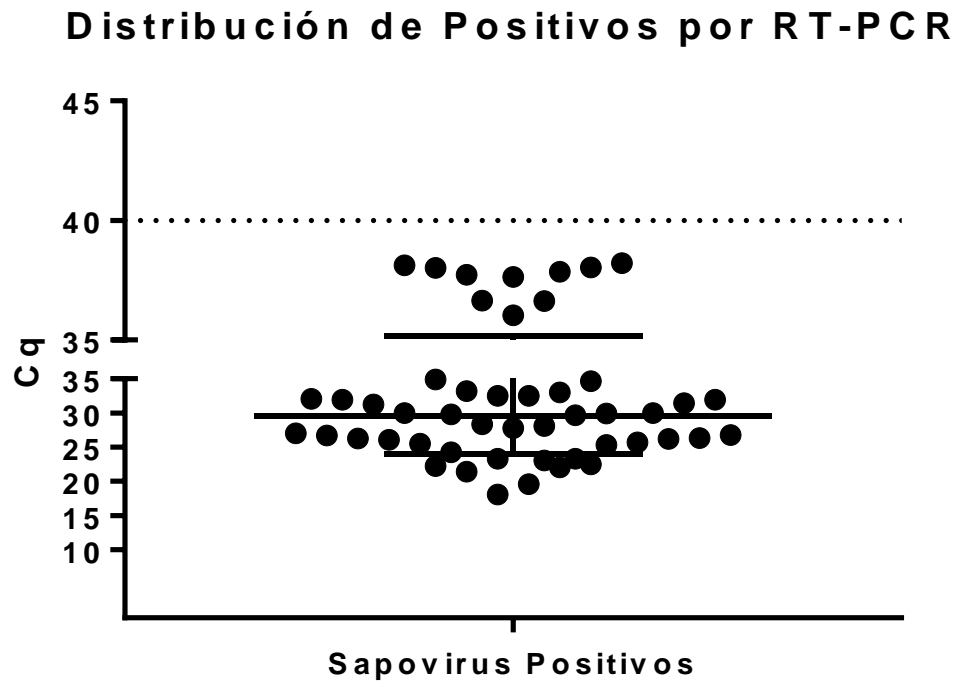


Anexo A5 Tabla de Contingencia con la concordancia en la detección de Sapovirus de la prueba de PCR en tiempo Real, y la Prueba de PCR convencional (n=622)

		Tiempo real	
		POS	NEG
PCR Convencional	POS	43	7
	NEG	6	566

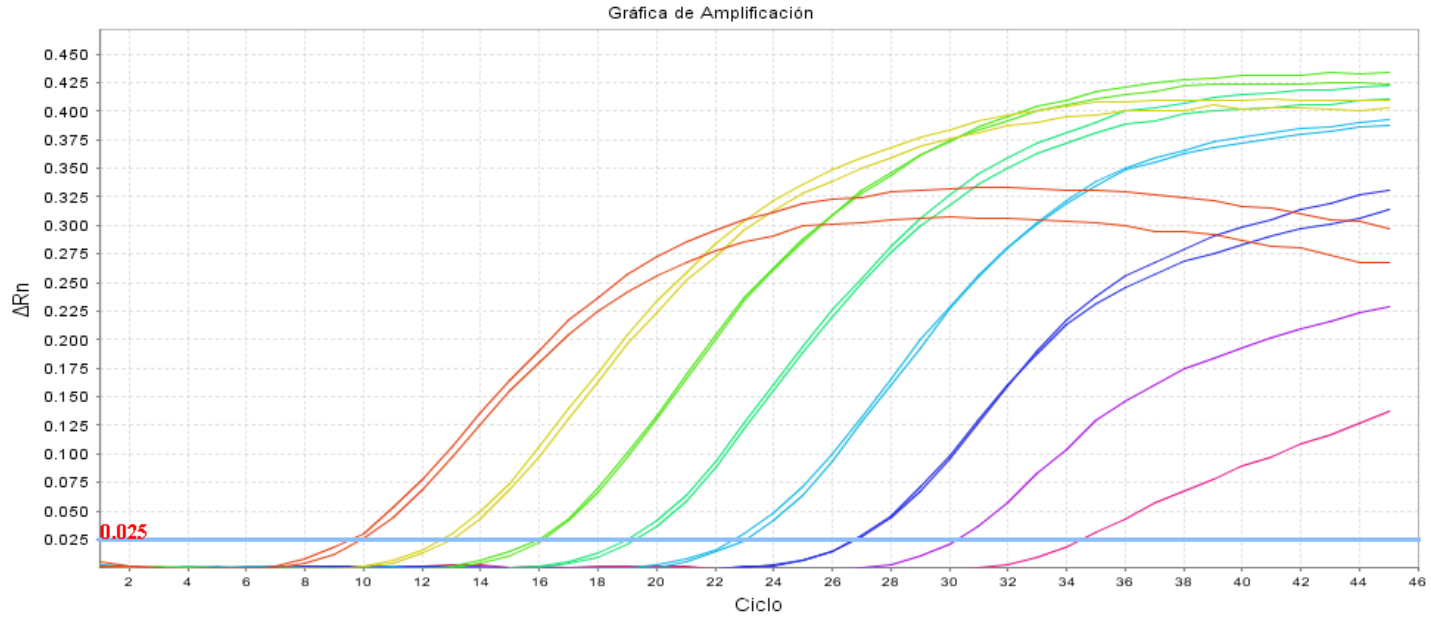
El índice Kappa obtenido es de 0.857- que indica una concordancia muy buena entre pruebas

Anexo A6 Distribución de los casos Sapovirus positivos según valor de Cq



De las 49 muestras detectadas como positivas 39 tuvieron un valor de Cq<35

Anexo A7 Curvas de amplificación de la Curva Estándar.



En rojo el valor de 10^8 hasta llegar a la curva fucsia correspondiente a 10^1 , 0.025 es umbral que se determinó para cada placa que se utilizó en el ensayo