

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA “ALBERTO
CAZORLA TALLERI”**



**EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS DE
FUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA
DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE LOS
GENOGRUPOS HUMANOS DE SAPOVIRUS**

Alexandra Prado Mantilla

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

Lima - Perú

2017

Asesor:

Holger Mayta Malpartida, MSc, PhD

Jurado Calificador:

Presidente: Manuela Verástegui Pimentel, PhD

Vocal: Patricia Sheen Cortavarria, PhD

Secretario: Ana Colarossi Salinas, MSc

DEDICATORIA

A mi padre por inspirarme a seguir el fascinante y complejo
mundo de la ciencia

A mi madre y hermanos que con su apoyo incondicional me
motivan a entregar lo mejor de mí

Alexandra

AGRADECIMIENTOS

A mi querida familia por su aliento y comprensión en toda las etapas de la vida universitaria y en este tramo final.

Al Dr. Holger Mayta, por su guía en este proceso y sus consejos que fueron imprescindibles para lograr los objetivos de esta tesis.

Al Laboratorio de Virología Molecular y Nanopartículas por brindarme la infraestructura y equipos necesarios para realizar mi tesis.

A mis amigos colegas Jorge Fernández, María Claudia Villegas y Noelia Coronado por brindarme su apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A Carmen Puemape por su aporte en el procesamiento de la base de datos de las muestras del estudio, y a Rocío Cabrera por su labor administrativa en el proyecto.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada como parte del proyecto “Hacia el Desarrollo de Pruebas Rápidas para la Detección de Sapovirus. Etapa I: Identificación de Genogrupos y Diseño de Partículas Tipo Virus (Viral Like Particles- VLPs)” por CIENCIACTIVA contrato N° 110-2015- FONDECYT.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
Introducción	1
CAPÍTULO II	7
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
2.1 Hipótesis	7
2.2 Objetivos	7
2.2.1 Objetivo general:	7
2.2.2 Objetivos específicos:	7
CAPÍTULO III	8
Materiales y Métodos	8
3.1 Muestras clínicas	8
3.2 Diseño de estudio	8
3.3 Extracción de RNA y transcripción reversa	9
3.4 PCR en Tiempo Real	12
3.5 PCR convencional	12
3.6 Secuenciamiento	13
3.7 Generación de plásmidos de referencia	13
3.8 Diseño de primers para el ensayo de fusión de alta resolución	14
3.9 Ensayo de fusión de alta resolución	15
3.10 Detección de genogrupos de sapovirus	18
3.11 Normalización de los datos de temperatura de fusión	19
3.12 Curva de calibración para la genotipificación de sapovirus	19
3.13 Detección de la reactividad cruzada de la técnica	20

3.14 Detección de coinfección inter-genogrupo de sapovirus	20
CAPÍTULO IV.....	21
Resultados.....	21
4.1 Generación de plásmidos de referencia	21
4.2 Detección de genogrupos de sapovirus.....	22
4.3 Detección de la reactividad cruzada de la técnica	36
4.4 Detección de coinfección inter-genogrupo de sapovirus	36
CAPÍTULO V.....	37
Discusión	37
CAPÍTULO VI.....	45
Conclusiones	45
Recomendaciones	46
CAPÍTULO VII.....	47
Referencias Bibliográficas	47
Anexos.....	53
Anexo 1. Valor de las temperaturas de fusión de GI y GII y sus desviaciones estándar dependiendo del genotipo	53

Abreviaciones

HRM: Fusión de alta resolución

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

cDNA: DNA complementario o DNA copia

ORF: Marcos abiertos de lectura

RdRp: RNA polimerasa RNA-dependiente

VP1, VP2: Proteína viral 1, Proteína viral 2

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

AW1, AW2: Buffer de lavado 1, buffer de lavado 2

IPTG: Isopropiltio- β -D-galactósido

bp: Pares de bases

Ct: Ciclo umbral que es inversamente proporcional a la carga viral

Tm: Temperatura de fusión, temperatura a la que el 50% de DNA esta denaturado.

Tm1, Tm2: Primer pico de fusión, segundo pico de fusión de la curva de fusión

(+)ssRNA: RNA de cadena simple de sentido positivo

Abstract

Introduction: After the introduction of rotavirus vaccine, sapovirus has emerged as one of the major causes of viral acute gastroenteritis especially among children under 5 years old. Sapovirus diagnosis is currently made by real time PCR; while the gold standard for genotyping is PCR and sequencing. However, in certain countries the access to sequencing is limited and expensive. Therefore, new and simple techniques need to be explored.

Objective: The aim of this study was to detect and differentiate human sapovirus genogroups using high resolution melting technique and compare it to sequencing analysis.

Materials and methods: The detection of sapovirus was performed by qPCR in stool samples. Positive samples were analyzed using nested PCR and the amplification products were sequenced. One sample of each genogroup was cloned in the pCR 2.1 TOPO vector to standardize the HRM technique. These plasmids were used as the reference curve of each genogroup. The technique was tested using 3 different primer sets to find the most noticeable difference among the melting curves of the genogroups. A total of 80 samples were used to standardize the technique, and 25 samples to perform a blind assay.

Results: One sample of each genogroups of sapovirus was successfully cloned and the HRM standardization was achieved. HRM was able to detect the 93.3% of samples of GI, 92.6% of GII, 94% of GIV and 83.3% of GV. While the percentage of correctly genotyped samples of GII, GIV and GV was 100%, and 96.4% of GI. In addition, the technique did not show cross-reactivity with others enteric viruses.

Conclusions: The high resolution melting technique has the ability to identify and differentiate sapovirus genogroups, and to detect inter-genogroup coinfections with GII and other sapovirus genogroups.

Keywords: Sapovirus, gastroenteritis, genotyping, cloning, high resolution melting.

Resumen

Introducción: Luego de la introducción de la vacuna de rotavirus, sapovirus ha emergido como una de las mayores causas de gastroenteritis viral especialmente en niños menores de 5 años. Actualmente, el diagnóstico de sapovirus se realiza mediante qPCR, y su tipificación se hace por secuenciamiento. Sin embargo, el acceso a secuenciamiento es limitado y costoso. Por lo tanto, es necesario explorar nuevas técnicas de tipificación.

Objetivo: Detectar y genotipificar los genogrupos humanos de sapovirus empleando la técnica de fusión de alta resolución comparándolos con el análisis de secuenciamiento.

Materiales y métodos: La detección de sapovirus fue realizada mediante qPCR en muestras de heces. Las muestras positivas se analizaron mediante PCR anidado y el producto de amplificación fue secuenciado. Una muestra de cada genotipo fue clonada en el vector pCR 2.1 TOPO para estandarizar la técnica de HRM y ser usados como curva de referencia de cada genotipo. La técnica de HRM fue probada con 3 sets de primers para hallar las diferencias más notorias entre las curvas de fusión de los genotipos. Se analizaron 80 muestras para estandarizar la técnica y 25, para realizar un ensayo en ciego.

Resultados: Se logró clonar exitosamente los cuatro genogrupos de sapovirus y estandarizar la técnica de HRM. El porcentaje de muestras detectadas empleando HRM de GI fue del 93.3%; de GII, 92.6%; de GIV, 94% y de GV, 83.3%. El porcentaje de muestras amplificadas y correctamente identificadas por HRM fue del 100% de los genogrupos GII, GIV y GV; y 96.4% de GI. Además, la técnica no mostró reacciones cruzadas con otros virus entéricos.

Conclusiones: La técnica de fusión de alta resolución permite identificar y diferenciar el genotipo de sapovirus de muestras de heces y detectar coinfecciones inter-grupo con GII y otro genotipo de sapovirus.

Palabras Clave: Sapovirus, gastroenteritis, genotipificación, clonación, fusión de alta resolución

CAPÍTULO I

Introducción

Las enfermedades diarreicas son un serio problema mundial para la salud pública debido a los problemas que puede causar en poblaciones vulnerables, como personas desnutridas, inmuno-suprimidas, ancianos y niños (Clark & McKendrick, 2004; Gustavsson *et al.*, 2011), incluso llegando a ser mortales. Anualmente se reportan 1.7 billones de episodios de diarreas, y 760 000 muertes de niños menores de 5 años debido a esta causa. En tal sentido, la gastroenteritis aguda es considerada como la segunda causa más importante de muerte debido a infecciones entre niños de este rango de edades en todo el mundo (World Health Organization, 2013).

Los agentes etiológicos causantes de gastroenteritis incluyen una variedad de bacterias, virus y parásitos y su frecuencia puede variar de una región a otra (Chao *et al.*, 2006; Jansen *et al.*, 2008; Karsten *et al.*, 2009). Estos enteropatógenos pueden ser rápidamente identificados, en un lapso de algunas horas, gracias a técnicas moleculares que permiten realizar estudios epidemiológicos para revelar la distribución de dichos agentes etiológicos. Los enteropatógenos virales más prevalentes son rotavirus y norovirus. Sin embargo, debido a la introducción de la vacuna contra rotavirus, las infecciones por norovirus se han visto incrementadas (Chen *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015), y se ha convertido en el virus con mayor prevalencia en países en vías de desarrollo (Platts-Mills *et al.*, 2015). Así mismo, otros virus como sapovirus emergieron, llegando a ser el más prevalente en 93 brotes de gastroenteritis norovirus-negativo en Estados Unidos (Lee *et al.*, 2012).

Sapovirus es un virus de RNA perteneciente a la familia *Caliciviridae* causante de gastroenteritis aguda en humanos y animales. Su denominación se debe a que fue descubierto por primera vez luego de un brote de gastroenteritis en 1977 en un grupo de niños en un orfanato de Sapporo en Japón (Chiba *et al.*,

1980). Su genoma de 7.1 a 7.7 kb de tamaño, consiste en una cadena simple de RNA de sentido positivo y está organizado en 2 ORFs. El ORF1 codifica una poliproteína larga que contiene proteínas no estructurales, siendo la última la proteína RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp), seguidas de la proteína de cápside mayor VP1; mientras que ORF2 codifica la proteína estructural VP2 (Figura 1; Chang *et al.*, 2005). Según el secuenciamiento completo de VP1, que es la región más diversa del genoma (Katayama *et al.*, 2004), sapovirus se divide en 5 genogrupos que van de GI a GV (Farkas *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2012). Los sapovirus que afectan a humanos pertenecen a los genogrupos GI, GII, GIV y GV. Los genogrupos GI y GII se dividen en 7 genotipos cada uno, GIV tiene un solo genotipo; mientras que GV se subdivide en 2 genotipos. Cepas de sapovirus similares a las encontradas en muestras clínicas de humanos también se encontraron en aguas residuales, ostras y almejas; sin embargo, no fueron encontradas en otros animales como cerdos, visones, murciélagos, perros y lobos marinos, los cuales si se ven afectados por otros genotipos de sapovirus.

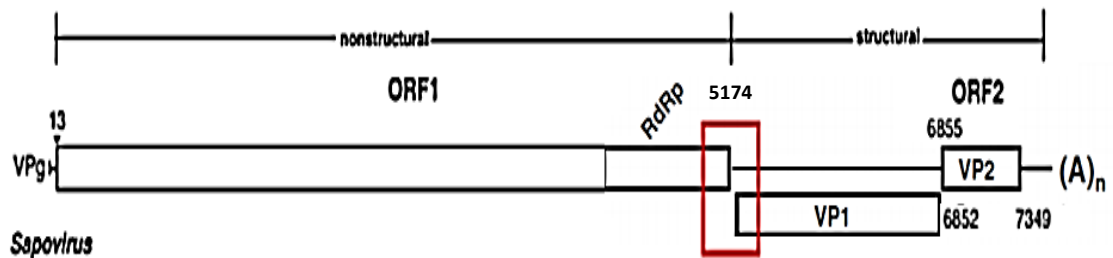


Figura 1. Esquema de la organización genómica de sapovirus. El recuadro en rojo indica la región de unión de la proteína no estructural RdRp y la VP1 (5074 bp – 5265 bp).

Se han reportado brotes y casos esporádicos de sapovirus en todo el mundo con diversas tasas de prevalencia dependiendo de su distribución geográfica. En Hungría, el 25% de muestras de un brote de gastroenteritis fueron causadas por sapovirus (Pankovics *et al.*, 2009). En Filipinas, el 7% de 417 niños

menores de 5 años estuvieron infectados por sapovirus (Liu *et al.*, 2015). En Australia, el 4.1% de muestras de 95 niños con gastroenteritis fueron causadas por el mismo virus (Hansman *et al.*, 2006). En China, en un estudio realizado en niños con gastroenteritis, la tasa de sapovirus de 277 muestras fue del 1.89% (Ren *et al.*, 2013). Mientras que en Irán, de 5 de 42 muestras resultaron positivas a sapovirus, siendo GI.2 el más predominante (Romani *et al.*, 2012). Además, ciertos estudios demuestran que el incremento de brotes de sapovirus está relacionado con la prevalencia del genotipo GI.2. Del total de brotes de sapovirus, el 58% en Holanda, el 27% en Suecia, el 40% en Eslovenia y el 100% en Hungría (Svraka *et al.*, 2010) fueron causados por GI.2.

Los estudios realizados sobre sapovirus en Latinoamérica son limitados. En Nicaragua, de 292 niños analizados, 33 (11%) estuvieron infectados con sapovirus (Bucardo *et al.*, 2012). En un hospital de niños en México, de 414 muestras de niños menores de 5 años con gastroenteritis aguda, sólo 4 estuvieron infectadas con sapovirus (Gómez-Santiago *et al.*, 2012). Mientras que en un centro urbano de Brasil, sólo una del total de 139 muestras de heces de niños menores de 3 años, fue positiva para sapovirus (Xavier *et al.*, 2009). En el Perú, un estudio realizado en una comunidad periurbana, demuestra que la tasa de detección de sapovirus en niños sintomáticos es de 12.4% (Liu *et al.*, 2016).

Hasta el momento no se ha desarrollado un sistema eficiente de cultivo celular para sapovirus que afectan a humanos, y los inmuno-ensayos desarrollados no han sido apropiadamente sensibles para la detección de casos esporádicos (Lu *et al.*, 2016). Inicialmente, sapovirus era detectado en base a su morfología en muestras de heces empleando microscopía electrónica (Chiba *et al.*, 1980). Sin embargo, esta técnica es tediosa y tiene baja sensibilidad, requiriendo al menos 10^6 partículas virales por mililitro de muestra de heces (Caul *et al.*, 1982). Posteriormente, se diseñaron primers para RT-PCR anidado (Honma *et al.*, 2001; Okada *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2003). Este método a pesar de ser altamente sensible, tiene alto riesgo de sufrir contaminaciones.

El método más empleado actualmente para la detección molecular de sapovirus es la técnica RT-PCR en tiempo real. Este método se basa en la tecnología de la hidrólisis de la sonda Taqman y tiene una sensibilidad mayor al RT-PCR anidado, una especificidad del 100% y no muestra reacción cruzada con otros virus enteros patógenos (Oka *et al.*, 2006).

La genotipificación se basa en el secuenciamiento del producto de amplificación de un PCR anidado de la región N-terminal del gen de la cápside de sapovirus. En países en los que el acceso al secuenciamiento es limitado debido al escaso financiamiento y su alto costo, resulta más económico enviar las muestras al extranjero para ser secuenciadas. Sin embargo, este proceso en conjunto sigue siendo costoso (\$10 dólares por pocillo) y toma por lo menos una semana conocer los resultados del secuenciamiento.

Asimismo, para la tipificación de sapovirus, se ha descrito un RT-PCR convencional tipo multiplex que presenta una sensibilidad del 95% de muestras genotipificadas mediante secuenciamiento (Okada *et al.*, 2006). Esta técnica, sin embargo, solo sirve para la tipificación de muestras positivas con alta carga viral. Adicionalmente, al ser un PCR tipo anidado y requerir de electroforesis es propenso a contaminaciones. Sin embargo, existen nuevas técnicas de genotipificación que podrían resultar más económicas y se llevarían a cabo en menos tiempo.

La técnica de análisis de fusión de alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés "High Resolution Melting") es un análisis post-PCR que permite no solo detectar la presencia de una secuencia de DNA, si no también identificar variaciones de la secuencia amplificada, lo cual permite genotipificar directamente la secuencia amplificada. El análisis de HRM puede discriminar de acuerdo al contenido de GC, la longitud o complementariedad de las hebras de DNA. Incluso se pueden identificar cambios en una sola base tal como en los SNP. Esto es posible debido al uso de un colorante saturante que se une completamente al DNA de doble cadena. Al hacerlo emite una fluorescencia que va disminuyendo al incrementar la temperatura a una gradiente

determinada, lo cual crea un patrón de disociación o curva de fusión (Arthofer *et al.*, 2011).

El método HRM se basa en la detección de diferencias en las curvas de fusión de las hebras de DNA del amplicón. Por lo tanto, el proceso consiste en realizar una amplificación por PCR, seguida de una adquisición de las curvas de fusión y su análisis mediante un software que normaliza las curvas para una mejor distinción entre secuencias diferentes. Dadas las características mencionadas, esta técnica tiene aplicaciones como análisis de metilación, escaneo de mutaciones y genotipificación de amplicones. Entre más pequeño sea el amplicón, las curvas de fusión tendrán mejor resolución. Las ventajas de esta técnica son el bajo consumo de reactivos, la simplicidad y rapidez con la que se hace la genotipificación. Esto se debe a que el procedimiento de la fusión se realiza en el mismo equipo inmediatamente después de la amplificación de PCR. Por lo tanto, reduce los costos relacionados al secuenciamiento de los productos de amplificación (Dorak, 2006).

Debido a los beneficios del análisis de fusión de alta resolución, esta técnica ha sido empleada para la detección y diferenciación de virus, tales como norovirus, con una sensibilidad de detección de 10 copias/reacción y un 100% de muestras genotipificadas (Tajiri-Utagawa *et al.*, 2009); astrovirus, cuya sensibilidad de detección fue de 10 copias/reacción, pero requiere 10^3 copias/reacción para realizar una correcta genotipificación (Hata *et al.*, 2014); mutaciones de UL97 de citomegalovirus que le confieren resistencia a ganciclovir, donde muestras de hasta 10 copias/ml fueron amplificadas y el número de copias mínimo necesario para la genotipificación fue de 10^3 copias/ml (Zhao *et al.*, 2012); papiloma virus humano, donde el 85% de las muestras fueron amplificadas por HRM, siendo capaz de genotipificar correctamente el 91% de estas muestras detectadas (Lee *et al.*, 2012). Por lo tanto, esta técnica ha mostrado tener una alta sensibilidad por lo que podría ser una herramienta útil para la detección y genotipificación de sapovirus.

En el presente estudio se emplean tres sets de primers para hallar los primers óptimos para la estandarización de la técnica. Los resultados por el ensayo de fusión de alta resolución fueron comparados a muestras positivas a qPCR, cuyo genotipo fue hallado por secuenciamiento. El objetivo de este trabajo es evaluar el método de análisis de fusión de alta resolución para la detección y diferenciación de los genogrupos humanos de sapovirus empleando muestras clínicas de niños peruanos con gastroenteritis aguda.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El método de análisis de fusión de alta resolución permite la detección y diferenciación de los genogrupos humanos de sapovirus.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general:

Detectar y genotipificar los genogrupos humanos de sapovirus (GI, GII, GIV y GV) empleando la técnica de fusión de alta resolución.

2.2.2 Objetivos específicos:

- Generar plásmidos de referencia de cada genogrupo de sapovirus a evaluar (GI, GII, GIV y GV) mediante la técnica de clonamiento.
- Estandarizar la técnica de fusión de alta resolución empleando diferentes sets de primers para detectar y genotipificar sapovirus.
- Hallar el porcentaje de muestras de sapovirus amplificadas y correctamente genotipificadas del ensayo de fusión de alta resolución para la detección de sapovirus.
- Hallar la reactividad cruzada de la técnica de fusión de alta resolución.
- Hallar la capacidad del ensayo de detectar coinfecciones inter-genogrupo de Sapovirus

CAPÍTULO III

Materiales y Métodos

3.1 Muestras clínicas

Las muestras de heces de niños menores de 5 años que presentaron gastroenteritis aguda en una comunidad de San Juan de Miraflores, fueron proporcionadas por el laboratorio de Virología Molecular (Laboratorios de Investigación y Desarrollo). Dichas muestras provinieron de un estudio realizado anteriormente código SIDISI 50347, el cual fue previamente aprobado por el Comité Institucional de Ética para Humanos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código: 66542) y cuenta con consentimiento informado para la utilización de muestras.

Para la estandarización del análisis de fusión de alta resolución, se empleó un total de 80 muestras positivas a sapovirus por PCR en tiempo real que fueron secuenciadas previamente: 30 muestras del genogrupo GI, 27 del genogrupo GII, 17 del genogrupo GIV y 6 del genogrupo GV; y 25 muestras para el ensayo en ciego: 10 muestras del genogrupo GI, 8 del genogrupo GII, 5 del genogrupo GIV y 2 del genogrupo GV. Además, se utilizaron 10 muestras de norovirus y 10 de astrovirus para determinar la reactividad cruzada de la técnica.

A partir de las muestras se preparó una suspensión del 10%, para ello se tomó aproximadamente 0.1 gr de la muestra y se completó a 1 ml con PBS. Las muestras preparadas se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.2 Diseño de estudio

En la Figura 2 se muestra el flujograma que describe los procedimientos realizados para la obtención del genotipo de las muestras, la generación de plásmidos y la estandarización del ensayo de fusión de alta

resolución. Brevemente, a partir de muestras positivas para sapovirus cuyo genotipo fue identificado por secuenciamiento se generaron plásmidos de cada genogrupo. Estos plásmidos sirvieron como referencia del patrón de curva de cada genogrupo. La estandarización de la técnica se realizó probando tres sets de primers para la detección y genotipificación de la técnica. Una vez estandarizada la técnica se normalizaron los datos de T_m , se realizó un ensayo en ciego y se probó la reactividad cruzada de la técnica. En la Figura 3 se muestra un esquema de la ubicación de todos los primers empleados en el estudio.

3.3 Extracción de RNA y transcripción reversa

Para realizar la extracción del RNA viral se empleó el minikit QIAamp viral RNA (Qiagen, Alemania). El procedimiento se realizó según el método previamente estandarizado por nuestro laboratorio (Apaza *et al.*, 2012). La dilución de la muestra se centrifugó por 10 min a 20,000 g. La extracción se realizó empleando 140 μ l del sobrenadante de la muestra y 560 μ l de buffer AVL que contiene carrier RNA, la mezcla se incubó por 10 min. Se adicionaron 560 μ l de etanol absoluto y se centrifugó brevemente. Un total de 630 μ l de esta solución se transvasaron a una columna de purificación y se centrifugó por 1 min a 6,000 g. La columna se lavó con 500 μ l de buffer AW1 y se centrifugó por 1 min a 6,000 g. Luego, se lavó con el buffer AW2 y se centrifugó a 20,000 g por 3 min. El RNA adherido a la columna se eluyó con 70 μ l de buffer AVE. Posteriormente, se procedió a convertir el RNA en cDNA empleando el kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Estado Unidos) según las instrucciones del fabricante. Para ello, se empleó 1 μ l de 250 η g random primers, 1 μ l de 10mM dNTP, 1 μ l de agua libre de nucleasas y 7 μ l de RNA de la muestra. Esta mezcla se incubó a 65°C por 5 min y posteriormente en hielo por 1 min, luego de la incubación se añadió 4 μ l de 5X First-Strand Buffer, 1 μ l de 0.1M DTT, 1 μ l de RNaseOUT y 1 μ l de

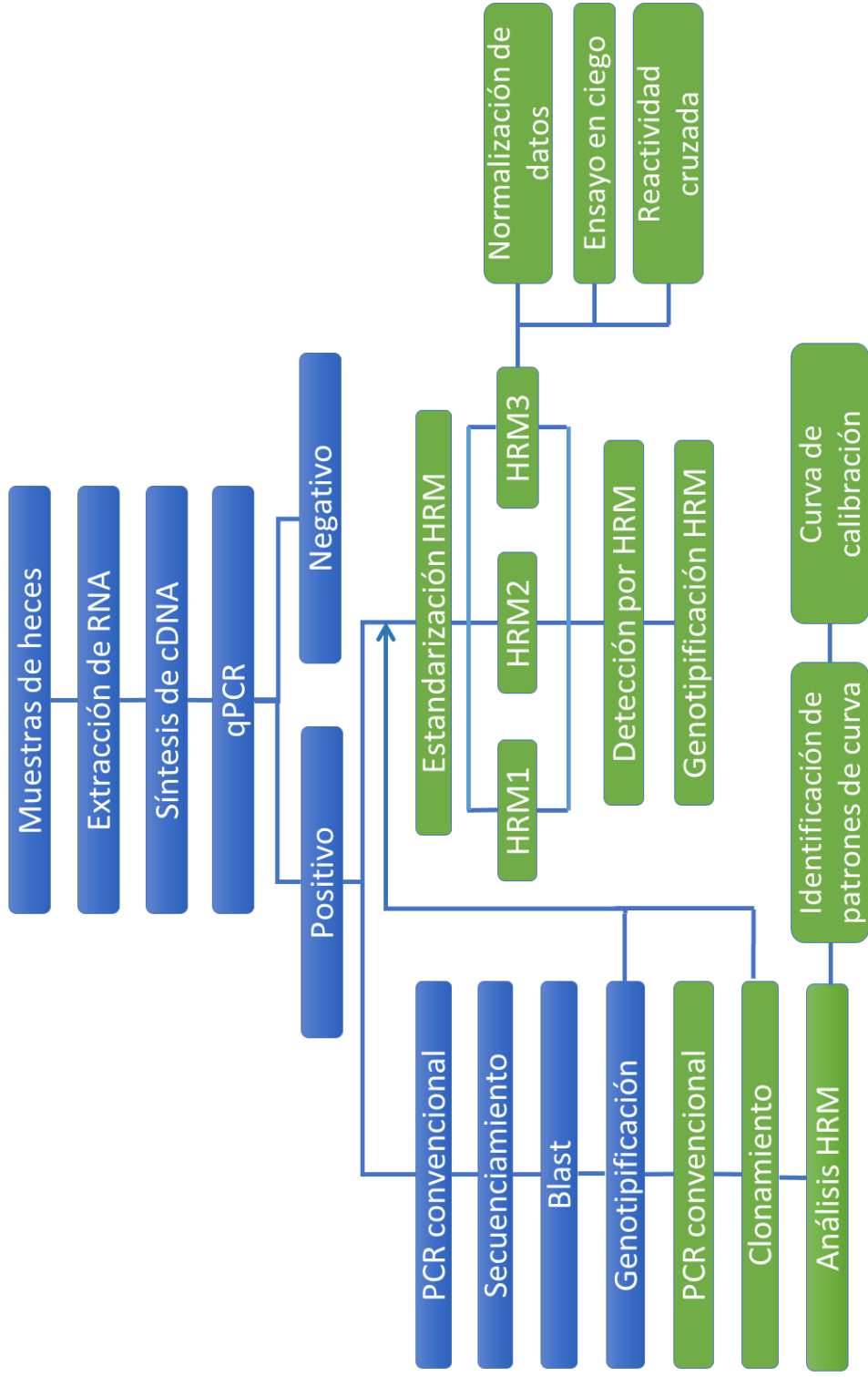


Figura 2. Flujo grama de la metodología empleada en el estudio. Los recuadros en azul indican los pasos previos a conocer el genotipo de la muestra realizados en conjunto con el equipo del laboratorio. Los recuadros en verde representan la generación de plásmidos y la estandarización de la técnica

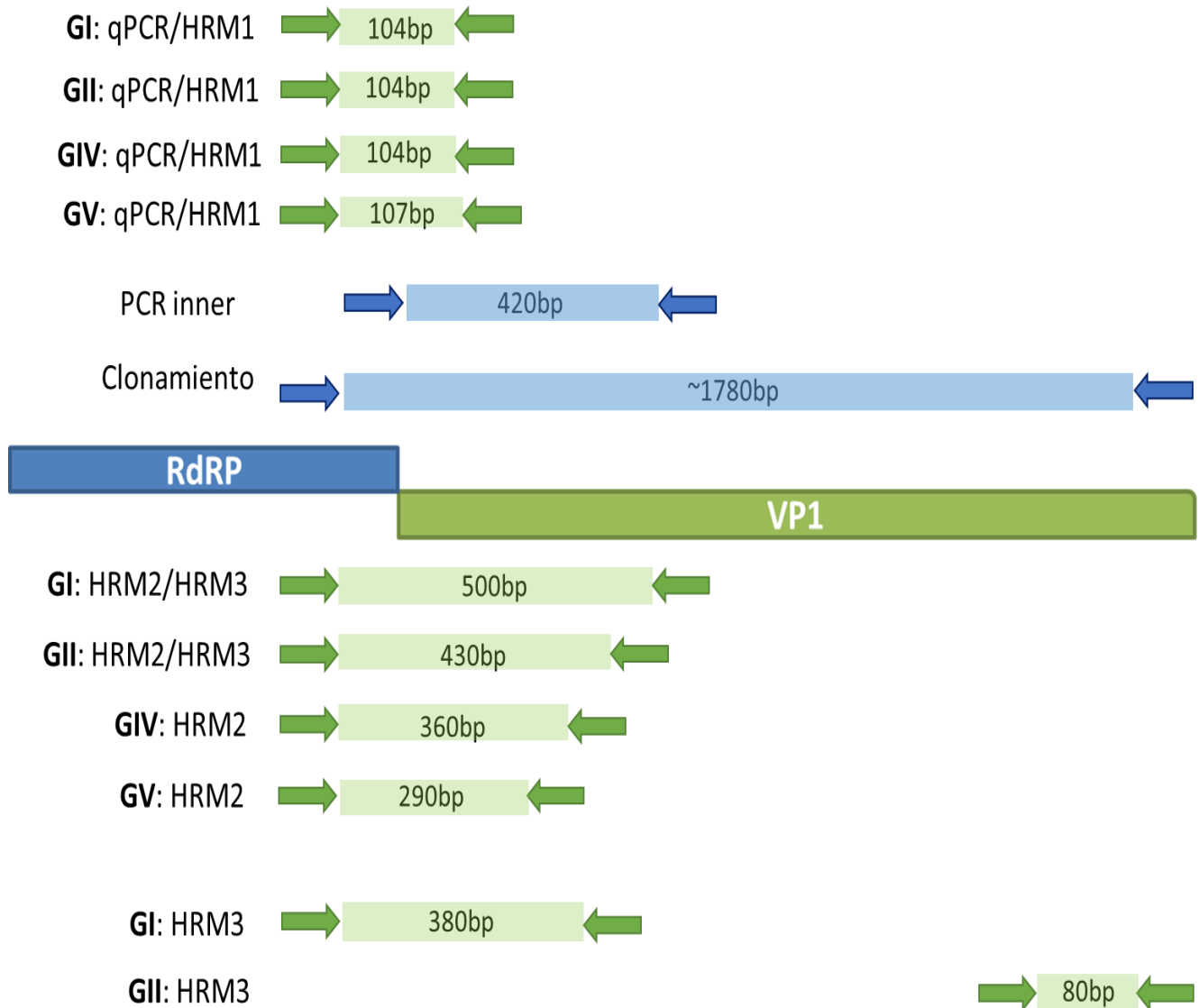


Figura 3. Esquema de la ubicación en el genoma de sapovirus de todos los primers empleados en el estudio. Los primers en verde son los empleados en los diferentes set de primers para la estandarización del ensayo de fusión de alta resolución. Los números indican el tamaño aproximado del producto de amplificación correspondiente a cada genogrupo. *Los primers empleados para la generación de plásmidos fueron específicos para cada genogrupo; sin embargo, en el esquema se hizo una aproximación del tamaño promedio de todos los amplicones que abarcaron toda la VP1.

agua libre de nucleasas y 7 μ l de RNA de la muestra. Esta mezcla se incubó a 65°C por 5 min y posteriormente en hielo por 1 min, luego de la incubación se añadió 4 μ l de 5X First-Strand Buffer, 1 μ l de 0.1M DTT, 1 μ l de RNaseOUT y 1 μ l de SuperScript III RT (200 units/ μ l). Se incubó a 25°C por 5 min, 50°C por 30 min y finalmente, para inactivar la reacción se subió la temperatura a 70°C por 15 min.

3.4 PCR en Tiempo Real

El PCR en tiempo real fue realizado en el equipo LightCycler 480 para detectar las muestras positivas para sapovirus y cuantificar la carga viral de las muestras. La reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l que consistió de 400 η M de cada primer SaV124F, SaV1F, SaV5F y SaV1245R, 500 η M de cada sonda TaqMan (Sonda SaV5TP y SaV124TP), 5 μ l de 2x TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) y 1 μ l de cDNA. El ciclado se realizó de la siguiente manera: 95 °C por 20 s, seguido de 55 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, y finalmente, 40°C por 1 min. (Oka et al., 2006).

3.5 PCR convencional

Las muestras que resultaron positivas a PCR en tiempo real fueron amplificadas mediante PCR anidado. El volumen final de la reacción fue de 20 μ l, que consistió de 5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 500 η M de los primers externos directos F13/F14 y reversos R13/R14, 0.05 unidades/ μ l de Taq Platinum y 1 μ l de cDNA. A partir del outer se amplificó el inner empleando los primers internos F22/R2. Las condiciones del PCR fueron las mismas para ambas corridas: 94°C por 2 min, y 45 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 30 s y 72°C por 45 s. (Okada *et al.*, 2006).

3.6 Secuenciamiento

Los amplicones generados por PCR convencional fueron enviados para secuenciamiento a la compañía MacroGen (Maryland, Estados Unidos). Los resultados de secuenciamiento se analizaron mediante Blast en NCBI comparando las secuencias muestra con secuencias de referencia de sapovirus obtenidas del GenBank. De esta manera, se obtuvo el genotipo de sapovirus perteneciente a cada muestra.

3.7 Generación de plásmidos de referencia

Debido a que se deseaba conocer el patrón de curva de fusión específico para cada genotipo de sapovirus y que era necesario tener estos patrones estándar en cada corrida, se construyeron plásmidos de cada genogrupo que fueron empleados para optimizar la técnica. Se seleccionaron 4 muestras de heces positivas a los genogrupos GI, GII, GIV y GV, y se amplificó la secuencia de inserción por PCR convencional empleando el primer directo SaV124F para todos los genotipos y los primers reversos G1RJ, G2RJ, G4RJ y G5RJ, respectivamente en reacciones separadas. El volumen total de reacción fue de 25 μ l y se compuso de 3 μ l de cDNA de la muestra, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 0.05 unidades/ μ l de Taq Platinum, y 500 nM de cada primer. Las condiciones del ciclado fueron las siguientes: 95°C por 1 min, 39 ciclos de 95°C por 15 s, 57°C por 15 s y 72°C por 1:30 min, y una extensión final de 72°C por 7 min. Estos productos fueron clonados en el vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se purificó el producto de PCR y se incubó con el vector durante 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se transformaron cepas de *E. coli* DH5- α químicamente competentes con el plásmido obtenido mediante shock térmico. Estas bacterias fueron sembradas en medio con kanamicina (50 μ g/ml), Bluo-gal (100 μ g/ml) e IPTG (40 μ g/ml). La selección de las colonias

recombinantes se hizo mediante el cribado de colonias azules y blancas empleando como substrato BluO-gal e IPTG como inductor del gen lactosa. El plásmido recombinante se extrajo empleando el kit QIAprep spin miniprep (Qiagen, Alemania) según instrucciones del fabricante. De tal modo, las bacterias seleccionadas fueron sembradas en 2 ml de caldo Luria-Bertani (LB) e incubadas overnight. El caldo con bacterias fue centrifugado a 10,000 g por 5 min, el pellet obtenido se resuspendió en 250 µl de buffer P1, 250 µl de buffer P2 y 300 µl de buffer N3 y se centrifugó a 17,000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue colocado en una columna de sílica en la que el DNA plasmídico fue capturado y lavado añadiendo 500 µl de buffer PB y 750 µl de buffer PE. Por último, el DNA fue eluído en 50 µl de Buffer Elución. Para confirmar que las secuencias de interés se insertaron en el vector pCR 2.1 TOPO, se volvió a correr un PCR convencional empleando 1 µl de los plásmidos obtenidos. Finalmente, la presencia de los productos se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.8 Diseño de primers para el ensayo de fusión de alta resolución

Con la finalidad de amplificar secuencias conservadas para cada genogrupo y que puedan ser diferenciadas entre ellas mediante la técnica de fusión de alta resolución, se emplearon secuencias de cada genotipo de los genogrupos I y II de sapovirus de la revisión de Oka *et al.*, 2015, las cuales fueron empleadas para realizar un árbol filogenético para la genotipificación de sapovirus en base a la región completa de la VP1. Estas secuencias fueron alineadas empleando el software UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012) a fin de hallar las regiones más conservadas entre los diferentes genotipos de cada genogrupo. Estas secuencias conservadas fueron introducidas en el programa LightCycler Probe Design Software 2.0 (Roche Applied Science) para diseñar los primers que flanquean estas secuencias.

3.9 Ensayo de fusión de alta resolución

Se probaron 3 sets distintos de primers (HRM1, HRM2 y HRM3) para amplificar regiones de sapovirus que sean suficientemente distintas para ser diferenciadas según el patrón de fusión del genogrupo de la muestra empleando HRM. En todos los casos el volumen de reacción total fue de 20 μ l, el cual consistió de 2 μ l de cDNA, 10 μ l del master mix High Resolution Melting 2x (Roche), el cual contiene la tinción de HRM "Resolight". La primera prueba fue realizada con el set de primers HRM1 (Tabla 1), que se emplean para la detección y cuantificación de sapovirus mediante qPCR (Oka *et al.*, 2006). La reacción consistió de 2.5 mM de $MgCl_2$ y 500 η M de cada primer (SaV124F, SaV1F, SaV5F y SaV1245R), ver Tabla 2. Las condiciones de PCR para la adquisición de las curvas de HRM fueron las siguientes: preincubación de 95°C por 10 min, luego 45 ciclos de 95°C por 10 s, seguidos de un touchdown de 65°C a 53°C con un descenso de 0.5°C/ciclo por 15 s, y 72°C por 15 s. El análisis de fusión de las hebras de cDNA de doble cadena se realizó con un ciclo de 95°C por 60 s, 40°C por 60 s y un aumento de la temperatura de 65°C a 97°C a 0.07°C/s.

El segundo ensayo se realizó con primers genogrupo-específicos cuyos productos de diferentes tamaños fueron usados para la genotipificación de sapovirus por electroforesis (Okada *et al.*, 2006). Se emplearon 3.5 mM de $MgCl_2$, y 400 η M de cada primer del set HRM2 (Tabla 1). El ciclado del PCR consistió en 10 min de preincubación, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 10s, 63°C a 45°C con un descenso de 0.5°C/s por 20s y un retraso de 5 ciclos, y 72°C por 25 s. El ensayo de fusión se realizó con un ciclo de 95°C por 60 s, 40°C por 60 s y un aumento de la temperatura de 60°C a 97°C a 0.02°C/s.

Tabla 1. Sets de primers empleados para realizar tres ensayos diferentes de HRM. Los primers para la detección de Sapovirus GII del ensayo HRM3 que se realizaron en una reacción separada se encuentran subrayados.

Set de Primers	Genogrupo	Primer Directo	Primer Reverso	Producto
HRM1	GI	SaV124F/SaV1F	SaV1245R	104 bp
	GII	SaV124F	SaV1245R	104 bp
	GIV	SaV124F	SaV1245R	104 bp
	GV	SaV5F	SaV1245R	107 bp
HRM2	GI	F13	SaV1R	500 bp
	GII	F13	SaV2R	430 bp
	GIV	F13	SaV4 R	360 bp
	GV	F14	SaV5R	290 bp
HRM3	GI	F13	G1R HRM	380 bp
	<u>GII</u>	<u>G2F HRM</u>	<u>G2R HRM</u>	80 bp
	GIV	F13	SaV4R	360 bp
	GV	F14	SaV5R	290 bp

Tabla 2. Lista de primers empleados en el estudio. Los primers se emplearon para realizar el qPCR, clonamiento, PCR convencional y los diferentes ensayos de HRM que amplifican los diferentes genogrupos de sapovirus. ^aLas sondas están marcadas con 6-carboxifluoresceína (FAM) tinción reportera en el extremo 5' y con el quencher no fluorescente de unión al surco menor (NFQ-MGB).

Primer	Secuencia	Función	Blanco	Referenc.	
SaV124F	GAYCASGCTCTCGCYACCTAC	Directo	GI/GII/GIV	Oka et al., 2006	
SaV1F	TTGGCCCTCGCCACCTAC	Directo	GI		
SaV5F	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC	Directo	GV		
SaV1245R	CCCTCCATYTCAAACACTA	Reverso	GI/GII/GIV/GV	Okada et al., 2006	
SaV124TP ^a	CCRCCTATRAACCA	Sonda	GI/GII/GIV/GV		
SaV5TP ^a	TGCCACCAATGTACCA	Sonda	GI/GII/GIV/GV		
R13	GGTGANAYNCCATTKTCCAT	Outter Reverso	GI/GII/GIV/GV		
R14	GGTGAGMMYCCATTCTCCAT	Outter Reverso	GI/GII/GIV/GV		
F22	SMWAWTAGTGTTTGARATG	Inner Directo	GI/GII/GIV/GV		
R2	GWGGGRTCAACMCCWGGTGG	Inner Directo	GI/GII/GIV/GV		
F13	GAYYWGGCYCTCGCYACCTAC	Outter Directo	GI/GII/GIV		
SaV1R	CCCBGGTGGKAYGACAGAAG	Reverso	GI		
SaV2R	CCANCCAGCAAACATNGCRCT	Reverso	GII		
SaV4R	GCGTAGCAGATCCCAGATAA	Reverso	GIV		
F14	GAACAAGCTGTGGCATGCTAC	Outter Directo	GV		
SaV5R	TTGGAGGWTGTTGCTCCTGTG	Reverso	GV		
G1R HRM	TGTTGGGATGAAGCGATACAGA	Reverso	GI		Diseñado
G2F HRM	GTTGGACTTTTCCCCAAAGCA	Directo	GII		Diseñado
G2R HRM	CATTATTCTAGGAACCTGACGGC	Reverso	GII		Diseñado
G1RJ	TTATCTCGAGTCATTGGAACACCCGYTGGC	Reverso	GI	Diseñado	
G2RJ	CCCAAGCTTTTATTCAAGAAACCTGACGGC	Reverso	GII	Diseñado	
G4RJ	TCATTGGTAAACRCTTCTGCCTCGC	Reverso	GIV	Diseñado	
G5RJ	AATTCTCGAGTCATGACCAAGCAATTTGGGC	Reverso	GV	Diseñado	

En el último ensayo se empleó el set de primer HRM3, para el cual se diseñaron 2 primers (Tabla2), y uno que acortaba el producto del genogrupo GI. Para la amplificación de GIV y GV, se emplearon los mismos primers que en el set HRM2. Ambas reacciones consistieron de 3 mM de MgCl₂, y 300 nM de los primers para amplificar GI, GIV y GV (Tabla 1) o GII (GIIF HRM/GIIR HRM). El ciclaje del PCR para la detección de GI, GIV y GV se realizó de la siguiente manera: 95°C por 10 min, 45 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C a 45°C con un descenso de 0.5°C/s por 20 s y un retraso de 5 ciclos, y 72°C por 20 s. Mientras que el PCR para la detección de GII fue 95°C por 10 min, 35 ciclos de 95°C por 10 s, 62°C a 58°C con un descenso de 0.5°C/s por 15 s y un retraso de 5 ciclos, y 72°C por 15 s. El ensayo de fusión fue realizado inmediatamente después del PCR y fue el mismo para ambas reacciones: un ciclo de 95°C por 60 s y 40°C por 60 s y elevando la temperatura de 60°C a 97°C, con un incremento de 0.02°C/s para obtener los perfiles de fusión.

Se realizó un ensayo en ciego empleando los primers idóneos en un grupo de 25 muestras al azar (GI: 10, GII: 8, GIV: 5, GV: 2) para corroborar la utilidad de la técnica para genotipificar correctamente sapovirus.

3.10 Detección de genogrupos de sapovirus

Con la finalidad de identificar los diferentes genogrupos, los patrones de las curvas obtenidas del ensayo HRM fueron analizados en el software de análisis de fusión del LightCycler 480, el cual identifica cambios en la forma de las curvas para indicar polimorfismos en las secuencias. El software muestra las curvas de fusión, las cuales pueden ser normalizadas fijando el 0% (pre-melting) y el 100% de intensidad de fluorescencia (post-melting). En la gráfica de curvas de fusión normalizadas es posible cambiar la temperatura al punto en que todo el

DNA de doble cadena este completamente desnaturalizado. Con las curvas normalizadas, el software elabora una gráfica de “Picos de Fusión Normalizados”, producto de la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura, en la cual los picos o puntos más altos de cada curva característica indican la temperatura de fusión. Además, la aplicación “gene scanning” del programa de la máquina LightCycler480 muestra un “Gráfico de Diferencias”, en la cual se selecciona una curva de fusión como “línea base” o referencia, la cual es tomada como una línea en el eje x para mostrar las diferencias de otras curvas de fusión con respecto a la curva seleccionada. De esta manera se resaltan las diferencias en la forma de las curvas de fusión de cada muestra y es posible realizar la genotipificación de sapovirus (Wittwer *et al.*, 2003).

3.11 Normalización de los datos de temperatura de fusión

Se corrieron los diferentes genogrupos de sapovirus en distintas placas de HRM y cada una contaba con los plásmidos de referencia de cada genogrupo. La clasificación de las muestras según su valor de T_m se realizó restando este valor con el T_m de la curva de fusión de referencia de cada placa. A esta diferencia se le sumó el promedio de todos los valores de T_m de cada genogrupo de las diferentes placas.

3.12 Curva de calibración para la genotipificación de sapovirus

Se prepararon diluciones seriadas de 10^7 a 10^1 copias/reacción del plásmido del genogrupo GIV. Esta curva de calibración se empleó como referencia de la forma de los picos de fusión que pueden tener muestras que contengan diferentes cargas virales.

3.13 Detección de la reactividad cruzada de la técnica

Para hallar la reactividad cruzada de la técnica con respecto a otros virus entéricos, se corrieron por HRM 10 muestras de astrovirus y 10 muestras de norovirus otorgadas por el laboratorio (ninguna tuvo co-infección con sapovirus).

3.14 Detección de coinfección inter-genogrupo de sapovirus

A fin de determinar la capacidad de la prueba para detectar coinfecciones entre genogrupos, se mezclaron muestras de cDNA positivas a los diferentes genogrupos en un volumen de 1:1 para el análisis de las curvas adquiridas por HRM. Se emplearon muestras de Ct similar de GI, GV y GV, y combinaciones de dos en dos de estos genogrupos, donde una de ellas contenía alta carga viral, mientras que la otra, baja carga viral.

CAPÍTULO IV

Resultados

4.1 Generación de plásmidos de referencia

Para la obtención de plásmidos que brinden un patrón de curvas referenciales de cada genogrupo, se insertó en el vector pCR 2.1 TOPO una secuencia de cada genogrupo que incluía un fragmento de la región de unión de RdRP-VP1 y el gen completo de la proteína de cápside VP1. La secuencia insertada de GI fue de 1792 bp; GII, 1788 bp; GIV, 1752 bp; GV, 1816 bp (Figura 4). Los productos insertados en el vector fueron empleados para adquirir las curvas de fusión de referencia para cada genotipo.

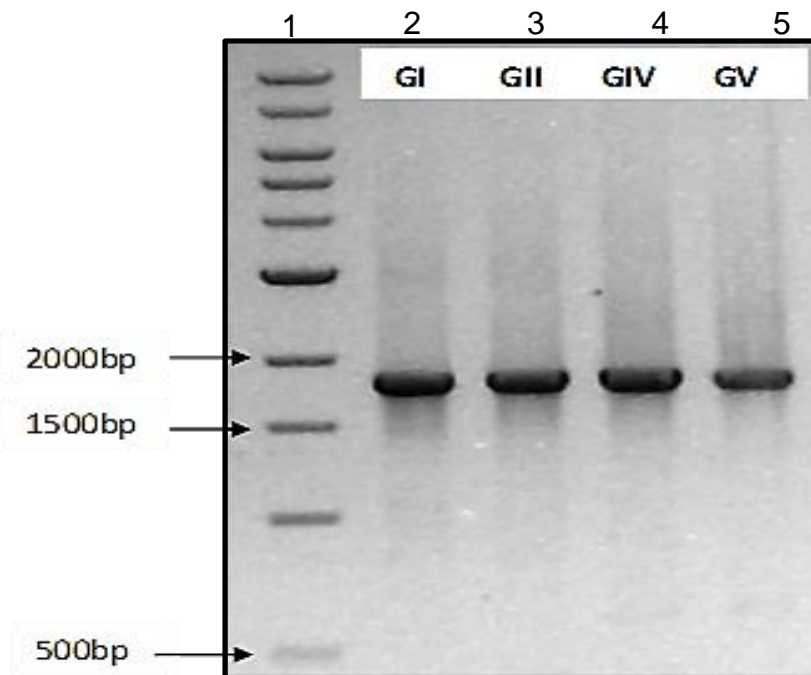


Figura 4. Productos de amplificación de los genogrupos de sapovirus insertados en pCR 2.1 TOPO. Los productos fueron corridos en gel de agarosa al 1% y teñidos con Bromuro de etidio. Carril 1: DNA Ladder 500 bp (Invitrogen), carril 2: sapovirus GI, carril 3: sapovirus GII, carril 4: sapovirus GIV, carril 5: sapovirus GV.

4.2 Detección de genogrupos de sapovirus

Para estandarizar la técnica se emplearon tres sets de primers. En el primer ensayo, empleando el set de primers HRM1, se corrieron 58 muestras que previamente fueron clasificadas por secuenciamiento. (Tabla 3). La prueba de HRM1 detectó el 96.15% (25/26) de muestras de GI y el 100% de muestras de los genogrupos GII, GIV y GV (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de los resultados del ensayo de fusión empleando los primers HRM1 con secuenciamiento. *Tres muestras del genogrupo GI fueron erróneamente genotipificadas: Dos muestras como GII y una, como GIV.

qPCR /Secuenciamiento		HRM			
Genogrupo	Muestras secuenciam.	Muestras detectadas	Correctamente genotipificadas	Erróneamente genotipificadas	No concluyentes
GI	26	25	9	3*	13
GII	14	14	12	0	2
GIV	12	12	10	0	2
GV	6	6	5	0	1
Total	58	57	36	3	18

El porcentaje de muestras correctamente identificadas de GI fue del 36%; de GII, 85.7%; mientras que de GIV y GV, fue del 83.3%. Además hubo 3 muestras de GI que fueron erróneamente identificadas como GII y GIV. Por lo tanto, se continuó con la búsqueda de primers idóneos a fin de estandarizar el HRM para la genotipificación de sapovirus.

En el ensayo con los primers HRM2 se emplearon primers cuyos productos sirvieron para la genotipificación de sapovirus mediante PCR convencional el cual amplifica productos de diferentes tamaños. Se corrieron los plásmidos de cada genogrupo con los primers HRM2 para obtener las curvas de fusión de referencia para GI, GII, GIV y GV (Figura 5).

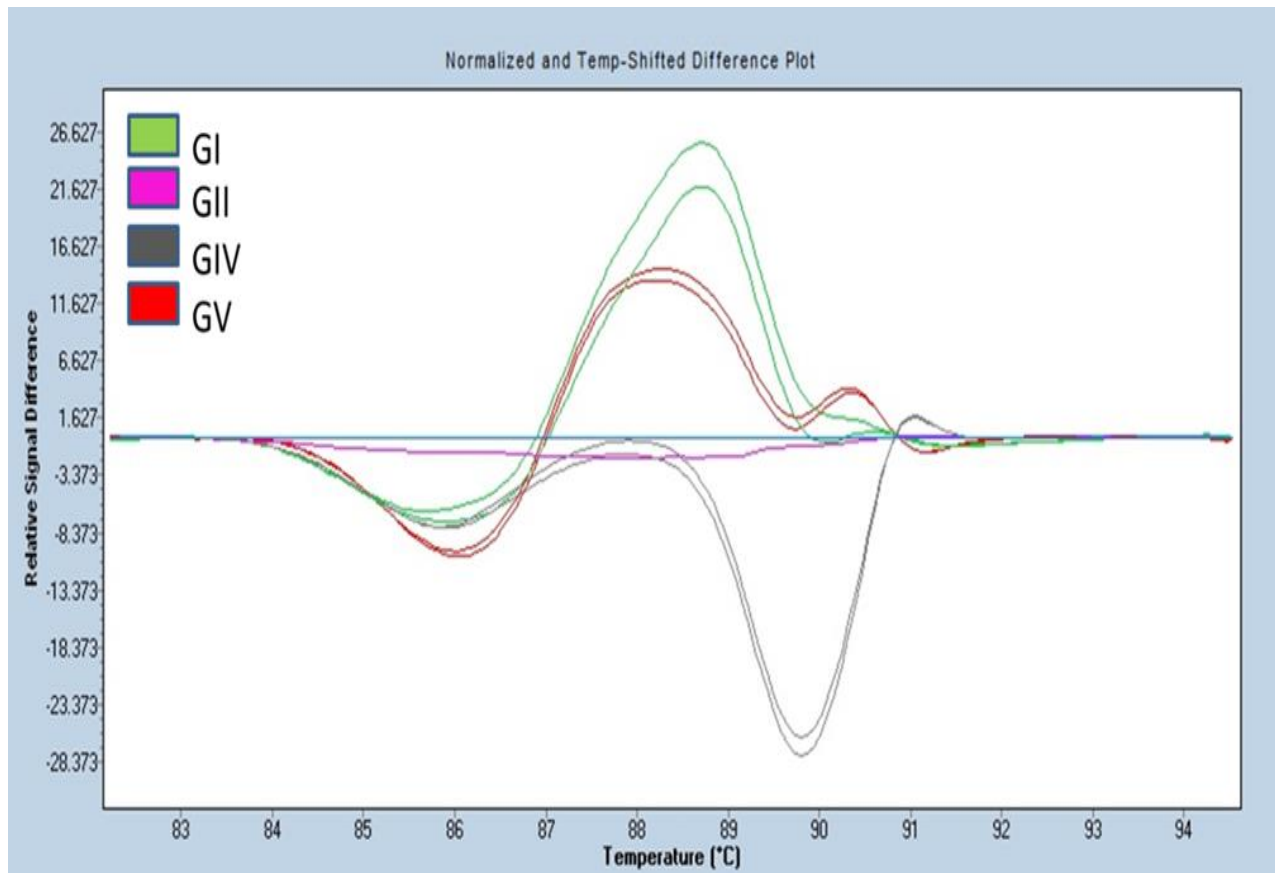


Figura 5. Gráfico de diferencias de las curvas de referencia de cada genogrupo con el set de primer HRM2. Se corrió por duplicado los plásmidos GI, GII, GIV y GV con el set de primers HRM2 y el genogrupo II fue tomado como línea base.

Empleando los primers HRM2, amplificaron 33 muestras de un total de las 36 muestras corridas. El porcentaje de muestras de GIV detectadas empleando HRM fue del 72.7% y el 100% de muestras de GI, GII y GV. Además, el 100% de las muestras amplificadas de GIV y GV fueron correctamente genotipificadas (Figura 6B, 6C, 6D) y no hubo casos de muestras erróneamente identificadas (Tabla 4). No obstante, a pesar de que todas las muestras de GI y GII amplificaron, ninguna pudo ser genotipificada ya que sus curvas de fusión no guardaron relación con las curvas de referencia (Figura 6A).

Tabla 4. Comparación de los resultados del ensayo de fusión empleando los primers HRM2 con secuenciamiento.

qPCR /Secuenciamiento		HRM			
Genogrupo	Muestras secuenciam.	Muestras detectadas	Correctamente genotipificadas	Erróneamente genotipificadas	No concluyentes
GI	9	9	0	0	9
GII	10	10	0	0	10
GIV	11	8	8	0	0
GV	6	6	6	0	0
Total	36	33	14	0	22

Para el ensayo HRM3 se diseñaron 2 primers que flanquearon la región más conservada del genogrupo GII, la cual fue la última región del gen de la proteína de cápside VP1, abarcando 80 bp. Así mismo, se diseñó un primer que acertaba el producto del genogrupo GI y amplificaba una región conservada de GI, que amplifica una región de 380 bp.

En el ensayo HRM3 la región de unión de la RNA polimerasa dependiente de RNA y el gen de la proteína de cápside VP1 se amplificó usando los mismos primers que se emplearon para la identificación de los genogrupos GIV y GV, además, se diseñó un primer reverso para GI (Figura 7). Mientras que para el genogrupo GII se diseñaron primers que amplifican la región terminal del gen VP1 dando un producto de 80 bp (Figura 8). Cuando se emplearon los primers para identificar los cuatro genogrupos en una sola reacción para adquirir las curvas de fusión, se obtuvieron productos inespecíficos, los cuales fueron observados al correr los productos del ensayo en gel de agarosa (Figura 9A).

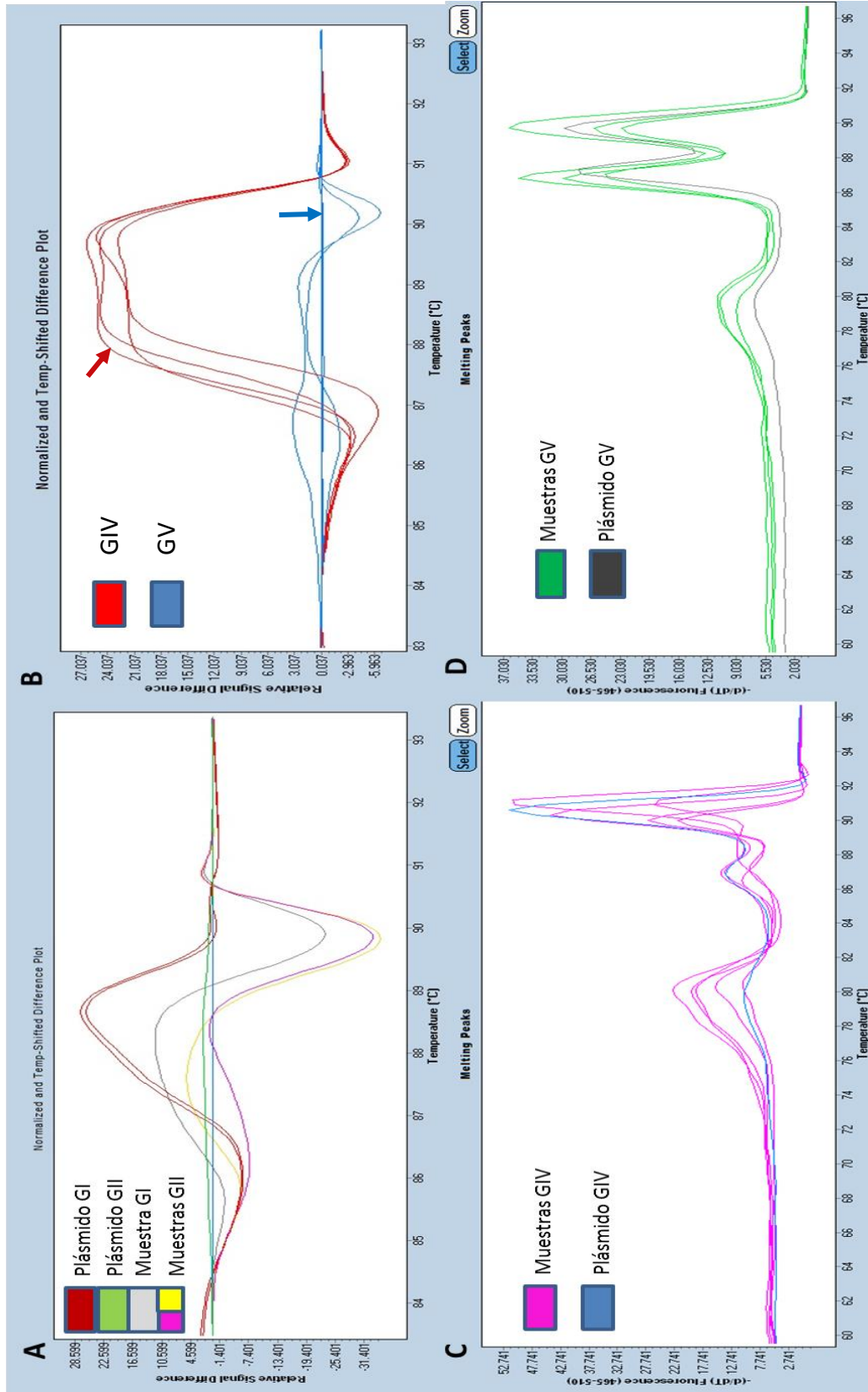


Figura 6. Curvas de fusión de muestras de los genogrupos GI, GII, GIV y GV usando primers HRM2. (A) Gráficos de Diferencias con el plásmido de GII como línea base de una muestra de GI, y 2 de GII; y (B) el plásmido GIV fue la línea base para 3 muestras GIV y 2 muestras de GV. La flecha roja indica el plásmido GIV y la flecha azul, el plásmido GV. (C) Los picos de fusión de 5 muestras de GIV y (D) 4 muestras de GV, con sus respectivos plásmidos de referencia.

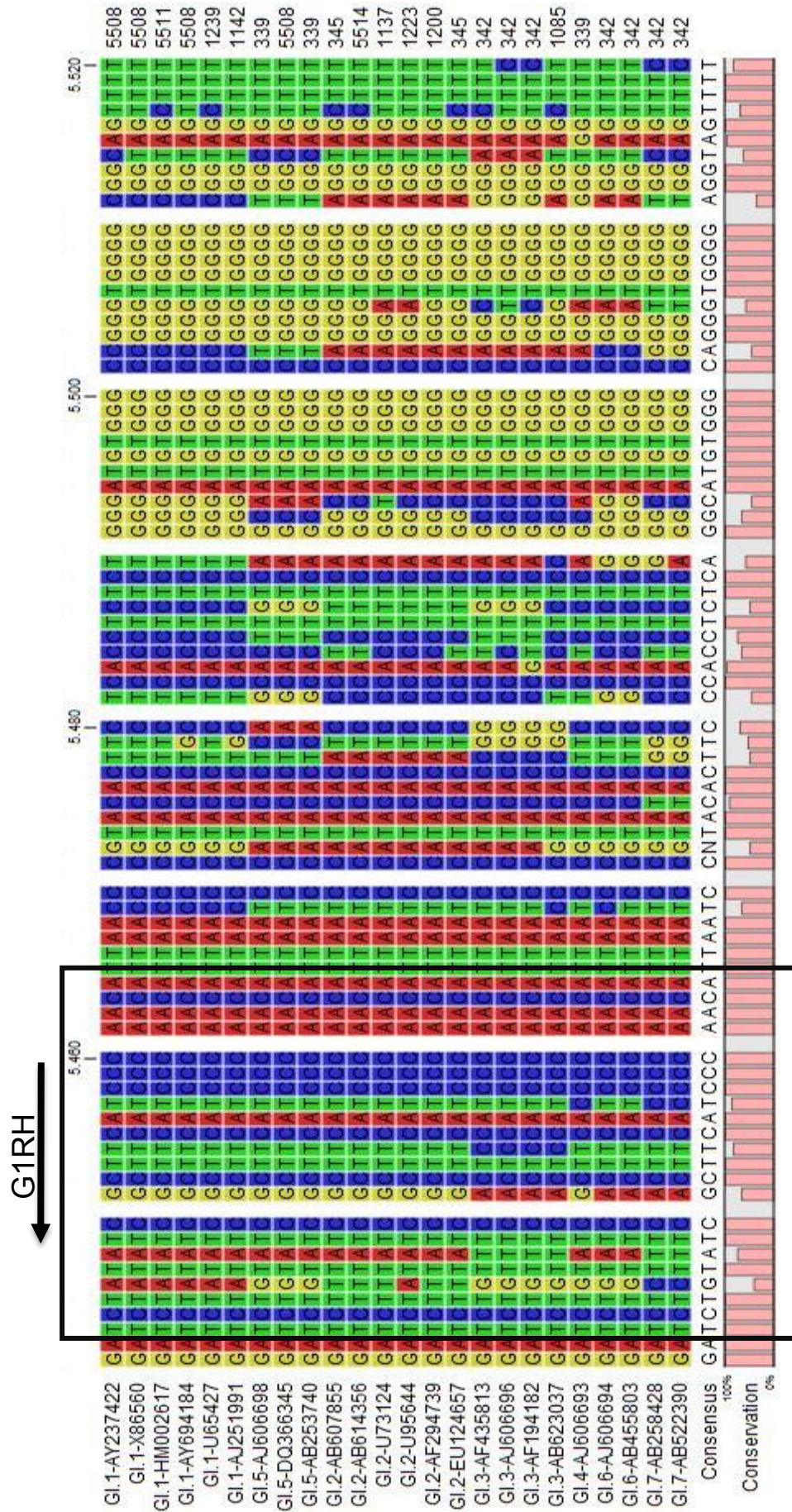


Figura 7. Alineamiento de las secuencias de los genotipos de G1 para diseñar el primer G1RHRM. La región que abarca el primer reverse para amplificar sapovirus G1 del set de primers HRM3 está señalada en el recuadro. Los primers se diseñaron con el programa LightCycler Probe Design Software 2.0.

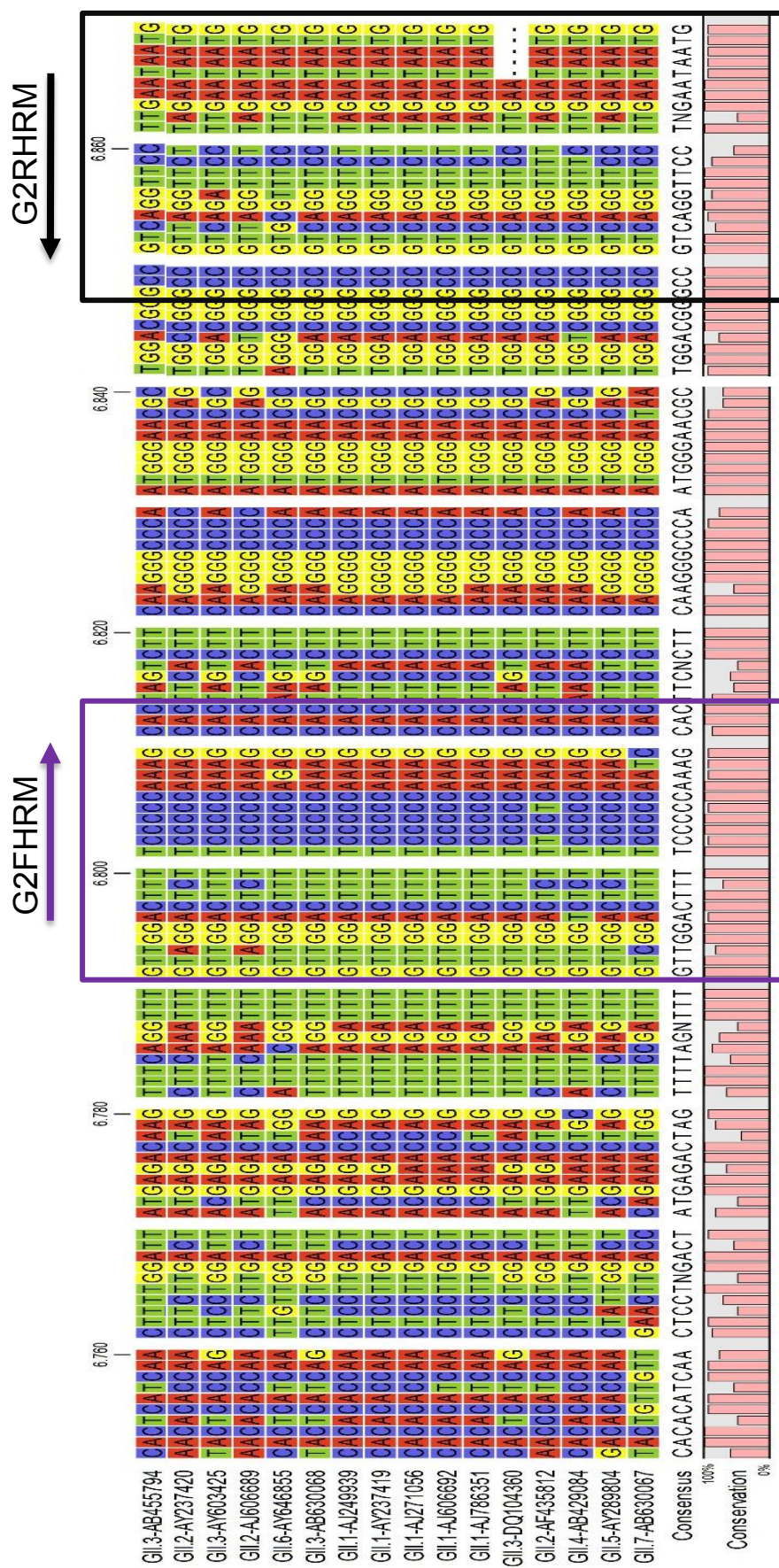


Figura 8. Alineamiento de las secuencias de los genotipos de GII para diseñar los primers G2FHRM y G2RHRM. Primers abarcan la región final de la VP1.

Sin embargo, al correr en gel los productos del ensayo de HRM en el que sólo se emplearon los primers para amplificar GI, GIV y GV no se observaron productos inespecíficos y se verificó que no existan productos de amplificación cuando la muestra es del genogrupo GII (Figura 9B). Cuando los plásmidos de cada genogrupo fueron analizados empleando los primers de HRM3 para GI, GIV y GV y en una reacción aparte, el genogrupo GII, se pudieron diferenciar la forma y la temperatura de fusión de los picos de fusión (Figura 10).

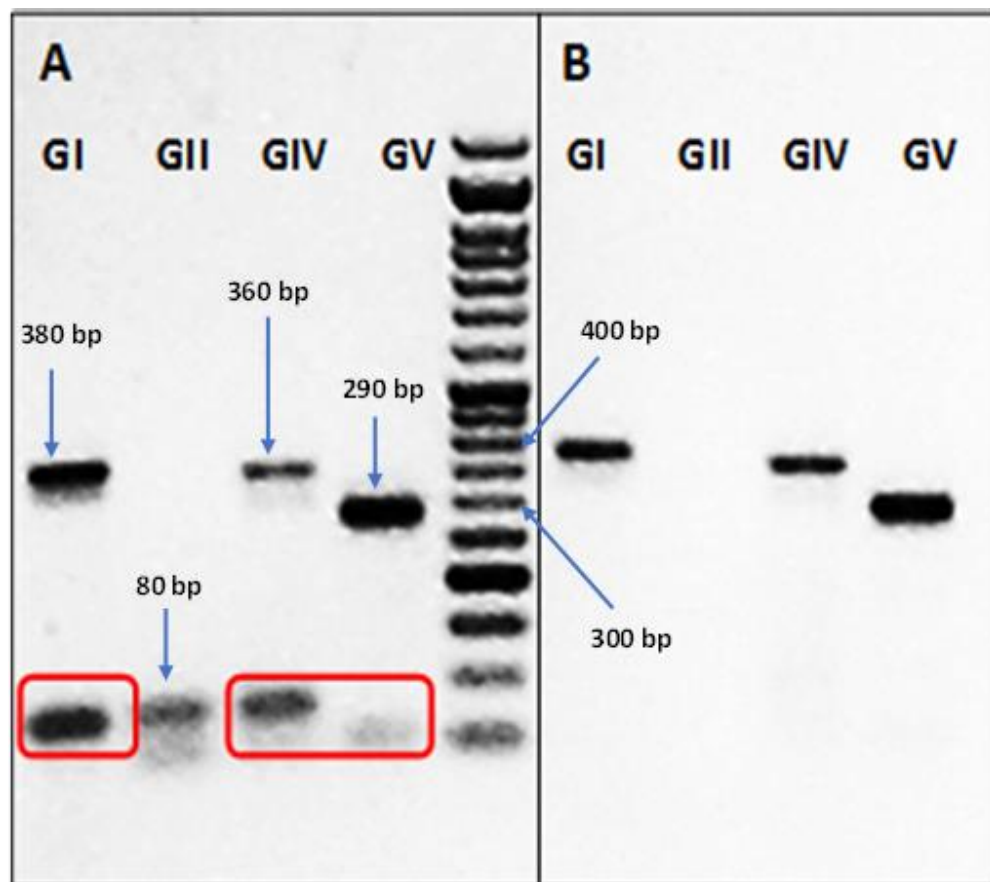


Figura 9. Productos del ensayo de HRM empleando los primers HRM3. (A) Se realizó un ensayo de HRM empleando los primers de todos los genogrupos en una sola reacción y sus productos se corrieron en gel de agarosa al 2% y fueron teñidos con Bromuro de etidio. Se pueden observar productos inespecíficos marcados con cuadros rojos. (B) Los productos del ensayo de HRM empleando sólo los primers de los genogrupos GI, GIV y GV, se corrieron en gel y se empleó DNA Ladder 50 bp. No se mostraron productos inespecíficos.

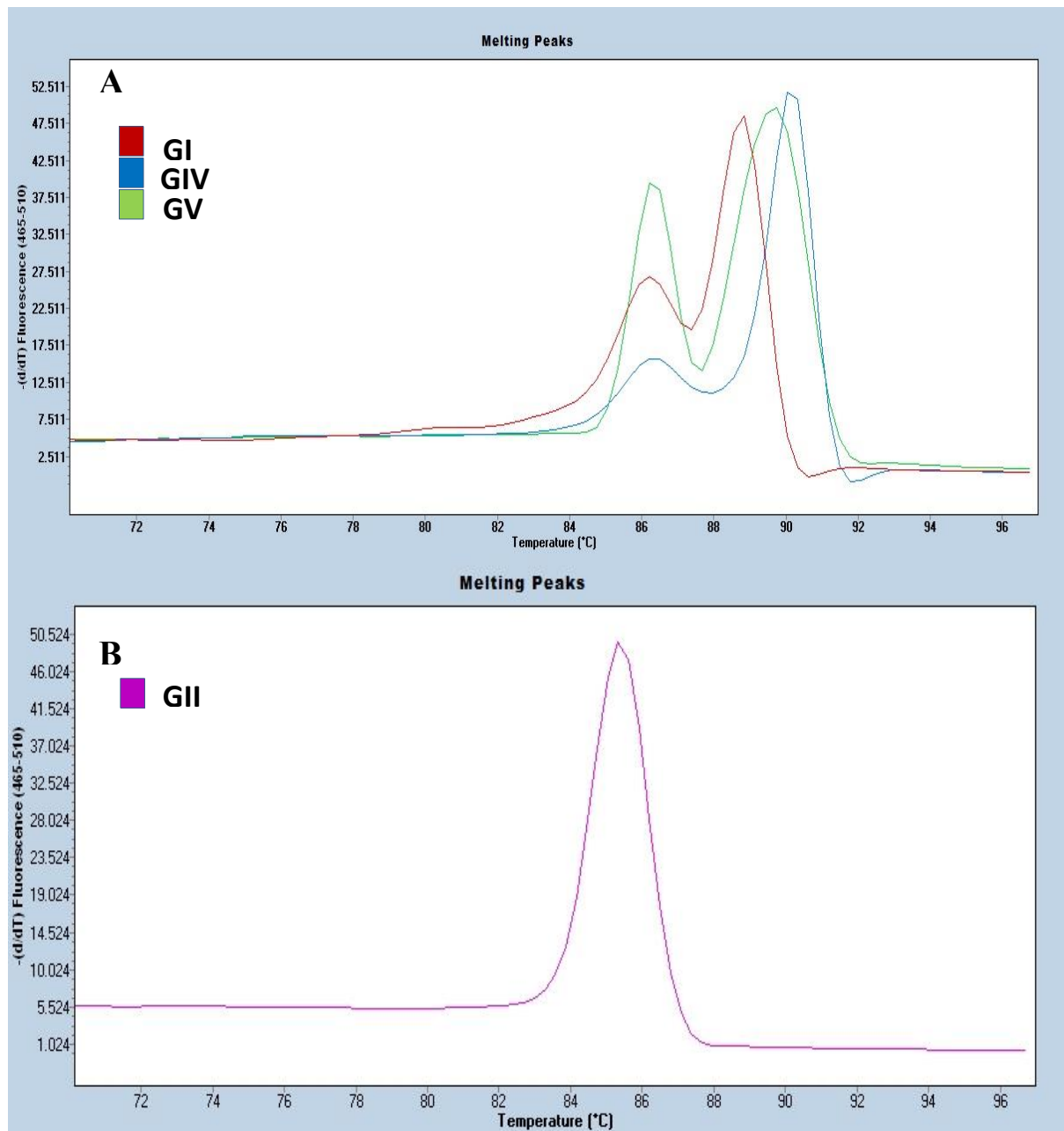


Figura 10. Picos de fusión de los plásmidos de los genogrupos de sapovirus usando los primers HRM3. En la parte superior de la figura (A) se muestran los picos de fusión de los genogrupos GI, GIV y GV, y en la parte posterior (B) el pico de fusión del genogrupo GII. Los plásmidos usados tuvieron una dilución de 10^3 .

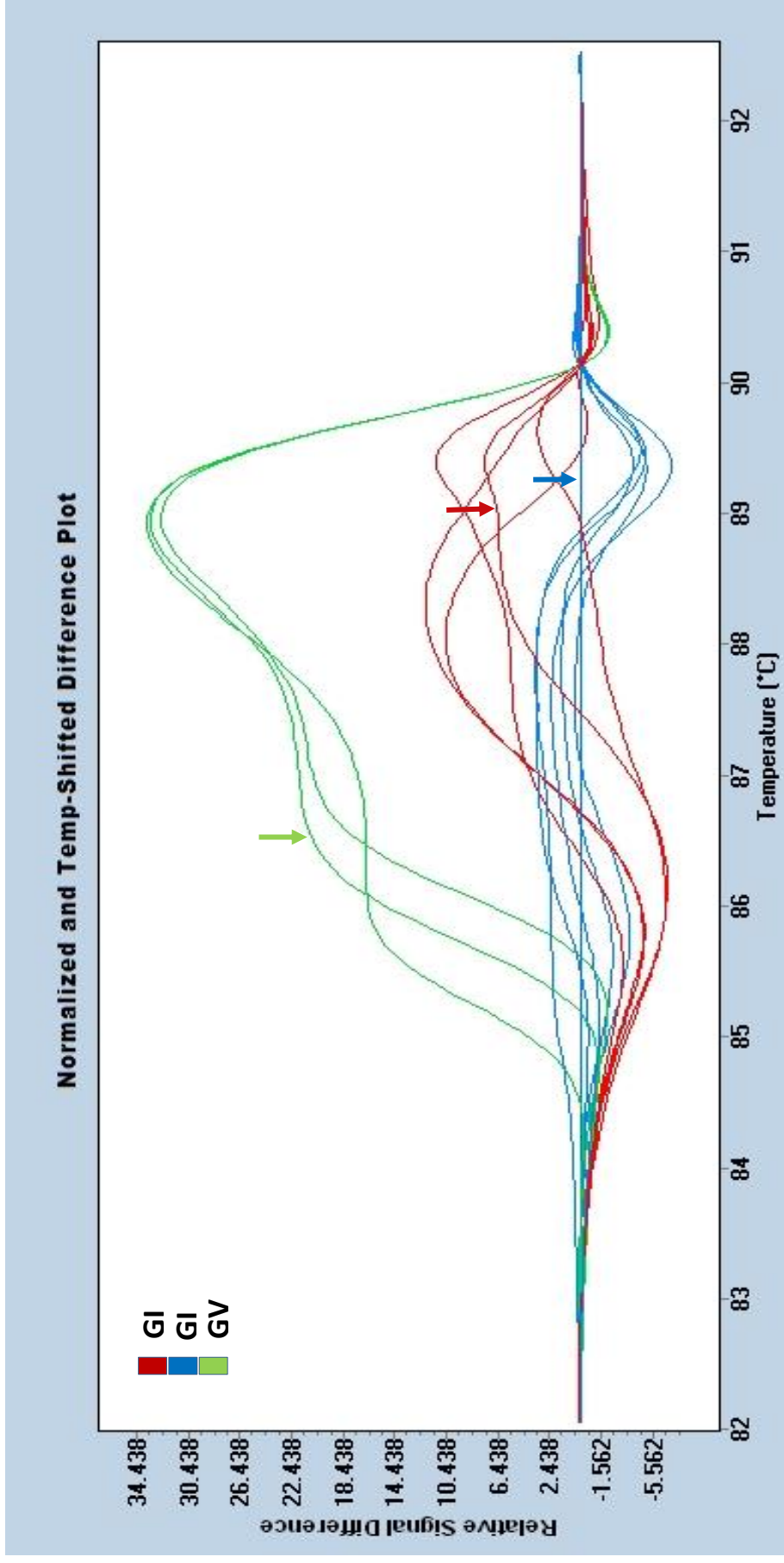


Figura 11. Gráfica de diferencias de los genogrupos GI, GIV y GV usando los primers HRM3. Se empleó el plásmido del genogruppo GIV como línea base, y las curvas de fusión se normalizaron con temperaturas pre y post-fusión a 82°C y 92°C, respectivamente, y una sensibilidad de 0.2. Las líneas en rojo representan a 4 muestras del genogruppo GI y su respectivo plásmido (flecha roja). Las líneas en azul corresponden a 6 muestras del genogruppo GIV y su plásmido ubicado en el eje x (flecha azul). Y las líneas en verde corresponden a 2 muestras del genogruppo GV y su respectivo plásmido (flecha verde).

En el análisis del gráfico de diferencias también se pueden distinguir los genogrupos GI, GIV y GV (Figura 11). Sin embargo, este gráfico no se puede emplear para identificar GII ya que se requiere más de un genogrupo para comparar las curvas de fusión entre ellos, lo cual si se puede hacer midiendo la temperatura de fusión.

Adicionalmente a la genotipificación por el gráfico de diferencias, fue necesario normalizar los datos de los valores de T_m ya que la forma de las curvas de fusión varía de acuerdo a la carga viral de la muestra, tal como se observa en la curva de calibración de genotipificación (Figura 12).

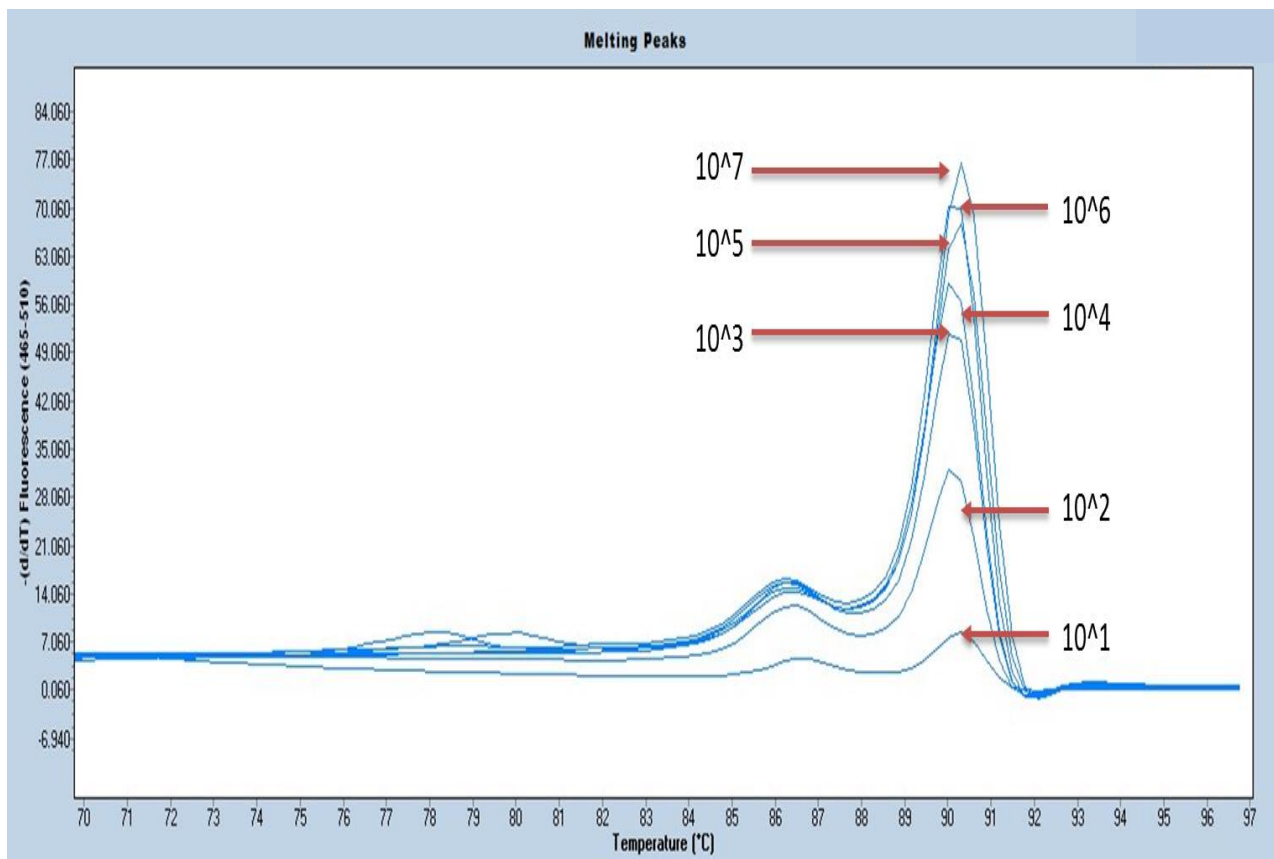


Figura 12. Curva de calibración genotipificación empleando HRM. Se corrieron diluciones seriadas de 10^7 a 10^1 del plásmido GIV y se tomó como referencia para los otros genogrupos.

Los primers HRM3 detectaron (amplificaron) el 93.3%; de muestras de GII, 92.6%; de GIV, 94% y de GV, 83.3%. Además, mostraron una mayor proporción entre las muestras detectadas por HRM y el número de muestras correctamente identificadas (96.4% de muestras de GI, y 100% de las muestras GII, GIV y GV), a comparación de los sets de primers anteriores. En total, sólo 3 muestras no fueron amplificadas y estas fueron pertenecientes a GI y GII (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de los resultados del ensayo de fusión empleando los primers HRM3 con secuenciamiento. *Una muestra del genogrupo GI, perteneciente al genotipo GI.3, fue erróneamente genotipificada como GIV.

qPCR /Secuenciamiento		HRM			
Genogrupo	Muestras secuenciam.	Muestras detectadas	Correctamente genotipificadas	Erróneamente genotipificadas	No concluyentes
GI	30	28	27	1*	30
GII	27	25	25	0	0
GIV	17	16	16	0	0
GV	6	5	5	0	0
Total	80	74	73	1	0

La dispersión de las temperaturas de fusión de los genogrupos fue calculada mediante desviación estándar de la media de Tm de cada genogrupo (Tabla 6). La desviación estándar de cada pico de fusión de GI fue la más amplia; mientras que los valores de Tm de los genogrupos GIV y GV estuvieron menos dispersos. La diversidad de temperaturas de fusión (Tm2) de los genogrupos, en especial del genogrupo GI (Figura 13) produjo una identificación errónea de la muestra GI.3, clasificándola como GIV (Figura 14).

Además, en un ensayo en ciego empleando los primers idóneos (HRM3) el 100% de muestras fue correctamente identificado como perteneciente a su genogrupo correspondiente, lo que demuestra que la técnica HRM es útil para la clasificación de sapovirus.

Tabla 6. Media y desviación estándar (SD) de los picos de fusión de los genogrupos de sapovirus.

GENOGRUPO	PICOS DE FUSIÓN	MEDIA	SD	RANGO DE Tm
GI	Tm1	85.40	1.2	[83.88 – 86.98]
	Tm2	88.61	0.63	[87.75 – 89.39]
GII	Tm	84.93	0.48	[83.99 – 85.65]
GIV	Tm1	86.54	0.53	[85.76 – 87.39]
	Tm2	90.22	0.42	[89.71 – 90.89]
GV	Tm1	86.56	0.33	[86.22 – 86.97]
	Tm2	89.29	0.37	[88.81 – 89.68]

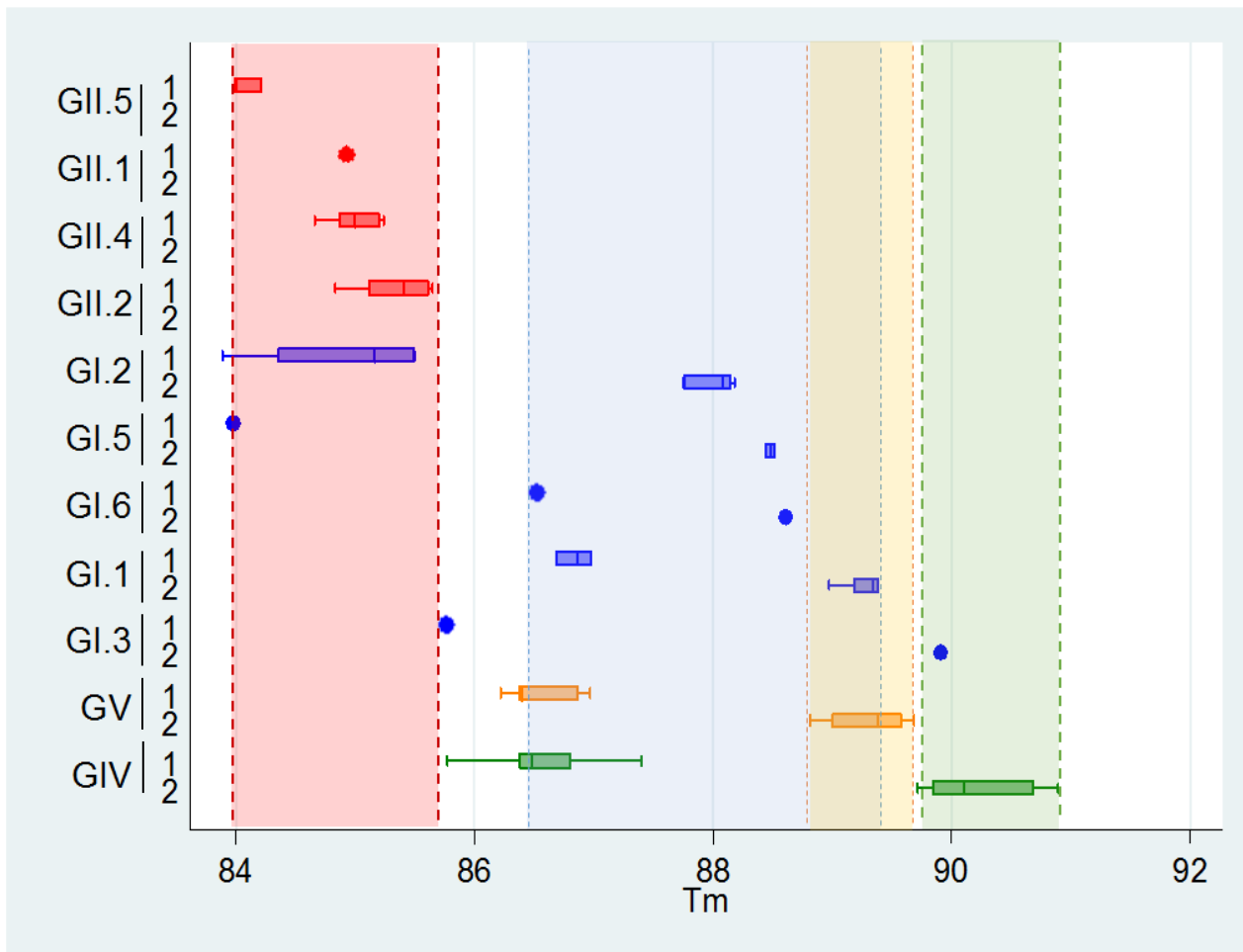


Figura 13. Diagrama caja y bigotes de las temperaturas de fusión de los diferentes genotipos. Tm1 (1) y Tm2 (2) con respecto al genotipo de las muestras encontradas de GI (azul) y GII (naranja), GIV (verde) y GV (amarillo). El único pico de fusión de GII está representado por 1. Las líneas y los puntos significan que sólo hubo una muestra de ese genotipo o coincidencia de datos. Las líneas punteadas de colores delimitan el rango de Tm2 de los genogrupos.

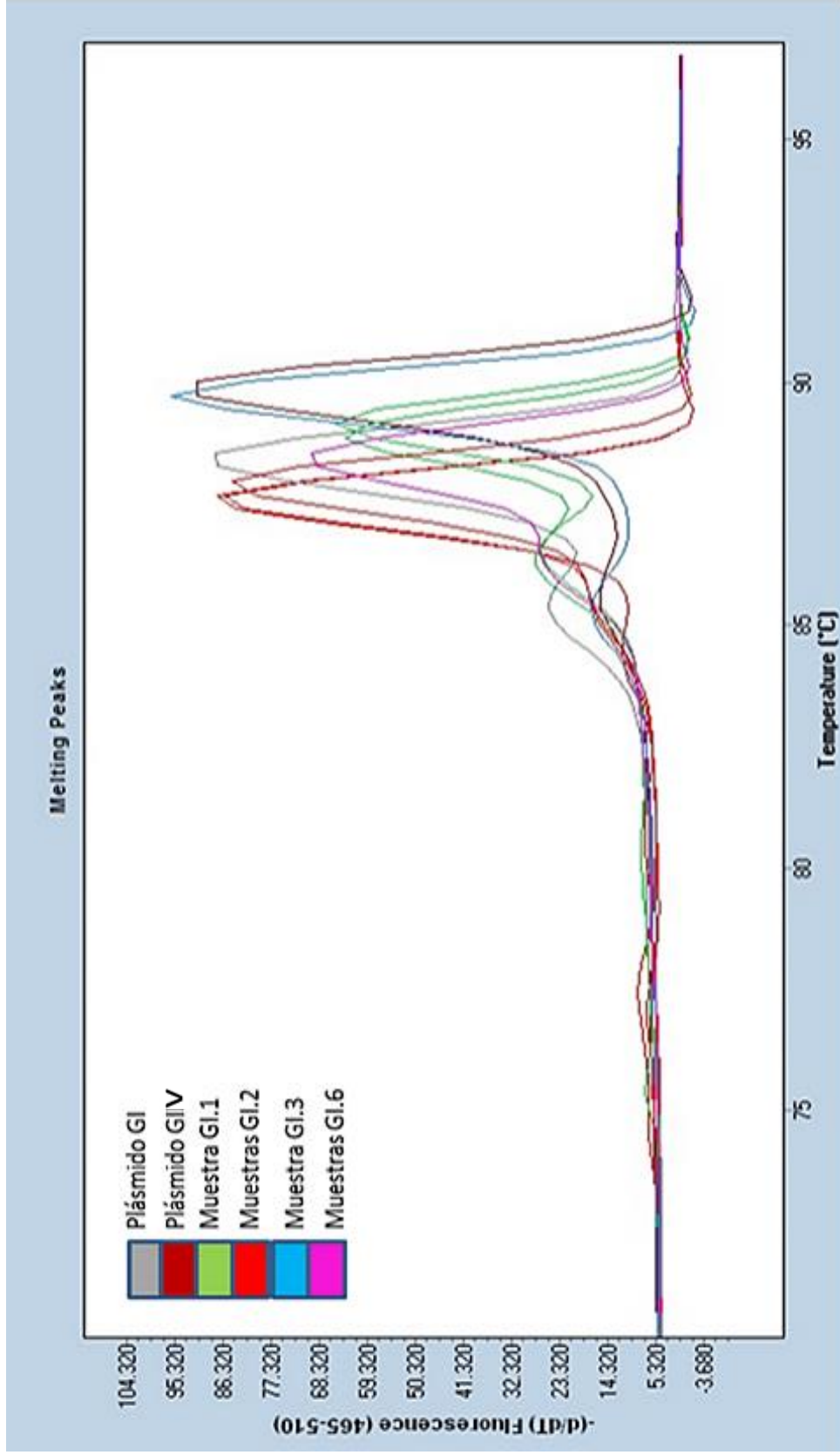


Figura 14. Dispersión de los picos de fusión de diferentes genotipos de GI con HRM3. Se corrieron 2 muestras de GI.1, 2 muestras de GI.2, 1 de GI.6 y 1 de GI.3, la cual es muy similar al plásmido del genogrupo GIV.

4.3 Detección de la reactividad cruzada de la técnica

No hubo reacción cruzada con otros virus entéricos al emplear HRM con el set de primers HRM3, ya que ninguna de las 20 muestras de astrovirus y norovirus fueron detectadas como alguno de los genogrupos de sapovirus.

4.4 Detección de coinfección inter-genogrupo de sapovirus

Al emplear la técnica de fusión de alta resolución para genotipificar muestras con 2 genogrupos diferentes, sólo se obtuvo el patrón de curva del genogrupo que tuvo mayor carga viral en cada reacción. Mientras que al mezclar muestras de Ct similares de GI y GIV, se obtuvo el patrón de curva de GIV, de GI y GV, se obtuvo la curva típica de GV, y al combinar GIV y GV, se observó claramente la curva característica de GV. Sin embargo, si es posible detectar coinfecciones de cualquiera de los genogrupos GI, GIV o GV con GII, ya que este se encuentra en una reacción aparte.

CAPÍTULO V

Discusión

El presente estudio es el primero en explorar la utilidad de la técnica de HRM para la genotipificación de los diferentes genogrupos GI, GII, GIV y GV de sapovirus. Los primers que se emplearon para genotipificar sapovirus en el primer ensayo de HRM (HRM1) son los mismos primers que se utilizan para la detección de sapovirus por qPCR. Sin embargo, la prueba no fue útil para genotipificar sapovirus ya que de las 57 muestras corridas en total, sólo 36 pudieron ser correctamente genotipificadas. Además, usando esta prueba en repetidas ocasiones y para todos los genogrupos hubo al menos una falsa identificación, es decir, hubo muestras que fueron clasificadas como un genogrupo diferente al obtenido por secuenciamiento que es el gold estándar para la genotipificación de sapovirus. Esta genotipificación errónea podría deberse a que los primers usados en HRM1 amplifican un fragmento corto de la unión de la RdRp y la VP1 (Oka *et al.*, 2006), la cual es la región más conservada en sapovirus. Esto significa que no existen muchas diferencias entre las secuencias de los diferentes genogrupos lo cual pudo haber causado la genotipificación incorrecta. A pesar que se recomienda que los productos de PCR sean lo más pequeños posibles para lograr mayor resolución de las curvas, las secuencias pequeñas producen temperaturas de fusión con un rango de Tm muy estrecho entre diferentes genogrupos (Athamanolap *et al.*, 2014), las cuales pueden variar fácilmente con pequeñas mutaciones en la secuencia como la delección de 1 bp, el cambio o la inserción de 1 o más nucleótidos, y la posición de una mutación (Cousins *et al.*, 2013). Por lo tanto, el empleo de amplicones cortos para la genotipificación de varios genogrupos no sería conveniente, debido al posible solapamiento de los rangos de temperaturas de fusión de estos géneros que provocaría una genotipificación errónea.

Debido al bajo porcentaje de muestras correctamente identificadas de los ensayos iniciales y conociendo que el uso de amplicones pequeños no es útil para diferenciar varios genogrupos con diversas mutaciones en su genoma, sino para detectar mutaciones puntuales (Derzele, 2015; Han *et al.*, 2012), se decidió emplear primers cuyos productos tengan mayor tamaño. Los primers que se eligieron amplifican la misma región del genoma pero de diferentes tamaños de acuerdo a cada genogrupo y fueron usados para genotipificar sapovirus mediante electroforesis (Okada *et al.*, 2016). La técnica funcionó correctamente para identificar los genogrupos GIV y GV. Sin embargo, los primers para detectar GI y GII no permitieron identificar ninguna de las muestras con estos genogrupos. Una posible explicación a esto es que los productos de amplificación para GI y GII, de 500 bp y 430 bp respectivamente, eran demasiado grandes como para tener un patrón definido. Las recomendaciones del fabricante del kit de High Resolution Melting (Roche) es que el amplicón a ser analizado sea idealmente menor a 250 bp, pero como máximo sea de 400 bp.

Los virus de RNA tienen una tasa de mutación mayor que la de los virus de DNA. Esto se debe sobre todo a que la RdRp de la mayoría de virus de RNA carece de la actividad de corrección de errores de la 3' exonucleasa, a excepción de los coronaviruses (Steinhauer *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2014). Esto significa que los virus de RNA son más propensos a incrementar su tasa de errores durante la replicación. Además, el grupo de los virus (+)ssRNA, donde pertenece sapovirus, es uno de los que tienen mayor tasa de mutación entre todas las clasificaciones de virus de Baltimore (Sanjuán y Calap, 2016). Por lo tanto, los amplicones al ser muy largos disminuyen la resolución del ensayo debido a tener más probabilidad de abarcar regiones con gran número de mutaciones que varían la temperatura de fusión notablemente. A esto se suma la variabilidad genética de los genotipos no identificados (GI y GII), los cuales cuentan con varios genotipos cada uno. Estas razones hicieron menos posible que las curvas de fusión de las muestras tengan un patrón de fusión definido y muestren relación con las curvas adquiridas de los plásmido de

referencia. Otra posible causa de que estos patrones sean inusuales es que al ser amplicones de más de 400 bp, mutaciones en regiones ricas en A/T del cDNA, regiones menos estables, pudieron generar que la fusión (melting) empiece a realizarse en estas regiones en lugar de iniciar por los extremos del amplicón como es usual (Cousins *et al.*, 2013).

En el ensayo HRM3 se emplearon los mismos primers para HRM2 para amplificar regiones de GIV y GV puesto que todas las muestras pudieron ser correctamente genotipificadas. Sin embargo, se decidió recortar la región de amplificación de GI diseñando un primer que produjo un amplicón de 380 bp (Figura 3) y amplificar la región más conservada del genogrupa GII puesto que este es el genogrupa con más variaciones genómicas entre genotipos. Esta región conservada abarcó una región de 80 bp del final del gen de la VP1. Sin embargo, este producto es más pequeño comparado al producto de los otros genogrupos. Por otro lado, dado que el análisis de curvas de fusión usa la temperatura de fusión de productos de doble cadena para identificar la identidad del producto, es indispensable que no existan productos inespecíficos en la reacción ya que también pueden ser detectados. Esto podría generar múltiples picos o variar significativamente el T_m , y genotipificar incorrectamente una muestra. Es por esta razón que fue necesario detectar los cuatro genotipos en dos reacciones separadas para contar con productos limpios que no provoquen errores en la genotipificación.

El empleo de la técnica de fusión de alta resolución usando los primers HRM3 para detectar y genotipificar sapovirus mostró tener resultados similares a los de trabajos anteriores realizados en virus empleando HRM. En este estudio se obtuvo un alto porcentaje de muestras correctamente identificadas (91.25% del total de muestras corridas), tal como ocurrió en la detección y genotipificación del virus del papiloma humano, donde el 91% de muestras lograron ser genotipificadas (Lee *et al.*, 2012). Además, HRM mostró una alta sensibilidad para detectar virus como norovirus y astrovirus, los cuales fueron detectados en concentraciones de hasta 10 copias/reacción, pero se requirió 10^3

copias/reacción para realizar la genotipificación de astrovirus (Tajiri-Utagawa *et al.*, 2009; Hata *et al.*, 2014). En este estudio, el 92.5% de las muestras de todos los genogrupos fueron amplificadas. Mientras que en el estudio de Okada *et al.*, 2006, en el cual se emplearon los primers del set HRM2 para genotipificar sapovirus por electroforesis, el 100% de muestras analizadas amplificó y pudo ser correctamente identificada. Sin embargo, el método empleado por Okada es un PCR anidado. La manipulación de productos de PCR hace que las muestras estén propensas a contaminarse, además de ser un método laborioso. En el laboratorio de Virología Molecular empleando este método de genotipificación, aproximadamente sólo el 50% de muestras que fueron detectadas como positivas a sapovirus por qPCR, pudieron ser genotipificadas.

El número de muestras de cada genogrupo empleadas en los ensayos de HRM depende de la prevalencia de estos en la población estudiada. Todas las muestras de los genogrupos GIV y GV amplificaron empleando el set de primer HRM3. Sin embargo, no todas las muestras analizadas amplificaron usando el último set de primers. Dos muestras de GI no amplificaron, posiblemente debido a que las muestras pudieron estar contaminadas con inhibidores de PCR los cuales son frecuentes en muestras de heces (Oikarinen *et al.*, 2009) o que el cDNA de la muestra pudo estar degradado. Mientras que en el genogrupo GII, se hallaron dos muestras del genotipo GII.8 que no pudieron ser identificadas por los primers diseñados. Este genotipo ha sido reportado recientemente (Wu *et al.*, 2016) y no fue considerado en la revisión de Oka *et al.*, 2015, cuyas secuencias se emplearon como referencia para diseñar los primers. La significancia de este genotipo es aún desconocida; sin embargo, si llega a ser importante, sería necesario modificar la prueba empleando primers diferentes o degenerados.

La genotipificación de las muestras se realizó mediante el gráfico de diferencias proporcionado por la aplicación gene scanning del programa. Sin embargo, debido a la alta sensibilidad de esta prueba, la forma de la curva de fusión varía según el Ct o la carga viral que tenga la muestra (Figura 12). Por lo tanto, este

gráfico podría identificar muestras del mismo genogrupo como diferentes o clasificar erróneamente muestras de GI y GIV. Por esta razón, es necesario corroborar esta clasificación observando el valor de T_m y las formas de los picos de fusión. No obstante, la temperatura de fusión de muestras de un mismo genogrupo no siempre es la misma debido a variaciones en la secuencia, a la cantidad de reactivos y de muestra o a errores de manipulación y pipeteo. La normalización de los datos de T_m ayudó a disminuir los errores por cambio de condiciones de reacción entre placas al establecer un rango de temperaturas de T_m para cada genogrupo. De esta manera, las muestras de sapovirus, las cuales suelen contener numerosas variaciones en su genoma a pesar de pertenecer al mismo genogrupo y hasta genotipo, pueden ser correctamente asignadas al genogrupo que pertenecen. Los genogrupos cuyas temperaturas de fusión fueron más dispersas son GI y GII, esto se debe probablemente a que son los genogrupos más variables, ya que cada uno cuenta con al menos 7 genotipos diferentes. Esto se puede ver en la media y la desviación estándar del T_m de cada genogrupo (Tabla 7). Las curvas de fusión de GI, GIV y GV mostraron dos picos de fusión, las cuales se denominaron T_{m1} y T_{m2} . A pesar de que se puede considerar de que múltiples picos es sinónimo de varios amplicones, el ensayo HRM sólo amplifica una banda, como se ve en la Figura 4B. Además, al introducir las secuencias amplificadas por los primers HRM3 en el software de predicción de curvas de melting uMELT (Dwight Z *et al.*, 2011), se produjeron predicciones de los patrones de curva similares a las curvas empíricas. Todas tuvieron 2 picos de fusión, a excepción de la secuencia amplificada por GII. La dispersión de los T_{m1} de cada grupo fue muy variable, posiblemente debido a la influencia de los dímeros de primers, por lo que la clasificación de los genogrupos se basó en el valor de T_{m2} de los genogrupos. Al aplicar la prueba estadística de Kruskal-Wallis usando el programa estadístico IBM SPSS para determinar si existe una diferencia significativa entre los valores de T_{m2} de todos los genogrupos, se encontró que existía una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p < 0.05$), a excepción de los

Tm2 de GI y GIV. Sin embargo, las formas de los picos de fusión de estos genogrupos son claramente distintas, lo cual hace posible su diferenciación.

Uno de los genotipos de GI (GI.3) fue erróneamente identificado como GIV dado que sus valores de Tm2 son muy similares. Este es el único caso de asignación errónea de genogrupo y se puede deber a similitudes entre las secuencias, porcentaje similar de G/C o mutaciones específicas de este genotipo de GI, ya que las diferencias en Tm dependen del tipo de bases que cambian, y de la posición de estos cambios (Cousins *et al.*, 2013). Por lo tanto, el conjunto de estas variables pudo haber influenciado en la semejanza del Tm. Además, podría tratarse de una muestra que contiene una coinfección de sapovirus con los genogrupos GI y GIV, ya que posiblemente, el genogrupo GIV se logró identificar con la PCR convencional; sin embargo, el genogrupo GI fue hallado por HRM. Otra opción es que se trate de una cepa de sapovirus recombinante GI/GIV. Los primers que se emplearon para la genotipificación mediante PCR-secuenciamiento abarcan 140 bp más de la región de la VP1 en comparación del set de primer HRM3, lo cual podría significar que los últimos primers están reconociendo la parte GI de la RdRp, mientras que los de secuenciamiento, el gen de la cápside VP1 de GIV.

El objetivo de este ensayo fue detectar los diferentes genogrupos de sapovirus que afectan a humanos. Además, es probable que los genotipos del genogrupo GI también se puedan diferenciar mediante la forma de los picos de fusión y calculando las temperaturas de fusión, ya que existe una relación entre los genotipos de GI y sus valores de Tm, aunque sólo se encontraron 5 de los 7 genotipos de GI en la población estudiada y se analizó un pequeño número de muestras de cada genotipo. Sin embargo, los genotipos del genogrupo GII no tienen relación con los valores de Tm ya que algunos genotipos se encuentran incluidos en el rango de Tm de otros (Anexo 1).

Para saber si esta prueba es útil para detectar casos de co-infecciones con genogrupos GI, GIV y GV de sapovirus se mezclaron muestras de dos diferentes genogrupos, ya que estos se pueden detectar en la misma reacción.

El resultado de las curvas de fusión obtenidas por HRM fue el del genogrupo con una carga viral más alta. Esto se puede deber a que existe una competencia por los reactivos, el genogrupo con mayor carga viral tiene una mayor ventaja para realizar la replicación debido a que cuenta con mayor cantidad de copias iniciales disponibles. Por lo tanto, sólo se expresa la curva de fusión con más copias de cDNA, contrario a las curvas híbrido entre los genogrupos presentes como se esperaba. Sin embargo, las coinfecciones intergenogrupo de sapovirus reportadas son GI/GII (Gallimore *et al.*, 2006; Nakagawa-Okamoto *et al.*, 2009; Iizuka *et al.*, 2010); por lo tanto, aplicar esta técnica empleando ambas reacciones para GI, GIV, GV y para GII en la misma muestra sería útil para encontrar múltiples infecciones con sapovirus. Si bien encontrar dos genogrupos distintos en la misma muestra también podría significar que se trate de una cepa recombinante, a la fecha, todos los sapovirus recombinantes hallados han sido GII basados en la región RdRp, y GIV en la región estructural VP1 (Farkas *et al.*, 2004; Hansman *et al.*, 2006; Chanit *et al.*, 2009; Hansman *et al.*, 2007; Mikula *et al.*, 2010).

Los resultados de detección de coinfecciones realizados en una misma reacción (genogrupos GI, GIV y GV) de sapovirus son similares a los obtenidos en un estudio en el que es posible detectar infecciones simultáneas de citomegalovirus con dos mutaciones diferentes de UL97 (M460V y M460I) usando HRM mas no es posible diferenciarlas (Zhao *et al.*; 2012). Además, el uso de HRM para genotipificar papiloma virus humano empleando una reacción múltiple no permitió detectar un genotipo específico en casos de infecciones con múltiples genotipos de este virus (Lee *et al.*, 2012). Sin embargo, algunos estudios de HRM si fueron capaces de detectar coinfecciones y diferenciarlas: la detección de infecciones múltiples con arbovirus empleando HRM fue posible debido a sus patrones de fusión mixtos. Así mismo, HRM sirvió para la detección simultánea de tres variantes de Torque teno sus virus en una misma muestra (Spandole *et al.*, 2013).

Los genogrupos de sapovirus a pesar de ser muy variables pudieron ser identificados por el ensayo de fusión de alta resolución empleando el set de primers HRM3. La clasificación de las muestras se hizo mediante el gráfico de diferencias; sin embargo, fue necesario comprobar esta clasificación con los valores de T_m de las muestras y la forma de los picos de fusión.

CAPÍTULO VI

Conclusiones

1. Se logró generar plásmidos de referencia de cada genogrupo de sapovirus humanos mediante la técnica de clonamiento.
2. Se estandarizó la técnica de fusión de alta resolución para detectar e identificar los diferentes genogrupos de sapovirus que afectan a humanos en dos reacciones separadas (una para la detección de GI y otra, para la detección de GII, GIV y GV). Las condiciones de la reacción del PCR fueron las mismas para ambos casos, en un volumen de reacción total de 20 μ l se emplearon 300 η M de cada primer del set de primers HRM3 (según la reacción que corresponda), 3 mM de $MgCl_2$, 1x Light Cycler 480 HRM master mix y 2 μ l de cDNA.
3. El porcentaje de muestras detectadas por HRM del genogrupo GI fue del 93.3%; de GII, 92.6%; de GIV, 94% y de GV, 83.3%. Mientras que el porcentaje de muestras detectadas y correctamente identificadas de los genogrupos GII, GIV y GV fue del 100%, y de GI, 96.4%.
4. La técnica de fusión de alta resolución para detectar y genotipificar sapovirus no tuvo reacción cruzada con otros virus entéricos como norovirus o astrovirus.
5. La técnica permite detectar coinfecciones inter-genogrupo realizadas en ensayos en paralelo para la detección de GII con GI, GIV o GV de sapovirus.

Recomendaciones

Con respecto a la identificación de los genotipos de GI, se recomienda emplear el ensayo de fusión de alta resolución con el set de primers HRM3 en los 7 diferentes genotipos de este genogrupo y correr un número de muestras significativas para poder corroborar la utilidad de la prueba para la diferenciación de los genotipos de sapovirus GI.

Debido a la clasificación errónea de la muestra de GI.3 como GIV, sería recomendable secuenciar esta muestra y otras muestras del mismo genotipo empleando los primers GI del set de primers HRM3, para identificar posibles similitudes con las regiones de GIV en las regiones y en el porcentaje de GC. Además, el secuenciamiento de esta muestra empleando primers dirigidos a la RdRp sería útil para identificar si se trata de una cepa de sapovirus recombinante GI/GIV o de una confección de muestras de diferentes genogrupos en la misma muestra.

Además, se recomienda correr más muestras de cada genogrupo para validar la estandarización del método de fusión de alta resolución para detectar y genotipificar sapovirus, y hacer una amplificación previa al ensayo de HRM para aumentar la sensibilidad de la prueba en caso que las muestras tengan una concentración menor a 100 copias/reacción.

Sería recomendable detectar e identificar automáticamente las curvas de fusión como su genotipo correspondiente empleando métodos de máquina de aprendizaje (learning machine), tal como se hizo para clasificar diferentes serotipos de *Streptococcus pneumoniae* (Athamanolap et al., 2014; Fraley et al., 2016). Sin embargo, las variaciones genómicas entre genotipos que varían los valores de Tm y las formas de las curvas de fusión posiblemente sean un problema para aplicar esta técnica en la clasificación de los genotipos de sapovirus.

CAPÍTULO VII

Referencias Bibliográficas

Clark B., McKendrick M. A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17:461–469.

Gustavsson L., Andersson L.M., Lindh M., Westin J. Excess mortality following community-onset norovirus enteritis in the elderly. *J Hosp Infect* 2011; 79:27–31

World Health Organization. Diarrhoeal disease. Fact sheet N°330. 2013. Revisado: 04/09/2015. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>

Chao HC, Chen CC, Chen SY, Chiu CH. Bacterial enteric infections in children: etiology, clinical manifestations and antimicrobial therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006; 4(4):629-38.

Jansen A, Stark K, Kunkel J, Schreier E, Ignatius R, Liesenfeld O, Werber D, Göbel UB, Zeitz M, Schneider T. Aetiology of community-acquired, acute gastroenteritis in hospitalised adults: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 2008; 8:143.

Karsten C, Baumgarte S, Friedrich AW, von Eiff C, Becker K, Wosniok W, Ammon A, Bockemühl J, Karch H, Huppertz HI. Incidence and risk factors for community-acquired acute gastroenteritis in north-west Germany in 2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28(8):935-43.

Chen SY, Tsai CN, Chen CL, Chao HC, Lee YS, Lai MW, Chen CC, Huang WL, Chiu CH. Severe viral gastroenteritis in children after suboptimal rotavirus immunization in Taiwan. *Pediatr Infect Dis J* 2013; 32(12):1335-9.

Chen CJ, Wu FT, Huang YC, Chang WC, Wu HS, Wu CY, Lin JS, Huang FC, Hsiung CA. Clinical and Epidemiologic Features of Severe Viral Gastroenteritis in Children: A 3-Year Surveillance, Multicentered Study in Taiwan With Partial Rotavirus Immunization. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(33):e1372.

Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R, Havt A, McCormick BJ, McGrath M, Olortegui MP, Samie A, Shakoor S, Mondal D, Lima IF, Hariraju D2, Rayamajhi BB, Qureshi S, Kabir F, Yori PP, Mufamadi B, Amour C, Carreon JD, Richard SA, Lang D, Bessong P, Mduma E, Ahmed T, Lima AA, Mason CJ, Zaidi AK, Bhutta ZA, Kosek M, Guerrant RL, Gottlieb M, Miller M, Kang G, Houpt ER; MAL-ED Network Investigators. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health* 2015;3(9):e564-75.

Lee LE, Cebelinski EA, Fuller C, Keene WE, Smith K, Vinjé J, Besser JM. Sapovirus outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. *Emerg Infect Dis.* 2012 May;18(5):873-6

Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Terashima H, Horino K, Nakao T. Fecal shedding of virus in relation to the days of illness in infantile gastroenteritis due to calicivirus. *J Infect Dis.* 1980;142(2):247-9.

Chang KO, Sosnovtsev SS, Belliot G, Wang Q, Saif LJ, Green KY. Reverse genetics system for porcine enteric calicivirus, a prototype sapo-virus in the Caliciviridae. *J Virol.* 2005;79:1409–1416.

Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, Hansman GS. 2004. Novel recombinant sapovirus. *Emerg Infect Dis* 10:1874–1876.

Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa S M, Martinez N, Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Jiang X. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol.* 2004;149:1309–1323.

Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K. 2012. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol* 157:349–352.

Pankovics P, Kugler Z, Kátai A, Reuter G. First gastroenteritis outbreak caused by sapovirus (GI2) in Hungary - part of an international epidemic. *Orv Hetil.* 2009 Jun 28;150(26):1223-9.

Liu X, Yamamoto D, Saito M, Imagawa T, Ablola A, Tandoc AO 3rd, Segubre-Mercado E, Lupisan SP, Okamoto M, Furuse Y, Saito M, Oshitani H. Molecular detection and characterization of sapovirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in the Philippines. *J Clin Virol.* 2015;68:83-8.

Hansman GS, Takeda N, Katayama K, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Genetic diversity of Sapovirus in children, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jan; 12(1):141-3.

Ren Z, Kong Y, Wang J, Wang Q, Huang A, Xu H. Etiological study of enteric viruses and the genetic diversity of norovirus, sapovirus, adenovirus, and astrovirus in children with diarrhea in Chongqing, China. *BMC Infect Dis.* 2013; 13: 412.

Romani S, Azimzadeh P, Mohebbi SR, Bozorgi SM, Zali N, Jadali F. Prevalence of sapovirus infection among infant and adult patients with acute gastroenteritis in Tehran, Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2012 Winter; 5(1): 43–48.

Svraka S, Vennema H, van der Veer B, Hedlund KO, Thorhagen M, Siebenga J, Duizer E, Koopmans M. Epidemiology and Genotype Analysis of Emerging Sapovirus-Associated Infections across Europe. *J Clin Microbiol.* 2010 Jun; 48(6): 2191–2198.

Bucardo F, Carlsson B, Nordgren J, Larson G, Blandon P, Vilchez S, and Svensson L. Susceptibility of Children to Sapovirus Infections, Nicaragua, 2005–2006. *Emerg Infect Dis.* 2012 Nov; 18(11): 1875–1878.

Gómez-Santiago F, Ribas-Aparicio RM, García-Lozano H. Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in Mexican children. *Virology* 2012; 9: 54.

Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MS, Victoria M, Miranda V, Silva MF, Strina A, Barreto ML, Miagostovicht MP, Leite JP. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(5):438-44

Liu X, Jahuir H, Gilman RH, Alva A, Cabrera L, Okamoto M, Xu H, Windle HJ, Kelleher D, Varela M, Verastegui M, Calderon M, Sanchez G, Sarabia V, Ballard SB, Bern C, Mayta H, Crabtree JE, Cama V, Saito M, Oshitani H. Etiological Role and Repeated Infections of Sapovirus among Children Aged Less than 2 Years in a Cohort Study in a Peri-urban Community of Peru. *J Clin Microbiol*. 2016;54(6):1598-604.

Lu Z, Yokoyama M, Chen N, Oka T, Jung K, Chang KO, Annamalai T, Wang Q, Saif LJ. Mechanism of Cell Culture Adaptation of an Enteric Calicivirus, the Porcine Sapovirus Cowden Strain. *J Virol* 2016; 90(3): 1345–1358

Caul, E. O., and H. Appleton. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J. Med. Virol* 1982;9:257-265

Honma S, Nakata S, Sakai Y, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chib S. Sensitive detection and differentiation of Sapporo virus, a member of the family Caliciviridae, by standard and booster nested polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2001;65:413–417.

Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, Kaiho I. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch Virol* 2002;147:1445–1451.

Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods* 2003;114:37–44.

Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, White PA, Takeda N. Detection of Human Sapovirus by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol*. 2006;78(10):1347-53.

Arthofer W, Steiner FM, Schlick-Steiner BC. Rapid and cost-effective screening of newly identified microsatellite loci by high-resolution melting analysis. *Mol Genet Genomics* 2011; 286(3-4):225-35.

Dorak Tevfik. Real time PCR. 2006. Nueva York: Taylor & Francis Group.

Tajiri-Utagawa E, Hara M, Takahashi K, Watanabe M, Wakita T. Development of a Rapid High-Throughput Method for High-Resolution Melting Analysis for Routine Detection and Genotyping of Noroviruses. *J Clin Microbiol*. 2009 Feb; 47(2): 435–440.

Hata A, Kitajima M, Tajiri-Utagawa E, Katayama H. Development of a high resolution melting analysis for detection and differentiation of human astroviruses. *J Virol Methods* 2014; 200:29-34.

Zhao XT, Zhou DQ, Wu S, Chen YW, Shao Y, Zhang J, Xia CS, Wang KP, Yang H, Wan J, Yu B, Zhang Z, Zhang W. Genotyping cytomegalovirus UL97 mutations by high-resolution melting analysis with unlabeled probe. *Arch Virol*. 2012 Mar;157(3):475-81. doi: 10.1007/s00705-011-1173-y. Epub 2011 Dec 29.

Lee TH, Wu TS, Tseng CP, Qiu JT. High-resolution melting molecular signatures for rapid identification of human papillomavirus genotypes. *PLoS One* 2012;7(8):e42051.

Apaza S, Espetia S, Gilman RH, Montenegro S, Pineda S, Herhold F, Pomari R, Kosek M, Vu N, Saito M. Detection and Genogrouping of Noroviruses from Children's Stools By Taqman One-step RT-PCR. *J Vis Exp*. 2012; (65): 3232.

Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M. *Bioinformatics* 2012;28(8):1166-7.

Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Shinozaki K. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Arch Virol* 2006;151:2503–2509.

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003;49:853-60.

Athamanolap P, Parekh V, Fraley SI, Agarwal V, Shin DJ, Jacobs MA, Wang TH, Yang S. Trainable high resolution melt curve machine learning classifier for large-scale reliable genotyping of sequence variants. *PLoS One*. 2014 Oct 2;9(9):e109094

Cousins, M. M., Donnell, D. & Eshleman, S. H. Impact of Mutation Type and Amplicon Characteristics on Genetic Diversity Measures Generated Using a High-Resolution Melting Diversity Assay. *J Mol Diagn* 2013;15:130–137.

Derzelle S. Single-nucleotide polymorphism discrimination using high-resolution melting analysis for the genotyping of *Bacillus anthracis*. *Methods Mol Biol*. 2015;1247:361-71.

Han Y, Khu D-M, and Monteros MJ. High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Mol Breed* 2012; 29(2): 489–501.

Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*. 1992;122:281–288.

Smith EC, Sexton NR, Denison MR. Thinking Outside the Triangle: Replication Fidelity of the Largest RNA Viruses. *Annu Rev Virol*. 2014 Nov; 1(1):111-32.

Sanjuán R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Dec;73(23):4433-4448. Epub 2016.

Dwight Z, Palais R, Wittwer CT. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics*. 2011;27(7):1019-20.

Oikarinen S, Tauriainen S, Viskari H, Simell O, Knip M, Virtanen S, Hyöty H. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *J Clin Virol*. 2009;44(3):211-4.

Wu FT, Liu LT. GII.8 sapoviruses from a diarrhea outbreak in Taiwan. Submitted 2016.

Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev* 2015;28(1):32-53.

Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 2009 Jan;44(1):1-8.

Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. 2007. Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *J Virol Methods* 146:36–44 Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Loan Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods*. 2003;114(1):37-44.

Svraka S, van der Veer B, Duizer E, Dekkers J, Koopmans M, Vennema H. 2009. Novel approach for detection of enteric viruses to enable syndrome surveillance of acute viral gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 47: 1674–1679.

Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Lewis D, Cubitt D, Cotterill H, Gray JJ. 2006. Characterization of sapoviruses collected in the United Kingdom from 1989 to 2004. *J Med Virol* 78:673–682.

Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T. 2009. Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. *Jpn J Infect Dis* 62:63–66.

Iizuka S, Oka T, Tabara K, Omura T, Katayama K, Takeda N, Noda M. 2010. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *J Med Virol* 82:1247–1254.

Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Jiang X. 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol* 149:1309–1323. Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund KO, Katayama K. 2005. Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 11:1916–1920.

Chanit W, Thongprachum A, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. 2009. Intergenogroup recombinant sapovirus in Japan, 2007–2008. *Emerg Infect Dis* 15:1084–1087.

Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, Takeda N. Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan. *Emerg Infect Dis* 2007;13:786–788.

Mikula C, Springer B, Reichart S, Bierbacher K, Lichtenschopf A, Hoehne M. Sapovirus in adults in rehabilitation center, upper Austria. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1186–1187.

S Spandole, D Cimponeriu, M Toma, I Radu, DA Ion. Rapid Detection of Human Torque Teno Viruses Using High-Resolution Melting Analysis. *Balkan J Med Genet* 2013;16(1): 55 – 62.

Fraley SI, Athamanolap P, Masek BJ, Hardick J, Carroll KC, Hsieh YH, Rothman RE, Gaydos CA, Wang TH, Yang S. Nested Machine Learning Facilitates Increased Sequence Content for Large-Scale Automated High Resolution Melt Genotyping. *Sci Rep.* 2016 Jan 18;6:19218.

Anexos

Anexo 1. Valor de las temperaturas de fusión de GI y GII y sus desviaciones estándar dependiendo del genotipo

GENOGRUPO	PICOS DE FUSIÓN	MEDIA	SD	Rango de Tm
GI.1	Tm1	86.84	0.16	[86.67 – 86.98]
	Tm2	89.25	0.18	[88.97 – 89.39]
GI.2	Tm1	84.92	0.75	[83.88 – 85.49]
	Tm2	88	0.17	[87.75 – 88.18]
GI.3	Tm1	85.74	-	-
	Tm2	89.91	-	-
GI.5	Tm1	83.977	-	-
	Tm2	88.48	0.05	[88.44 – 88.52]
GI.6	Tm1	86.44	-	-
	Tm2	88.61	-	-
GII.1	Tm	84.93	-	-
GII.2	Tm	85.33	0.35	[84.83 – 85.65]
GII.4	Tm	85	0.19	[84.66 – 85.24]
GII.5	Tm	84.07	0.12	[83.99 - 84.21]