

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA



**Desarrollo y validación de un sistema de “ELISA casero”
basado en la expresión de la proteína recombinante VP6 en *E. coli*, para el diagnóstico de Rotavirus del grupo A y sus
potenciales aplicaciones**

Tesis de Post Grado para optar el Título de Magíster Scientiarum en Ciencias Biológicas y
Biomédicas, Mención Biología Molecular

Leonarda Achá Alarcón

Tutores: Volga Iñiguez Rojas Ph.D
Ewald Beck Ph.D

LA PAZ-BOLIVIA
2021

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA



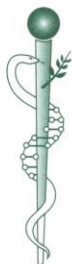
**Desarrollo y validación de un sistema de “ELISA casero”
basado en la expresión de la proteína recombinante VP6 en *E. coli*,
para el diagnóstico de Rotavirus del grupo A y sus
potenciales aplicaciones**

Tesis de Post Grado para optar el Título de Magíster Scientiarum en Ciencias Biológicas y
Biomédicas en la Mención de Biología Molecular

Leonarda Achá Alarcón

Tutores: Volga Iñiguez Rojas Ph.D
Ewald Beck Ph.D

LA PAZ-BOLIVIA
2021



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS

UNIDADES ACADÉMICAS
PARTICIPANTES:

INSTITUTO DE GENÉTICA
Facultad de Medicina

LABORATORIO
DE INMUNOLOGÍA
PARASITARIA
Departamento de Patología
Facultad de Medicina

INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
FARMACO BIQUÍMICAS
Facultad de Ciencias
Farmacéuticas y Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA
Facultad de Ciencias Exactas

UNIDADES DE
INVESTIGACION DEL
INSTITUT DE RECHERCHE
POUR LE DÉVELOPPEMENT
IRD - FRANCIA

Formulario de calificación tesis Maestría

Calificación sobre el 100%	Puntaje	Otorgado por el evaluador
Presentación de resultados	30	30
Revisión Bibliográfica	25	25
Protocolo de investigación	20	20
Claridad de documento	15	15
Cumplimiento de hipótesis y objetivos	10	10
Total	100	100

Comentarios

La tesis de Maestría de la estudiante Leonarda Achá Alarcón bajo la dirección de la Dra. Volga Iñiguez y la co-dirección del Dr. Ewald Beck es un trabajo muy bien diseñado y ejecutado, que da como resultado el desarrollo y validación de una prueba de ELISA para la detección de RVA en muestras de heces de humanos y animales. La prueba si bien no es novedosa, tiene relevancia para Bolivia y ha sido diseñada en base a la expresión de proteína recombinante VP6 en un formato novedoso. El ensayo posee de elevada sensibilidad y especificidad tanto en muestras de niños como de camélidos, especie de relevancia económica para Bolivia. El ensayo fue probado en varias aplicaciones.

El trabajo es muy claro, con una extensa y apropiada revisión bibliográfica, figuras y tablas muy informativas y una excelente discusión y proyección a futuro.

Por lo expuesto este revisor considera que la estudiante debe recibir la nota máxima que asigna el programa de Maestría.

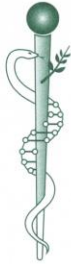
Dra. Viviana Parreño

INCUINTA, CICV y A, INTA

Buenos Aires, Argentina

POSTGRADO: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

Dirección: Av. Saavedra N° 2224 - Piso 4 - Teléfonos: 2612420 - Fax: 2243320 Cs. Farm. y Bioq.
E-mail: maebiobio@hotmail.com - Casilla N° 3239 - La Paz - Bolivia (Sud América)



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS

MAESTRIA EN CIENCIA BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS

MENCIÓN: *Biología Molecular*

Fecha: Perú, 19 de enero de 2021
Institución: Instituto de Biología Molecular y Biotecnología
Título del Tema: Desarrollo y validación de un sistema de "ELISA casero" basado en la expresión de la proteína recombinante VP6 en *E. coli*, para el diagnóstico de Rotavirus del grupo A y sus potenciales aplicaciones.

Postulante: Lic. Leonarda Acha Alarcón
Asesores: Volga Iñiguez Rojas
Revisor: Dr. Raul Rosadio Alcántara
Institución: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

UNIDADES ACADÉMICAS PARTICIPANTES:

INSTITUTO DE GENÉTICA
Facultad de Medicina

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA PARASITARIA
Departamento de Patología
Facultad de Medicina

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
Facultad de Ciencias Exactas

UNIDADES DE INVESTIGACION DEL INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT IRD - FRANCIA

Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% EN BASE A:	PORCENTAJE	CALIFICACIÓN
1	Presentación de Resultados	30%	25
2	Revisión Bibliográfica	25%	20
3	Protocolo de Investigación	20%	20
4	Claridad del documento presentado	15%	15
5	Cumplimiento de objetivos	10%	10
TOTAL		100%	90%

Comentarios:

Los resultados de esta investigación debería traducirse, por lo menos, en dos artículos en revistas indizadas: 1) Desarrollo de la prueba, 2) Uso de la prueba en niño y quizás un tercero en camélidos sudamericanos.

Hay varias publicaciones sobre este tema en Alpacas: Rojas et al., 2016 (*Vet microbiology*) Rojas et al., 2017 (*Genetic & evolution*) Rojas et al., 2019 (*Transbound Emerging diseases*) Martínez et al., 2014 (*Infection, genetic & evolution*).

NOTA.- La calificación mínima de aprobación es de 61%



UNMSM

Firmado digitalmente por RCGADMO
ALCANTARA Raul Hector FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 19.01.2021 21:46:02 -05:00

FIRMA REVISOR

POSTGRADO: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Dirección: Av. Saavedra N° 2224 - Piso 4 - Teléfonos: 2612420 - Fax: 2243320 Cs. Farm. y Bioq.
E-mail: maebiobio@hotmail.com - Casilla N° 3239 - La Paz - Bolivia (Sud América)



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS

MENTIÓN: BIOLOGÍA MOLECULAR

Fecha: Germany, 11 de abril 2021
Institución: Instituto de Biología Molecular y Biotecnología
Título del Tema: Desarrollo y validación de un sistema de "Elisa casero" basado en la expresión de la proteína recombinante VP6 en *E. coli*, para el diagnóstico de Rotavirus del grupo A y sus potenciales aplicaciones
Postulante: Lic. Leonarda Achá Alarcón
Tutor: Volga Iñiguez Rojas Ph. D.
Revisor: Pilar Hernandez Pastor Ph. D.
Institución: RESEARCHER AND TEAM LEADER
HELMHOLTZ CENTRE FOR INFECTION RESEARCH
Braunschweig, Germany

UNIDADES ACADÉMICAS PARTICIPANTES:

INSTITUTO DE GENÉTICA
Facultad de Medicina

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA PARASITARIA
Departamento de Patología
Facultad de Medicina

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
Facultad de Ciencias Exactas

UNIDADES DE INVESTIGACION DEL INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT IRD - FRANCIA

Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% EN BASE A:	PORCENTAJE	CALIFICACIÓN
1	Presentación de Resultados y Proyectos de Trabajo	30%	30
2	Revisión Bibliográfica	25%	25
3	Protocolo de Investigación	20%	20
4	Claridad del documento presentado	15%	15
5	Cumplimiento de hipótesis y objetivos	10%	10
TOTAL		100%	100

Comentarios:

1. La tesis está escrita de forma muy clara que facilita la lectura, incluyendo gráficos explicativos. La presentación del documento es muy ordenada.
2. Se ha hecho una revisión bibliográfica adecuada y se ha producido una tesis doctoral bien documentada.
3. Se ha cumplido con los objetivos planteados concluyendo con un producto listo para ser establecido en un laboratorio de diagnóstico, ser estandarizado como método local y ser escalado (scale-up).
4. Se destaca la cantidad y variación de pruebas que se han hecho para la puesta a punto del ensayo, proporcionando una información amplia y un producto robusto:
 - a. Se ha comparación con varios tests comerciales (incluyendo pruebas rápidas), obteniendo resultados comparables;
 - b. Se han utilizado muestras de varios orígenes (diferentes sets de muestras) con características diferentes;
 - c. Se han incluido muestras humanas y animales (camélidos)
 - d. Se han incluido muestras de diferentes genotipos de rotavirus (aunque tests con genotipos adicionales deben hacerse en el futuro)
 - e. Se han descartado reacciones cruzadas haciendo pruebas con muestras de otros tipos de virus y bacterias
5. Aunque una de las limitaciones del ensayo es que no permite la detección de rotavirus de origen vacunal (por las pequeñas cantidades excretadas), este ensayo es un importante

POSTGRADO: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

Dirección: Av. Saavedra N° 2224 - Piso 4 - Teléfonos: 2612420 - Fax: 2243320 Cs. Farm. y Bioq.
E-mail: maebiobio@hotmail.com - Casilla N° 3239 - La Paz - Bolivia (Sud América)



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS

UNIDADES ACADÉMICAS PARTICIPANTES:

INSTITUTO DE GENÉTICA
Facultad de Medicina

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA PARASITARIA
Departamento de Patología
Facultad de Medicina

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIQUÍMICAS
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
Facultad de Ciencias Exactas

UNIDADES DE INVESTIGACION DEL INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT IRD - FRANCIA

aporte para el control y la eliminación de diarreas causadas por el rotavirus (tanto en humanos como en camélidos) en el contexto boliviano, ya que permite establecer una prueba diagnóstica robusta que, por su precio y posibilidad de producción local, puede ser aplicada a gran escala. Esto último, facilitando el seguimiento de la reducción de diarreas después de la introducción de la vacuna del rotavirus en el país.

NOTA. - La calificación mínima de aprobación es de 61%

FIRMA REVISOR

POSTGRADO: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Dirección: Av. Saavedra N° 2224 - Piso 4 - Teléfonos: 2612420 - Fax: 2243320 Cs. Farm. y Bioq.
E-mail: maebiobio@hotmail.com - Casilla N° 3239 - La Paz - Bolivia (Sud América)



INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Universidad Mayor de San Andrés

Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Campus Universitario Cota-Cota, Calle 27 s/n, telf. 2-612815

A QUIEN CORRESPONDA:

En calidad de tutora de la tesis de maestría titulada **Desarrollo y validación de un sistema de “ELISA casero” basado en la expresión de la proteína recombinante VP6 en *E. coli*, para el diagnóstico de Rotavirus del grupo A y sus potenciales aplicaciones**“, realizada por la Lic. Leonarda Achá Alarcón con C.I. 5966598 LP., le comunico que el trabajo de la candidata ya ha sido evaluado y aprobado por los tres revisores internacionales y presenta una calidad suficiente para proceder con los tramites de defensa publica de acuerdo a las normas universitarias vigentes.

Volga Iñiguez Ph.D

Volga Iñiguez Ph. D.
Tutor

Dedicatoria

Dedicado a mi abuelo Gonzalo Alarcón a quien debo gran admiración y cariño infinito; y para Julián porque hay muchas cosas por descubrir y aprender.

Agradecimientos

Agradezco profundamente al Dr. Ewald Beck por todas sus enseñanzas, paciencia, conocimientos y experiencia ya que sin él este trabajo no hubiera sido posible.

Agradezco a mi tutora y mentora en este campo de la investigación Dra. Volga Iñiguez, gracias por las enseñanzas, oportunidades, confianza y la paciencia vertida hacia mi persona.

Agradezco al Instituto de Biología Molecular y Biotecnología y a todas las personas que conforman el maravilloso grupo de trabajo.

Agradezco a Dios y a mi familia, en especial a mis padres y a mi tía Nelly por el apoyo incondicional.

Finalmente agradezco al proyecto ASDI-UMSA Enfermedad Diarreica por el financiamiento.

Tabla de contenido

Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	4
2.1. Características generales de rotavirus	4
2.2. Proteína VP6	5
2.3. Antigenicidad de la proteína VP6	7
2.4. Partículas tipo virales, pseudopartículas o cápsidas vacías de RVA	8
2.5. Sistemas de expresión de proteína recombinante VP6.....	9
2.6. Proteínas de fusión	13
2.6.1. SUMO y SUMO proteasa	14
2.7. SUMO-VP6.....	15
2.8. Pruebas de diagnóstico para RVA.....	15
2.9. Producción de VP6, anticuerpos y ensayos inmunoenzimáticos.....	19
2.10. ELISAS para la detección de RVA en mamíferos	22
3. Justificación.....	24
4. Objetivos	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos específicos.....	25
5. Materiales y Métodos	25
5.1. Extracción del RNA viral y clonación de VP6.....	25
5.2. Construcción del gen de fusión SUMO-VP6	26
5.3. Sumo proteasa	28
5.4. Expresión, purificación y digestión de la proteína recombinante SUMO-rVP6	28
5.4.1. Expresión.....	28
5.4.2. Purificación	29
5.4.3. Digestión	29
5.4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)....	29
5.5. Cuantificación de la proteína recombinante	30
5.6. Dot blot de la proteína recombinante	30
5.7. Producción de anticuerpos	30
5.8. Formación del conjugado con la enzima HRP	30
5.9. Intercambio de anticuerpos de captura y detectores.....	31
5.10. Titulación de los anticuerpos de captura y detectores	32
5.11. ELISA casero	33

5.12.	Límite de detección	33
5.13.	Reacciones cruzadas.....	34
5.14.	Precisión intra e interplaca	34
5.15.	Validación del ensayo de “ELISA casero”.....	35
5.16.	Confirmación de las muestras discordantes	35
5.16.1.	Extracción del material genético	35
5.16.2.	RT-PCR para VP6.....	35
5.16.3.	Genotipado de las cepas	36
5.17.	Aplicaciones del ensayo de “ELISA casero”	37
5.17.1.	Comparación entre el ensayo de “ELISA casero” con el ELISA comercial y la prueba rápida para RVA.....	37
5.17.2.	Ensayo de “ELISA casero” para el análisis de la diarrea comunitaria.....	37
5.17.3.	Evaluación de la excreción del virus de la vacuna anti-rotaviral Rotarix (RV1)	38
5.17.4.	Análisis de muestras almacenadas	38
5.17.5.	Análisis de la presencia de RVA en muestras diarreicas y muestras control (no diarreicas) de camélidos domésticos	38
5.17.6.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	38
5.18.	Análisis estadístico.....	39
6.	Resultados y Discusión	39
6.1.	Proteína recombinante.....	39
6.1.1.	Expresión y purificación de la proteína recombinante SUMO-rVP6.....	39
6.1.2.	Cuantificación de la proteína recombinante rVP6.....	40
6.1.3.	Reconocimiento de la proteína recombinante por anticuerpos dirigidos contra VP6	41
6.2.	Funcionalidad de anticuerpos policlonales.....	45
6.3.	Especificidad y sensibilidad de los anticuerpos de captura y detección	46
6.3.1.	Ensayos de intercambio de anticuerpos.....	46
6.3.2.	Titulación de los anticuerpos.....	49
6.3.3.	Límite de detección	51
6.3.4.	Reacciones cruzadas.....	52
6.4.	Validación del ensayo de “ELISA casero”.....	55
6.4.1.	Valor de cut off o punto de corte.....	55
6.4.2.	Ensayo de “ELISA casero” vs Reverso-transcripción (RT-PCR).....	59
6.4.3.	Genotipos detectados por el ensayo de “ELISA casero”.....	63
6.4.4.	Precisión intra e interplaca del ensayo de “ELISA casero”	65
6.5.	Aplicaciones del ensayo de “ELISA casero”	66

6.5.1.	Comparación con el ELISA comercial y Prueba Rápida de RVA	66
6.5.2.	Análisis de la diarrea comunitaria	70
6.5.3.	Evaluación de la excreción del virus de la vacuna anti-rotaviral Rotarix (RV1)	71
6.5.4.	Análisis de muestras almacenadas	72
6.5.5.	Detección de un brote de diarreas causado por rotavirus del grupo A en camélidos	73
7.	Conclusiones	77
8.	Estudios posteriores y proyecciones futuras	79
9.	Anexos.....	79
9.1.	Protocolo para la producción de placas del ensayo de “ELISA casero”	79
9.2.	Protocolo del ensayo de “ELISA casero”.....	80
9.3.	Lista de primers utilizados en la genotipificación.....	81
10.	Referencias	81

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la producción del ensayo de “ELISA casero” para el diagnóstico de RVA.....	2
Figura 2. Esquema de la estructura y conformación de rotavirus del grupo A.	5
Figura 3. Esquema de la proteína VP6. (A) disposición de la proteína VP6 en la cápside viral en contacto con las demás proteínas de rotavirus. (B) estructura de la proteína VP6 monomérica.	7
Figura 4. Esquema del ensayo de intercambio de anticuerpos para el reconocimiento de la proteína VP6.	31
Figura 5. Esquema del funcionamiento del ensayo de “ELISA casero” tipo sándwich.	33
Figura 6. Digestión de la proteína recombinante SUMO-rVP6. Proteína recombinante no digerida, línea 1. Proteína recombinante tras el proceso de digestión, línea 2.	40
Figura 7. Semi-cuantificación de la proteína rVP6 mediante el ensayo de Dot Blot.	41
Figura 8. Reconocimiento de la proteína recombinante rVP6 en estado nativo y desnaturalizada por los anticuerpos policlonales del ELISA comercial.....	42
Figura 9. Dot Blot de la proteína recombinante rVP6 reconocida por los anticuerpos policlonales IgG anti-rVP6-HRP.....	46
Figura 10. Reconocimiento del antígeno viral por anticuerpos cruzados entre el ensayo de “ELISA casero” IgG anti-rVP6 (anticuerpo de captura) y ELISA comercial (anticuerpo detector).	47
Figura 11. Optimización de las diluciones de anticuerpos de captura (A) o anticuerpos de detección (B), a utilizarse en el ensayo de “ELISA casero”.	50
Figura 12. Límite de detección del ensayo de “ELISA casero” para el antígeno viral.	51
Figura 13. Valor de cut off calculado para el ensayo de “ELISA casero”.	56
Figura 14. Esquema del protocolo para el ensayo de “ELISA casero”.	59
Figura 15. Comparación de las curvas ROC de la prueba de ELISA comercial y el ensayo de “ELISA casero” en base a la reverso-transcripción.....	62
Figura 16. Genotipos G y [P] de las muestras positivas para RVA mediante el ELISA comercial y posteriormente por el ensayo de “ELISA casero”.	63
Figura 17. Genotipos G y P [] identificados de las muestras positivas para RVA.	64
Figura 18. Electroferotipo de RVA en gel de poliacrilamida (7%) y tinción de nitrato de plata. Línea 1 RVA electroferotipo largo extraído de una muestra humana, línea 2 RVA electroferotipo corto extraído de muestra humana, línea 3 RVA electroferotipo largo extraído de una muestra fecal de llamas.	74
Figura 19. Distribución de los casos de RVA de enero a agosto en relación con la variación de la temperatura.	76

Índice de tablas

Tabla 1. Ensayo de reconocimiento de la proteína recombinante VP6 expresada en <i>E. coli</i>	41
Tabla 2. Reconocimiento del antígeno viral por anticuerpos cruzados entre el ensayo de “ELISA casero” IgG anti-rVP6-HRP (anticuerpo detector) y ELISA comercial (anticuerpo de captura).	48
Tabla 3. Reacción de los anticuerpos de captura IgG anti-rVP6 y detección IgG anti-rVP6HRP producidos para el ensayo de “ELISA casero”.	49
Tabla 4. Reacciones cruzadas para el ensayo de “ELISA casero” con diferentes patógenos entéricos.....	53
Tabla 5. Desempeño del ensayo de “ELISA casero” frente al ELISA comercial.	55
Tabla 6. Características analíticas del ensayo de “ELISA casero”.....	57
Tabla 7. Comparación entre los resultados de la reverso-transcripción con el ensayo de “ELISA casero” y el ELISA comercial.	61
Tabla 8. Concordancia de la reverso-transcripción y de los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial	63
Tabla 9. Precisión intraplaca del ensayo de “ELISA casero”.....	66
Tabla 10. Precisión interplaca del ensayo de “ELISA casero”.....	66
Tabla 11. Comparación de los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial	67
Tabla 112. Comparación de la prueba rápida contra los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial	68
Tabla 13. Probabilidad de riesgo entre EDA y la detección de la presencia de RVA mediante el ensayo de “ELISA casero”.....	70
Tabla 14. Comparación de los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial en muestras de niños que recibieron la vacuna Rotarix.	71
Tabla 15. Comparación de los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial en muestras de heces almacenadas por un periodo entre 2 a 6 años. Los números en paréntesis corresponden a las muestras analizadas luego de la depuración de 25 muestras que registraron valores dentro la zona de incertidumbre (densidad óptica: 0.05 – 0.09).....	72
Tabla 16. Características analíticas del ensayo de “ELISA casero” en el total de las muestras 588 y al eliminar las muestras en la zona de incertidumbre 563.....	73
Tabla 17. Asociación entre infección por RVA y EDA en camélidos domésticos.	76

Abreviaturas

RVA: Rotavirus del grupo A

EDA: Enfermedad diarreica aguda

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

RNA: Ácido desoxirribonucleico

VP: Proteína viral

NSP: Proteína no estructural

SLP: Partícula de capa única

VLP: Partículas tipo virales

DLP: Partículas tipo virales de dos capas

TLP: Partículas tipo virales de tres capas

MET: Aminoácido Metionina

ALA: Aminoácido Alanina

ASN: Aminoácido Asparagina

DO: Densidad óptica

TMB: Tetrametilbenzidina

4CN: 4-cloro-1-naftol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

NIDI: Nutrición, Inmunidad y Diarrea Infantil

OR: Razón de probabilidades del inglés Odds Ratio

Desarrollo y validación de un sistema de “ELISA casero” basado en la expresión de la proteína recombinante VP6 en *E. coli*, para el diagnóstico de Rotavirus del grupo A y sus potenciales aplicaciones

Resumen

Rotavirus del grupo A (RVA) es el agente causal más importante de enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños menores de 5 años y en crías de mamíferos domésticos. El diagnóstico de RVA es importante para identificar a este patógeno, conocer su epidemiología y considerar medidas de control. Los métodos inmunológicos de detección de RVA están generalmente basados en la proteína VP6, la más abundante y conservada en el virión. En este estudio se reporta el desarrollo de un ensayo de “ELISA casero” para la detección de RVA, para el mismo se expresó la proteína recombinante VP6 de rotavirus humano en células de *E. coli*. Se utilizó a la proteína de fusión SUMO-rVP6, para incrementar la solubilidad. Una vez purificada y separada del péptido SUMO por clivaje proteolítico, la proteína se inóculo a conejos para la producción de anticuerpos policlonales IgG anti-rVP6, los cuales se utilizaron en un sistema de ELISA-sándwich para la captura y detección del antígeno viral. Para la validación de este ensayo, 181 muestras fueron analizadas mediante el ensayo de “ELISA casero” y los resultados comparados con un ELISA comercial recomendado por la OMS obteniéndose una sensibilidad diagnóstica de 93.42%, especificidad diagnóstica de 95.24% y un estadístico kappa de 0.887, interpretable como fuertemente concordante. Comparado con RT-PCR, el ensayo de “ELISA casero” obtuvo una sensibilidad de 89.45%, especificidad de 92.47% y un valor kappa de 0.781, estos valores fueron ligeramente mayores a los obtenidos por el ELISA comercial.

El método desarrollado alcanza un nivel de sensibilidad de detección de hasta 3×10^3 CCID₅₀. La especificidad analítica del ensayo fue evaluada frente a diferentes patógenos gastrointestinales: *Giardia lamblia*, ETEC, EPEC, EAEC, EHEC, *Salmonella* spp., *Shigella*, Norovirus, Coronavirus, Adenovirus, Parvovirus, *C. perfringens*, no observándose reacción cruzada. Este ensayo permitió identificar a RVA perteneciente a diferentes genotipos (G2P[4], G3P[6], G9P[8], G9P[6], G12P[8], G1P[8]) circulantes en muestras de niños con GA. Asimismo, el ensayo se utilizó finalmente para la detección de un brote de EDA por RVA en camélidos domésticos.

El “ELISA casero” desarrollado será de utilidad para la detección de RVA en la vigilancia de diarreas por rotavirus tanto en hospitales como también en los casos de diarrea en las unidades de producción ganadera.

Palabras clave: Rotavirus grupo A, ELISA, anticuerpos, proteína recombinante VP6, diagnóstico.

Summary

Group A rotavirus (RVA) is the most prevalent pathogen causing gastroenteritis in children under 5 years old and young domestic animals. The appropriate detection of rotavirus is important to study viral epidemiology and to implement public health measures. The detection of the virus can be based on immunological techniques that focus on protein VP6 -the most abundant and conserved protein of RVA-. In this study, we developed an in-house ELISA for RVA detection, based on the expression of recombinant VP6 protein from a human RVA in *E. coli* cells. To increase the solubility of VP6, we used a fusion tag and obtained SUMO-rVP6 protein, which was cleaved and purified. This product was used to produce polyclonal antibodies IgG anti-rVP6 that were applied on a sandwich ELISA method, to detect the RVA antigen.

For the validation of the assay, 181 diarrhoeal samples from children less than 5 years of age were evaluated concomitantly with a commercial ELISA kit as a reference. Based on the comparison of both immunoassays the sensibility of the in-house method was 93.42%, the specificity 95.24% and the kappa value 0.887, indicating strong agreement between both assays. Compared to RT-PCR the assay had a sensibility of 89.45% and a specificity of 92.47% with a kappa value of 0.781, higher than the values observed for the commercial ELISA. The assay has a limit of detection of 3×10^3 CCID₅₀. No cross reactions with *Giardia lamblia*, ETEC, EPEC, EAEC, EHEC, *Salmonella* spp., *Shigella*, Norovirus, Coronavirus, Adenovirus, Parvovirus, *C. perfringens*, was observed. A variety of circulating genotypes (G2P[4], G3P[6], G9P[8], G9P[6], G12P[8], G1P[8]) were identified by RT PCR in positive RVA samples identified by the in-house assay. Additionally, the developed assay was useful for the detection of an AGE outbreak caused by RVA in domestic camelids. Collectively, these data suggest that the in-house ELISA can be useful for RVA detection in diarrheal cases in children and camelid livestock.

Key words: Group A rotavirus, ELISA, antibodies, recombinant protein VP6, diagnosis.

Resumen gráfico

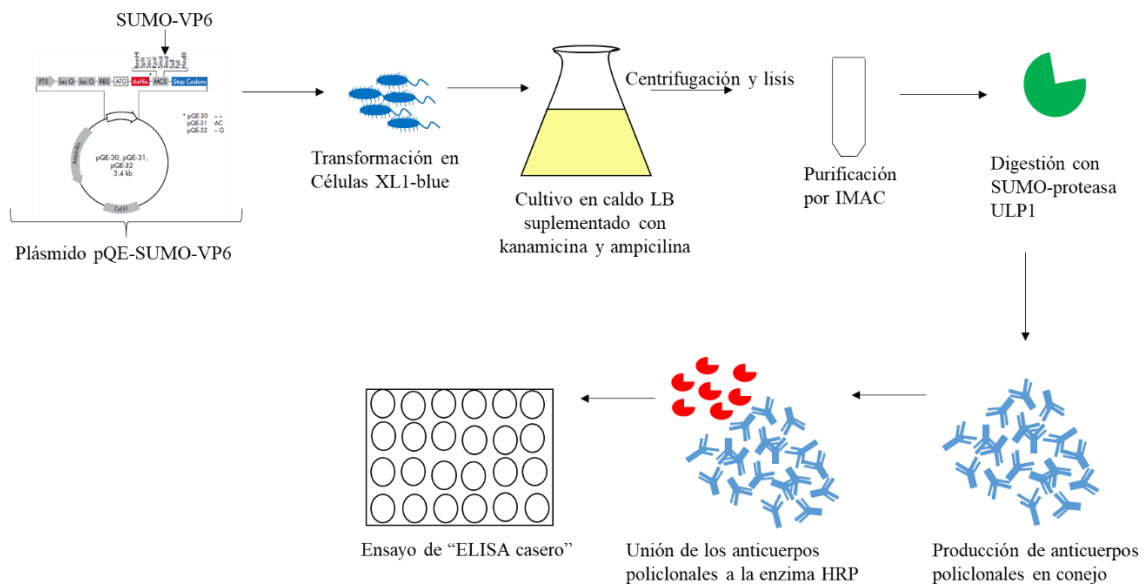


Figura 1. Esquema de la producción del ensayo de “ELISA casero” para el diagnóstico de RVA

1. Introducción

Rotavirus del grupo A (RVA) es el patógeno gastrointestinal responsable de la mayor causa de diarrea en niños menores de 5 años, ocasionando anualmente, a nivel mundial la muerte de hasta 215.000 niños (Jacqueline E. Tate et al., 2016).

A pesar del efecto de la introducción de las vacunas anti-RVA y de la reducción observada en las tasas de hospitalizaciones y mortalidad, RVA aún continúa siendo una de las causas importantes de EDA en niños menores a 5 años, por lo que su detección y diagnóstico, siguen siendo de vital importancia. En el caso de Bolivia, por ejemplo, luego de la introducción de la vacuna anti-rotavirus en el Programa Nacional de Inmunizaciones en el año 2008, se registró un descenso del 40.8% en las tasas de hospitalizaciones a causa de rotavirus, en niños <5 años en el periodo post-vacuna (2009-2014). Asimismo, las tasas de mortalidad y hospitalizaciones asociadas a la enfermedad diarreica aguda (EDA) también presentaron un descenso de 37.5% y 30.2% respectivamente (Inchauste et al., 2017). Pese a estas mejoras, sin embargo, es necesario a lo largo del programa nacional de rotavirus, continuar estudios de vigilancia epidemiológica y del monitoreo de la efectividad de la vacuna, por lo que se requieren ensayos disponibles, de bajo costo a nivel local, que otorguen resultados confiables para el diagnóstico de la infección por rotavirus, asociada a la diarrea aguda.

Por otra parte, RVA también es un agente importante que infecta a diferentes mamíferos y aves, afectando a los neonatos de varios animales domésticos, causando EDA, pérdida de peso, altas tasas de morbilidad, mortalidad, generando así severas pérdidas económicas y disminuyendo la producción en el ganado bovino, porcino, equino entre otros (Dhama, Chauhan, Mahendran, & Malik, 2009; Papp et al., 2013). RVA es uno de los enteropatógenos más comunes en animales y su presencia se ha asociado significativamente con la EDA en muestras de heces de terneros con síntomas clínicos, donde además se halló una razón de probabilidad entre la EDA y la presencia de RVA con un valor de 79.9, lo que indica que tras la exposición a rotavirus la posibilidad de presentar diarrea es mayor en estos animales (Cho et al., 2013).

La infección de RVA en camélidos sudamericanos también ha sido reportada en alpacas (Rojas et al., 2016), llamas (Barbieri et al., 2014), vicuñas (Badaracco et al., 2013) y guanacos (Parreño et al., 2001), encontrándose la presencia de anticuerpos contra RVA en crías de guanacos en el primer mes de vida, sugiriendo que la adquisición de los

mismos se da desde las madres a las crías (Marcoppido, Olivera, Bok, & Parreño, 2011). Un 95% de los camélidos adultos presentan anticuerpos contra RVA, por lo que este es un patógeno prevalente en estos mamíferos (Parreño et al., 2001). Las cepas de RVA que se detectaron en vicuñas y guanacos (Badaracco et al., 2013; Parreno, Bok, Fernandez, & Gomez, 2004) fueron caracterizadas mediante secuenciación reportando constelaciones genéticas que comparten segmentos similares entre ambas como G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-Ax-N2-T6-E3-Hx y G8-P[14]-I2-R5-C2-M2-A11-N2-T6-E12-H3 para vicuñas y guanacos respectivamente. Algunos segmentos del genoma de RVA se describieron en RVA de bovinos y también de aislados de cabra, búfalo, oveja y humano.

En cuanto a las cepas de RVA detectadas en alpacas y llamas (Rojas et al., 2019), se reportan genotipos con segmentos similares entre las cepas de RVA que circulan en diferentes hospederos, observándose posibles reordenamientos de genes (del inglés reassortment) producto de la transmisión de RVA entre especies.

Bolivia cuenta con una de las mayores poblaciones de camélidos en el mundo. Siendo la crianza de estos la principal actividad económica y fuente de ingreso para varias comunidades productoras del occidente del país. La producción tanto de fibra como de carne para consumo puede verse afectada por las altas tasas de morbilidad que reporta la infección por RVA en crías de camélidos sudamericanos, sin embargo, estudios sobre la infección por rotavirus y su prevalencia en estos animales no está aún bien documentada.

2. Antecedentes

2.1. Características generales de rotavirus

Miembro de la familia *Reoviridae*, rotavirus es un virus sin envoltura, que mide aproximadamente 1000 Å de diámetro. Tras ser observado por microscopía electrónica, presenta una forma característica de rueda, de donde proviene su nombre. Su cápside icosaédrica está compuesta de tres capas proteicas que encierran en el centro 11 segmentos de RNA doble cadena, cada uno de los cuales codifican para las proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) o para las proteínas no estructurales que conforman el virión (NSP1-NSP6) excepto el segmento 11 que codifica para NSP5 y NSP6 (Pesavento, Crawford, Estes, & Prasad, 2006). El core del virión de rotavirus o partícula de capa única (en inglés single layer particle SLP) formado por la proteína VP2, contiene

en su interior, además del material genético de doble cadena de RNA, el complejo enzimático necesario para la replicación viral formado por las proteínas VP1 (RNA dependiente de RNA polimerasa) y VP3 (enzima capping). La proteína VP6 es altamente inmunogénica y forma la capa intermedia del virión constituyendo las partículas virales infectantes que constan de dos capas denominadas DLP (del inglés “double layer particles” DLP). VP6 tiene un papel estructural ya que está en contacto con el core y con la capa superficial del virus formada por las proteínas VP7 y VP4, donde esta última forma espículas. (Desselberger, 2014).

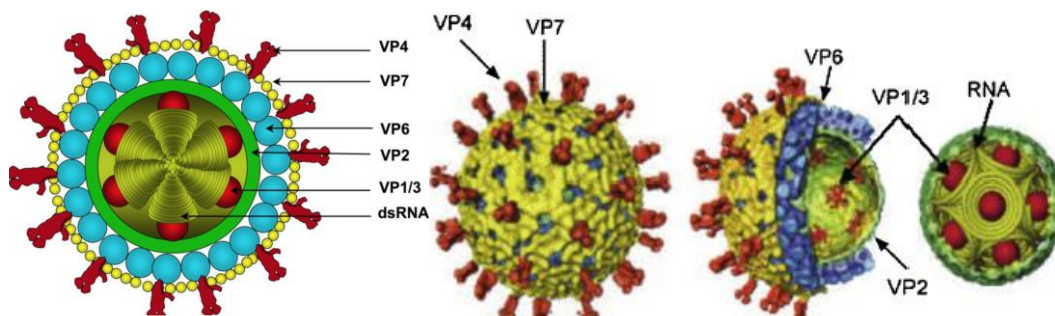


Figura 2. Esquema de la estructura y conformación de rotavirus del grupo A.

2.2. Proteína VP6

VP6 es la proteína dominante inmunogénica de rotavirus por ser el constituyente proteico estructural más abundante (alrededor del 50% de las proteínas estructurales) y conservado entre las cepas que infectan tanto a humanos como a animales (Rey, Lepault, & Cohen, 2003), compone la capa intermedia de la cápside icosaédrica de rotavirus, por lo que está en contacto con las capas interna (proteína VP2) y externa (proteína VP4 y VP7) del virión mediante aminoácidos altamente conservados en cada una de estas regiones (M. Mathieu et al., 2001), cumpliendo funciones importantes para el virus, tanto como componente estructural, como en la entrada a la célula huésped, en la transcripción y el empaquetamiento del nuevo material genético (Pesavento et al., 2006).

VP6 es una proteína compuesta por 397 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 45kD, su cadena polipeptídica se pliega en dos diferentes dominios; el dominio B y el dominio H. El dominio B constituye la base del trímero, conformado por ocho alfa hélices (α -ah) que abarcan los residuos 1-150 en extremo amino-terminal y los residuos 335-397 del extremo carboxi-terminal de la cadena de aminoácidos. El dominio H conforma la cabeza o la parte superior del trímero formado por un dominio tipo “ β -sandwich con

jelly- roll” en el que se involucran los residuos 151-334 que se insertan entre las α -e y α -f del dominio B.

En el virión, la proteína VP6 se presenta en 260 trímeros, los cuales forman una estructura alargada que mide aproximadamente 95 Å de alto, con base triangular, y una parte superior que tiene forma hexagonal, las tres subunidades de VP6 que conforman el trímetro están en contacto mediante ambos dominios de la proteína (H y B) lo que estabiliza la molécula (Magali Mathieu et al., 2001; Rey et al., 2003).

La proteína VP6 tiene la capacidad intrínseca de auto ensamblarse formando trímeros (estructura natural de VP6) que luego se agrupan en estructuras más complejas esféricas o cilíndricas de elevado peso molecular denominadas nanoesferas o nanotubos respectivamente. La función de estos ensambles puede deberse a un almacenamiento de VP6 durante la replicación viral. Factores como el pH y la fuerza iónica llevan a diferentes ensamblajes de la proteína VP6. Un medio con una fuerza iónica (NaCl 0.2 a 0.6 M) y un pH alrededor de 4.5 permite a las partículas ensamblarse en una simetría icosaédrica (Rey et al., 2003).

Se ha resaltado la capacidad inmunogénica de la proteína VP6 en varios estudios (Bugli et al., 2014; Lappalainen et al., 2014; Pastor et al., 2014), pues en la inmunización de ratones con la proteína recombinante VP6, se ha reportado una respuesta mucosal y sistémica contra el virus cuando los animales fueron desafiados con diferentes cepas de rotavirus (Lappalainen et al., 2014). Es importante mencionar que los nanotubos son los que han producido mayores títulos de IgA, IgG, al igual que una mayor cantidad de células T productoras de INF- γ a comparación de las nano esferas o simplemente los trímeros de VP6 (Malm, Heinimäki, Vesikari, & Blazevic, 2017). Debido a las propiedades altamente inmunogénicas de VP6, esta constituye una proteína propicia para ser utilizada con fines de diagnóstico de la enfermedad causada por RVA.

Por la antigenicidad y la inmunogenicidad que VP6 genera en el hospedero, se ha utilizado a VP6 como adyuvante, en unión a otras partículas de otros virus entéricos, con la intención de aumentar la respuesta inmune, por ejemplo, frente a norovirus, además de servir como vacuna contra RVA. Por lo que VP6 es considerada como un potencial candidato a vacuna contra el RVA por presentar epítopes conservados y sin presentar el riesgo de una recombinación de material genético, pero brindando la protección necesaria al individuo (Malm et al., 2017).

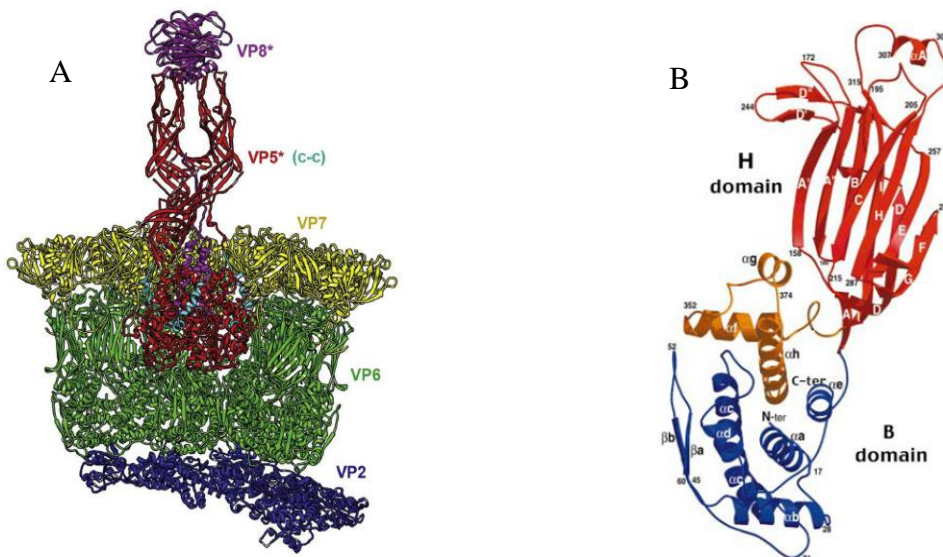


Figura 3. Esquema de la proteína VP6. (A) disposición de la proteína VP6 en la cápside viral en contacto con las demás proteínas de rotavirus. (B) estructura de la proteína VP6 monomérica.

2.3. Antigenicidad de la proteína VP6

VP6 representa el antígeno a partir del cual se definen los 10 grupos (A-J) (Bányai et al., 2017; Matthijssens et al., 2012) y los 4 subgrupos (subgrupo I, subgrupo II, subgrupo I/II y subgrupo no I/II) de rotavirus (Tang, Gilbert, Matsui, & Greenberg, 1997) y tiene la capacidad de inducir en el huésped una respuesta antigénica, inmunogénica y protectora importante (Ward & McNeal, 2010). De acuerdo con la publicación de Matthijssens et al., (2008), la proteína VP6 se clasifica en 10 genotipos denominados I, debido a que VP6 es la proteína intermedia de la cápside viral (en inglés intermediate capsid shell), esta clasificación se realizó tras un análisis filogenético de las secuencias estableciendo que el 85% de identidad es el valor de cut off para determinar los diferentes genotipos de la proteína VP6 (Matthijssens et al., 2008).

Los antígenos que definen el grupo de rotavirus se basan en el reconocimiento por anticuerpos monoclonales específicos comunes a las diferentes cepas de distintos huéspedes incluyendo rotavirus de aves. Mientras que los antígenos de subgrupo se definen por la presencia de dos epítopes, el epítipo I reconocido por el anticuerpo monoclonal 255/60 y el epítipo II reconocido por el anticuerpo monoclonal 631/9. Una variación en la cadena aminoacídica en posiciones 172 Met→Ala o en el aminoácido 305 Asn→Ala, pueden originar el cambio del subgrupo II al subgrupo I/II, al igual que cambios en los aminoácidos de rotavirus de subgrupo I Ala→Asn en la posición 305 y

Asn→Ala en la posición 308 resultan en el cambio hacia el subgrupo II (Lopez, Espinosa, Greenberg, & Arias, 1994).

La proteína VP6 por constituir la capa intermedia de rotavirus interactúa con las proteínas VP2 del core y VP7 de la capa externa de la cápside además de con otras subunidades de VP6. Su ubicación y el doble rol que desempeña en la infección viral, desde proteger al core del virión, a ceder espacio a la polimerasa viral para la síntesis de RNA mensajero, ejercen una presión de selección para que las secuencias de aminoácidos se mantengan conservadas.

Sin embargo, pese a que los anticuerpos monoclonales reaccionan reconociendo el epítipo conformacional de los trímeros de VP6 y no así las estructuras monoméricas de la proteína, ni la cadena peptídica en la que pueden existir entre 14 a 32 sitios variables con menos del 70% de conservación (Parbhoo, Dewar, & Gildenhuis, 2016), algunas de estas sustituciones podrían afectar regiones que conforman los epítopos de subgrupo, llegando a ser irreconocibles para los anticuerpos monoclonales específicos de los diferentes subgrupos llevando así a una clasificación incorrecta de RVA. En vista de este hecho, Thongprachum et al., (2010) diseñaron el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la clasificación de los subgrupos de RVA, diseñando primers en base al alineamiento de las secuencias de diferentes proteínas VP6 de distintos subgrupos tanto de humanos como de cerdos. De esta forma diseñaron un ensayo que permitió una clasificación más segura y la reasignación de algunas cepas en otros subgrupos de rotavirus con los que comparten una identidad entre el 97% y el 99% (Thongprachum et al., 2010).

2.4. Partículas tipo virales, pseudopartículas o cápsides vacías de RVA

VP6 forma parte de las llamadas “partículas tipo virales” (en inglés “viral like particles” asignadas como VLP’s), estas se caracterizan por tener la estructura de la cápside del virión, pero carecen de material genético, sin embargo de igual manera generan respuesta inmune en el huésped, por lo que son utilizadas con diferentes propósitos, como vacunas o en métodos de diagnóstico (Ward & McNeal, 2010) como en el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Las VLP’s compuestas por la proteína VP2 se denominan partículas de capa única (del inglés single like particles SLP), las que están compuestas por la proteína VP2 y VP6 son partículas de doble capa (del inglés “double

layer particles” DLP’s), mientras las conformadas por las proteínas VP2, VP6 y VP7 se describen como las partículas virales de triple capa (del inglés “triple layer particles” TLP’s) (Ward & McNeal, 2010).

2.5. Sistemas de expresión de proteína recombinante VP6

La expresión heteróloga de la proteína VP6 se ha realizado en diferentes sistemas, uno de los más utilizados es el de baculovirus, en células de insecto *Spodoptera frugiperda*. Las proteínas recombinantes se localizan en el citoplasma de las células infectadas y posteriormente son purificadas. La proteína recombinante mantiene su conformación nativa y es reconocida por anticuerpos monoclonales dirigidos contra VP6 (Estes et al., 1987).

El 2003, Bertolotti-Ciarlet et al., (2003) expresaron conjuntamente las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus del grupo A, en un sistema de baculovirus. Para ello los genes de ambas proteínas se clonaron en un vector y posteriormente se introdujeron en baculovirus, la expresión de VP2 y VP6 se inició a las 24 horas y 36 horas respectivamente. A las 72 horas, se identificaron VLP’s de ambas proteínas, además de detectarse partículas de doble capa. Entre las ventajas de este sistema de expresión se remarca el elevado rendimiento, la obtención de partículas virales intactas, el mantenimiento de la interacción entre los epítopes de ambas proteínas y las características inmunogénicas de ambas proteínas que originan una respuesta inmune al ser inoculadas en ratones (Bertolotti-Ciarlet, Ciarlet, Crawford, Conner, & Estes, 2003).

Con la idea de obtener un candidato a vacuna que sea comestible o proteína recombinante que sea útil para el desarrollo de sistemas de diagnóstico de RVA, el sistema desarrollado por Matsumura et al., (2002) permite la expresión de la proteína VP6 de rotavirus bovino en las hojas de plantas de papa, donde la proteína recombinante obtenida en este estudio, es antigénica e inmunogénica (Matsumura, Itchoda, & Tsunemitsu, 2002). De la misma manera en otro estudio las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus SA11 y EDIM respectivamente, se expresaron en plantas de tomate, donde en los frutos de las plantas transgénicas se pudieron identificar mediante los anticuerpos correspondientes a las proteínas recombinantes, la proteína VP6 que se encontraba en su forma trimérica, formando VLPs y en asociación con VP2 formando DLPs. Las proteínas expresadas

también tenían propiedades inmunogénicas ya que los ratones inmunizados con las proteínas recombinante presentaron una respuesta humoral (Saldana et al., 2006).

Recientemente, Ryabchevskaya et al., (2020), basados en la identificación realizada por Choi et al., (2000), del epítotope de la proteína VP6 que confiere protección frente a la infección por RVA (residuos de aminoácidos 289-302 RLSFQLMRPPNMTP), expresaron el mencionado fragmento de la proteína VP6 en la superficie de la proteína de la envoltura del virus del mosaico de Alternanthera (AltMV), elegido por sus características como adyuvante y capacidad de formar VLPs, para obtener un candidato de vacuna contra rotavirus. La expresión se realizó en *E. coli* a partir de una fusión de la proteína de la envoltura de AltMV con el extremo carboxi-terminal del epítotope de VP6. La proteína de fusión tanto en su forma monomérica (peso de 25kDa) como polimérica, reconocida por anticuerpos policlonales de cabra contra RVA. De forma similar, al incubarse la proteína con RNA de AltMV y proteínas de la envoltura de AltMV se observó la formación de ribonucleoproteínas morfológicamente parecidas a VLPs de AltMV (Choi et al., 2000; Ryabchevskaya et al., 2020).

Se ha descrito también la expresión de la proteína recombinante VP6 en *Sacharomyces cerevisiae* y posteriormente en *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*, la ventaja de la producción de la proteína en estos sistemas es que se obtiene una proteína soluble que presenta modificaciones postraduccionales y que el cultivo es escalable para la producción en biorreactores (Bredell, Smith, Prins, Görgens, & van Zyl, 2016; Rodríguez-Limas, Tyo, Nielsen, Ramírez, & Palomares, 2011).

Cabe mencionar que las levaduras tienen una importante producción de biomasa que no está ligada a la expresión de la proteína recombinante, por ejemplo *H. polymorpha* y *P. pastoris* producen alrededor de cinco veces más biomasa que *Escherichia coli* (*E. coli*), a pesar de que ésta última tiene un mayor rendimiento de la proteína recombinante VP6, aunque la proteína expresada es insoluble.

Los rendimientos de la proteína recombinante VP6 reportados en levaduras varían de acuerdo a la escala en la que se realiza el cultivo, pues en frascos de cultivo la producción de VP6 en *P. pastoris* es mayor que en *H. polymorpha*, mas el rendimiento se ve invertido cuando se emplean biorreactores (Bredell et al., 2016). También es posible la expresión de partículas de triple capa que se ensamblan a partir de la expresión de las proteínas VP2, VP6 y VP7 producidas en proporciones 1:12:4 respectivamente en *Sacharomyces*

cerevisae, al transformar las células de levadura con un plásmido que contenga los tres genes correspondientes a estas proteínas (Rodríguez-Limas et al., 2011).

La expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, es muy útil debido a su rapidez, rendimiento y bajo costo. Al utilizar la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, se ha reportado que la producción de la proteína recombinante VP6 empieza a la primera hora post-inducción alcanzando un pico entre 3 o 4 horas posteriores con rendimientos de alrededor de 298.8 mg por litro (Bredell et al., 2016). Sin embargo, al no contar la célula procariota con la gama de modificaciones postraduccionales que presentan las proteínas de una célula eucariota, se observan dificultades como la formación de agregados insolubles o cuerpos de inclusión debido al mal plegamiento de las proteínas por lo que luego de la purificación tienen que pasar por un proceso de renaturalización para poder ser utilizadas (Bredell et al., 2016; Choi et al., 2004; Zhao et al., 2011).

Las proteínas heterólogas requieren generalmente de proteínas moduladoras, ya que al ser proteínas largas y con múltiples dominios necesitan de chaperonas y/o requieren tener varias modificaciones post-traduccionales para superar las dificultades en su correcto plegamiento, y evitar formar cuerpos amorfos característicos que contienen estructuras ordenadas “cross- β ” que recuerdan a las estructuras amiloideas de proteínas en humanos (Bucciantini et al., 2002).

La formación de agregados proteicos ocurre cuando las superficies hidrofóbicas intramoleculares de las subunidades estructurales de una proteína que están en proceso de plegarse interactúan con la superficie intramolecular de una subunidad vecina, exponiendo así regiones hidrofóbicas que se encontrarían hacia el centro de una proteína nativa, por lo que las regiones hidrofóbicas expuestas tienen tendencia a agregarse entre sí. Debido a su estructura trimérica VP6 tiene naturaleza menos soluble y la conformación “ β -barrel” que adquiere su cadena polipeptídica, la predispone a la formación de estructuras amiloideas.

Para la exitosa expresión de las proteínas se deben tomar en cuenta diferentes factores como los plásmidos utilizados para insertar la proteína de interés, plásmidos como pQE tienen un origen de replicación en ColEI y suelen encontrarse entre 15 y 20 copias del vector por célula (Rosano & Ceccarelli, 2014). Entre los promotores ampliamente utilizados que controlan la expresión del gen, se resalta el uso del promotor del operón lac, el cual es inducido bajo la presencia de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Para obtener un mejor rendimiento, IPTG debe ser añadido cuando el cultivo alcance densidades ópticas de 0.5-0.7, cuando las células ingresan a la fase de crecimiento logarítmico. De lo contrario, la sobreexpresión de las proteínas reduce la viabilidad de la célula (ya que los cultivos inducidos por IPTG presentan un menor recuento bacteriano). Se ha observado que la cantidad de células incrementa en las primeras tres horas post-inducción (Choi et al., 2004) lo que concuerda con el pico de mayor expresión de VP6.

Otro factor importante es la optimización de los codones del gen VP6 de rotavirus para su expresión en *E. coli*, pues de otra manera se producen proteínas truncadas e incompletas en el extremo carboxi-terminal como observan Choi et al., (2004) quienes expresaron la proteína VP6 de rotavirus marcada por Hexa-histidina en fusión con la proteína de unión a la maltosa (del inglés maltose binding protein MBP). Las proteínas truncadas se deben a un sesgo en el uso de codones, pues los codones de alanina GCA y GCU, histidina CAU, lisina AAG, asparagina AAU, glutamina CAA, serina UCA, UCU, treonina ACA, ACU, y valina GUA, GUU, se emplean mucho más en el gen de VP6 de rotavirus que en *E. coli*, de manera que al utilizarse codones óptimos en *E. coli* para las mismas proteínas se obtienen proteínas completas que después de purificarse otorgan protección a ratones inmunizados con las mismas (Choi et al., 2004).

Las cepas bacterianas utilizadas para la expresión de la proteína también juegan un rol importante, la cepa XL1-Blue tiene un crecimiento más lento que otras cepas de *E. coli*, sin embargo, el producto formado es de calidad. Las cepas Rosetta (DE3) pLacI y BL21 (DE3) en el estudio de Choi et al., (2004) y la cepa Turner (DE3) pLysS en la expresión de VP6 en el trabajo de Kumar et al., (2016) fueron las cepas que tuvieron un mejor rendimiento (Choi et al., 2004; Kumar et al., 2016).

La expresión de VP6 en *E. coli* puede también utilizarse como un coadyuvante aplicado unido a vacunas de virus entéricos, con el fin de incrementar la respuesta inmune del hospedero (Malm et al., 2017), para otorgar inmunidad al hospedero (Heinimäki et al., 2019), o como un candidato a vacuna contra RVA.

Finalmente existen reportes de la expresión de la proteína VP6 en la pared celular de *Lactococcus lactis*, donde la presencia de la proteína provoca inmunidad en ratones BALB/c adultos los cuales recibieron una inmunización intranasal, generando la producción de anticuerpos IgG e IgA anti-rotavirus (Temprana et al., 2018).

2.6. Proteínas de fusión

Si bien la expresión heteróloga de proteínas recombinantes en sistemas procariotas como en células de *E. coli* es rápida, económica y fácil, también conlleva complicaciones como la degradación por proteólisis de las proteínas recombinantes, la insolubilidad de la proteína expresada, la purificación y clivaje de las mismas, la formación de cuerpos de inclusión y el bajo rendimiento (Butt, Edavettal, Hall, & Mattern, 2005).

Para subsanar tales situaciones, se utilizan diferentes estrategias como la unión del gen de la proteína deseada a varios tramos de secuencias (marcas) o a secuencias de otros genes codificantes de proteínas. Esto puede ser útil, por ejemplo, para proteger a la proteína de la degradación y promover el plegamiento adecuado de la proteína (Kaur, Kumar, & Kaur, 2018). Entre las proteínas de fusión se incluyen por ejemplo a la proteína de unión a la maltosa (MBP), la glutatión s-transferasa (GST), la ubiquitina y el péptido SUMO. En los dos últimos casos, se trata de una unión covalente entre la proteína recombinante (proteína deseada) y proteínas de bajo peso molecular estables, que posteriormente son removidas mediante diferentes proteasas. Las proteínas de fusión probablemente actúan como chaperonas de las proteínas recombinantes y al ser estructuras estables promueven a un plegamiento adecuado de la proteína recombinante. La unión entre proteínas reporta varias ventajas como el incremento en el rendimiento de la expresión de la proteína deseada, mejora en la solubilidad y facilitan a su vez la purificación de la misma, pues la utilización de una columna de afinidad adecuada es suficiente (Butt et al., 2005).

Se plantea la unión de proteínas de fusión, con el fin de incrementar la solubilidad de las proteínas recombinantes expresadas en un sistema procariota y al mismo tiempo facilitar la purificación del producto, así por ejemplo adicionalmente se puede incorporar una marca de Hexa-histidina al extremo amino-terminal de SUMO seguido por la proteína blanco. En caso de que la proteína recombinante aún sea insoluble, es recomendada la adición de otra proteína de fusión (GST, tioredoxina, MBP) en el extremo amino-terminal de SUMO para incrementar la solubilidad. Las proteínas blanco posteriormente se purifican mediante dos pasos de cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados, logrando obtenerse un producto puro (Guerrero, Ciragan, & Iwai, 2015).

2.6.1. SUMO y SUMO proteasa

El péptido SUMO (del inglés Small Ubiquitin Modifier) es una pequeña proteína de bajo peso molecular, de la familia de las ubiquitinas UBL (ubiquitin like), que es utilizada como proteína de fusión para facilitar la expresión de proteínas heterólogas en sistemas de procariotas como *E. coli*.

Las proteínas UBLs son precursores que comparten una estructura tridimensional parecida con ubiquitina, sus estructuras globulares contienen laminas- β alrededor de una α -hélice, además presentan residuos de di-glicina (-GG) conservados en el extremo carboxi-terminal, necesarias para el clivaje y separación de las proteínas blanco. Las ubiquitinas son muy resistentes y estables a la proteólisis y el calor, por lo que su unión al extremo amino terminal de la proteína recombinante contribuye a su estabilidad e incremento de su rendimiento.

El gen de SUMO, sentrin o Smt3 de levaduras, es un gen que se emplea generalmente en fusión con los genes de las proteínas recombinantes en *E. coli* para incrementar su rendimiento (logrando obtenerse hasta un 60% de las proteínas de *E. coli*) y solubilidad.

SUMO se une covalentemente a las lisinas de la proteína blanco, en el extremo amino terminal para incrementar la solubilidad de las proteínas heterólogas. Por una parte, SUMO posee un centro hidrofóbico y una superficie hidrofílica sobre el que las proteínas insolubles suelen plegarse alrededor adecuadamente y también porque proporciona un efecto de proteína chaperona. Por ejemplo, se menciona que la proteína MMP13 de difícil expresión, al unirse a Hexa-histidina-SUMO, alcanza un estado soluble y plegamiento correcto en *E. coli* (Malakhov et al., 2004) demostrándose el efecto chaperona de SUMO. El adecuado plegamiento de las proteínas se debe a que SUMO se reporta naturalmente como la proteína que se pliega más rápidamente, lo que tendría un efecto iniciador en el extremo carboxi-terminal donde se ubica la proteína blanco (Malakhov et al., 2004). Otra de las ventajas por la que SUMO es utilizada es porque protege de la degradación por proteasas en diferentes compartimientos celulares y facilita además la translocación nuclear (Butt et al., 2005).

Por otra parte, uno de los inconvenientes más comunes al utilizar proteínas de fusión, es el uso posterior de proteasas que pueden clivar y dejar a proteínas con un extremo amino-terminal inadecuado y por lo tanto no funcional. Las SUMO proteasas (ULP1) ofrecen la ventaja de reconocer estructuras terciarias de SUMO en el sitio de unión a otras proteínas,

a diferencia de las otras proteasas que reconocen secuencias de aminoácidos. Estas enzimas se encuentran activas y clivan las proteínas blanco en un amplio rango de temperaturas, pH y diferentes condiciones, aunque se encuentran óptimas a una temperatura entre 22°C y 37°C y a un pH entre 8-9. Es importante mencionar que ULP1 puede clivar cualquier aminoácido que se encuentre después del motivo Gly-Gly de SUMO, a excepción de prolina, por lo que se puede fusionar a proteínas casi con cualquier extremo amino-terminal. La enzima funciona a una proporción 1:10000 con relación a la proteína blanco (Malakhov et al., 2004).

2.7. SUMO-VP6

Al expresar la proteína VP6 en células de *E. coli*, el mayor inconveniente encontrado por Zhao et al., (2011) o Choi et al., (2004) fue la formación de cuerpos de inclusión y la insolubilidad de la proteína recombinante, que posteriormente fue solucionada tras un proceso de renaturalización de la proteína (Choi et al., 2004; Zhao et al., 2011).

Idealmente una proteína heteróloga expresada debe encontrarse en su forma soluble. Con este objetivo y para tener un mayor rendimiento, Bugli et al., (2014) reporta la expresión de la proteína VP6 en fusión con SUMO, los resultados muestran que SUMO es el mejor candidato como marca de afinidad para la fusión de la proteína en su extremo amino-terminal en comparación con tioredoxina o una marca de Hexa-histidina, ya que incrementa el rendimiento en la expresión y el 80% de la proteína permanece soluble, incluso una vez separada la proteína recombinante VP6 de SUMO, ya que SUMO promovería a una conformación de VP6 que beneficia la interacción de la proteína con los solventes (Bugli et al., 2014) .

La expresión de la fusión de proteínas SUMO-VP6 da como resultado una proteína quimérica que se auto ensambla en estructuras muy estables de alrededor de 20 nm capaces de resistir a diferentes pH (Palmieri et al., 2015).

2.8. Pruebas de diagnóstico para RVA

El diagnóstico de rotavirus se realiza tanto mediante la detección del virus como también por la detección de los anticuerpos contra rotavirus (Parashar, Nelson, & Kang, 2013). De acuerdo con esta clasificación, se emplean técnicas para la detección de rotavirus

mediante ensayos inmunoenzimáticos como un ejemplo, para estos se han desarrollado anticuerpos capaces de reconocer específicamente al antígeno viral. De estos, las pruebas de inmunocromatografía y ELISA que poseen 10-100 veces mayor sensibilidad que la microscopia electrónica (antiguamente utilizada como prueba de referencia) son ampliamente utilizadas por su practicidad.

Desde la década de los 80 los ensayos inmunoenzimáticos se constituyeron en el método estándar para la detección de RVA en muestras fecales. En el 2013 y con el propósito contar con métodos fáciles y disponibles para la detección de RVA, a nivel mundial Gautman y colaboradores publicaron una comparación de los ensayos inmunoenzimáticos que estaban disponibles en el mercado para el diagnóstico de rotavirus del grupo A en muestras fecales. Se incluyeron a Premier™ Rotaclone® (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati OH, USA) que utiliza anticuerpos monoclonales contra VP6, ProSpect™ Rotavirus Microplate Assay (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) que utiliza anticuerpos policlonales específicos contra el antígeno de grupo de RVA (proteína VP6) y RIDASCREEN® (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) que emplea anticuerpos monoclonales contra la proteína VP6. Para ello, los resultados obtenidos por las pruebas se compararon con los resultados obtenidos mediante RT-PCR (prueba de referencia), encontrándose que la sensibilidad variaba ligeramente entre los diferentes ensayos. Para Premier™ Rotaclone® se reportó un 77%, para ProSpect™ Rotavirus Microplate Assay, 75% y un 82% para RIDASCREEN®, a su vez, las tres pruebas alcanzaron un 100% en la especificidad contra RVA (R. Gautam, F. Lyde, M. D. Esona, O. Quaye, & M. D. Bowen, 2013).

Los ensayos de ELISA se utilizaron como prueba de referencia para la evaluación de diferentes técnicas de detección de RVA. como las de inmunocromatografía, empleadas en lugares donde la disponibilidad de los primeros es limitada y presentan un costo más elevado (Dhiman, Devi, Singh, & Devi, 2015). Asimismo, para diferenciar las muestras clínicamente relevantes en los ensayos de RT-PCR (Phillips et al., 2009).

Asimismo, para realizar estudios epidemiológicos, pues como se reporta en un estudio de vigilancia de rotavirus en Estados Unidos, se observó el cambio que ocasionó la introducción de la vacuna antirotaviral en la población. Pues en el periodo pre-vacunal se realizaban 31800 exámenes para rotavirus anualmente, de los cuales el 21% resultaron positivos, mientras que en el periodo post-vacunal las pruebas realizadas por año descendieron alrededor de 20981 con un 5.6% de resultados positivos, lo que muestra una

reducción del 73.3% en el total de casos positivos donde se detectó al antígeno viral (Kaufman & Chen, 2016).

En cuanto a los ensayos de inmunocromatografía son sencillos, rápidos y no requieren de equipo específico para su desarrollo. En las comparaciones realizadas entre pruebas de este tipo, se destaca que tienen características analíticas similares y que además existe una concordancia sustancial entre las pruebas de inmunocromatografía y el ensayo de reverso-transcripción (De Grazia et al., 2017; Kaplon et al., 2015). Al comparar con la reverso-transcripción, la sensibilidad registrada oscila de un 69.1% hasta un 94% (según la prueba utilizada), mientras que la especificidad se encuentra entre 97% y 100%, además de poder detectar una variedad de genotipos de rotavirus circulantes y no presentar reacciones cruzadas con otros virus entéricos (Kaplon et al., 2015).

Otra técnica para identificar a rotavirus es la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en la que se detectan los 11 segmentos de RNA doble cadena de rotavirus que permite diferenciar el electroferotipo de rotavirus (largo o corto) y mediante este el subgrupo al que pertenecen (Pereira et al., 1983).

Entre las pruebas más empleadas actualmente está la detección de rotavirus mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), que es además un método de referencia para determinar la presencia del virus y comparar con cualquier ensayo, por su alta especificidad y sensibilidad 1000 o 10000 veces mayor a los métodos que utilizan anticuerpos (Mijatovic-Rustempasic et al., 2013).

Los ensayos de reverso-transcripción (RT-PCR y qRT-PCR), se basan en la detección de genes que presentan secuencias conservadas. Así por ejemplo, en un estudio reciente, Joshi et al., (2019) evaluaron las secuencias de los 11 segmentos del RNA de rotavirus en busca de regiones que posean segmentos conservados, seleccionándose a los genes NSP2, NSP3 y VP6 en base los cuales se desarrollaron primers y sondas para su uso por qRT-PCR (Joshi, Deore, Walimbe, Ranshing, & Chitambar, 2019).

A pesar de su amplia utilidad, la prueba de qRT-PCR por su sensibilidad reportó la presencia de rotavirus en muestras de individuos asintomáticos, que presentan cargas virales bajas pero aun detectables con Ct elevados (Corcoran, Van Well, & Van Loo, 2014). De esta manera, por ejemplo, en el ensayo de Joshi et al., (2019) se estableció un Ct de 35 como punto de corte. Al comparar la sensibilidad y especificidad del ensayo con un ELISA de referencia (para diferenciar las muestras clínicamente relevantes) este

alcanzo un 96.2% de sensibilidad y un 100% de especificidad, siendo capaz de detectar desde 4.7×10^7 hasta 4.7 copias por reacción (Joshi et al., 2019). En contraste, la sensibilidad de 78.5% - 88.6% de las pruebas inmunocromatográficas tienen una mejor utilidad para diagnosticar casos sintomáticos de RVA y tendrían una eficiencia relativamente similar a las pruebas recomendadas por la OMS (De Grazia et al., 2017).

El estudio de Lagare et al., (2017) al comparar en base al ensayo de RT-PCR, a un ensayo inmunocromatográfico (VIKIA® Rota-Adeno) con un ELISA (Premier™ Rotaclone®), muestra que existe una alta concordancia en los resultados obtenidos por ambas pruebas, alcanzándose un valor kappa de 0.99, con una sensibilidad similar alrededor de 81%, mientras que la especificidad calculada llega a ser 95.5% y 100% para la prueba de inmunocromatografía y el ensayo inmunoenzimático respectivamente. Por lo que se propone a la inmunocromatografía como una herramienta adecuada para el diagnóstico especialmente en áreas rurales que no cuenten con equipos sofisticados (Lagare et al., 2017).

En otro estudio, al evaluarse la efectividad de la vacuna de rotavirus en Estados Unidos, se comparó un qRT-PCR semicuantitativo con ensayos inmunoenzimáticos, donde se advirtió que la detección de RVA únicamente por qRT-PCR no se asocia necesariamente con la EDA, pues en los controles negativos (niños sin EDA no vacunados) del estudio también se detectó RNA rotaviral, que se excretaba en heces con una carga viral muy baja, por lo que los ensayos de ELISA también son útiles en los estudios de efectividad de la vacuna en pacientes con diarrea aguda (J. Tate et al., 2013).

A su vez el CDC en base a la información obtenida de los resultados de las pruebas inmunoenzimáticas realizadas por laboratorios que participan en la Vigilancia Nacional de Virus Entéricos y Respiratorios (del inglés National Respiratory and Enteric Viruses Surveillance NREVSS) encargados de realizar una vigilancia pasiva de rotavirus en Estados Unidos, reporta también que en los últimos años existe una disminución en la cantidad de laboratorios que realizan pruebas de diagnóstico de RVA, al igual que una reducción del número de pruebas inmunoenzimáticas realizadas para la detección de rotavirus. Por otra parte, se señala que existe un incremento en el uso de la técnica RT-PCR para la detección de RVA, esto podría deberse a que en los últimos años se han preferido pruebas que detectan múltiples patógenos y la cantidad de laboratorios que realizan diagnóstico por PCR se ha multiplicado (Hallowell, Parashar, Curns, DeGroot, & Tate, 2019).

2.9. Producción de VP6, anticuerpos y ensayos inmunoenzimáticos

Los ensayos inmunoenzimáticos o ELISAs para el diagnóstico de rotavirus, se basan en el desarrollo de anticuerpos policlonales o monoclonales capaces de reconocer a un antígeno viral, en este caso, la mayoría de los ensayos de ELISA comerciales, se basan en la proteína estructural VP6.

En 1984 Beards et al., describen el desarrollo de dos ensayos de ELISA sándwich para la detección de rotavirus en heces, en base a la producción de anticuerpos policlonales en conejos, que estaban dirigidos contra partículas virales purificadas completas o incompletas de rotavirus de los subgrupos I y II, los cuales se utilizaron como anticuerpos de captura, mientras que para el anticuerpo detector se utilizaron dos tipos diferentes de anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, conjugados con diferentes enzimas, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante respectivamente. Las condiciones óptimas descritas para el ensayo involucraban la utilización de placas de poliestireno irradiadas para incrementar la afinidad de los anticuerpos a la fase sólida; si bien los anticuerpos policlonales de conejo reconocieron al antígeno viral, los anticuerpos monoclonales tuvieron mayor sensibilidad para detectar a RVA funcionando en diluciones más elevadas, además de una mejor especificidad pues sólo reaccionaron con la proteína VP6 de la cápside interna de rotavirus, tanto de humanos como de otras especies de mamíferos. Se observó, que tetrametilbenzidina (TMB) tuvo una mejor señal como sustrato y el uso de EDTA en la muestra permitía la exposición del antígeno viral mayoritario de rotavirus por lo que la señal del ensayo se incrementaba (Beards et al., 1984). El ensayo de ELISA es un método muy sensible, específico, pero su desempeño depende completamente de los anticuerpos desarrollados y empleados para el mismo, por lo que la prueba será tan buena como los reactivos empleados. En este caso, los autores pudieron observar que la prueba es más sensible que microscopia electrónica.

Garaicoechea et al., (2008) realizaron un estudio en el que se demostró que los fragmentos de anticuerpos de llama recombinantes de cadena simple VHH, son capaces de reconocer la proteína VP6 de rotavirus del grupo A, por lo que se usaron para el diagnóstico de RVA en un ensayo de ELISA. Con este fin, se obtuvieron los anticuerpos anti-rVP6 de una llama que fue inmunizada con rVP6 derivada de rotavirus bovino, de la que se colectó la sangre y se separaron las células mononucleares para la producción de una librería de anticuerpos VHH con capacidad de reconocer a la proteína VP6. Los anticuerpos VHH

con mayor rendimiento y capacidad de reconocer a la proteína VP6 de RVA tanto recombinante como natural del virus, se seleccionaron luego para la producción de anticuerpos VHH recombinantes monovalentes (denominados como 2KA4, 2KD1, 3A6, 3B2) y bivalentes en células de *E. coli* XL1-Blue. Se observó que los anticuerpos VHH son específicos para la proteína VP6 reconociendo epítopes conformacionales de elevado peso molecular y no así estructuras desnaturalizadas. Los anticuerpos VHH en su forma tanto monovalente como bivalente se probaron en un ensayo ELISA, donde fueron absorbidos directamente en las placas de 96 pozos reconociendo con éxito a diferentes cepas de rotavirus de diferentes genotipos y de distintas especies incluidas las humanas. Otra característica importante de resaltar fue la actividad neutralizadora *in vitro* de los anticuerpos VHH, pues las cepas de diferentes genotipos de rotavirus analizados fueron neutralizadas por 3 de los anticuerpos VHH (2KD1, 3A6 y 3B2) en su forma monomérica, probablemente por su pequeño tamaño, éstos tuvieron mejor respuesta neutralizante que los VHH bivalentes. Al incubar previamente los anticuerpos VHH con la proteína VP6 se observó una disminución en la actividad neutralizante del virus, por lo que se sugiere que el reconocimiento de la proteína VP6 estaría asociado a la neutralización de los anticuerpos VHH monoméricos. En otro experimento, para probar la capacidad de los VHH como agentes profilácticos, se administraron los mismos independientemente a crías de ratones que fueron infectados experimentalmente con dos cepas diferentes de rotavirus (rotavirus bovino y rotavirus murino), donde se encontró que el anticuerpo 3B2 brindó protección completa contra la enfermedad a 9 de 15 ratones evaluados e infectados con RVA bovino, mientras que el anticuerpo 2KD1 generó una menor protección, protegiendo sólo al 27% de los individuos del grupo. En este estudio, también se observó que el resto de los ratones tuvo una diarrea menos severa y de corta duración a diferencia de los controles. Al desafiar a los ratones con rotavirus murino, 60% de los individuos presento protección contra la EDA por rotavirus, el 40% de los individuos tratados con el anticuerpo 3B2 desarrollaron diarrea 96 horas después de la infección, mientras que los individuos que recibieron el anticuerpo 2KD1 presentaron diarrea 48 horas post-infección. Los investigadores pudieron comprobar que la excreción del virus en las heces en individuos tratados en presencia de cualquier anticuerpo VHH, fue mucho menor que en el grupo no tratado con VHH (Garaicoechea et al., 2008).

Posteriormente los anticuerpos VHH 2KD1 y 3B2 se probaron como agentes tanto profilácticos como terapéuticos y se estudió más detalladamente sus mecanismos de

protección en modelos murinos. La administración de ambos anticuerpos (2KD1 y 3B2) VHH redujo la duración de la diarrea, la severidad de la infección y la excreción del virus en las heces. En los grupos de estudio, no se detectó la formación de anticuerpos contra VHH. Es más en presencia de sales de rehidratación oral los anticuerpos muestran estabilidad, los autores sugieren que podrían ser utilizados como complemento de la vacuna anti-rotavirus, especialmente en regiones donde la eficiencia de la vacuna se ve afectada (Maffey, Vega, Miño, Garaicoechea, & Parreño, 2016). Estos datos en conjunto muestran las aplicaciones extensivas que se derivan de la inmunización de animales con la proteína VP6.

Se han desarrollado otros ensayos de ELISA basados en la detección de VP6, en estos se utiliza anticuerpos anti-rVP6 (proteína recombinante VP6) como anticuerpos de captura, mientras que los anticuerpos detectores se componen de anticuerpos contra múltiples péptidos antigénicos desarrollados a partir de los epítopes más inmunogénicos de la proteína recombinante VP6. Para ello se identificaron seis regiones con un alto índice de inmunogenicidad en VP6, a partir de las cuales se sintetizaron péptidos múltiples, que contienen estructuras secundarias que incluyen laminas- β , que fueron posteriormente inoculados para la producción anticuerpos. Se reporta que este ensayo es capaz de detectar al antígeno viral en muestras de diferentes especies como humanas, bovinas, porcinas y avícolas, tiene una especificidad mayor a 93% y sensibilidad superior a 74% dependiendo de las muestras empleadas, con una concordancia con la prueba de referencia RT-PCR es alta (0.912) (Kumar et al., 2016).

En los estudios de efectividad de la vacuna de rotavirus se consideró un ensayo ELISA en formato de sándwich, para el que se utilizó un anticuerpo monoclonal 1D4 dirigido especialmente contra la proteína VP6 de la cápside viral, capaz de reaccionar con el epítipo conformacional compuesto de los péptidos 76-100, 247-270, 261-258, 306-330, 321-345 de VP6 de varias cepas de RVA. Para incrementar la sensibilidad del ensayo se empleó como anticuerpo de captura el anticuerpo monoclonal 1D4 que se unió a la fase sólida en una concentración de 0.5 μ g/mL, mientras que el anticuerpo de detección fue marcado con biotina y se encontraba en una concentración de 0.05 μ g/mL. El ensayo alcanza a detectar hasta 3.1x10⁵ partículas virales por mL y es más sensible que los ensayos comerciales disponibles para RVA. Al comparar la prueba con el ensayo de referencia (qRT-PCR) se observó que tenía 43.5% de sensibilidad y 100% especificidad,

al menos un 20% más de sensibilidad que las pruebas comerciales disponibles y una especificidad similar (Wang et al., 2018).

2.10.ELISAS para la detección de RVA en mamíferos

Se han desarrollado diferentes ensayos de ELISA para la detección de rotavirus en diferentes especies de animales, tanto domésticas como salvajes y animales de laboratorio (Fingas et al., 2018; Memon et al., 2017; Mino, Kern, Barrandeguy, & Parreno, 2015; Zhu et al., 2013). Entre estos, el desarrollado por Fingas et al., (2018) detecta a rotavirus del grupo A en muestras fecales de ratones, en base a la expresión de la proteína recombinante VP6 de rotavirus murino EDIM, a partir un constructo que contiene la marca StrepTag II en el extremo 5' y en el 3' a Hexa-histidina. La proteína se almacenó en cuerpos de inclusión, los cuales se purificaron por cromatografía por afinidad a iones metálicos y posteriormente se solubilizaron, llegando a obtenerse 90 mg/mL de proteína recombinante. La proteína recombinante se empleó en un ELISA indirecto para la detección serológica de infecciones por diferentes cepas de rotavirus de ratones. De esta manera, el ensayo permitió reclasificar las muestras falsas positivas detectadas por otros ensayos menos sensibles, pues presento una sensibilidad, especificidad y selectividad de 99.8%, 100% y 98.7% respectivamente, sin presentar reacciones cruzadas con otros virus (Fingas et al., 2018)

Por otra parte, Zhu et al., (2013) desarrollaron un ensayo inmunoenzimático para la detección de rotavirus en muestras de ganado porcino. Para ello clonaron el gen de la proteína VP6 de un aislado de rotavirus porcino y expresaron la proteína VP6 en *E. coli*, la cual se acumuló en cuerpos de inclusión. Una vez solubilizada, se confirmó la reactividad de la proteína por Western Blot. Se produjeron luego anticuerpos de conejo anti-VP6 que se utilizaron en un ensayo de ELISA que resultó ser muy específico para rotavirus pues no presentó reacciones cruzadas con otros virus porcinos. De esta manera, este ensayo puede ser una herramienta de diagnóstico para rotavirus en el ganado porcino (Zhu et al., 2013)

Por su parte, el estudio de Memon et al., (2017) describe el desarrollo de un ELISA basado en la captura de antígenos para la detección de rotavirus porcino. En el ensayo se utilizó la proteína VP6 para la formación de anticuerpos policlonales en conejos (anticuerpo de captura) y anticuerpos monoclonales de origen murino (anticuerpo detector). Ambos

anticuerpos reaccionaron adecuadamente con rotavirus porcino incluso a diluciones elevadas. La sensibilidad del ensayo fue evaluada mediante el límite de detección el cual igualaba a la prueba convencional de RT-PCR, llegando a detectarse alrededor de $10^{2.5}$ TCID₅₀/mL. En cuanto a la especificidad, esta se evaluó mediante ensayos con diferentes virus que ocasionan diarrea, donde ninguno de ellos fue detectado por el ensayo. En la validación del ensayo se evaluó la sensibilidad del ELISA, comparando con RT-PCR y RT-qPCR (pruebas de referencia), observándose una sensibilidad que alcanzó el 95.8% y 91.7% respectivamente. La especificidad fue del 100% en ambos casos y el valor κ reportó una alta concordancia entre el ensayo de ELISA y las pruebas de referencia (Memon et al., 2017).

La detección de RVA en ganado doméstico como vacas y caballos, muchas veces se realiza mediante ensayos de ELISA desarrollados para la detección de rotavirus humano, sin embargo, es necesario validar el ensayo con muestras de los animales y hacer algunas modificaciones necesarias cuando el caso lo requiera. Tal como reporta el estudio de Miño et al., (2015) en el que comparan el funcionamiento de dos ensayos inmunoenzimáticos comerciales uno de cromatografía FASTest Rota®, un ELISA Pathfinder™ Rotavirus, con un ELISA casero para la detección de rotavirus bovino, para el reconocimiento del antígeno viral de muestras de heces. Para la validación del ensayo se analizaron muestras de potros de 1 a 3 meses, utilizando RT-PCR como prueba de referencia. Se reporta que los tres ensayos pueden detectar rotavirus equino, sin embargo, existe un sesgo cuando se utiliza el ensayo de ELISA Pathfinder™ Rotavirus pues no detecta a RVA pertenecientes al genotipo G3 P [12] I6 en contraste al ELISA casero, esto probablemente debido a que los anticuerpos que emplea el ensayo no son capaces de reconocer los cambios que podrían existir en el epítotope de VP6. El ELISA casero tiene una sensibilidad de 76% y una especificidad de 93% con una exactitud de 88% y es capaz de reconocer los dos tipos de RVA equino circulantes que se identificaron en el estudio (G14 P [12] I2 y G3 P[12] I6) al igual que coinfecciones, por lo que se consideró adecuado para el diagnóstico de EDA causada por RVA. FASTest Rota® presentó el mejor desempeño pues la sensibilidad y especificidad calculadas fueron 92% y 97% respectivamente, además de detectar ambos genotipos de RVA equino (Mino et al., 2015).

3. Justificación

El diagnóstico de RVA es un factor importante para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica del RV en Bolivia en el periodo post-vacuna. La detección del virus sirve de base para monitorear su circulación en la población de estudio y para luego realizar sobre las muestras positivas, la caracterización de las cepas circulantes de RVA. Por tal motivo es necesario contar localmente con técnicas sensibles y específicas que permitan realizar un diagnóstico confiable y clasificación adecuada de las muestras obtenidas para posterior análisis. En Bolivia, no existe un método de diagnóstico de RV desarrollado en el país, por lo que se requiere adquirir kits comerciales de ensayos inmunoenzimáticos como los recomendados por la OMS. Estos ensayos son de alto costo por su importación, pero son altamente sensibles, específicos y sus resultados son comparables con la técnica de RT – PCR (R. Gautam, F. Lyde, M. D. Esona, O. Quaye, & M. D. Bowen, 2013) para la detección de muestras sintomáticas.

Haciendo una comparación de varios métodos de diagnóstico para RVA, varios estudios mostraron que la técnica de ELISA es más sensible que la microscopía electrónica para detectar específicamente la presencia de RVA (Rodák et al., 2011; Soltan et al., 2016). Asimismo el ELISA es utilizado como “gold estándar” para establecer los límites de la carga viral de la muestra y el valor de cut off del RT-PCR, pues permite detectar las infecciones gastrointestinales causadas por RVA que desencadenan en la EDA (Phillips et al., 2009). Es importante resaltar el uso del ELISA en los estudios de la evaluación de la efectividad de la vacuna en pacientes con EDA, pues técnicas más sensibles como PCR en tiempo real logran detectar partículas de RV que se encuentren en pequeñas cantidades, que podrían ser clínicamente no relevantes (Jacqueline E Tate et al., 2013).

En este trabajo de tesis se presenta una alternativa de diagnóstico del RVA en nuestro medio. Para ello, se desarrolló un sistema de diagnóstico casero de ELISA, en base a la producción recombinante de la proteína de fusión SUMO-rVP6. Este sistema, permite la detección de RVA en muestras de heces humanas y de animales siendo una alternativa de diagnóstico económica, sensible y específica que puede ser utilizada en la vigilancia epidemiológica de RVA, para continuar evaluando el impacto y efectividad de la vacuna, así como extender su uso al manejo y control de la EDA en animales.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Desarrollar un ensayo de diagnóstico ELISA sensible y específico para la detección de RVA en base a la unión de anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína rVP6 de rotavirus del grupo A en muestras diarreicas procedentes de niños y animales (camélidos domésticos).

4.2. Objetivos específicos

1. Optimizar y estandarizar las condiciones necesarias para el funcionamiento del ensayo de “ELISA casero”
2. Evaluar la especificidad y sensibilidad, valor predictivo positivo y negativo del ensayo inmunoenzimático casero, frente a técnicas sensibles y confiables como los kits de ELISA comerciales recomendados por la OMS y la reverso-transcripción.
3. Demostrar la aplicación y utilidad del ensayo en la detección de RVA en muestras de heces humanas y de camélidos domésticos (llamas y alpacas).

5. Materiales y Métodos

En este estudio para la construcción del gen recombinante, expresión, extracción y purificación de la proteína recombinante rVP6 se siguieron los protocolos desarrollados por el Profesor Ewald Beck de la Universidad de Giessen, Alemania.

Para la evaluación de la funcionalidad, especificidad, sensibilidad, titulación de los anticuerpos del ensayo de “ELISA casero” y la validación de este último, los protocolos empleados se desarrollaron los en el Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Mayor de San Andrés específicamente para el presente estudio.

5.1. Extracción del RNA viral y clonación de VP6

El RNA viral de doble cadena se aisló por el método de Boom (Boom et al., 1990), utilizando una mezcla de tiocianato de guanidina 5M y silica (10µl), el RNA extraído fue almacenado a -70°C hasta su utilización.

Se realizó una desnaturalización previa del RNA de doble cadena a 97°C por 5 minutos, posteriormente la reverso-transcripción se realizó utilizando la enzima SuperScript III (ThermoFisher Scientific), en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ RESEARCH), el programa utilizado fue 50 min a 50°C y 5 min a 85°C. El cDNA obtenido se clonó utilizando los primers empleados por Bugli et al. (2014), se amplificó el fragmento correspondiente al gen completo VP6 utilizando los primers VP6-for (5' -ATG GAG GTT CTG TAT TCA TTG TCA-3' ; nucleótidos 1–24) en el mismo sentido del segmento y el cebador contrasentido del segmento, VP6-rev (5' -TCA CTT AAT CAA CAT GCT TCT GAT-3' ; nucleótidos 1,170–1,194), las condiciones del termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de amplificación (94°C por 1 minuto, luego 55°C por 1 minuto y después 72°C por 1 minuto) y por último la extensión final a 72°C por 7 minutos. Se verificó el producto de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de GelRed la banda correspondiente al producto esperado de 1194 pares de bases fue observado en el transiluminador con UV. Posteriormente se purificó el fragmento deseado en columnas PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit según las instrucciones del fabricante y el producto purificado fue secuenciado.

5.2. Construcción del gen de fusión SUMO-VP6

La secuencia obtenida de la proteína VP6 de RVA que se introdujo en GenBank, fue alineada con otras 30 diferentes secuencias de aislados de RVA en humanos originando una secuencia consenso del gen de la proteína VP6 que convertida en un gen sintético fue optimizada para la expresión en *E. coli*. El segmento del gen correspondiente a la región amino-terminal de VP6 fue unido al gen de la proteína de fusión SUMO Smt3 de *Sacharomyces cerevisiae*. El gen fusionado se insertó en el vector de expresión pQE-30 (Quiagen), en el sitio de clonación múltiple, que contiene una marca de Hexa-histidina resultando un plásmido pQE-SUMO-rVP6 bajo la secuencia especificada en el Cuadro 1, donde a los extremos de la secuencia de nucleótidos se muestra el sitio de corte por las enzimas de restricción utilizadas:

HindIII

GGATCCTCTGGTCTGGTCCGCGTGGTAGCGCGTCTATGTCTGATCAAGA
AGCTAAACCGTCTACGGAAGACCTGGGTGATAAAAAGGAAGGTGAATA
CATCAAGCTGAAGGTTATCGGTCAGGACTCTTCTGAGATCCACTTCAA
GTTAAAATGACCACCCATCTGAAGAACTGAAGGAATCTTACTGCCAGC
GTCAGGGTGTTCGATGAACTCTCTGCGTTTCCTGTTTGAAGGTCAGCGT
ATTGCGGACAACCACACTCCAAAAGAACTGGGTATGGAAGAAGAGGAT
GTTATTGAAGTTTACCAGGAACAGACCGGTGGCATGGAGGTGCTGTATT
CCCTCTCTAAGACCCTGAAAGACGCTCGTGACAAAATTGTAGAAGGTAC
CCTGTACTCTAACGTCTCCGACCTGATCCAACAATTTAACAGATGATTG
TTACCATGAACGGCAACGACTTCCAGACGGGTGGTATCGGTAACCTCCC
AATCCGTAACCTGGACCTTCGACTTCGGTCTGCTCGGTAACGCTGCTGA
ACCTGGATGCGAACTACGTTGAAAACGCGCGTACCACCATCGAATATTT
CATCGACTTTATTGACAATGTTTGCATGGACGAAATGGCGCGTGAATCTC
AACGCAATGGTGTGCGCCGCAAAGCGAAGCGCTCCGTAAACTGGCGGG
TATCAAATCAAACGTATCAACTTTAACTCCTCTGAGTACATTGAAA
ATTGGAATCTGCAAAATCGTTCGTCAGCGCACCGGTTTTGTTTTCCACAAA
CCTAATATCTTCCGTATTCTGCGTCCTTCAACCTCAACCGTTCTCAGCCT
ATGCACGACAACCTCATGGGTACTATGTGGCTGAACGCGGGTTCTGAAA
TTCAGGTTGCAGGTTTTGACTATTCTTGCAGCTGAATGCACCGGCGAAC
ATCCAGCAGTTCGAGCACATCGTACAGCTGCGTCGTGCGCTCACCACTG
CTACCATTACCCTGCTCCCGACGCGGAGCGTTTCTCTTCCCGCGTGTT
ATTAACCTGCGGACGGTGCGACCACCTGGTTCTTCAACCCGATCATCCT
GCGCCCTAACAACGTGGAAGTTGAATTCCTCCTGAATGGTCAGATCATC
AACACCTACCAGGCTCGTTTCGGTACCATCGTTGCACGTAACCTCGACAC
CATCCGTCTGTCTTCCAGCTCATGCGTCCGCCAAACATGACCCAGCGG
TTAACGCGCTGTTCCCGCAGGCGCAGCCGTTTTCAGCATCACGCCACCGTT
GGTCTGACCCTGCGCATCGAAAGCGCTGTGTGCGAATCTGTTCTGGCTGA
TGCCAATGAAACCCTCCTGGCAAATGTGACGGCAGTACGTCAGGAATAC
GCGATCCCGGTGGGCCCTGTTTTCTCCGGGTATGAATTGGACTGAACT
GATCACCAACTACAGCCCGTCTCGTGAAGATAATCTCCAGCGTGTTTTTA
CCGTGGCGAGCATCCGTTCTATGCTGATTAATAAGCTT

BamHI

Cuadro 1. Secuencia de nucleótidos de la proteína VP6 insertada en el sitio de clonación del vector pQE30 entre las enzimas de restricción HindIII y BamHI.

El gen expresado de 1548 nucleótidos codifica para un producto esperado de un peso molecular de 58kDa, una proteína de fusión cuya secuencia se encuentra especificada en el Cuadro 2, donde los primeros aminoácidos corresponden a los 6 residuos de histidina, los siguientes corresponden al fragmento SUMO y los aminoácidos restantes corresponden a la proteína rVP6 con un peso molecular de 45 kDa. El diseño fue realizado en colaboración con el Dr. Ewald Beck (Unoversodad de Giessen Alemania). La producción del gen recombinante se realizó en Centic Biotech (Martinsried, Alemania).

```

MRGSHHHHHHGSSGLVPRGSASMSDQEAKPSTEDLGDKKEGEYIKLKVIGQ
DSSEIHFVKVMTTHLKKLKEYCQRQGVPMSLRFLFEGQRIADNHTPKEL
GMEEEDVIEVYQEQTGGMEVLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNVSDLIQQF
NQMIVTMNGNDFQTGGIGNLPIRNWTFDFGLLGTLLNLDANYVETARTTIE
YFIDFIDNVCMDEMARESQRNGVAPQSEALRKLAGIKFKRINFNSSEYIEN
WNLQNRQRRTGFVFHKPNIFPYSASFLLNRSQPMHDNLMGTMWLNAGSEI
QVAGFDYSCALNAPANIQQFEHIVQLRRALTTATITLLPDAERFSFPRVNSA
DGATTWFFNPILRPNNVEVEFLLNGQIINTYQARFGTIVARNFDTIRLSFQLM
RPPNMTPAVNALFPQAQPFQHATVGLTLRIEAVCESVLADANETLLANV
TAVROEYAIIPVGPVFPFGMNVTELITNYSPSREDNLRVFTVASIRSMLIK

```

Cuadro 2. Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión SUMO-VP6.

5.3. Sumo proteasa

También se realizó expresión de la proteasa que digiere el constructo SUMO-rVP6, para ello se siguió un protocolo similar al de la expresión de la proteína recombinante rVP6, donde el gen codificante de la SUMO-proteasa ULP1 derivado de levaduras, fue insertado en el vector de expresión pQE-30, generando el plásmido pQE-ULP1. La proteína de fusión corresponde a la secuencia del Cuadro 3.

```

MRGSHHHHHHGSLVPELNEKDDDQVQKALASRENTQLMNRDNEITVRDF
KTLAPRRWLNDTIEFFMKYIEKSTPNTVAFNSFFYTNLSERGYQGVRRWMK
RKKTKQIDKLDKIFTPINLNQSHWALGIIDLKKTIGYVDSLNGPNAMSFALL
TDLQKYVMEE SKHTIGEDFDLIHLDCPQQPNGYDCGIYVCMNTLYGSADAP
LDFDYKDAIRMRRFIAHLILTDALK

```

Cuadro 3. Sumo proteasa Ulp1-his.

5.4. Expresión, purificación y digestión de la proteína recombinante SUMO-rVP6

5.4.1. Expresión

La proteína recombinante SUMO-rVP6 se expresó en cepas transformadas de *E. coli* XL1-Blue que cargaban con el plásmido pQE-SUMO-rVP6 junto a pREP que expresaba el represor lac, se sembraron en 1 litro de caldo LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml y se incubaron a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.6, posteriormente se ajustó el pH con 4 ml de NaOH 1 M y se indujo el cultivo con 1 ml de IPTG 1 mM para la expresión de la proteína recombinante rVP6, la incubación en presencia de IPTG se realizó en agitación por 7 horas a 30°C. Posteriormente las células se colectaron mediante centrifugación a 10000 x g y se almacenaron a -80°C.

5.4.2.Purificación

Para la lisis, las células se sometieron a ciclos de congelación y descongelación, luego se resuspendieron en 10 ml de buffer fosfato 50 mM pH 7.4 y se incubaron con 1 ml de lisozima (20 mg/ml) bajo agitación a temperatura ambiente. Luego las células fueron brevemente sonicadas por 1 min (Sonicador Ultraturrax T25 basic IKA LABORTECHNIK) en presencia de Tween 20 a una concentración final de 0.5 %.

Para la purificación de la proteína, se separó el sobrenadante por centrifugación a 10000 x g por 10 minutos y se lo mezcló con 30 ml de PBS 0.5X, a los que se añadió 5 ml de resina TALON incubándose la mezcla bajo agitación a 4°C por 1 hora. Se lavó la resina con PBS 0.5X y Triton X-114 al 0.1% por dos veces y luego con PBS 0.5X y 10% de glicerol dos veces más. Se eluyó la proteína recombinante His-SUMO-rVP6 en una columna con PBS 0.5X, 10% de glicerol y 0.25 M de imidazol. Se colectó 1ml de las fracciones y se evaluó la presencia de proteína preliminarmente por una tinción de negro amido. A las fracciones que presentaron mayor concentración de proteína se añadió DTT hasta una concentración final de 1 mM, luego éstas se dializaron durante 18 horas contra PBS pH 7.4, se añadió un volumen similar de glicerol para su conservación a -20°C.

5.4.3.Digestión

La digestión de la proteína recombinante SUMO-rVP6 se realizó agregando 100 µl de SUMO-proteasa ULP1 por mililitro de SUMO-rVP6, en buffer TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM y DTT 2mM), se incubó la mezcla por 4 horas a 37°C y posteriormente se agregó un volumen igual de glicerol almacenándose a -20°C.

5.4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Para visualizar la proteína expresada, purificada y digerida se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS para el mismo se preparó un gel de concentración al 4% y un gel de separación al 7%, se sembró 50 µl de una mezcla de la proteína en buffer de Laemmli que se sometió a calor por 5 minutos y se corrieron las muestras con buffer de Tris-Glicina 1X en las siguientes condiciones primero a 100 V por 15 minutos hasta que el colorante se encontraba en el gel de separación y posteriormente a 200 V por 1 hora.

Posteriormente el gel se tiñó con solución de tinción con azul de Coomassie y posteriormente se destiño y se enjuagó con agua destilada.

5.5. Cuantificación de la proteína recombinante

Se realizó una semi-cuantificación de la proteína recombinante mediante una comparación con diluciones definidas de albumina de suero fetal bovino (BSA), para ello se aplicaron en una membrana de nitrocelulosa diluciones de BSA que se prepararon a partir de una solución de BSA de 1 mg por mililitro; aplicándose concentraciones de BSA desde 0.25 µg/ml hasta 40 µg/ml. Por otra parte, también se realizaron diluciones seriadas de la proteína recombinante que se impregnaron en la membrana de nitrocelulosa. La membrana se tiño con azul de Commasie, la interpretación se realizó de acuerdo a la intensidad en la tinción que presentaban las diluciones de la proteína recombinante.

5.6. Dot blot de la proteína recombinante

Para el ensayo de Dot Blot, se impregnaron en una membrana de nitrocelulosa 10µL de una dilución 1:2 de la proteína recombinante SUMO-rVP6 y la proteína digerida rVP6, la membrana se incubó a temperatura ambiente y bajo agitación durante 30 minutos con una solución de leche 1% en PBS 1X que contenía el anticuerpo detector (IgG anti-rVP6-HRP) en una proporción 1:4000. Posteriormente se lavó la membrana tres veces con buffer TBST (Tris-HCl 20mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0.05%). Por último, se añadió a la membrana la solución reveladora (4-CN) (Bio-Rad), y se incubó en agitación por 20 minutos con un posterior enjuague con agua destilada.

5.7. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos policlonales de conejo se sintetizaron en la compañía ProteoGenix (<https://www.proteogenix.science/>), en base a la proteína recombinante que se obtuvo mediante la expresión de las células de *E. coli*.

5.8. Formación del conjugado con la enzima HRP

Para la formación de los anticuerpos conjugados IgG anti-rVP6 con la enzima peroxidasa de rábano picante (en inglés horseradish peroxidase HRP), una solución de 10 mg de la

enzima HRP se activó con 150 µl de periodato de sodio 0.1 M, por incubación por 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se dializó contra un litro de buffer citrato 1 mM pH 4.4 a 4°C durante 18 horas. Similarmente 1 ml del anticuerpo de conejo IgG anti-rVP6 se dializó contra una solución de carbonato de potasio pH 9.4 10 mM.

Después de la diálisis se añadió 100 µl de carbonato de potasio 0.2 M pH 9.4 a la solución de HRP, ésta se mezcló con los anticuerpos IgG anti-rVP6 y la mezcla se incubó a 4°C por 24 horas, deteniéndose luego la reacción al añadir 150 µl de Tris-HCl 1M pH 7.4. Posteriormente se añadió a la mezcla glicerol al 50%, 1 ml de albumina de suero bovino 2 mg/ml y 60 µl de cloruro de calcio 10 mM. El conjugado luego fue almacenado a -20°C.

5.9. Intercambio de anticuerpos de captura y detectores

Para este experimento, se realizó un ELISA en el que los anticuerpos policlonales de captura del “ELISA casero” IgG anti-rVP6 pegados a una placa de 96 pozos (a una dilución de 1:2000), se incubaron con controles y muestras de rotavirus tanto positivas como negativas. Posteriormente se agregó el anticuerpo detector (conjugado comercial, ProSpect™ que cuenta con anticuerpos policlonales de conejo, o Premier™ Rotaclone® que tiene anticuerpos monoclonales ambos dirigidos contra la proteína VP6 de RVA, estos se utilizaron indistintamente), con el objeto de reconocer al complejo antígeno-anticuerpo formado por la unión del anticuerpo de captura inmovilizado en la placa con rotavirus (Fig. 4A).

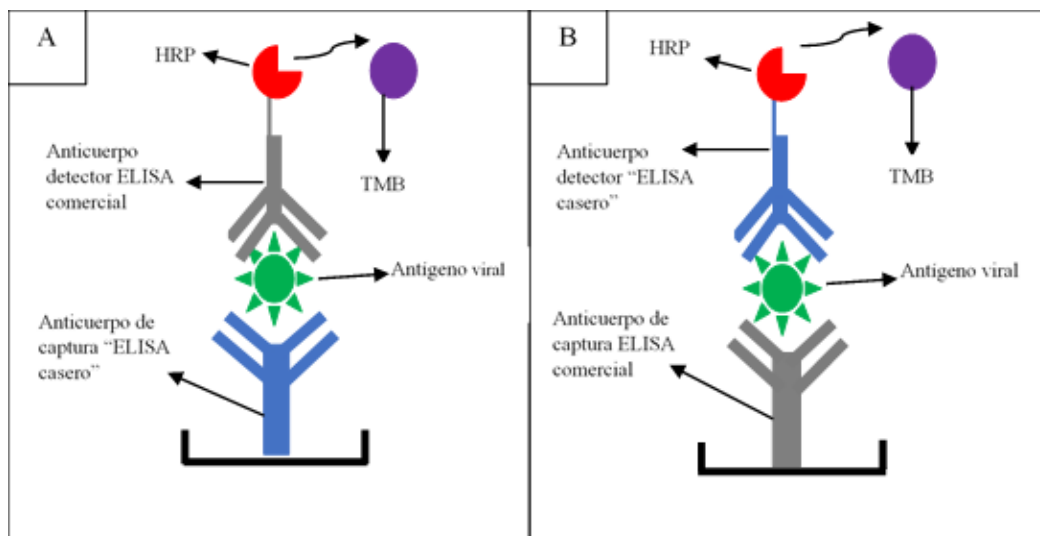


Figura 4. Esquema del ensayo de intercambio de anticuerpos para el reconocimiento de la proteína VP6.

(A) anticuerpo de captura del “ELISA casero” (celeste) y anticuerpo detector comercial ligado a la enzima HRP (gris). (B) anticuerpo de captura comercial (gris) y anticuerpo detector del ensayo de “ELISA casero” ligado a la enzima HRP (celeste). El antígeno viral utilizado fue virus RVA inactivado, muestras de heces positivas para rotavirus y la proteína VP6 recombinante.

En otro ensayo se evaluó la capacidad de los anticuerpos detectores del conjugado del “ELISA casero” para reconocer al antígeno viral. Por lo que, esta vez se emplearon indistintamente los anticuerpos de captura de las placas de 96 pozos de los kits de ELISA comercial Premier™ Rotaclone® (anticuerpos monoclonales anti-VP6) y ProSpect™ (anticuerpos policlonales anti-VP6), que se incubaron con los respectivos controles positivos y negativos, junto al conjugado del ensayo de “ELISA casero” que contenía los anticuerpos policlonales ligados a HRP (IgG anti-rVP6-HRP) (a una dilución de 1:4000) como se observa en la Fig.4B.

Los ensayos de intercambio de anticuerpos se realizaron por triplicado para evaluar controles tanto positivos como negativos.

5.10. Titulación de los anticuerpos de captura y detectores

Para determinar la concentración adecuada de anticuerpos de captura a añadirse en el ensayo de “ELISA casero”, se aplicaron por triplicado diferentes diluciones de los anticuerpos IgG anti-rVP6 (1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10000 y 1:50000) a una placa de 96 pozos. Posteriormente esta se incubó con diferentes concentraciones de antígeno rVP6 (625 pg - 20 ng) y con una dilución $1:8 \times 10^3$ del anticuerpo de detección IgG anti-rVP6-HRP. Se seleccionó la dilución del anticuerpo de captura que tuvo mayor densidad óptica con las diferentes concentraciones de antígeno.

Por otra parte, la concentración adecuada de anticuerpos de detección se determinó empleando diferentes diluciones de los anticuerpos IgG anti-VP6-HRP (1:4000, 1:8000, 1:16000) aplicados en tres repeticiones, bajo la misma concentración del anticuerpo de captura IgG anti-rVP6 ($1:2 \times 10^3$) y de diferentes concentraciones del antígeno rVP6 (625 pg - 20 ng). Se seleccionó la dilución que presentaba una mayor densidad óptica con las diferentes concentraciones de antígeno.

5.11.ELISA casero

Se diseñó el ensayo de “ELISA casero” para la detección del antígeno de RVA, el formato elegido para su funcionamiento fue tipo sándwich directo. Un esquema que representa la disposición de los anticuerpos del ensayo se puede observar en la Fig. 5.

Placas de 96 pozos recubiertas con 100 μ l de una dilución 1:3000 de los anticuerpos policlonales IgG anti-RVP6, se incubaron a 4°C durante 24 horas, posteriormente se añadió a las mismas una solución de leche descremada al 2% en PBS 1X, por tres horas a temperatura ambiente y en agitación. Las placas luego se secaron a 37°C.

Para el análisis de las muestras, se añadió 150 μ l de una dilución 1:10 en PBS 1X de la muestra de heces a cada pozo de la placa sensibilizada, la cual se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación, posteriormente la placa se lavó con PBS 1X por cinco veces. Se añadieron luego, 100 μ l de la solución del conjugado en una dilución 1:8000 del anticuerpo detector IgG anti-rVP6-HRP en PBS 1X con leche descremada al 1%. Esta segunda incubación se realizó bajo las condiciones arriba descritas. Posteriormente se lavó la placa nuevamente y se agregaron 100 μ l del sustrato TMB, la mezcla se incubó por aproximadamente 7 minutos en agitación a temperatura ambiente y bajo protección de la luz, finalmente se añadieron 100 μ l de una solución de ácido sulfúrico 2 M para detener la reacción. Se leyó la placa en el espectrofotómetro a 450 nanómetros de longitud de onda.

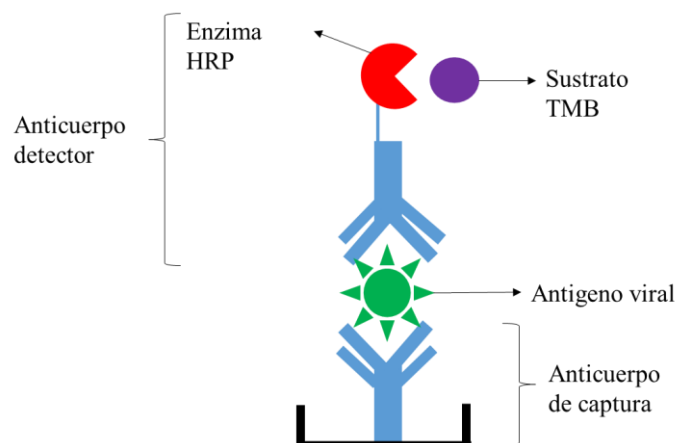


Figura 5. Esquema del funcionamiento del ensayo de “ELISA casero” tipo sándwich.

5.12.Límite de detección

El límite de detección del ensayo de “ELISA casero” se calculó a partir de diluciones seriadas de rotavirus humano cepa RIX4414 (concentración inicial 2×10^6 CCID₅₀) que se

aplicaron por triplicado en el ensayo de “ELISA casero”, para lo cual se sembraron en la placa de 96 pozos 100 µl de las diluciones utilizadas (1:2 hasta 1:32), que correspondían a concentraciones desde 6.25×10^4 hasta 1×10^6 CCID₅₀ de la cepa RIX4414 de rotavirus humano atenuado.

También se evaluaron por triplicado diluciones seriadas de la proteína recombinante rVP6 (desde 1:4 hasta 1:320) que correspondían a concentraciones desde 625 ng/ml hasta 5 µg/ml.

5.13. Reacciones cruzadas

Se evaluaron a varios patógenos entéricos, virales, bacterianos y a un protozoario. Para ello, una suspensión de cada patógeno por separado fue evaluada por duplicado mediante el ensayo de ELISA casero. Los patógenos analizados que se incluyeron en el ensayo fueron coronavirus, parvovirus, adenovirus, de los cuales se aplicó 100 µl de una dosis de la vacuna Recombitek (MERIAL INC., Georgia, USA). Norovirus se analizó a partir de una muestra fecal positiva mediante RT-PCR para este virus y negativa para RVA. Las enterobacterias analizadas incluyeron diferentes patotipos de *E. coli*, ETEC, EHEC, EAEC, EPEC y STEC, *Salmonella spp*, *Shigella*, *Clostridium perfringens*, que se evaluaron en una concentración aproximada de 10^7 UFC. Asimismo, se evaluó también a *Saccharomyces cerevisiae*, (1 mg/ml).

5.14. Precisión intra e interplaca

La precisión intra-placa se realizó analizando en una placa de 96 pozos a tres muestras positivas y a tres muestras negativas por triplicado cada una. Posteriormente se comparó la densidad óptica obtenida de cada uno de los pozos y se obtuvo tanto el promedio como la desviación estándar para calcular posteriormente el coeficiente de variación, el cual no debía sobrepasar el 10%.

Los ensayos de precisión interplaca se basaron en la aplicación de las mismas muestras positivas (tres) y negativas (tres) en tres diferentes placas, una vez obtenida la densidad óptica se obtuvo el promedio, desviación estándar y se calculó el coeficiente de variación, el cual debía ser menor al 20% (Azze, 2012).

5.15. Validación del ensayo de “ELISA casero”

El ensayo de “ELISA casero” se validó mediante el análisis de 181 muestras diarreicas de niños menores a cinco años, recolectadas del Hospital San Martín de Porres Ibuelo ubicado en Cochabamba-Bolivia, estas se enviaron bajo cadena de frío al IBMB. Se evaluaron dos ensayos simultáneamente, el ensayo de “ELISA casero” y el ensayo de ELISA comercial ProSpect™. Los resultados obtenidos de ambos ensayos se compararon tomando como referencia al ensayo de ELISA comercial. A partir de estos se graficó la curva ROC, se calcularon los valores de cut off y se obtuvo una tabla de doble entrada a partir de la cual se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo, negativo y exactitud del ensayo de “ELISA casero”.

5.16. Confirmación de las muestras discordantes

La confirmación de la presencia de RVA en muestras que presentaron un resultado discordante en el ensayo de “ELISA casero” y la prueba de ELISA comercial, se realizó mediante RT-PCR.

5.16.1. Extracción del material genético

El RNA viral de doble cadena se extrajo de manera similar a la mencionada anteriormente mediante el método de Boom (Boom et al., 1990) y fue almacenado a -70°C hasta su utilización.

5.16.2. RT-PCR para VP6

La reverso-transcripción del RNA extraído se realizó utilizando random primer hexamers (Invitrogen) y la enzima SuperScript III (ThermoFisher Scientific), en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ RESEARCH), el programa utilizado fue 50 min a 50°C y 5 min a 85°C.

La amplificación del cDNA obtenido se realizó en una mezcla con volumen final de 25 µl que contenía 5 µl de green buffer 5X, 1.5 µl de cloruro de magnesio 25mM, 0.5 µl de la mezcla de dNTPs 10 mM, 2 µl de cada primer 10 µM, 0.125 µl de enzima Taq polimerasa 5 U/ml (Promega) y se adicionó 5 µl de templete. Los primers empleados fueron diseñados por Iturriza-Gomara et al., (2002), VP6 F (5' -GAC GGV GCR ACT

ACA TGG T-3' ; nucleótidos 747 - 766) en el mismo sentido del segmento y el primer contrasentido del segmento, VP6 R (5' -GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG-3' ; nucleótidos 1126 - 1106), la región amplificada tuvo un tamaño esperado de 379 pares de bases y se encontraba en un segmento relacionado con la especificidad de subgrupo de RVA.

El programa de termociclador que se utilizó fue: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de amplificación (94°C por 1 minuto, luego 55°C por 1 minuto y después 72°C por 1 minuto) y por último la extensión final a 72°C por 7 minutos. Se verificó el producto de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de GelRed la banda correspondiente al producto esperado de 379 pares de bases fue observado en el transiluminador con UV.

5.16.3. Genotipado de las cepas

Los genotipos G y P [] se determinaron mediante PCR anidada, para ello se utilizó como templete el cDNA obtenido de una reverso-transcripción.

El primer PCR de VP7 se realizó en un volumen final de 25 µl para el cual se añadieron 5 µl de green buffer 5X, 1.5 µl de cloruro de magnesio 25 mM, 0.5 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM, 0.4 µl de cada primer (VP7F y VP7R), 0.1 µl de la enzima Taq polimerasa 5 U/ µl y 3 µl de un templete de cDNA.

Las condiciones del primer mix para el gen de VP4 fueron similares a las de VP7, pero se agregó 1 µl de cada primer (Con2 y Con3).

Para el segundo PCR de VP7 se utilizó un volumen final de 25 µl de la mezcla de reacción compuesta de 5 µl de green buffer 5X, 1.5 µl de cloruro de magnesio 25 mM, 0.5 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM, 0.375 µl de cada primer (VP7R, G1, G2, G3, G4, G8, G9 y G12), 0.1 µl de la enzima Taq polimerasa 5 U/ µl y 1 µl del producto de la primera amplificación.

Para el segundo PCR de VP4 se utilizó un volumen final de 33 µl de la mezcla de reacción compuesta de 6 µl de green buffer 5X, 1.8 µl de cloruro de magnesio 25 mM, 0.6 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM, 1.2 µl de cada primer (Con3, ND2 y un pool de primers para P[4], P[6], P[8], P[9], P[10]), 0.24 µl de la enzima Taq polimerasa 5 U/ µl y 5 µl de una dilución 1:10 del producto de la primera amplificación.

La lista de los primers utilizados se encuentra descrita en la tabla del anexo 9.3.

5.17. Aplicaciones del ensayo de “ELISA casero”

5.17.1. Comparación entre el ensayo de “ELISA casero” con el ELISA comercial y la prueba rápida para RVA

Un set de 85 muestras diarreicas de niños menores a cinco años colectadas y analizadas para el diagnóstico de RVA mediante una prueba de inmunocromatografía o prueba rápida (OnSite™ Rotavirus Ag rapid test) en el Hospital San Martín de Porres Ibuelo Cochabamba-Bolivia, fueron enviadas bajo cadena de frío (4°C) al IBMB donde se analizaron para la detección de RVA, de forma paralela mediante el ELISA comercial ProSpect (siguiendo las instrucciones del fabricante) y mediante el ensayo de “ELISA casero”. Los resultados obtenidos entre las pruebas se compararon, considerando al ELISA comercial como la prueba de referencia, se calculó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo y la exactitud de la prueba rápida con relación a los ensayos de ELISA.

5.17.2. Ensayo de “ELISA casero” para el análisis de la diarrea comunitaria

La diarrea comunitaria se evaluó en 682 muestras de niños menores a cinco años, que pertenecían a niños con y sin diarrea que se habían recolectado como parte de un estudio anterior denominado NIDI (Nutrición, Inmunidad y Diarrea Infantil) en el año 2013 y se encontraban almacenadas a -80°C. Las muestras de heces se alicuotaron a una dilución al 10% y se analizaron mediante el ensayo de “ELISA casero”.

Del total de muestras (682), 97 (14.22%) muestras correspondían a heces diarreicas, mientras que las restantes 585 (85.78%) eran muestras no diarreicas. Las muestras de EDA se analizaron mediante el ELISA comercial y las no diarreicas fueron evaluadas mediante el ensayo de “ELISA casero”. Posteriormente en base a este set de muestras se calculó la razón de probabilidad entre la EDA y la presencia de RVA.

5.17.3. Evaluación de la excreción del virus de la vacuna anti-rotaviral Rotarix (RV1)

Un total de 169 muestras colectadas de entre cuatro a siete días post vacunación de niños que recibieron la vacuna RV1 y que fueron analizadas mediante el ELISA comercial Premier™ Rotaclone® como parte del estudio NIDI, se analizaron nuevamente por el ensayo de “ELISA casero” para evaluar y comparar el desempeño del ensayo en la detección de individuos vacunados que excretaban al virus.

5.17.4. Análisis de muestras almacenadas

Muestras de heces de niños menores de cinco años provenientes de los Hospitales que realizan la Vigilancia de RVA en La Paz, que fueron recolectadas entre dos hasta seis años atrás y que se encontraban almacenadas a -80° C se reevaluaron mediante el ensayo de “ELISA casero”. Las 594 muestras contaban con un diagnóstico para RVA realizado previamente mediante el ELISA comercial. Los resultados obtenidos de ambos ensayos se compararon entre sí considerando que las muestras analizadas por el ensayo de “ELISA casero” ya tenían al menos dos ciclos de congelamiento – descongelamiento.

5.17.5. Análisis de la presencia de RVA en muestras diarreicas y muestras control (no diarreicas) de camélidos domésticos

Un total de 135 muestras de heces de llamas y alpacas menores a 1 año de edad del Centro Experimental Agropecuario Condoriri (CEAC) Oruro-Bolivia se colectaron por medio de hisopado rectal, 16 muestras provenientes de episodios de EDA, de animales identificados clínicamente (debilitamiento, anorexia, cola manchada con heces). Para la colección de las muestras, los hisopos se introdujeron luego en tubos de 1.5 ml con PBS 1X, hasta su envío bajo cadena de frío (4°C) al IBMB para su análisis. En el laboratorio las muestras fueron analizadas para la detección de RVA mediante el ensayo de “ELISA casero”. Las 119 muestras de heces no diarreicas se colectaron de forma similar mediante hisopado rectal o de forma directa durante la deposición.

5.17.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida

En las muestras positivas para RVA según el ensayo de “ELISA casero” se confirmó la presencia de rotavirus por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Para

ello el RNA extraído mediante el método de fenol cloroformo, se sembró en un gel de poliacrilamida al 7% y se corrió durante seis horas a 150 voltios, 30 mA y 18 watts. Posteriormente las bandas se visibilizaron mediante tinción con nitrato de plata.

5.18. Análisis estadístico

Se construyeron las curvas ROC para determinar el punto de corte, la concordancia entre el ensayo de “ELISA casero” con las pruebas de referencia (ELISA comercial y RT-PCR). Se calculó el valor Kappa de Cohen, los valores obtenidos se interpretaron de la siguiente manera 0 – 20 sin concordancia, 21 – 39 concordancia mínima, 40 – 59 concordancia débil, 60 – 79 concordancia moderada y 80 – 90 fuerte concordancia, > 90 concordancia casi perfecta. Estas pruebas se realizaron utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 23.0.

Se calcularon los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, exactitud del ensayo de “ELISA casero”.

Asimismo, se calculó la razón de probabilidad (del inglés Odds Ratio OR) para evaluar la asociación entre la presencia de RVA y EDA en muestras de diarrea comunitaria y en muestras diarreicas de camélidos domésticos. Los parámetros analíticos del ensayo de “ELISA casero” con relación a las pruebas de referencia y la asociación entre RVA y la EDA se calcularon en el programa estadístico MedCalc disponible en línea (www.medcalc.org).

6. Resultados y Discusión

6.1. Proteína recombinante

6.1.1. Expresión y purificación de la proteína recombinante SUMO-rVP6

Tras la inducción y purificación de la proteína a partir de las células de *E. coli* XL1-Blue transformadas con el plásmido pQE30-SUMO-rVP6 y posterior a la electroforesis se obtuvo el siguiente gel, en el que se observa una diferencia en la migración de la proteína recombinante digerida y no digerida Fig. 6. En la línea 2 se puede observar que la proteína recombinante rVP6 digerida tiene un peso molecular similar al esperado, de 45 kDa

además de observarse una banda de bajo peso molecular en la parte inferior del gel línea 2, que corresponde a la proteína de fusión SUMO, mientras que la fusión SUMO-rVP6 no digerida forma agregados de alto peso molecular (línea 1).

El producto digerido fue el que se utilizó para la producción de los anticuerpos del ensayo de “ELISA casero” en conejos por la compañía ProteoGenix (<https://www.proteogenix.science/>).

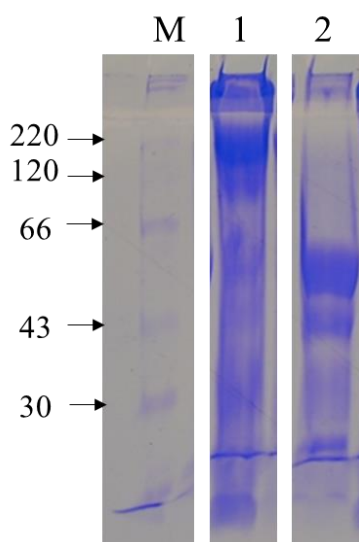


Figura 6. Digestión de la proteína recombinante SUMO-rVP6. Proteína recombinante no digerida, línea 1. Proteína recombinante tras el proceso de digestión, línea 2.

6.1.2. Cuantificación de la proteína recombinante rVP6

Se realizó una “semi-cuantificación”, de la proteína recombinante mediante la comparación con concentraciones definidas de albumina de suero fetal bovino (BSA). La cantidad de proteína recombinante rVP6 obtenida fue de entre 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 7), generando un rendimiento de aproximadamente entre 5-10 mg de proteína recombinante rVP6 por litro de cultivo.

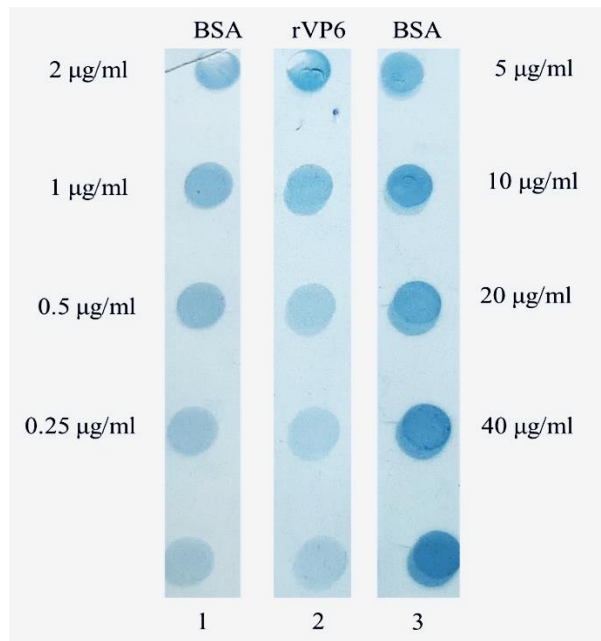


Figura 7. Semi-cuantificación de la proteína rVP6 mediante el ensayo de Dot Blot. Se trabajó con concentraciones definidas de BSA impregnadas en membraba de nitrocelulosa, bajo tinción con azul de Coomasie. albumina de suero fetal bovino (BSA) a diferentes concentraciones, líneas 1 y 3. Proteína recombinante rVP6 aplicada en diluciones seriadas en la membrana de nitrocelulosa línea 2.

6.1.3. Reconocimiento de la proteína recombinante por anticuerpos dirigidos contra VP6

Inicialmente, se comprobó mediante los ensayos de ELISAs comerciales que la proteína recombinante rVP6 purificada sea reconocida por los anticuerpos anti-RVA monoclonales y policlonales de los ensayos Premier™ Rotaclone® y ProSpect™ respectivamente. Ambos anticuerpos dirigidos que reconocen a la proteína VP6 de la cápside de RVA, reaccionaron con la proteína rVP6 (lo que se infiere a partir de los datos de densidad óptica obtenidos) (Tabla 1).

Tabla 1. Ensayo de reconocimiento de la proteína recombinante VP6 expresada en *E. coli*. Los valores de densidad óptica corresponden al promedio de tres repeticiones.

Ensayo de ELISA	Proteína rVP6	DO ₄₅₀	
		Rotavirus inactivado de simio SA-11 y bovino	Control Negativo
Premier™ Rotaclone®	0.92 (0.18)	0.57 (0.12)	0.02 (0)
ProSpect™	1.29 (0.57)	0.82 (0)	0.03 (0)

DO₄₅₀: Densidad óptica leída a 450 nm de longitud de onda.

Asimismo, se evaluó si la proteína recombinante rVP6 desnaturalizada, podía ser reconocida por los anticuerpos policlonales anti-RVA en el ensayo ProSpect™. Como se

observa en la Fig. 8, estos anticuerpos no reaccionaron con la proteína recombinante desnaturalizada, en claro contraste a rVP6 en su estado nativo. La rVP6 añadida en su estado nativo y tras la incubación con los anticuerpos policlonales del ensayo, generó una reacción positiva (línea B coloración amarilla intensa) similar al control positivo (línea C). En contraste, la densidad óptica correspondiente al pozo donde se colocó la proteína rVP6 desnaturalizada (línea A) presentó una densidad óptica de 0.04, en el rango que corresponde al control negativo utilizado en la prueba (línea D).

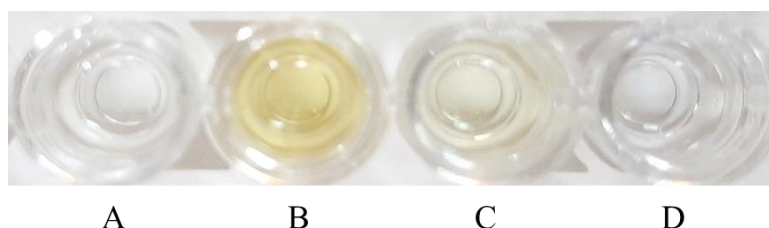


Figura 8. Reconocimiento de la proteína recombinante rVP6 en estado nativo y desnaturalizada por los anticuerpos policlonales del ELISA comercial.

A: Proteína rVP6 desnaturalizada $DO_{450}= 0.04$. B: Proteína rVP6 en estado nativo $DO_{450}= 887$. C: Rotavirus inactivado bovino (control positivo) $DO_{450}= 0.11$. D: Control negativo (PBS 1X) $DO_{450}= 0.04$.

DO_{450} : Densidad óptica leída a 450 nm de longitud de onda.

La expresión de rVP6 en *E. coli* es un modelo útil, debido a su fácil manipulación, buen rendimiento y sobre todo por su bajo costo. Zhao et al., (2011), reportan que alrededor del 27% de las proteínas bacterianas expresadas corresponderían a la proteína rVP6. Sin embargo, las desventajas de usar sistemas procariontes para la expresión de proteínas que se expresan naturalmente en eucariotas, es que los primeros no contienen las enzimas para las complejas modificaciones postraduccionales que requieren muchas proteínas eucariotas. Así, por ejemplo, durante la infección rotaviral, en células de riñón de mono africano (BS-C-1 y MA 104), los nuevos virus que se forman intracelularmente se ensamblan inicialmente a partir de proteínas VP6, que han pasado por modificaciones postraduccionales como la miristilación, desaminación y acetilación en el extremo amino-terminal (Clark & Desselberger, 1988; Emslie et al., 2000). Por lo que, al expresar la proteína recombinante rVP6 en *E. coli* estas modificaciones no se producen conllevando a la formación de agregados insolubles que tienden a precipitar y que representan una de las mayores limitaciones, pues su mal plegamiento y su baja solubilidad requiere un tratamiento adicional de desnaturalización en presencia de urea y renaturalización por dilución y diálisis, donde luego no siempre se logra el plegamiento adecuado de la proteína.

Es importante considerar que la solubilidad de la proteína VP6 viene dada por su estructura, ya que en la parte central se encuentra una cavidad hidrofílica que está rodeada por las diferentes subunidades del dominio B, lo que limita su área de contacto, por otra parte, los residuos del dominio H tienen propiedades hidrofóbicas (M. Mathieu et al., 2001). Bugli et al., (2014), evaluaron en la cepa de *E. coli* BL21 la expresión de la proteína recombinante VP6 y describen que al utilizar la proteína SUMO fusionada a VP6, obtuvieron 50 mg/L de rVP6 con una solubilidad de alrededor del 80% de la proteína total a comparación con otros constructos de fusión y marcas utilizadas como Tiorredoxina y Hexa-histidina (Bugli et al., 2014).

Los estudios en los que se expresó la proteína rVP6 en *E. coli* sin estar fusionada a SUMO, a pesar del buen rendimiento obtenido dan generalmente como resultado cuerpos de inclusión insolubles, como se reporta en el estudio de Zhu et al., (2013), Bredell et al., (2015), Fingas et al., (2018) y Masoudi et al., (2020). En contraste la aproximación experimental realizada en el presente estudio incluyó además del péptido SUMO (adicionado para incrementar la solubilidad), a la marca de Hexa-histidina para facilitar la purificación. Al utilizar un constructo que contiene una marca de Hexa-histidina y el péptido de fusión SUMO se pudo obtener una proteína rVP6 soluble que no se formaron cuerpos de inclusión visibles. Similares resultados obtuvieron previamente Bugli et al., (2014), los residuos de Hexa-histidina permitieron que la proteína fuese fácilmente purificable mediante cromatografía de afinidad. Sin embargo, a diferencia la proteína recombinante obtenida en el estudio de Bugli et al., (2014), la proteína rVP6 no se sometió a una segunda purificación en la columna correspondiente.

A diferencia del trabajo de Bugli et al., (2014), se observó la formación de multímeros de la proteína de fusión recombinante obtenida SUMO-rVP6 purificada que puede deberse a las conformaciones que adquieren los trímeros de VP6 por su naturaleza de auto agregarse y formar estructuras de alto peso molecular, sin embargo, al ser digeridas por la SUMO proteasa estas desaparecen y se observa una banda en el peso molecular esperado para la proteína VP6.

La cantidad final de proteína recombinante con la que se trabajó en el presente estudio fue aproximadamente 5 veces menor a la cantidad reportada por Bugli et al., (2014) y en similar orden de magnitud que el obtenido por Kumar et al., (2016). Estas variaciones en el rendimiento pueden deberse a los diferentes constructos utilizados, al tipo de cepa de *E. coli* empleado. Sin embargo, se requiere una medición más exacta de la cantidad de

proteína mediante el método de Bradford para estimar el rendimiento exacto de la proteína, ya que debido a la falta de acceso al reactivo de Bradford solamente se obtuvo un aproximado de la cantidad de proteína rVP6 mediante comparación con cantidades de BSA determinadas que se compararon a simple vista. Por lo que, la cantidad de la proteína obtenida podría estar subestimada o sobreestimada.

Otro factor para tomar en cuenta son las cepas de las células a ser empleadas para la expresión de la proteína recombinante. En el presente estudio utilizó una proteína que se expresó en las células XL1-Blue de *E. coli*. Es conocido que estas células tienen un muy lento crecimiento por lo que este factor adicional puede afectar al rendimiento final de rVP6. Futuros estudios deberán evaluar la conveniencia de utilizar otras cepas hospederas de *E. coli* como por ejemplo BL21 reportada en varios estudios con un mayor rendimiento (Bredell et al., 2016; Masoudi et al., 2020). En contraste, Kumar et al., (2016) reportan tras una comparación entre diferentes cepas de *E. coli*, que las células BL21(DE3) y Origami (DE3) pLysS tuvieron un rendimiento muy bajo a diferencia de la cepa Turner (DE3) pLysS que generó un rendimiento de aproximadamente 16 mg/L de la proteína rVP6 purificada, este fue 1.5 veces mayor al obtenido con la cepa Rosetta-gami (DE3) pLysS, (Kumar et al., 2016). Otro factor potencial a considerar que podría afectar al rendimiento, podría ser la altura de la ciudad de La Paz.

Las condiciones utilizadas en la expresión de la proteína recombinante que pueden injerir en el rendimiento de la proteína obtenido son la concentración de IPTG, temperatura y tiempo de incubación. En el presente estudio se utilizó la misma concentración de IPTG y temperatura de incubación que en el estudio de Masoudi et al., (2020) sin embargo la densidad óptica de las bacterias que fueron inducidas fue menor e igual al que Bugli et al., (2014) reporta, en cuanto al tiempo de incubación que se empleó fue menor al de los dos estudios anteriormente citados (Masoudi et al., 2020).

La proteína recombinante rVP6 obtenida es reconocida únicamente en su estado nativo por los anticuerpos del ensayo comercial de ELISA, sugiriendo que la inmunogenicidad de la proteína rVP6 depende de su conformación y que esta es reconocida por los mismos anticuerpos que reconocen a VP6 presente en el virión. Similares resultados pudieron observar Garicoechea et al., (2008) pues reportaron que los anticuerpos recombinantes VHH producidos para su estudio en base a la proteína recombinante VP6 reconocen sus epítopes conformacionales y no así estructuras desnaturalizadas (Garaicoechea et al., 2008).

Se conoce que, la proteína VP6 de la cápside intermedia de RVA presenta alta inmunogenicidad que depende de su estructura. En el estudio realizado por Kumar et al., 2016, se resalta los sitios más antigénicos de la estructura de la proteína identificándose seis regiones de mayor antigenicidad en la secuencia de aminoácidos de la proteína, donde las regiones identificadas correspondientes a los residuos de aminoácidos 6-29; 98-121; 112-134; 125-149; 161-175; 368-393 poseen una estructura más ordenada al encontrarse en una solución no polar y tienen una conformación o estructura secundaria de tipo lamina β . Estos residuos fueron empleados para la construcción de péptidos sintéticos, de los cuales el correspondiente a la región 125-149 presentaba la estructura más ordenada, y es justamente este péptido el que tiene una reacción cruzada hacia los anticuerpos policlonales contra rotavirus del grupo A (Kumar et al., 2016).

6.2. Funcionalidad de anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales IgG anti-rVP6 de conejo para el ensayo, se obtuvieron comercialmente de la compañía ProteoGenix (<https://www.proteogenix.science/>), en base a la inmunización de los animales con la proteína recombinante SUMO-rVP6 purificada y digerida con la SUMO-proteasa ULP1. Se separó una fracción de los anticuerpos IgG anti-rVP6 para ligarlos a la enzima de rábano picante (en inglés horseradish peroxidase HRP) (IgG anti-rVP6-HRP), conformándose así los anticuerpos de captura y detección respectivamente, como base del ensayo de “ELISA casero” tipo sándwich representado en la Fig. 5 (Materiales y Métodos).

Para probar la funcionalidad de los anticuerpos policlonales obtenidos, se realizó un ensayo de Dot Blot cuyo resultado se muestra en la Fig. 9, donde se observa la capacidad de reconocimiento del anticuerpo IgG anti-rVP6 ligado a la enzima HRP (IgG anti-rVP6-HRP) (a una dilución de 1:4000), sobre la proteína rVP6 en dos estados, proteína digerida y no digerida. Se observó que los anticuerpos IgG anti-rVP6-HRP reconocieron a la proteína rVP6 tanto en su forma pre-digerida como post-digerida por la proteasa ULP1, demostrándose así tanto la funcionalidad del anticuerpo para el reconocimiento de la proteína rVP6, como de la enzima HRP acoplada al mismo.

Por otra parte, también se probó si los anticuerpos del ensayo de “ELISA casero” IgG anti-rVP6-HRP podían reconocer a la proteína rVP6 desnaturalizada y en su estado nativo (Fig. 9). En este caso, los anticuerpos IgG anti-rVP6-HRP del ensayo de “ELISA casero”

(a una dilución de 1:4000), reconocieron únicamente a la proteína rVP6 en su estado nativo, mientras que la proteína desnaturalizada no fue detectada.

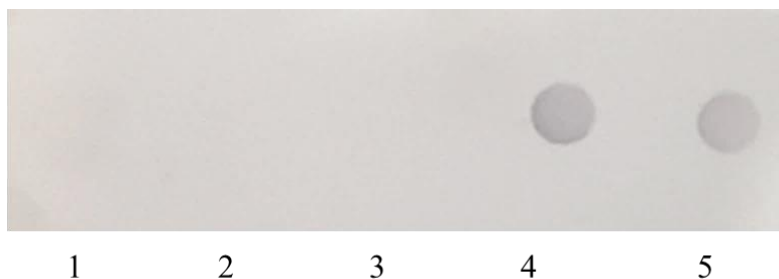


Figura 9. Dot Blot de la proteína recombinante rVP6 reconocida por los anticuerpos policlonales IgG anti-rVP6-HRP.

Membrana de nitrocelulosa con la proteína recombinante rVP6. Control negativo PBS 1X línea 1. Proteína SUMO-rVP6 desnaturalizada y digerida línea 2. Proteína SUMO-rVP6 desnaturalizada y no digerida línea 3. Proteína nativa digerida y no digerida líneas 4 y 5 respectivamente.

De esta manera, tanto los anticuerpos del ELISA comercial como los del ensayo de “ELISA casero”, muestran similar comportamiento frente a la proteína desnaturalizada, reconociendo únicamente a la proteína en su estado nativo.

Bugli et al., (2014) demostraron que la fusión SUMO-VP6 puede ser reconocida por un suero específico para anti-VP6 (Bugli et al., 2014). Los anticuerpos policlonales del “ELISA casero” reconocen de similar forma la fusión SUMO-rVP6, sugiriendo que la presencia de SUMO no altera la conformación de epítopes estructurales específicos de VP6. Una explicación alternativa menos probable podría deberse a la presencia de anticuerpos policlonales adicionales dirigidos contra la proteína de fusión SUMO.

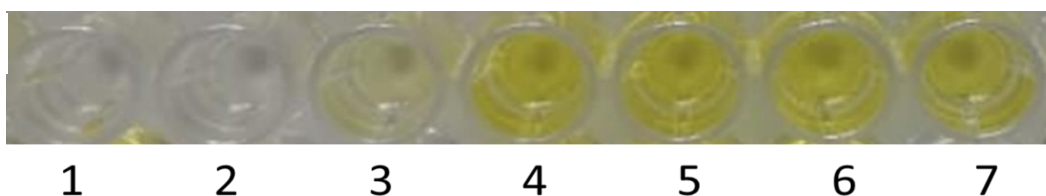
6.3. Especificidad y sensibilidad de los anticuerpos de captura y detección

6.3.1. Ensayos de intercambio de anticuerpos

Con el fin de determinar si los anticuerpos policlonales producidos para el ensayo “ELISA casero” eran capaces de reconocer a la proteína VP6 presente ya sea en la cápside viral de RVA purificado (control positivo) o en muestras de heces RVA positivas, inicialmente se intercambiaron indistintamente los anticuerpos de dos kits ELISAs comerciales

(ProSpect™ y Premier™ Rotaclone®) con los anticuerpos del “ELISA casero”, como se esquematiza en la Fig. 4.

En la Fig. 10 se observan los resultados de este ensayo, en la variante donde los anticuerpos de captura y de detección corresponden al “ELISA casero” y comercial respectivamente. Se observó (Tabla de la Fig. 10) que las densidades ópticas a 450 nm de longitud de onda de los controles positivos presentaron un valor ≥ 0.18 , a diferencia de los controles negativos los cuales no presentaron coloración y cuyo valor de densidad óptica se encuentra por debajo del punto de corte del kit comercial (valor menor a 0.15), indicando que los anticuerpos de captura IgG anti-rVP6 del “ELISA casero” son capaces de reconocer específicamente a la proteína VP6 de rotavirus, razón por la que se sugiere que estos serían específicos para RVA.



N°	Muestras	Anticuerpo detector			
		Premier™ Rotaclone®		ProSpect™	
		DO ₄₅₀	Ds	DO ₄₅₀	Ds
1	Control negativo	0.05	0	0.04	0.00
2	Muestras Negativas	0.02	0	0.07	0.02
3	Rotavirus humano atenuado cepa RIX4414	0.18	0.03	0.46	0.04
4	Virus inactivado de simio SA-11	0.19	0.01	0.83	0.30
5	Virus inactivado bovino	0.50	0.08	0.74	0.05
6	Proteína recombinante VP6	0.87	0.04	0.53	0.33
7	Muestras Positivas	0.18	0.03	0.86	0.49

Figura 10. Reconocimiento del antígeno viral por anticuerpos cruzados entre el ensayo de “ELISA casero” IgG anti-rVP6 (anticuerpo de captura) y ELISA comercial (anticuerpo detector).

Fotografía del resultado del ensayo de intercambio de anticuerpos entre el ensayo de “ELISA casero” y ELISA comercial. Tabla: Promedio de tres densidades ópticas obtenidas del ensayo de intercambio de anticuerpos en presencia de controles negativos, muestras negativas, muestras positivas, proteína recombinante rVP6, rotavirus inactivado bovino y de simio.

DO₄₅₀: Densidad óptica leída a 450 nm de longitud de onda.

ds: desviación standard

A su vez, utilizando los anticuerpos de captura de los ensayos comerciales se evaluó el funcionamiento del anticuerpo detector del ensayo de “ELISA casero”. Los resultados mostraron una diferencia clara entre los valores de densidad óptica de los controles

positivos y de los controles negativos (Tabla 2). Por lo que los anticuerpos detectores del ensayo de “ELISA casero” fueron capaces de reconocer de forma específica al antígeno viral inmovilizado en las placas de ELISA. Así mismo, la enzima HRP ligada al anticuerpo detector, mostro funcionalidad al reaccionar con el sustrato emitiendo la señal de coloración respectiva.

Tabla 2. Reconocimiento del antígeno viral por anticuerpos cruzados entre el ensayo de “ELISA casero” IgG anti-rVP6-HRP (anticuerpo detector) y ELISA comercial (anticuerpo de captura).

Muestras	Anticuerpo de captura			
	Premier™ Rotaclone®		ProSpect™	
	DO ₄₅₀	Ds	DO ₄₅₀	ds
Control negativo	0.02	0.01	0.03	0
Proteína recombinante VP6	1.32	0.79	0.25	0.06
Virus inactivado de simio SA-11	0.74	0.27	-	-
Virus inactivado bovino	-	-	0.73	0.07

Los valores de densidad óptica presentados corresponden al promedio de tres repeticiones.

DO₄₅₀: Densidad óptica leída a 450 nm de longitud de onda.

ds: desviación standard

Finalmente, se probó el funcionamiento de ambos anticuerpos del “ELISA casero”. Para ello las placas nuevas de 96 pozos recubiertas con el anticuerpo de captura IgG anti-rVP6 (dilución 1:2000) del ensayo de “ELISA casero” se incubaron con los respectivos controles y muestras de rotavirus tanto positivos como negativos, luego de esta incubación se agregó el conjugado con los anticuerpos detectores IgG anti-rVP6-HRP (1:4000) y luego el sustrato TMB, los resultados de la prueba se detallan en la Tabla 3, observándose una diferencia entre las densidades ópticas de los controles negativos y muestras negativas, cuya densidad óptica fue de 0.04 y 0.05 respectivamente, con los controles positivos y las muestras RVA positivas que alcanzan densidades ópticas por encima de 0.23. Por lo que, ambos anticuerpos aplicados en el mismo ensayo “ELISA casero” reconocen a la proteína VP6 de rotavirus y por lo tanto a RVA, mostrando que el ensayo es funcional en los dos principales pasos del ELISA, tanto para la captura como para la detección del antígeno viral de RVA.

Tabla 3. Reacción de los anticuerpos de captura IgG anti-rVP6 y detección IgG anti-rVP6HRP producidos para el ensayo de “ELISA casero”.

N°	Muestras	DO ₄₅₀	ds
1	Control negativo	0.04	0
2	Muestras Negativas	0.05	0
3	Rotavirus humano atenuado cepa RIX4414	0.17	0.04
4	Virus inactivado de simio SA-11	0.39	0.02
5	Virus inactivado bovino	0.23	0.02
6	Proteína recombinante VP6	1.28	0.05
7	Muestras Positivas	1.05	0.13

Los valores de DO₄₅₀ representan el valor promedio de tres lecturas

DO₄₅₀: Densidad óptica leída a 450 nm de longitud de onda.

ds: desviación standard

Al intercambiar los anticuerpos producidos para el “ELISA casero” con los anticuerpos dirigidos contra VP6 de los dos ensayos enzimáticos recomendados por la OMS para el diagnóstico de RVA, se pudo observar que los anticuerpos IgG anti-rVP6 (captura) e IgG anti-rVP6-HRP (detección) son capaces de acoplarse con los ensayos comerciales de forma complementaria, es decir pueden reconocer específicamente a la proteína VP6 y a RVA presente en los controles y muestras RVA positivas respectivamente. Los anticuerpos utilizados por estas pruebas comerciales son de diferente tipo; por una parte Premier™ Rotaclone® que contiene anticuerpos monoclonales dirigidos contra el producto del segmento 6 del genoma de RVA (VP6) y por otra, ProSpect™ que utiliza al igual que en este estudio anticuerpos policlonales dirigidos contra VP6. De acuerdo con el estudio realizado por Gautman et al. (2013), ambos kits poseen 100% de especificidad y alrededor de 75% de sensibilidad para reconocer RVA en relación con el ensayo de reverso-transcripción (R. Gautam et al., 2013).

6.3.2. Titulación de los anticuerpos

Se observó que las diluciones del anticuerpo de captura (lote 1) en un rango entre $1:2 \times 10^3$ y $1:4 \times 10^3$, fueron óptimas para detectar a la proteína a valores de absorbancia mayores a 0.12, bajo diferentes concentraciones del antígeno (desde 625 pg hasta 20 ng por pocillo). Por lo que, se eligió la dilución intermedia del anticuerpo IgG anti-rVP6 de $1:3 \times 10^3$ para el recubrimiento de las placas del ensayo de “ELISA casero”. Tal como se muestra en la Fig. 11A a diluciones mayores de $1:4 \times 10^3$ en un rango hasta $1:8 \times 10^3$, se observó un ligero, descenso en la densidad óptica. Este mismo patrón se observó utilizando diferentes

concentraciones de antígeno (datos no mostrados). Concentraciones menores del antígeno por debajo de este límite inferior de dilución no fueron detectables por el ensayo.

La Fig. 11B muestra que las diluciones $1:4 \times 10^3$ y $1:8 \times 10^3$ del IgG anti-VP6-HRP presentaron una densidad óptica bastante similar, sin embargo, empleando la dilución $1:1,6 \times 10^4$, la densidad óptica se vio disminuida a comparación de la dilución previa ($1:8 \times 10^3$), por lo que se eligió a la dilución $1:8 \times 10^3$ del anticuerpo detector como la óptima, para el ensayo de “ELISA casero”.

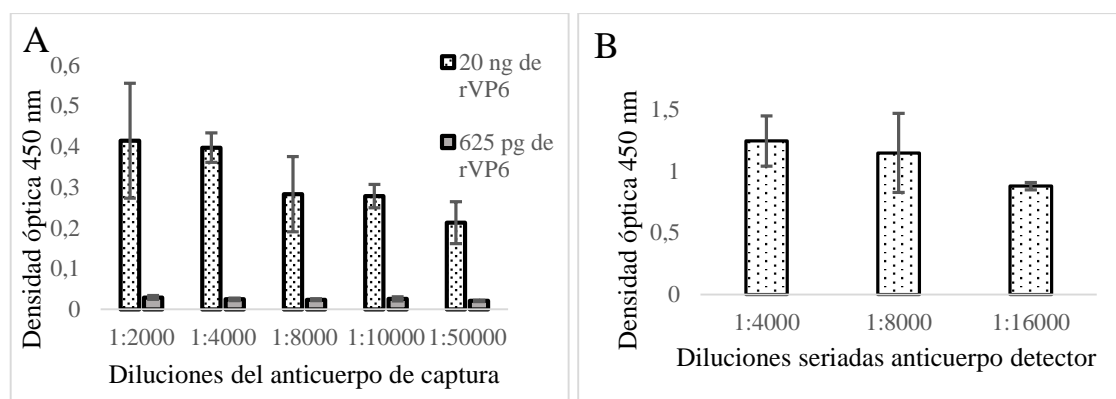


Figura 11. Optimización de las diluciones de anticuerpos de captura (A) o anticuerpos de detección (B), a utilizarse en el ensayo de “ELISA casero”.

(A) Diluciones de anticuerpo de captura IgG anti-rVP6, incubados con diferentes concentraciones del antígeno (625 pg- 20 ng) y bajo una dilución de $1:8 \times 10^3$ de anticuerpo detector. (B) Diluciones del anticuerpo detector IgG anti-rVP6-HRP incubados con una concentración del antígeno (10 ng) bajo una dilución de $1:2 \times 10^3$ del anticuerpo de captura.

Como comparación, las cantidades de anticuerpos anti-rVP6 que se emplean para el funcionamiento del ensayo de “ELISA casero” se encuentran en diluciones más elevadas $1:3 \times 10^3$ y $1:8 \times 10^3$ para los anticuerpos de captura y detección respectivamente, que las que se encontraron como óptimas en el ensayo de ELISA desarrollado por Zhu y colaboradores quienes determinaron la dilución $1:2^9$ como la cantidad óptima de anticuerpos policlonales anti-VP6 producidos en conejo necesaria para el funcionamiento de su ensayo de ELISA (Zhu et al., 2013).

Esta mayor dilución en los anticuerpos para el ensayo de “ELISA casero”, permite la producción de un mayor número de placas para el diagnóstico de RVA. Cabe señalar que ambos anticuerpos del ensayo provienen del mismo lote y que las condiciones establecidas son estables luego de un año de uso (datos no mostrados). La estandarización y ajuste de la concentración de los anticuerpos se deberá monitorear en el tiempo y entre diferentes lotes.

6.3.3. Límite de detección

Bajo las condiciones establecidas de diluciones de anticuerpos anti-rVP6, el siguiente paso fue determinar la concentración mínima de rotavirus de grupo A, que el ensayo “ELISA casero” puede detectar, para ello se realizaron diluciones seriadas de rotavirus humano atenuado, específicamente la cepa RIX4414, encontrándose que la dilución que contenía hasta 2.5×10^4 CCID₅₀ corresponde a la cantidad mínima que el ensayo “ELISA casero” pudo identificar (Fig. 12A).

También se probó la menor concentración de proteína recombinante que los anticuerpos IgG anti-rVP6 eran capaces de detectar, el resultado de esta prueba mostró que la cantidad mínima detectable de la proteína rVP6 fue de 625 pg (Fig. 12B), donde mayores diluciones del antígeno ya no pueden ser óptimamente reconocidos por los anticuerpos del “ELISA casero”.

Considerando que una partícula de rotavirus del grupo A contiene 6×10^{-10} µg de proteína VP6 se puede potencialmente inferir que la cantidad de virus que corresponden a 625 pg de proteína recombinante es equivalente a 1.04×10^6 partículas virales. Este valor sería ligeramente inferior al del ELISA comercial (Premier™ Rotaclone®) que detecta el antígeno viral a partir de una concentración de 5×10^5 partículas virales/mL, aunque estos valores deberán ajustarse con una cuantificación de la proteína más precisa.

Considerando que la excreción de rotavirus en individuos infectados con diarrea es alta (alrededor de 10^{11}) el ensayo de “ELISA casero” permitiría identificar a RVA en las heces diarreicas.

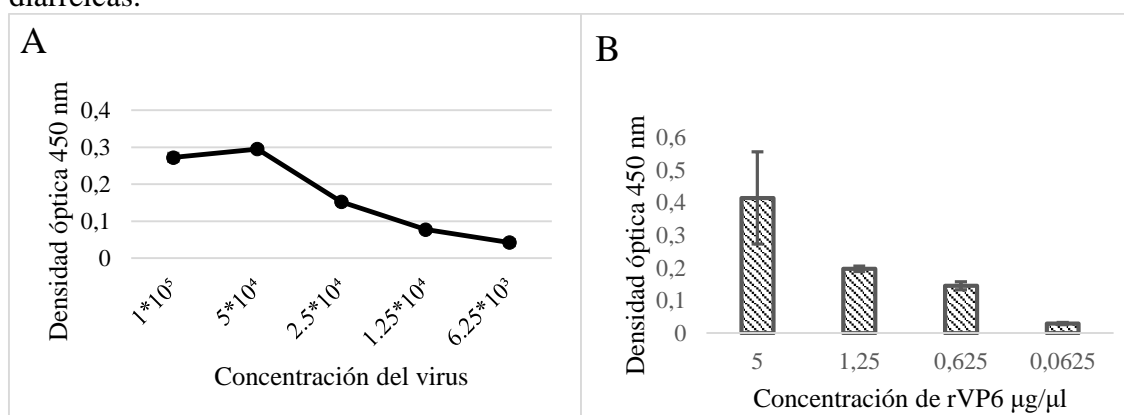


Figura 12. Límite de detección del ensayo de “ELISA casero” para el antígeno viral. (A) Diferentes concentraciones de la cepa atenuada de RVA RIX4414. B: Concentración de la proteína recombinante rVP6. En este ensayo se consideró el promedio de tres densidades ópticas por dilución.

La OMS incluye a la técnica de ELISA en el Manual de Métodos para la Detección y Caracterización de rotavirus (www.who.int/vaccines-documents/), resaltando que es el método más empleado alrededor del mundo para el diagnóstico de RVA a gran escala, en base a los niveles de sensibilidad y especificidad de la técnica por lo que se la recomienda en los estudios de vigilancia centinela. En el Protocolo Genérico para el Monitoreo del Impacto de la Vacunación de Rotavirus en la Carga de la Enfermedad Gastrointestinal y las Cepas Virales (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/69913>), la OMS indica que las muestras fecales deben ser analizadas mediante la técnica ELISA, mientras que la técnica de RT-PCR no se recomienda para el diagnóstico de la EDA causada por RVA debido a su elevada sensibilidad que detecta cargas virales bajas no asociadas a la enfermedad.

Se ha observado, que la carga viral que se encuentra en las heces esta positivamente asociada a los síntomas severos de la enfermedad (Bennett et al., 2019), por lo que esta prueba permitiría diferenciar la etiología de la enfermedad causada por RVA de otros casos de individuos que sufren una coinfección por otro patógeno que sería el responsable de causar la EDA (Protocolo Genérico para el Monitoreo del Impacto de la Vacunación de Rotavirus en la Carga de la Enfermedad Gastrointestinal y las Cepas Virales) (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/69913>).

Se ha descrito anteriormente que los resultados de las pruebas de los kits de ELISA comerciales están correlacionados con una carga viral presente en las muestras de heces provenientes de individuos con EDA. Es por eso que se utilizan los kits comerciales de ELISA para la validación de otras técnicas diagnósticas con elevada sensibilidad como el caso de la reverso-transcripción en tiempo real, ensayo altamente sensible que es capaz de detectar RVA presentes en individuos asintomáticos, por lo que la infección por rotavirus en algunos casos podría deberse a una infección adicional y no la causa de la enfermedad diarreica (Phillips et al., 2009).

6.3.4. Reacciones cruzadas

Las pruebas de reacciones cruzadas se llevaron a cabo para verificar que los anticuerpos policlonales IgG anti-VP6, producidos para el ensayo del “ELISA casero” reconocían únicamente a RVA, para esto se añadieron por duplicado a una placa recubierta con los anticuerpos IgG anti-rVP6, varios patógenos entéricos virales, bacterianos y un protozooario, así como a un microorganismo no patógeno (*S. cerevisiae*). En la Tabla 4, se

puede apreciar que el promedio de los valores de densidad óptica (DO) obtenidos con todos los microorganismos testados en la prueba, fueron comparables con la densidad óptica del control negativo.

Se puede observar que no se produjeron reacciones cruzadas con ninguno de los patógenos analizados, y sólo se presentaron reacciones positivas en los pocillos que contenían los controles positivos, ya sea la proteína purificada rVP6, virus inactivados, bovino y de simio SA-11 y el virus atenuado RIX4414, en las que se pueden observar valores de densidad óptica dentro del rango de muestras positivas, por lo que estas muestras presentan una clara diferencia en su resultado.

Tabla 4. Reacciones cruzadas para el ensayo de “ELISA casero” con diferentes patógenos entéricos.

Patógeno	Resultado	DO ₄₅₀	ds	Valor de cut off
Norovirus _A	Negativo	0.02	0	0.12
Coronavirus _B	Negativo	0.02	0	0.12
Parvovirus _B	Negativo	0.02	0	0.12
Adenovirus _B	Negativo	0.02	0	0.12
<i>Salmonella spp</i> _C	Negativo	0.02	0	0.12
<i>Shigella</i> _C	Negativo	0.02	0	0.12
ETEC _C	Negativo	0.02	0.01	0.12
EPEC _C	Negativo	0.03	0.01	0.12
EHEC _C	Negativo	0.02	0	0.12
EAEC _C	Negativo	0.02	0	0.12
STEC _C	Negativo	0.02	0	0.12
<i>Clostridium perfringens</i> _C	Negativo	0.02	0	0.12
<i>Giardia lamblia</i> _D	Negativo	0.02	0	0.12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> _E	Negativo	0.02	0	0.11
Proteína rVP6 purificada	Positivo	0.79	0.05	0.12
Rotavirus bovino inactivado	Positivo	0.41	0.09	0.12
Rotavirus de simio inactivado SA-11	Positivo	0.29	0.05	0.12
Rotavirus atenuado (Rotarix) G1P[8]	Positivo	0.36	0.15	0.12
Control negativo	Negativo	0.02	0	0.12

A: Muestra de heces positiva para PCR para norovirus y negativa para rotavirus

B: 100 µL de la vacuna Recombitek correspondiente a 1 dosis.

C: 100 µL con 10⁷ UFC de cultivos de enterobacterias (ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, STEC, *Salmonella spp.*, *Shigella* y *Clostridium perfringens*)

D: 100 µL de cultivo puro de *Giardia lamblia*

E: 100 µL de 1 mg/mL de levaduras resuspendidas

DO₄₅₀: Densidad óptica leída a 450 nm de longitud de onda.

ds: desviación standard

Los ensayos de Zhu et al., (2013) y Kumar et al., (2016) indican que los anticuerpos producidos para los ELISAs de los respectivos estudios son específicos para detectar a RVA en base a la prueba de reacción cruzada con diferentes patógenos entéricos que son los más comunes para causar EDA en los respectivos hospederos (Kumar et al., 2016; Zhu et al., 2013). De acuerdo con los resultados obtenidos, en la prueba de reacciones cruzadas, pudimos observar que el ensayo de “ELISA casero” también es específico para RVA, puesto que los anticuerpos IgG anti-VP6, no reconocen a ningún otro enteropatógeno testado, sino únicamente a RVA, destacándose el caso de norovirus, que es muy prevalente en las EDAs. Sin embargo, es necesario incluir en un futuro estudio un número mayor de patógenos que podrían estar presentes en las heces, sobre todo los de tipo viral como es el caso de poliovirus, astrovirus, sapovirus, enterovirus, echovirus, coxsackievirus, picornavirus, que por falta de acceso a los mismos no se pudo verificar.

Es importante resaltar que, en este ensayo, *Saccharomyces cerevisiae* no presentó ninguna reacción cruzada con los anticuerpos IgG anti-rVP6 que fueron producidos para el ensayo de “ELISA casero”, considerando que la proteína SUMO (Smt3) y la proteasa ULP-1 provienen de secuencias derivadas de levaduras y podrían haber reaccionado contra los anticuerpos policlonales. Tanto la solución inicial (1mg/mL) como una dilución (200ug/mL) de la suspensión de *Sacharomyces cerevisiae* no presentaron reactividad con los anticuerpos IgG anti-rVP6.

Por el contrario, los anticuerpos del ensayo de “ELISA casero” fueron capaces de detectar a RVA de diferentes orígenes incluyendo a rotavirus humano, rotavirus inactivado de simio SA-11 y rotavirus inactivado bovino, similar a lo observado en otros ensayos, debido a que la proteína VP6 es muy conservada entre las cepas de RVA a comparación de las otras proteínas que conforman el virus. Por lo que, se podría argumentar que los IgG anti-rVP6 del ensayo de “ELISA casero” reconocen efectivamente la proteína VP6 de la cápside de RVA, lo que sugiere que son útiles para el reconocimiento de RVA en distintas especies de mamíferos.

Otros estudios también han reportado la utilización de ELISAs que contienen anticuerpos mono o policlonales dirigidos contra la proteína VP6 para la detección de rotavirus en diferentes especies de animales como Miño et al., (2015) al analizar muestras de potros y Soltan et al., (2016) que evaluaron muestras equinas, bovinas, caprinas y caninas con ELISAs recomendados para el diagnóstico en heces humanas como Pathfinder™ y Premier™ Rotaclone® respectivamente.

En el estudio realizado por Kumar et al., (2016) los anticuerpos desarrollados y empleados en un ensayo de ELISA eran capaces de detectar RVA en muestras humanas y de ganado bovino, porcino y avícola (Kumar et al., 2016). Por lo que futuros estudios deberán evaluar el funcionamiento del ensayo de “ELISA casero” con muestras de diferentes animales.

6.4. Validación del ensayo de “ELISA casero”

6.4.1. Valor de cut off o punto de corte

Para la validación del ensayo de “ELISA casero” y el cálculo del valor de cut off, se evaluaron simultáneamente 181 muestras diarreicas de niños menores a 5 años, recolectadas del Hospital San Martín de Porres Ibuelo, mediante comparación con la prueba de ELISA comercial como referencia. Como se puede observar en la Tabla 5, del 100% de las muestras testadas (181) mediante el ELISA comercial, el 58.0% (105) correspondían a muestras negativas para RVA y el restante 42.0% (76) correspondía a muestras con resultado positivo para RVA.

Tabla 5. Desempeño del ensayo de “ELISA casero” frente al ELISA comercial.
Tabla de contingencia de los resultados del ensayo de “ELISA casero” (test a evaluar) frente a los resultados de la prueba de ELISA comercial (test de referencia).

		ELISA comercial		Total
		Positivo	Negativo	Recuento
"ELISA casero"	Positivo	71	5	76
	Porcentaje del ELISA comercial	93.4%	4.8%	100%
	Negativo	5	100	105
	Porcentaje del ELISA comercial	6.6%	95.2%	100%
Total	Recuento	76	105	181

Valor de Cut off	Sensibilidad	1-Especificidad	Índice de Youden
0.07	0.96	0.11	0.86
0.07	0.95	0.10	0.85
0.07	0.93	0.10	0.84
0.08	0.93	0.09	0.85
0.09	0.93	0.08	0.86
0.09	0.93	0.07	0.87
0.09	0.93	0.06	0.88
0.09	0.93	0.05	0.89
0.09	0.92	0.05	0.87
0.10	0.91	0.05	0.86

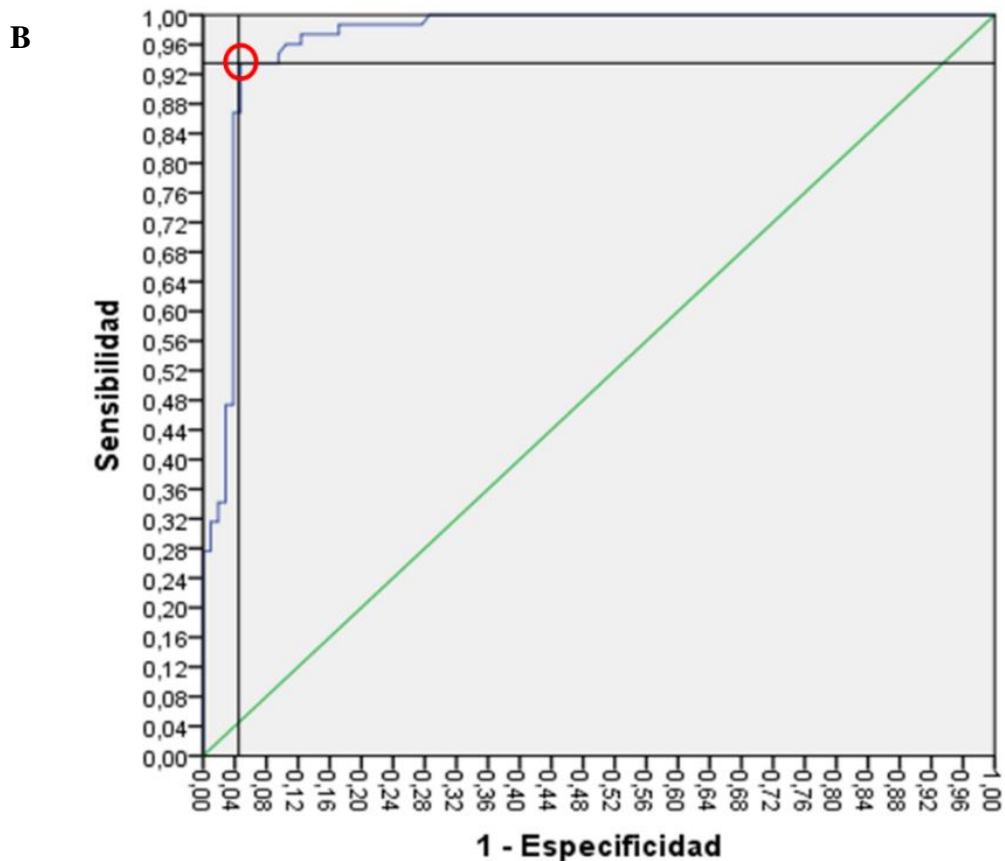


Figura 13. Valor de cut off calculado para el ensayo de “ELISA casero”.
 (A) extracto de la tabla de las coordenadas de la curva ROC con su respectiva sensibilidad, proporción de falsos positivos e índice de Younden. (B) curva ROC de la comparación de los resultados de “ELISA casero” contra ELISA comercial, se indican las coordenadas del punto más cercano al extremo superior izquierdo en rojo.

El cálculo del valor de cut off para discriminar las muestras positivas, se realizó a través de la curva ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic), en la que se compara el porcentaje de sensibilidad y el porcentaje de resultados falsos positivos (1-especificidad) del ensayo en diferentes puntos de corte. En base a esta curva que se muestra en la Fig. 13B, el valor de cut off fue definido como 0.09, tomando en cuenta, el punto en la curva más cercano a la intersección 0; 1 (esquina superior izquierda donde se encuentra el punto de mayor sensibilidad y especificidad). El ensayo de “ELISA casero” presentó su punto más cercano al límite superior izquierdo en la intersección 0.05; 0.93. Este resultado coincide con el Índice de Younden (J) cuyo máximo valor calculado 0.89 corresponde a los valores de sensibilidad y especificidad de 0.93 y 0.95 respectivamente, como se muestra en la tabla correspondiente a la Fig. 13A.

De esta manera densidades ópticas iguales o por encima de este valor (0.09) deberán ser consideradas como positivas.

El área bajo la curva obtenida para el ensayo de “ELISA casero” es de 0.97 (considerando que el máximo valor es de 1), lo que indica que la exactitud del ensayo es elevada al momento de clasificar los resultados de las muestras (Mandrekar, 2010). Debido a este alto valor alcanzado, se sugiere que el ensayo es útil para el diagnóstico de RVA en muestras de heces.

Tabla 6. Características analíticas del ensayo de “ELISA casero”. (A) concordancia entre los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial. (B) valores estadísticos de la evaluación del ensayo de “ELISA casero”.

A		Valor	Error estandarizado	T	Significación
			asintótico ^a	aproximada ^b	aproximada
Nominal por	Phi	.89			0
Nominal	V(Cramer)	.89			0
Medida de acuerdo	Kappa	.89	.04	11.92	0
N de casos válidos		181			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

B	Estadísticos	Valor	95% IC
	Sensibilidad	93.42%	85.31% - 97.83%
	Especificidad	95.24%	89.24% - 98.44%
	Razón de verosimilitud positiva	19.62	8.32 - 46.25
	Razón de verosimilitud negativa	0.07	0.03 - 0.16
	Prevalencia de la enfermedad	41.99%	34.71% - 49.54%
	Valor predictivo positivo (*)	93.42%	85.76% - 97.10%
	Valor predictivo negativo (*)	95.24%	89.54% - 97.90%
	Exactitud (*)	94.48%	90.07% - 97.32%

Por otra parte, el valor de concordancia calculado de acuerdo a la prueba kappa de Cohen es de 0.89 (Tabla 6A), por lo que los resultados de ambos ensayos son fuertemente concordantes entre sí de acuerdo a la interpretación y los valores sugeridos por Cohen (McHugh, 2012).

Finalmente, se calculó un segundo punto de corte para clasificar en un rango de seguridad, a las muestras negativas en base a la adición de tres desviaciones estándar al promedio de la densidad óptica de los controles negativos (0.02), donde el valor obtenido fue de 0.05, de esta manera, las muestras que presenten una DO menor o igual a este valor se clasificarán como negativas. Los dos valores de punto de corte positivo y negativo generan una zona de incertidumbre en el rango de densidad óptica entre 0.05 y 0.09,

donde las muestras que se encuentren en este rango de incertidumbre deben volver a ser analizadas por ELISA o por RT-PCR.

El cálculo del punto de corte o valor de cut off es muy importante ya que permite la clasificación de los resultados en positivos o negativos. Los diferentes valores del punto de corte tendrán un efecto en la sensibilidad y la especificidad del ensayo, pues al cambiar este valor se observa la variación inversa entre ambos estadísticos, por lo que es importante buscar un balance entre ambos valores.

En base a todos los resultados obtenidos, se observa que el ensayo de “ELISA casero” en cuanto a especificidad y sensibilidad se refiere, podría ser comparable a los ensayos recomendados por la OMS, estos ensayos reportan en sus respectivos insertos una sensibilidad entre 81% - 100% y especificidad del 92% - 100% para Premier™ Rotaclone® al compararse con microscopía electrónica y un ensayo de ELISA de referencia (Kallestad) y para ProSpect™ una sensibilidad entre 98.7% - 100% y especificidad del 99.2% al compararse con microscopía electrónica.

Otros ensayos comerciales de ELISA para la detección de RVA recomiendan que para el cálculo del valor de cut off se debe adicionar 0.20 al valor de la densidad óptica del control negativo (ProSpect™ Rotavirus). En el caso de las recomendaciones del ensayo de Premier™ Rotaclone®, se indica que las muestras que presenten una densidad óptica mayor al valor de densidad óptica de 0.15 deberán ser consideradas como positivas. De la misma manera, Miño et al., (2015), determinan un punto de corte muy estricto para asegurar un 100% de especificidad en su ensayo. El punto de corte calculado para el ensayo de “ELISA casero” es menor que los reportados por los ensayos comerciales y el que sugiere Miño et al., (2015), esto permite la detección de RVA en muestras que presenten una menor densidad óptica.

Para asegurar una mejor interpretación de los resultados se ha delimitado la zona de incertidumbre (delimitada por estos dos valores) donde las muestras podrían ser potencialmente clasificadas como falsas positivas o falsas negativas, por lo que deberían confirmarse posteriormente.

En cuanto al valor predictivo positivo para el ensayo de “ELISA casero” es 93.4% mientras que el valor predictivo negativo es 95.3% (Tabla 6). Estos valores coinciden casualmente con la sensibilidad y especificidad del ensayo respectivamente. Por otra parte,

la efectividad del ensayo es elevada con un valor de 94.48%, lo que indica la cantidad de muestras correctamente clasificadas en el total de muestras evaluadas.

En base a las estandarizaciones previas y una vez validado el desempeño del ensayo, el esquema del funcionamiento del ensayo de “ELISA casero” se presenta a continuación Fig.14, el mismo puede leerse detalladamente en el anexo 9.2.

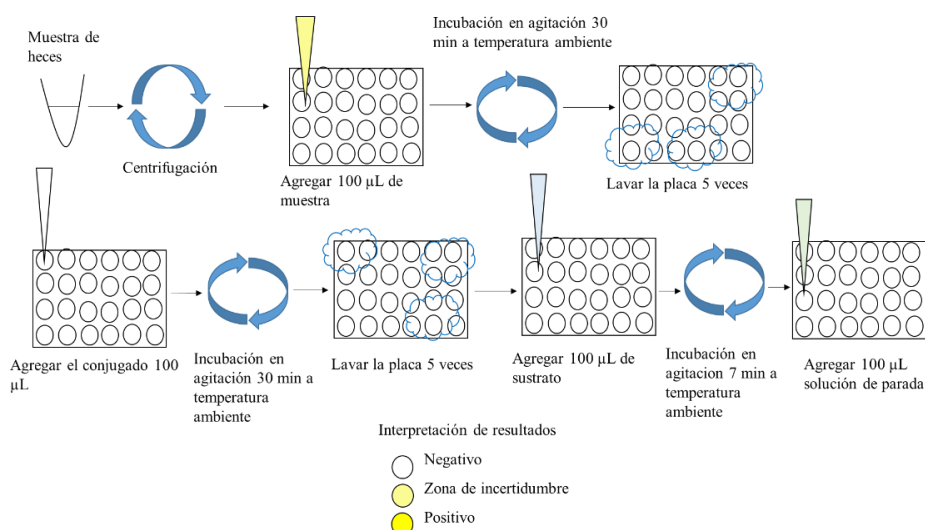


Figura 14. Esquema del protocolo para el ensayo de “ELISA casero”.

6.4.2. Ensayo de “ELISA casero” vs Reverso-transcripción (RT-PCR)

Como otro parámetro se tomó en cuenta a la reverso-transcripción como ensayo de referencia para comparar así los resultados obtenidos mediante esta técnica con los resultados obtenidos por los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial.

Para este ensayo 311 muestras diarreicas se analizaron por la prueba de la reverso-transcripción para la detección de RVA. De estas muestras el 70.10% (218) tuvieron un resultado positivo para RVA y el 29.90% (93) tuvieron un resultado negativo.

Al comparar los ensayos de “ELISA casero” y el ELISA comercial contra la reverso-transcripción, se pudo observar que, el ensayo de “ELISA casero” detectó el 35.05% como muestras negativas de las cuales el 27.65% fueron muestras verdaderamente negativas y 7.40% fueron clasificadas como falsas negativas, en contraste el ELISA comercial detectó el 33.44% como negativas, de las cuales el 25.08% corresponde a las verdaderamente negativas y el 8.36% fueron muestras falsas negativas. En cuanto a las muestras positivas, el ensayo de “ELISA casero” detectó 64.95% (202) como positivas,

de estas el 62.70% corresponde a muestras verdaderamente positivas y el 2.25% son muestras falsas positivas. En contraste el ensayo de ELISA comercial detectó 66.56% (207) de las muestras como positivas, de estas 61.74% eran verdaderas positivas y 4.82% correspondían a muestras clasificadas como falsas positivas. En este sentido 90.35% del total de las muestras fue correctamente clasificado por el ensayo de “ELISA casero” como se puede observar en las tablas de contingencia (Tabla 7A), mientras que el ELISA comercial clasificó correctamente el 86.82% de las muestras.

Al comparar los resultados obtenidos por el ensayo de “ELISA casero” con los del RT-PCR mediante la prueba de chi cuadrado, se pudo observar que los resultados del ensayo de “ELISA casero” no difieren significativamente de los resultados obtenidos por la reverso-transcripción con un valor de Chi-cuadrado de Pearson= 192.19, 1 grado de libertad y $p > 0.05$. De la misma manera, los resultados entre el ensayo de ELISA comercial con la prueba de RT-PCR tampoco tienen una diferencia estadísticamente significativa presentando un valor de Chi-cuadrado de Pearson= 151.60, 1 grado de libertad y $p < 0.05$. Por último, tampoco se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa, con un valor de Chi-cuadrado de Pearson= 143.48, 1 grado de libertad y $p < 0.05$ entre los resultados del ensayo de “ELISA casero” y los obtenidos por ELISA comercial.

La sensibilidad calculada para ambos ensayos de ELISA con respecto a la prueba de reverso-transcripción se ve disminuida en ambos casos con porcentajes de 89.45% y 88.07% para el ensayo de “ELISA casero” y el ELISA comercial respectivamente, por su parte la especificidad del ensayo de “ELISA casero” es ligeramente mayor (92.47%), que la del ELISA comercial (83.87%) (Tabla 7B).

En cuanto a la comparación de los valores predictivos de ambos ensayos ELISA, el valor predictivo negativo es menor al 80% en ambos casos. Esta comparación muestra que los ensayos de ELISA en relación con la reverso transcripción tenderían a clasificar algunas muestras como falsas positivas.

Los resultados obtenidos son comparables a los que Gautman et al., (2013) reporta en su estudio, donde los ensayos de PremierTM Rotaclone[®] y ProSpectTM tienen una sensibilidad de 76.8% y 75% respectivamente, una especificidad del 100% en ambos casos, el valor predictivo positivo es 100% para las dos pruebas, mientras que el valor predictivo negativo es 80.6% y 79.4% respectivamente cuando se compararon las pruebas de ELISA con RT-PCR (R. Gautam, F. Lyde, M. Esona, O. Quaye, & M. Bowen, 2013). Por lo

tanto, estos datos muestran y refuerzan que el ensayo de “ELISA casero”, podría otorgar resultados tan sensibles y específicos como los de los ensayos de ELISA comercial.

Tabla 7. Comparación entre los resultados de la reverso-transcripción con el ensayo de “ELISA casero” y el ELISA comercial.

(A) tablas de contingencia. (B) características analíticas de los ensayos de ELISA con respecto a la reverso-transcripción.

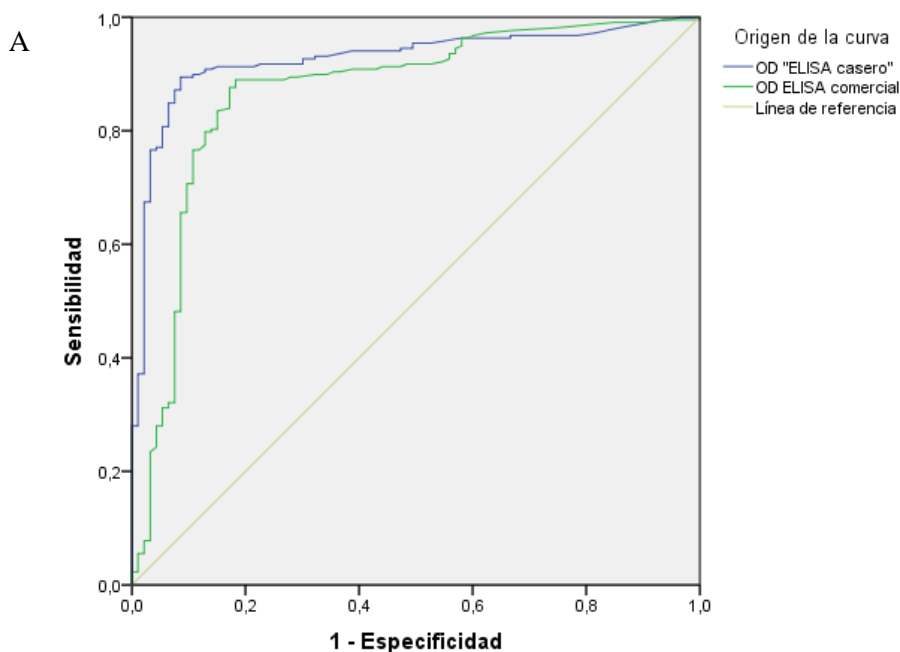
A		RT-PCR VP6		Total
		Positivo	Negativo	
"ELISA casero"	Positivo	195	7	202
	Negativo	23	86	109
Total		218	93	311

		RT-PCR VP6		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA comercial	Positivo	192	15	207
	Negativo	26	78	104
Total		218	93	311

B Estadístico	"ELISA casero"		ELISA comercial	
	Valor	95% CI	Valor	95% CI
Sensibilidad	89.45%	84.59% - 93.19%	88.07%	83.01% - 92.06%
Especificidad	92.47%	85.10% - 96.92%	83.87%	74.80% - 90.68%
Razón de verosimilitud positiva	11.88	5.82 - 24.27	5.46	3.43 - 8.70
Razón de verosimilitud negativa	0.11	0.08 - 0.17	0.14	0.10 - 0.21
Valor Predictivo Positivo	96.53%	93.17% - 98.27%	92.75%	88.93% - 95.33%
Valor Predictivo Negativo	78.90%	71.67% - 84.68%	75.00%	67.42% - 81.31%
Exactitud	90.35%	86.52% - 93.40%	86.82%	82.54% - 90.37%

En la Fig. 15 se representa la comparación del desempeño de ambos ensayos de ELISA con respecto a la reverso-transcripción, por medio de las curvas ROC. Los resultados entre ambos métodos de ELISA muestran que, la línea azul de la gráfica que corresponde al ensayo de “ELISA casero”, se encuentra más cercana al punto superior izquierdo (Fig. 15A) presentando también un mayor valor de área bajo la curva (Fig. 15B), en contraste a la línea verde que corresponde al ensayo de ELISA comercial. Esto indica que una mayor cantidad de muestras evaluadas con el ensayo de “ELISA casero” concuerda con los resultados de la reverso-transcripción, a comparación de la concordancia con los resultados entre ELISA comercial y el RT-PCR, donde se observa una línea ligeramente más lejana al extremo superior izquierdo. En general ambos métodos de ELISA muestran un desempeño muy parecido, donde la concordancia que tienen con respecto a la reverso-

transcripción es moderada según la escala de Cohen, para el ensayo de “ELISA casero” con un valor de 0.78 y de 0.70 para el ELISA comercial (Tabla 8).



		Área bajo la curva			
		95% de intervalo de confianza asintótico			
Variables de resultado de prueba	Área	Error estándar ^a	Significación asintótica ^b	Límite inferior	Límite superior
DO "ELISA casero"	.93	.02	0	.90	.96
DO ELISA comercial	.87	.03	0	.82	.92

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0.5

Figura 15. Comparación de las curvas ROC de la prueba de ELISA comercial y el ensayo de “ELISA casero” en base a la reverso-transcripción.

(A) Curvas ROC del ensayo de “ELISA casero” (línea azul) y ELISA comercial (línea verde).

(B) Área bajo la curva del ensayo de “ELISA casero” y ELISA comercial.

El valor de concordancia de la prueba del ensayo de “ELISA casero” con la reverso-transcripción es mayor al obtenido por Soltan et.al, (2016) donde comparan un ELISA comercial (Premier™ Rotaclone®) con un kit comercial de RT-PCR para diagnóstico de RVA, en muestras de diferentes especies de animales, y donde se observa una concordancia débil (Soltan et al., 2016). En general, los ensayos de detección de RVA por ELISA comparados a la reverso-transcripción dada la elevada sensibilidad de esta última, muestran concordancias desde débiles hasta altas (Kumar et al., 2016; Soltan et al., 2016).

Tabla 8. Concordancia de la reverso-transcripción y de los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial

RT-PCR vs ensayo de "ELISA casero"		RT-PCR vs ELISA comercial	
Medidas de concordancia	Valor	Medidas de concordancia	Valor
Kappa	0.78	Kappa	0.70
Error estándar	0.04	Error estándar	0.04
Significancia	0	Significancia	0

6.4.3. Genotipos detectados por el ensayo de “ELISA casero”

En 118 de las muestras de heces de niños con diarrea identificadas mediante ELISA casero y comercial como positivas para RVA, se realizó la genotipificación de RVA en base a la proteína VP4 (genotipo P) y VP7 (genotipo G) por reverso-transcripción. Se pudo observar una diversidad de genotipos G: G1, G2, G3, G4, G9 y G12 y P: P[4], P[6] y P[8]. En la Fig. 16 se observa la distribución encontrada de dichos genotipos G y P[.]

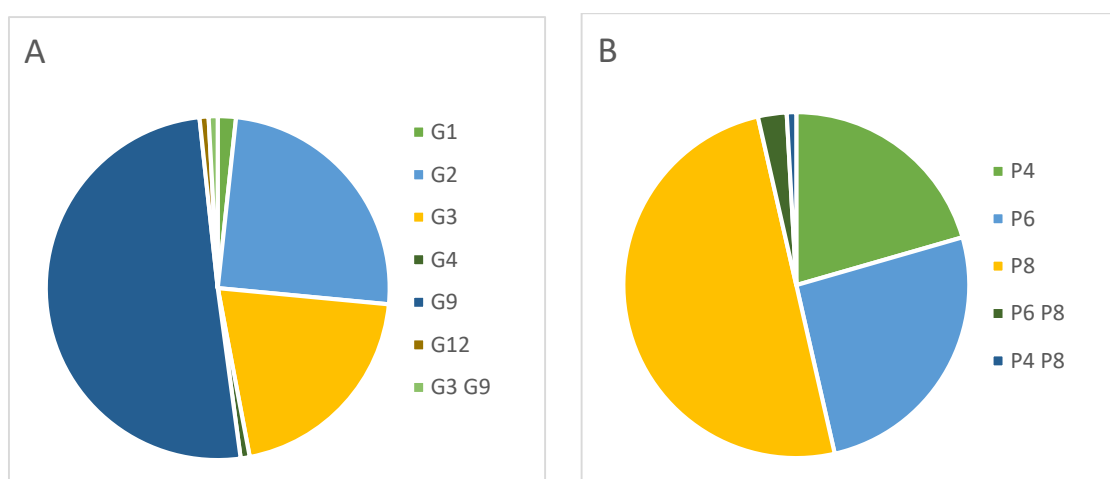


Figura 16. Genotipos G y [P] de las muestras positivas para RVA mediante el ELISA comercial y posteriormente por el ensayo de “ELISA casero”.

(A) genotipos G encontrados en base a la detección de la proteína VP7 mediante PCR convencional. (B) genotipos [P] de las muestras detectadas positivas para RVA en base a la detección de la proteína VP4 mediante PCR convencional.

Se pudo observar positividad a RVA, en muestras con un solo genotipo ya sea G o P [], pero también en muestras que presentaban coinfecciones con una combinación de dos genotipos G o P [], como en el caso de una muestra genotipificada como G3 y G9 cuyo genotipo P [] se identificó como P [6].

102 muestras presentaron combinaciones de genotipos definidos. En la Fig. 17, se muestra la distribución de estos entre los que se pudieron identificar a 13 diferentes

combinaciones de genotipos G y [P], donde G9 P[8], G2 P[4] y G3 P[6] fueron los más prevalentes.

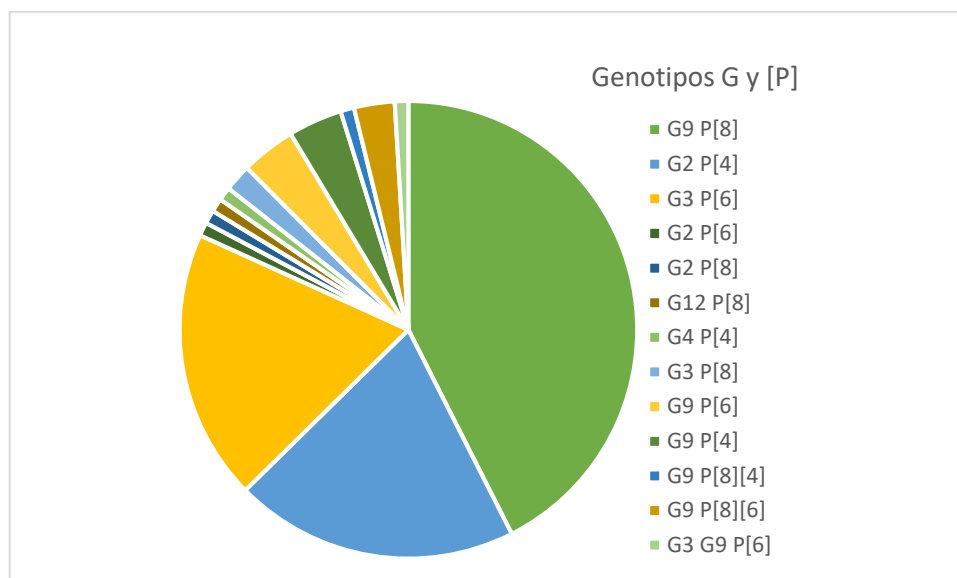


Figura 17. Genotipos G y P [] identificados de las muestras positivas para RVA.

Por lo que, se infiere que el ensayo de “ELISA casero” al igual que el comercial (Premier™ Rotaclone®) permite identificar a rotavirus del grupo A, portando genotipos individuales G o P [], diversas combinaciones de genotipos G, y/o P [] y muestras con coinfecciones de RVA que presentan más de un genotipo G o P [].

Los genotipos G (36) y P [] (51) (RCWG) son mucho más diversos en RVA y tienden a variar constantemente por encontrarse en la capa externa, como un mecanismo de defensa del virus, para poder seguir infectando a las células huésped. Se ha reportado que sólo el 72% de la proteína VP7 (G) es conservada, presentando regiones hipervariables entre las ubicaciones 87 y 96, estos sitios con elevado nivel de variación son conservados entre las distintas especies y se presentan generalmente en hacia la cara externa de la proteína que está expuesta a la respuesta inmune del huésped (Parbhoo et al., 2016), sin embargo la proteína VP6 al formar la capa intermedia de la cápside de RVA, por lo que en general tiene menos variación (Desselberger, 2014).

Debido a que los anticuerpos del ensayo de “ELISA casero” están dirigidos contra la proteína VP6, este ensayo no interactúa con las proteínas VP7 y VP4 especificados por los genotipos G y P [] respectivamente, por lo que puede reconocer varios genotipos de rotavirus circulantes. Sin embargo, se debe tener cuidado al analizar muestras de los diferentes huéspedes pues pueden presentar otros genotipos de RVA que no sean

reconocidos por los anticuerpos de ensayo, como en el estudio de Mino et al., (2015) en el que reporta que el ensayo de ELISA comercial (Pathfinder™) falla al detectar ciertos genotipos circulantes (G3 P [12] I6) entre las muestras de potros analizadas y por lo que serían susceptibles a un sesgo en la detección de RVA (Mino et al., 2015).

En base a los datos obtenidos el ensayo de “ELISA casero” pudo reconocer a los mismos genotipos de rotavirus que los que detecta el ELISA comercial, siendo los genotipos que se encontraban circulando en nuestro medio, sin embargo, será necesario probar en el futuro si el ensayo detecta a RVA de otros genotipos, especialmente de aquellos prevalentes en animales.

6.4.4. Precisión intra e interplaca del ensayo de “ELISA casero”

Para observar la variación de los resultados del ensayo de “ELISA casero” se realizaron ensayos de repetitividad intra e interplaca utilizando tres muestras positivas y tres negativas, se utilizaron las mismas muestras en tres placas diferentes, de estas se calculó el coeficiente de variación entre los resultados para compararlas posteriormente.

En la Tabla 9, se pueden observar las medias, desviación estándar y coeficiente de variación intraplaca de las seis muestras analizadas. Se puede observar que el coeficiente de variación intraplaca tanto de las muestras positivas como de las negativas son menores al 10% y está acorde a lo que se recomienda en las pruebas de precisión intraplaca (Azze, 2012). Excepto por una muestra negativa y una muestra positiva de la placa dos, que alcanzan un coeficiente de variación mayor a 13%. Esto probablemente puede deberse a una falla en el pipeteo por parte del analista.

Tabla 9. Precisión intraplaca del ensayo de “ELISA casero”.

La tabla a continuación representa los valores promedio de tres densidades ópticas.

Precisión intraplaca						
Muestras	Placa 1		Placa 2		Placa 3	
	Promedio (DS)	CV %	Promedio (DS)	CV%	Promedio (DS)	CV%
1 positiva	0.92 (0.07)	7.82	0.72 (0,10)	13,77	1,10 (0)	0,19
2 positiva	0.43 (0.01)	2.50	0.48 (0,01)	1,33	1,08 (0,05)	4,80
3 positiva	0.45 (0.01)	1.82	0.34 (0)	6,06	0,47 (0,03)	5,32
4 negativa	0.02 (0)	0	0.03 (0)	13,34	0,03 (0)	9,87
5 negativa	0.03 (0)	8.32	0.02 (0)	5,89	0,02 (0)	3,29
6 negativa	0.02 (0)	3.14	0.03 (0)	4,88	0,02 (0)	6,15

La variación interplaca de las muestras evaluadas en el ensayo de “ELISA casero” se muestra en la Tabla 10, donde el coeficiente de variación de las muestras negativas es de 11%, considerándose un valor aceptable. Sin embargo, el coeficiente de variación de las muestras positivas es de 44%, más del doble del valor que se recomienda en las pruebas de precisión interplaca (Ochoa. R. F, 2012). Esto podría deberse probablemente a que el recubrimiento de las placas se realiza manualmente, por lo que es probable que no exista un recubrimiento uniforme en las placas, por lo que este proceso deberá ser en el futuro optimizado.

Tabla 10. Precisión interplaca del ensayo de “ELISA casero”.

La tabla a continuación representa el promedio de las medias de las densidades ópticas de la Tabla 9, la desviación estándar de dicho promedio y el coeficiente de variación tanto para muestras positivas como negativas.

Precisión interplaca		
Estadístico	Positivas	Negativas
Promedio DO	0,66	0,02
DS	0,29	0
CV%	44,82	11,26

6.5. Aplicaciones del ensayo de “ELISA casero”

6.5.1. Comparación con el ELISA comercial y Prueba Rápida de RVA

Se analizaron un set de muestras diarreicas de niños menores a cinco años, mediante una prueba rápida para RVA (OnSite™ Rotavirus Ag rapid test), los resultados obtenidos se compararon contra los resultados del ELISA comercial y el ensayo de “ELISA casero”, considerando al ELISA comercial como prueba de referencia.

Como un primer paso y en calidad de control, los resultados obtenidos por ambos ensayos de ELISA se compararon entre si obteniéndose la Tabla 11, donde en el ensayo de “ELISA casero” se observaron ocho muestras que difieren con el resultado del ELISA comercial, cuatro de las cuales son falsas positivas y cuatro falsas negativas. El valor kappa de concordancia obtenido para ambos ensayos de ELISA fue de 0.81, similar a lo observado anteriormente.

Tabla 11. Comparación de los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial

		ELISA comercial		
		Positivo	Negativo	Total
"ELISA casero"	Positivo	33	4	37
	Negativo	4	44	48
Total		37	48	85

Posteriormente, se realizó la comparación entre los resultados de la prueba rápida de rotavirus contra ambos ensayos de ELISA, esta comparación se muestra en la Tabla 12A donde se puede apreciar que los resultados de la prueba rápida obtuvieron la misma distribución de muestras positivas, negativas y falsas positivas al compararse tanto con el ELISA comercial como con el ensayo de “ELISA casero”. Así 37, 16 y 32 muestras fueron clasificadas como positivas, negativas y falsas positivas respectivamente mediante ambos ensayos de ELISA. Los valores de especificidad, sensibilidad, valores predictivos positivo y negativo y la exactitud de la prueba rápida Tabla 12B, se resaltan sobre todo la baja especificidad 33.33%, el bajo valor predictivo positivo (53.62%) y la baja exactitud 62.35% que alcanza la prueba.

Tabla 112. Comparación de la prueba rápida contra los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial

(A) Tabla de contingencia de la Prueba rápida comparada con el ensayo de “ELISA casero” y el ELISA comercial. (B) Características analíticas de la prueba rápida frente al ELISA comercial.

A		“ELISA casero” (ELISA comercial)		
		Positivo	Negativo	Total
Prueba rápida RVA	Positivo	37 (37)	32 (32)	69
	Negativo	0 (0)	16 (16)	16
Total		37	48	85

B	Estadísticos	Valores	95% CI
	Sensibilidad	100.00%	90.51% - 100.0%
	Especificidad	33.33%	20.40% - 48.41%
	Razón de verosimilitud positiva	1.5	1.23 - 1.83
	Razón de verosimilitud negativa	0	
	Valor predictivo positivo	53.62%	48.63% - 58.55%
	Valor predictivo negativo	100.00%	
	Exactitud	62.35%	51.18% - 72.64%

Por otra parte, el valor de concordancia de la prueba rápida con respecto a cada uno de estos ensayos, expresado por el coeficiente kappa fue de 0.30, mostrando una débil concordancia entre los ensayos de ELISA y la prueba rápida.

Estos resultados sugieren que el ensayo de “ELISA casero” podría considerarse como un ensayo de referencia local, para evaluar otras técnicas de diagnóstico para RVA, ya que funciona de manera similar al ELISA comercial.

Estos datos difieren de otros estudios como el trabajo realizado por de Rougemont et al., (2009) que reportan una concordancia elevada de 93.6% entre la prueba inmunocromatografía o prueba rápida VIKIA® Rota-Adeno y el ELISA IDEIA™ para la detección de rotavirus en muestras fecales de niños (de Rougemont et al., 2009), o el trabajo de Izzo et al., (2012) en el que compararon las técnicas de ELISA e inmunocromatografía de flujo lateral para la detección de rotavirus en muestras fecales de terneros y donde observaron una especificidad de 95.2% y sensibilidad de 67.8%, que se considera una concordancia razonable entre ambos métodos de detección (Izzo et al., 2012). En el presente estudio, la concordancia encontrada entre ambas técnicas fue débil, especialmente porque se detectaron el doble de muestras positivas con la prueba rápida a diferencia de los ensayos de ELISA. Estas muestras clasificadas como falsas positivas

redujeron los valores de especificidad que fueron casi tres veces menores a los reportados por Rougemont et al., (2009) e Izzo et al., (2012) 96.4% y 95.2% respectivamente.

Ye et al., (2013), reportaron una baja especificidad del ensayo inmunocromatográfico VIKIA Rota-Adeno al evaluar muestras fecales de niños con diarrea, por lo que estas muestras se volvieron a analizar mediante dos técnicas de RT-PCR y tres ensayos de ELISA (Premier™ Rotaclone®, ProSpect™ y Ridascreen), únicamente el 28-37% de las muestras pudieron comprobarse como positivas mediante las otras técnicas de detección de rotavirus. Al volver a analizar las muestras mediante VIKIA Rota-Adeno el 86% de las muestras seguía siendo teniendo un resultado positivo, mientras que el 90% de estas tuvo un resultado negativo mediante RT-PCR y ELISA. Los resultados del presente estudio concuerdan con los reportados por Ye et al., (2013) en que indican que de uno a dos tercios de los resultados obtenidos corresponden a muestras falsas positivas (Ye et al., 2013). Por lo que, comparando con otros estudios las diferencias encontradas puede deberse al tipo de kit utilizado .

Otros estudios en los que se evalúa el funcionamiento de las pruebas inmunocromatográficas (CerTest Rotavirus+Adenovirus y Vikia Rota-Adeno) con la reverso-transcripción usada como referencia reportan una sensibilidad de hasta 94% y una especificidad del 93%, mostrando una concordancia sustancial ($K=0.79$) entre ambas técnicas (De Grazia et al., 2017). En un estudio realizado por Kaplon et al., (2015) se compara el desempeño de siete ensayos inmunocromatograficos para la detección de RVA al haber utilizado la prueba de PCR en tiempo real como referencia, en éste se señala que la especificidad de los siete ensayos se encontraba alrededor de 97.9% - 100%, mientras que la sensibilidad reportada para todos los ensayo era baja encontrandose entre 69.1% - 78.2% (Kaplon et al., 2015).

Las pruebas rápidas de inmunocromatográfica para la detección del antígeno de RVA son ampliamente empleadas en los hospitales de nuestro medio para el diagnóstico de EDA por RVA, por su bajo costo, practicidad y rapidez. Sin embargo, como se puede observar en este estudio, podrían generar muchos resultados falsos positivos. Para evaluar mejor el desempeño del ensayo de “ELISA casero” y de las de inmunocromatografia de uso local, sera necesario evaluar y comparar a todas ellas mediante RT-PCR (tiempo real) en muestras clinicas de pacientes con diarrea y pacientes recientemente recuperados con baja excrecion viral.

6.5.2. Análisis de la diarrea comunitaria

Para evaluar la asociación de rotavirus con la diarrea comunitaria, se analizaron 682 muestras de niños menores a cinco años, correspondientes a 97 muestras provenientes de episodios con diarrea y 585 muestras sin diarrea.

De las muestras diarreicas y no diarreicas; tres (3.09%) y cinco (0.85%) dieron resultado positivo para RVA respectivamente, como se observa en la Tabla 13.

A partir de esta tabla y la razón de probabilidad entre la presencia de RVA y la EDA calculada, se observó que en muestras de diarrea comunitaria existe una asociación entre EDA y la presencia de RVA (OR=3.70), con un valor de p cercano al límite de significancia.

Tabla 13. Probabilidad de riesgo entre EDA y la detección de la presencia de RVA mediante el ensayo de “ELISA casero”

		Enfermedad Diarreica Aguda		Total
		Positivo	Negativo	
RVA	Positivo	3	5	8
	Negativo	94	580	674
Total		97	585	682

Odds ratio	3.70
95% CI	0.87 – 15.75
Estadístico z	1.77
Nivel de significancia	P = 0,08

Como se observo en los datos de la tabla 13, la prevalencia de RVA en la EDA comunitaria representa el 3.09%. Datos no publicados del IBMB registran prevalencias de 25-27% para el periodo pre-vacuna. Observándose así, que el impacto de la vacuna anti-rotavirus también tuvo efecto sobre la diarrea comunitaria. Estos datos fueron obtenidos en muestras de 2 poblaciones de la ciudad de El Alto, colectadas a lo largo de un año, refuerzan los datos obtenidos en un estudio previo realizado por Inchauste et al., (2017), donde se compara el número de consultas médicas por EDA en los periodos pre y post-vacuna a partir de los datos del Sistema Nacional de Información en Salud (SNIS), observándose que luego de la introducción de la vacuna de RVA en el Programa Nacional de Inmunización en Bolivia, existe una disminución en un 12.9% (Inchauste et al., 2017).

6.5.3. Evaluación de la excreción del virus de la vacuna anti-rotaviral Rotarix (RV1)

Se compararon los resultados obtenidos del análisis de las 169 muestras mediante el ensayo comercial de ELISA Premier™ Rotaclone® y el ensayo de “ELISA casero” con el propósito de verificar su desempeño evaluando muestras que contienen una baja cantidad de virus.

Como se puede observar en la Tabla 14, de las 169 muestras evaluadas ocho (4.73%) y 6 (3.55) mostraron un resultado positivo al ser evaluadas mediante el ELISA comercial, y el ensayo de “ELISA casero” respectivamente. A su vez, los resultados negativos obtenidos fueron parecidos entre ambos métodos.

Tabla 14. Comparación de los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial en muestras de niños que recibieron la vacuna Rotarix.

		ELISA comercial		Total
		Positivo	Negativo	
"ELISA casero"	Positivo	2	4	6
	Negativo	6	157	163
Total		8	161	169

Estos datos muestran que los ensayos ELISA utilizados no son apropiados para evaluar la efectividad de la vacuna, en base a la excreción del virus vacunal, probablemente debido a que en la población analizada los niños no presentan en sus heces una cantidad suficiente de virus para ser detectados por la técnica de ELISA, pues como se ha reportado en el estudio semicuantitativo de Tate et al., (2013), las muestras con excreción viral pero negativas para ELISA, presentaron en promedio un valor Ct= 36 mediante qRT-PCR.

Por lo que para la detección de RVA en mínimas cantidades como en el caso de la excreción del virus vacunal o para la evaluación de este tipo de muestras es necesaria una técnica mucho más sensible como PCR en tiempo real, en la que además se pueden identificar las cepas de las vacunas que serían excretadas en las heces (Whiley et al., 2020). Por lo que el ensayo de “ELISA casero” se limitaría para el diagnóstico clínico de la EDA originada por RVA.

6.5.4. Análisis de muestras almacenadas

588 muestras de heces diarreicas provenientes de niños hospitalizados por EDA en los hospitales de la Vigilancia de rotavirus, con diagnóstico para RVA por ELISA comercial que fueron luego conservadas a -80°C en un periodo de dos a seis años, habiendo sufrido al menos dos ciclos de congelación y descongelación, se re-analizaron mediante el ensayo de “ELISA casero”, con el objeto de evaluar su desempeño en la detección del antígeno viral en muestras no frescas y almacenadas a diferentes periodos de tiempo.

Como se observa en la Tabla 15, de las 336 muestras positivas de acuerdo con el ensayo de ELISA comercial realizado previo al congelamiento, 294 concordaron con el resultado positivo. En cuanto a las muestras negativas 252 fueron detectadas por el ensayo de ELISA comercial y de estas 217 coincidieron con el resultado del ensayo de “ELISA casero”, siendo que 42 muestras resultaron como falsas negativas y 35 como falsas positivas.

Se consideró también el análisis de los resultados eliminando 25 muestras que habrían quedado en la zona de incertidumbre (0.05 – 0.09) de acuerdo con los valores de corte del ensayo de “ELISA casero”, quedando un total de 563 muestras. La comparación de los resultados de ambos ensayos puede observarse en la Tabla 15 en los paréntesis. Se puede apreciar que hubo una disminución en las muestras negativas (13) y en las muestras clasificadas como falsas negativas (12).

Tabla 15. Comparación de los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial en muestras de heces almacenadas por un periodo entre 2 a 6 años. Los números en paréntesis corresponden a las muestras analizadas luego de la depuración de 25 muestras que registraron valores dentro la zona de incertidumbre (densidad óptica: 0.05 – 0.09).

		ELISA comercial		Total
		Positivo	Negativo	Recuento
"ELISA casero"	Positivo	294 (294)	35 (35)	329 (329)
	Negativo	42 (30)	217 (204)	259 (234)
Total	Recuento	336 (324)	252 (239)	588 (563)

En la Tabla 16 se puede observar que los valores de sensibilidad, especificidad y exactitud se encuentran disminuidos a comparación de los valores correspondientes registrados en la Tabla 6B cuando se comparan simultáneamente ambos ensayos ELISA.

Tabla 16. Características analíticas del ensayo de “ELISA casero” en el total de las muestras 588 y al eliminar las muestras en la zona de incertidumbre 563.

Estadístico	Na= 588		Nb= 563	
	Valor	95% CI	Valor	95% CI
Sensibilidad	87.50%	83.48% - 90.84%	90.74%	87.05% - 93.67%
Especificidad	86.11%	81.22% - 90.13%	85.36%	80.23% - 89.58%
Razón de verosimilitud Positiva	6.30	4.62 - 8.59	6.20	4.55 - 8.43
Razón de verosimilitud Negativa	0.15	0.11 - 0.19	0.11	0.08 - 0.15
Valor Predictivo Positivo (*)	89.36%	86.03% - 91.97%	89.36%	86.06% - 91.96%
Valor Predictivo Negativo (*)	83.78%	79.49% - 87.32%	87.18%	82.81% - 90.57%
Exactitud (*)	86.90%	83.91% - 89.53%	88.45%	85.52% - 90.98%

Na: número total de muestras analizadas

Nb: número de muestras analizadas excluyendo aquellas que quedaron en zona de incertidumbre

Esto puede atribuirse al almacenamiento de las muestras, su forma de conservación y los procesos de estrés a los que se sometieron, más que al desempeño del ensayo de “ELISA casero”.

6.5.5. Detección de un brote de diarreas causado por rotavirus del grupo A en camélidos

Con el propósito de probar si el ensayo de “ELISA casero” era capaz de detectar RVA en muestras fecales diferentes a las muestras de humanos, se evaluaron las heces de camélidos domésticos llamas y alpacas de un brote de EDA.

En el año 2018, se registró un brote de EDA en las llamas y alpacas del el Centro Experimental Agropecuario Condoriri (CEAC) Oruro – Bolivia. Se colectaron 29 muestras de heces diarreicas de los animales afectados (aquellos que presentaban la cola manchada con heces) correspondientes a 28 llamas y a una alpaca. El análisis de las muestras mediante el ensayo de “ELISA casero” para detectar a RVA, mostró la presencia del antígeno viral en todas las muestras.

La presencia de RVA en las muestras positivas de acuerdo al ensayo de “ELISA casero” fue corroborada paralelamente mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con tinción de nitrato de plata (dado que no se contaba con controles positivos para rotavirus de camélidos). 14 muestras que registraron la mayor densidad óptica fueron sujetas a la extracción del RNA viral de doble cadena y posteriormente evaluadas por electroforesis en geles de PAGE. La detección del genoma

viral en las muestras diarreas de llamas y alpacas permitió comprobar la infección por rotavirus además de visualizar el patrón de migración de los 11 segmentos del genoma viral, correspondientes al electroferotipo largo de rotavirus. En la Fig. 18 se muestra el patrón electroforético del RNA de RVA obtenido de una de las muestras fecales de llama, donde se observa la presencia de las 11 bandas con una migración característica del genoma de rotavirus 4:2:3:2. El electroferotipo detectado, en las muestras diarreas del brote de RVA, tiene un patrón similar al detectado por Parreño et al., (2001) en guanacos, que consiste de un electroferotipo largo con una disposición 4:2:3:2 identificado como característico en rotavirus del grupo A (Parreño et al., 2001). Se observa también que el electroferotipo de RVA de llama contrasta con las muestras de rotavirus del grupo A humano de electroferotipo corto y largo donde se aprecian notoriamente diferencias en las bandas correspondientes a los segmentos uno y cinco.

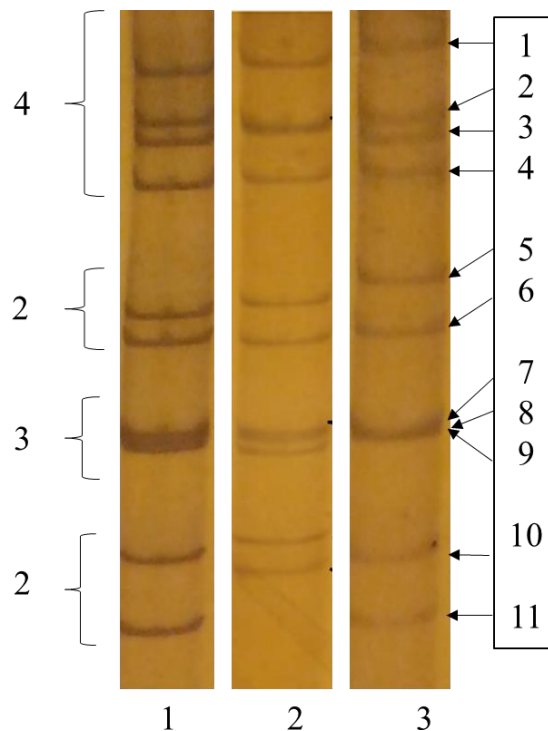


Figura 18. Electroferotipo de RVA en gel de poliacrilamida (7%) y tinción de nitrato de plata. Línea 1 RVA electroferotipo largo extraído de una muestra humana, línea 2 RVA electroferotipo corto extraído de muestra humana, línea 3 RVA electroferotipo largo extraído de una muestra fecal de llamas.

Posteriormente el virus aislado de dos de las muestras diarreas positivas para RVA de camélidos fue secuenciado, los resultados obtenidos permitieron identificar la presencia del genotipo G8 P[14] (datos no mostrados). El genotipo encontrado en las muestras de llamas y alpaca de este estudio es similar al RVA recuperado en las muestras de vicuñas

y guanacos que se secuenciaron en diferentes regiones de Argentina en las que se pudo observar que ambos aislados comparten características en común y son cercanas según el análisis filogenético de varios segmentos de su genoma (VP7,VP4, VP1, VP2, NSP2 y NSP3), también se observó que el segmento seis del RNA de doble cadena secuenciado en vicuñas, se relaciona más con la secuencia de RVA aislado de muestras de ganado bovino, por lo que se ha sugerido que las cepas de RVA que tienen genotipo parecido son más prevalentes en infecciones de animales del mismo orden (Badaracco et al., 2013; Parreno et al., 2004). Sin embargo, se requiere un análisis filogenético más extensivo del genoma en los camélidos domésticos para comprobar que podría tratarse de una misma cepa circulante en ambas regiones o en otros mamíferos presentes en la región.

El brote ocasionado por RVA, se inició el 25 de mayo y finalizó el diez de junio del 2018, tuvo una duración de 16 días, con un pico al tercer día de infección, mismo en el que se colectaron el mayor número de muestras de animales con EDA. El periodo corresponde a los días donde se registraron descensos en la temperatura durante la transición otoño-invierno. En otros meses del año, no se observaron casos de diarrea ocasionados por RVA como se observa en la Fig. 19, sugiriendo que podría tratarse de un brote estacional característico de la infección por RVA, sin embargo, los brotes de diarrea ocasionados por este enteropatógeno como el reportado por Rojas et al., (2016), en crías de alpacas del Cusco-Perú se presentaron en el mes de febrero y las detecciones de RVA en guanacos de Argentina descritas por Parreño et al., (2001) corresponden a los meses de noviembre y diciembre, es decir en época de verano, por lo que la estacionalidad deberá confirmarse en futuros estudios. Por otra parte, cabe mencionar que la estacionalidad de este brote es similar al reportado en infecciones de humanos, antes de la introducción de la vacuna anti-rotaviral al Programa Ampliado de Inmunizaciones en Bolivia (Inchauste et al., 2017).

La EDA asociada a RVA se presentó mayormente en llamas (20 hembras y ocho machos) a comparación de las alpacas (un macho), pese a estar ambas en la misma localidad.

La edad promedio en meses de los camélidos infectados fue de 3.3 meses para las llamas, mientras que la alpaca tenía cuatro meses. No se reportaron decesos entre los animales infectados, probablemente debido a la edad en la que se presentó la enfermedad. Otros brotes de diarrea ocasionados por RVA en alpacas y guanacos (Parreño et al., 2001; Rojas et al., 2016) reportan casos de mortalidad en animales a pocos días de nacidos.

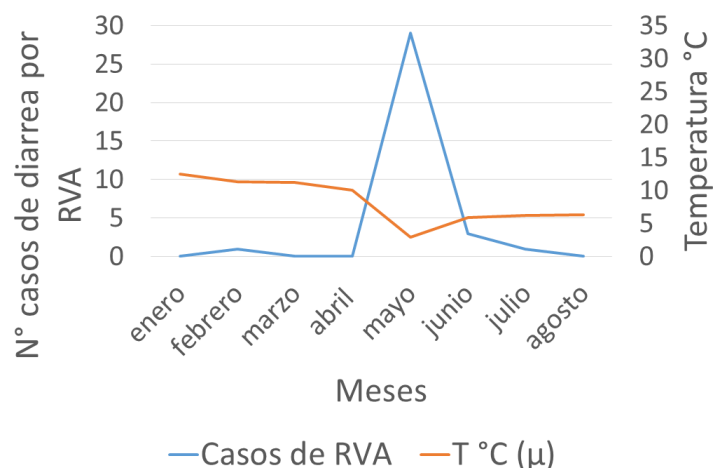


Figura 19. Distribución de los casos de RVA de enero a agosto en relación con la variación de la temperatura.

Adicionalmente se calculó la razón de probabilidad entre la EDA y la presencia de RVA. Para esto, se analizaron 135 muestras de camélidos domésticos colectadas a lo largo de nueve meses (enero-septiembre del 2018), 16 de estas muestras provenían de episodios de EDA y 119 correspondían a animales sanos.

Mediante la razón de probabilidades (OR), se observó que la infección por RVA es un determinante para la EDA en los camélidos (OR=22.36), con una significancia menor a 0.0001, tal como se observa en la Tabla 17. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Cho et al., (2013) en terneros, sugiriendo que en las llamas y alpacas jóvenes la infección por RVA también está asociada con la EDA.

Tabla 17. Asociación entre infección por RVA y EDA en camélidos domésticos.

	EDA +	EDA -	Total
RVA +	7	4	11
RVA -	9	115	124
Total	16	119	135
Odds Ratio	22.36		
95% CI	5.50 – 90.99		
Estadístico z	4.34		
Nivel de significancia	P < 0.0001		

RVA+ = Muestra con resultado rotavirus positivo de acuerdo al ensayo de “ELISA casero”

RVA- = Muestra con resultado rotavirus negativo de acuerdo al ensayo de “ELISA casero”

EDA+ = Muestra diarreaica

EDA- = Muestra no diarreaica

Este es a nuestro conocimiento el primer brote de RVA detectado y reportado en camélidos domésticos de Bolivia, con muestras tomadas en campo y analizadas en el IBMB, gracias al uso del ensayo de “ELISA casero”.

Los estudios que han evaluado la presencia del antígeno viral en diferentes especies animales han empleado ensayos inmunoenzimáticos diseñados para muestras de humanos, sin embargo, la funcionalidad de estos debe ser evaluada al momento de realizar el diagnóstico en muestras de animales (Mino et al., 2015; Soltan et al., 2016). Al utilizar ensayos diseñados específicamente para ser empleados en la detección de rotavirus de la especie a partir de la cual se aislaría el virus, los valores de sensibilidad y especificidad incrementan y se acercan a valores de 100% y 99.8% respectivamente como en el caso del ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra RVA murino desarrollado a partir de la secuencia de VP6 de RVA murino EDIM de la cepa ETD_822 (Fingas et al., 2018).

En el presente trabajo se logró identificar la presencia del antígeno viral de RVA en muestras fecales de llamas y alpacas con EDA mediante el empleo del ensayo de “ELISA casero”, información que concuerda con los patógenos más comunes causantes de enfermedades gastrointestinales en camélidos sudamericanos. Con estos datos podemos sugerir que el ensayo de “ELISA casero” es potencialmente útil para identificar a RVA como agente etiológico en las muestras diarreicas de camélidos domésticos afectados por EDA, y podría extenderse para el diagnóstico de EDA por RVA en animales.

7. Conclusiones

El ensayo de “ELISA casero”, presentado en este estudio permite detectar específicamente a la proteína VP6 de la cápside RVA en muestras fecales y no presenta reacciones cruzadas con otros patógenos entéricos causantes de EDA ni virales (norovirus, coronavirus, parvovirus, adenovirus) ni bacterianos (EHEC, EPEC, ETEC, EAEC, STEC y *Clostridium perfringens*) o protozoarios (*Giardia lamblia*). Tiene la capacidad de detectar hasta 2.5×10^4 CCID₅₀ de la cepa RIX4414 de RVA humano atenuado.

El ensayo de “ELISA casero” mostró una sensibilidad (93.42%), especificidad (95.24%), valores predictivos positivo (93.42%) y negativo (95.24%) y exactitud (94.48%) en

relación con los ensayos de ELISA comercial (Premier™ Rotaclone® y ProSpect™) que se tomaron como referencia, siendo ambos comparables.

El ensayo de “ELISA casero” es útil para el diagnóstico de casos de EDA ocasionado por RVA, pero no así para la detección de la cepa de la vacuna RV1 que es excretada en las heces entre 4 a 7 días luego de administrarse la vacuna (shedding viral).

El ensayo de “ELISA casero” al igual que el ELISA comercial, es capaz de detectar a RVA de una variedad de genotipos G y P [], además de coinfecciones con RVA de más de un genotipo.

Los ensayos de “ELISA casero” y ELISA comercial presentaron un desempeño similar al ser comparados con la prueba rápida de rotavirus OnSite™ Rotavirus Ag rapid test que presentó un valor de sensibilidad (100%) y un valor de especificidad (33%).

Se logró detectar RVA en muestras diarreicas almacenadas y expuestas posteriormente a varios ciclos de congelación y descongelación aunque los valores de sensibilidad, especificidad y exactitud del ensayo de “ELISA casero” se ven disminuidos en relación al análisis de muestras frescas.

La aplicación del ensayo de “ELISA casero” permitió establecer la prevalencia de RVA en la diarrea comunitaria en dos poblaciones de la ciudad de El Alto, observándose que esta habría disminuido en el periodo post-vacunal .

El ensayo permitió detectar a RVA en muestras diarreicas de llamas y alpacas. El análisis del RNA viral mostro la presencia de un patrón electroferético diferente al de RVA humano, cuyo genotipo fue G8 P[14].

La aplicación del ensayo de “ELISA casero” permitió identificar y caracterizar a un brote de EDA en los animales del Centro Experimental Agropecuario Condoriri.

Por todas las características que presenta el ensayo de “ELISA casero” se considera que es una alternativa local que podría emplearse para el diagnostico de RVA en remplazo de los ensayos ELISAs comerciales cuya utilidad es extendible para la detección de RVA en muestras de camélidos.

8. Estudios posteriores y proyecciones futuras

Como se ha podido observar en el presente trabajo, el funcionamiento del ensayo de “ELISA casero” es prometedor para ser empleado como herramienta de diagnóstico de RVA en los Hospitales que realizan la vigilancia de rotavirus, sin embargo, es necesario evaluar y validar su desempeño en las diferentes regiones del país y someterlo a examinación por parte de los Servicios Departamentales en Salud y laboratorios de referencia para que estos garanticen la calidad de los resultados obtenidos. Caso similar ocurre para el diagnóstico de EDA por RVA en animales, donde el ensayo deberá ser evaluado por SENASAG, para obtener el respaldo de la institución y asegurar el resultado de dicho diagnóstico.

Un análisis de costo y beneficio deberá ser realizado para justificar la producción local del ensayo de “ELISA casero”. Los ensayos ELISA comerciales recomendados por la OMS disponibles en el mercado tienen localmente un precio muy elevado y un número contado de hospitales pediátricos (Vigilancia de Rotavirus) los utilizan.

La aplicación de los anticuerpos sobre una superficie diferente es otra de las posibles aplicaciones futuras para los anticuerpos IgG anti-rVP6 que, con las modificaciones necesarias, podría derivar en un ensayo de inmunocromatografía para la detección de RVA, facilitando el diagnóstico en diferentes ubicaciones, sobre todo rurales.

9. Anexos

9.1. Protocolo para la producción de placas del ensayo de “ELISA casero”

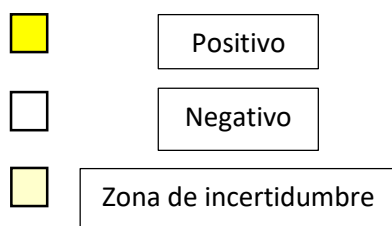
1. Recubrir los tubos y el material que contendrá los anticuerpos con leche al 1% en PBS 1X esperar 5 minutos, enjuagar con agua destilada y secar el material.
2. Realizar una dilución del anticuerpo IgG anti-rVP6 1:3000 con PBS 0.1X y recubrir una placa de 96 pozos con 100 μ L/pozo de la dilución.
3. Incubar las placas recubiertas con el anticuerpo a 4°C durante 18 horas.
4. Desechar el contenido de las placas y añadir 350 μ L/pozo de una solución de leche descremada al 2% en PBS 1X para bloquear la placa y evitar que los anticuerpos se unan inespecíficamente. Incubar por 3 horas en agitación a temperatura ambiente.

5. Desechar la solución de bloqueo y secar las placas a 37°C. Posteriormente sellar las placas con el adhesivo correspondiente.

9.2. Protocolo del ensayo de “ELISA casero”

1. Realizar la dilución de la muestra diarreica en tubos de 1.5 mL, colocando 1 mL de PBS 1X y aproximadamente 200-300 µL de la muestra.
2. Mezclar por vortex hasta que la solución quede homogénea y posteriormente centrifugar la muestra a 3000 rpm por 10 min.
3. Añadir en una placa de 96 pozos recubierta con una dilución 1:3000 de anticuerpo de captura IgG anti-rVP6, 150 µL del sobrenadante de cada muestra a un pozo distinto.
4. Añadir 150 µL de los controles positivos (rotavirus inactivado bovino o de simio SA-11), negativos (PBS 1X) y 2 µL de proteína recombinante rVP6 en los pozos correspondientes.
5. Incubar la placa en agitación a temperatura ambiente y cubierta de la luz durante 30 minutos.
6. Preparar la solución de conjugado, que contiene el anticuerpo detector IgG anti-rVP6-HRP en una dilución 1:8000 en PBS 1X con leche descremada al 1% para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo.
7. Después de la incubación desechar el contenido de la placa y lavar 5 veces con PBS 1X, secando la placa de manera invertida sobre un papel absorbente.
8. Agregar 150 µL de la solución de conjugado a cada pozo e incubar en agitación y oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos.
9. Posteriormente desechar el contenido de la placa y lavar 5 veces con PBS 1X, secando la placa de manera invertida sobre un papel absorbente.
10. Añadir 100 µL de sustrato a cada pozo e incubar 7 minutos en agitación y protegido de la luz.
11. Agregar 100 µL de la solución de parada a cada pozo.
12. Leer la densidad óptica en el lector de ELISA a 450nm de longitud de onda.

13. Interpretar los resultados de acuerdo con el siguiente esquema.



9.3. Lista de primers utilizados en la genotipificación

Primer	Secuencia 5' → 3'	Número de acceso	Amplificación
G con 1	TAGCTCCTTTTAATGTATGG	K02033	Primera amplificación G
G con 2	GTATAAAATACTTGCCACCA	K02033	Primera amplificación G
GT-1	TCTTGTCAAAGCAAATAATG	K02033	Segunda amplificación G
GT-2	GTTAGAAATGATTCTCCACT	M11164	Segunda amplificación G
GT-3	GTCCAGTTGCAGTGTAGC	D86284	Segunda amplificación G
GT-4	GGGTCGATGGAAAATTCT	X13603	Segunda amplificación G
GT-9	TATAAAGTCCATTGCAC	L14072	Segunda amplificación G
Con 3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	M21014	Primera amplificación P
Con 2	ATTTTCGGACCATTTATAACC	M21014	Primera amplificación P
1T-1	TCTACTTGGATAACGTGC	M21014	Segunda amplificación P
2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	M32559	Segunda amplificación P
3T-1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	M88480	Segunda amplificación P
4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	D90260	Segunda amplificación P
5T-1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	M60600	Segunda amplificación P

10. Referencias

- Azze, C. R. F. O. (2012). TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS PARA ENSAYOS CLÍNICOS DE VACUNAS Y ESTUDIOS INMUNOEPIDEMIOLÓGICOS.
- Badaracco, A., Matthijnsens, J., Romero, S., Heylen, E., Zeller, M., Garaicoechea, L., . . . Parreno, V. (2013). Discovery and molecular characterization of a group A rotavirus strain detected in an Argentinean vicuna (*Vicugna vicugna*). *Vet Microbiol*, *161*(3-4), 247-254. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.035
- Bányai, K., Kemenesi, G., Budinski, I., Földes, F., Zana, B., Marton, S., . . . Jakab, F. (2017). Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infection, Genetics and Evolution*, *48*, 19-26.
- Barbieri, E. S., Rodriguez, D. V., Marin, R. E., Setti, W., Romero, S., Barrandeguy, M., & Parreno, V. (2014). [Serological survey of antibodies against viral diseases of public health interest in llamas (*Lama glama*) from Jujuy province, Argentina]. *Rev Argent Microbiol*, *46*(1), 53-57. doi:10.1016/s0325-7541(14)70049-5
- Beards, G., Campbell, A., Cottrell, N., Peiris, J., Rees, N., Sanders, R., . . . Flewett, T. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. *Journal of clinical microbiology*, *19*(2), 248-254.
- Bennett, A., Pollock, L., Jere, K. C., Pitzer, V. E., Lopman, B., Bar-Zeev, N., . . . Cunliffe, N. A. (2019). Duration and Density of Fecal Rotavirus Shedding in Vaccinated Malawian Children With Rotavirus Gastroenteritis. *The Journal of Infectious Diseases*. doi:10.1093/infdis/jiz612
- Bertolotti-Ciarlet, A., Ciarlet, M., Crawford, S. E., Conner, M. E., & Estes, M. K. (2003). Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by

- a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine*, 21(25-26), 3885-3900. doi:10.1016/s0264-410x(03)00308-6
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 28(3), 495-503.
- Bredell, H., Smith, J. J., Prins, W. A., Görgens, J. F., & van Zyl, W. H. (2016). Expression of rotavirus VP6 protein: a comparison amongst *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research*, 16(2). doi:10.1093/femsyr/fow001
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., . . . Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *nature*, 416(6880), 507-511.
- Bugli, F., Caprettini, V., Cacaci, M., Martini, C., Paroni Sterbini, F., Torelli, R., . . . Arcovito, A. (2014). Synthesis and characterization of different immunogenic viral nanoconstructs from rotavirus VP6 inner capsid protein. *Int J Nanomedicine*, 9, 2727-2739. doi:10.2147/ijn.S60014
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., & Mattern, M. R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expression and Purification*, 43(1), 1-9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.03.016>
- Cho, Y. I., Han, J. I., Wang, C., Cooper, V., Schwartz, K., Engelken, T., & Yoon, K. J. (2013). Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Vet Microbiol*, 166(3-4), 375-385. doi:10.1016/j.vetmic.2013.07.001
- Choi, A. H., Basu, M., McNeal, M. M., Bean, J. A., Clements, J. D., & Ward, R. L. (2004). Intranasal administration of an *Escherichia coli*-expressed codon-optimized rotavirus VP6 protein induces protection in mice. *Protein Expr Purif*, 38(2), 205-216. doi:10.1016/j.pep.2004.08.009
- Choi, A. H., Basu, M., McNeal, M. M., Flint, J., VanCott, J. L., Clements, J. D., & Ward, R. L. (2000). Functional mapping of protective domains and epitopes in the rotavirus VP6 protein. *Journal of Virology*, 74(24), 11574-11580. doi:10.1128/jvi.74.24.11574-11580.2000
- De Grazia, S., Bonura, F., Pepe, A., Li Muli, S., Cappa, V., Collura, A., . . . Giammanco, G. M. (2017). Performance analysis of two immunochromatographic assays for the diagnosis of rotavirus infection. *J Virol Methods*, 243, 50-54. doi:10.1016/j.jviromet.2017.01.025
- de Rougemont, A., Kaplon, J., Billaud, G., Lina, B., Pinchinat, S., Derrough, T., . . . Floret, D. (2009). [Sensitivity and specificity of the VIKIA Rota-Adeno immuno-chromatographic test (bioMérieux) and the ELISA IDEIA Rotavirus kit (Dako) compared to genotyping]. *Pathologie-biologie*, 57(1), 86-89. doi:10.1016/j.patbio.2008.08.004
- Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *Virus research*, 190, 75-96.
- Dhama, K., Chauhan, R. S., Mahendran, M., & Malik, S. V. (2009). Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Veterinary Research Communications*, 33(1), 1-23. doi:10.1007/s11259-008-9070-x
- Estes, M. K., Crawford, S. E., Penaranda, M. E., Petrie, B. L., Burns, J. W., Chan, W. K., . . . Summers, M. D. (1987). Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J Virol*, 61(5), 1488-1494.
- Fingas, F., Ruckner, A., Heenemann, K., Volke, D., Sieg, M., Bielefeldt, P., . . . Hoffmann, R. (2018). Highly sensitive ELISA for the serological detection of murine rotavirus EDIM based on its major immunogen VP6. *J Virol Methods*, 262, 72-78. doi:10.1016/j.jviromet.2018.07.016
- Garaicoechea, L., Olichon, A., Marcoppido, G., Wigdorovitz, A., Mozgovoij, M., Saif, L., . . . Parreño, V. (2008). Llama-Derived Single-Chain Antibody Fragments Directed to Rotavirus VP6 Protein Possess Broad Neutralizing Activity In Vitro and Confer Protection against Diarrhea in Mice. *Journal of Virology*, 82(19), 9753-9764. doi:10.1128/jvi.00436-08
- Gautam, R., Lyde, F., Esona, M., Quaye, O., & Bowen, M. (2013). Comparison of Premier (TM) Rotacloone (R), ProSpecT (TM), and RIDASCREEN (R) rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. *Journal of clinical virology* :

- the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 58. doi:10.1016/j.jcv.2013.06.022
- Gautam, R., Lyde, F., Esona, M. D., Quaye, O., & Bowen, M. D. (2013). Comparison of Premier(TM) Rotaclone(®), ProSpecT(TM), and RIDASCREEN(®) Rotavirus Enzyme Immunoassay Kits for Detection of Rotavirus Antigen in Stool Specimens. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 58(1), 292-294. doi:10.1016/j.jcv.2013.06.022
- Guerrero, F., Ciragan, A., & Iwai, H. (2015). Tandem SUMO fusion vectors for improving soluble protein expression and purification. *Protein expression and purification*, 116, 42-49.
- Heinimäki, S., Hankaniemi, M. M., Sioofy-Khojine, A.-B., Laitinen, O. H., Hyöty, H., Hytönen, V. P., . . . Blazevic, V. (2019). Combination of three virus-derived nanoparticles as a vaccine against enteric pathogens; enterovirus, norovirus and rotavirus. *Vaccine*, 37(51), 7509-7518. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.072>
- Inchauste, L., Patzi, M., Halvorsen, K., Solano, S., Montesano, R., & Iniguez, V. (2017). Impact of rotavirus vaccination on child mortality, morbidity, and rotavirus-related hospitalizations in Bolivia. *Int J Infect Dis*, 61, 79-88. doi:10.1016/j.ijid.2017.06.006
- Izzo, M., Kirkland, P., Gu, X., Lele, Y., Gunn, A., & House, J. (2012). Comparison of three diagnostic techniques for detection of rotavirus and coronavirus in calf faeces in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 90(4), 122-129. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00891.x>
- Kaplon, J., Fremy, C., Pillet, S., Mendes Martins, L., Ambert-Balay, K., Aho, S. L., & Pothier, P. (2015). Diagnostic Accuracy of Seven Commercial Assays for Rapid Detection of Group A Rotavirus Antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(11), 3670-3673. doi:10.1128/jcm.01984-15
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803-822. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kumar, N., Malik, Y. S., Kumar, S., Sharma, K., Sircar, S., Saurabh, S., . . . Dhama, K. (2016). Peptide-Recombinant VP6 Protein Based Enzyme Immunoassay for the Detection of Group A Rotaviruses in Multiple Host Species. *PLoS One*, 11(7), e0159027. doi:10.1371/journal.pone.0159027
- Lappalainen, S., Pastor, A. R., Tamminen, K., López-Guerrero, V., Esquivel-Guadarrama, F., Palomares, L. A., . . . Blazevic, V. (2014). Immune responses elicited against rotavirus middle layer protein VP6 inhibit viral replication in vitro and in vivo. *Hum Vaccin Immunother*, 10(7), 2039-2047. doi:10.4161/hv.28858
- Lopez, S., Espinosa, R., Greenberg, H. B., & Arias, C. F. (1994). Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virology*, 204(1), 153-162. doi:10.1006/viro.1994.1519
- Maffey, L., Vega, C. G., Miño, S., Garaicoechea, L., & Parreño, V. (2016). Anti-VP6 VHH: an experimental treatment for rotavirus A-associated disease. *PloS one*, 11(9), e0162351.
- Malakhov, M. P., Mattern, M. R., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D., & Butt, T. R. (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of structural and functional genomics*, 5(1-2), 75-86.
- Malm, M., Heinimäki, S., Vesikari, T., & Blazevic, V. (2017). Rotavirus capsid VP6 tubular and spherical nanostructures act as local adjuvants when co-delivered with norovirus VLPs. *Clinical and experimental immunology*, 189(3), 331-341. doi:10.1111/cei.12977
- Mandrekar, J. N. (2010). Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(9), 1315-1316. doi:<https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ec173d>
- Marcoppido, G., Olivera, V., Bok, K., & Parreño, V. (2011). Study of the kinetics of antibodies titres against viral pathogens and detection of rotavirus and parainfluenza 3 infections in captive crias of guanacos (Lama guanicoe). *Transboundary and emerging diseases*, 58(1), 37-43.
- Masoudi, M., Teimoori, A., Tabaraei, A., Shahbazi, M., Divbandi, M., Lorestani, N., . . . Nikoo, H. R. (2020). Advanced sequence optimization for the high efficient yield of human

- group A rotavirus VP6 recombinant protein in *Escherichia coli* and its use as immunogen. *Journal of Medical Virology*, n/a(n/a). doi:10.1002/jmv.26522
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., . . . Rey, F. A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *The EMBO Journal*, 20(7), 1485-1497. doi:10.1093/emboj/20.7.1485
- Matsumura, T., Itchoda, N., & Tsunemitsu, H. (2002). Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Arch Virol*, 147(6), 1263-1270. doi:10.1007/s00705-002-0808-4
- Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., . . . Van Ranst, M., (2008). Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *Journal of Virology*, 82 (7), 3204. doi: 10.1128/JVI.02257-07.
- Matthijnsens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M., & Johne, R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of Virology*, 157(6), 1177-1182. doi:10.1007/s00705-012-1273-3
- McHugh, M. L. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia medica*, 22(3), 276-282. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092060>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3900052/>
- Memon, A. M., Bhuyan, A. A., Chen, F., Guo, X., Menghwar, H., Zhu, Y., . . . He, Q. (2017). Development and Validation of Monoclonal Antibody-Based Antigen Capture ELISA for Detection of Group A Porcine Rotavirus. *Viral Immunology*, 30(4), 264-270.
- Mino, S., Kern, A., Barrandeguy, M., & Parreno, V. (2015). Comparison of two commercial kits and an in-house ELISA for the detection of equine rotavirus in foal feces. *J Virol Methods*, 222, 1-10. doi:10.1016/j.jviromet.2015.05.002
- Palmieri, V., Bugli, F., Papi, M., Ciasca, G., Maulucci, G., Galgano, S., . . . De Spirito, M. (2015). VP6-SUMO Self-Assembly as Nanocarriers for Gastrointestinal Delivery. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 378786. doi:10.1155/2015/378786
- Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijnsens, J., . . . Bányai, K. (2013). Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Veterinary Microbiology*, 165(3), 190-199.
- Parbhoo, N., Dewar, J. B., & Gildenhuis, S. (2016). Sequence analysis and structural implications of rotavirus capsid proteins. *Acta Virol*, 60(3), 260-270. doi:10.4149/av_2016_03_260
- Parreno, V., Bok, K., Fernandez, F., & Gomez, J. (2004). Molecular characterization of the first isolation of rotavirus in guanacos (*Lama guanicoe*). *Archives of virology*, 149(12), 2465-2471.
- Parreño, V., Costantini, V., Cheetham, S., Blanco Viera, J., Saif, L. J., Fernandez, F., . . . Schudel, A. (2001). First isolation of rotavirus associated with neonatal diarrhoea in guanacos (*Lama guanicoe*) in the Argentinean Patagonia region. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48(9), 713-720.
- Pastor, A. R., Rodríguez-Limas, W. A., Contreras, M. A., Esquivel, E., Esquivel-Guadarrama, F., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2014). The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine*, 32(24), 2874-2877.
- Pesavento, J., Crawford, S., Estes, M., & Prasad, B. V. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. In *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis* (pp. 189-219): Springer.
- Phillips, G., Lopman, B., Tam, C. C., Iturriza-Gomara, M., Brown, D., & Gray, J. (2009). Diagnosing rotavirus A associated IID: using ELISA to identify a cut-off for real time RT-PCR. *Journal of clinical virology*, 44(3), 242-245.
- Rey, F. A., Lepault, J., & Cohen, J. (2003). II, 2. The three-dimensional structure of rotavirus VP6. *Perspectives in Medical Virology*, 9, 129-141. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-7069\(03\)09009-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-7069(03)09009-8)
- Rodák, L--, Smítalová, R., Šmíd, B., Nevoránková, Z., Valíček, L., & Pšíkal, I. (2011). Comparing electron microscopy and a competitive blocking ELISA in the detection of

- rotaviruses in porcine faeces. *The Veterinary Journal*, 187(2), 279-281. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.11.020>
- Rodríguez-Limas, W. A., Tyo, K. E. J., Nielsen, J., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2011). Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 33. doi:10.1186/1475-2859-10-33
- Rojas, M., Dias, H. G., Gonçalves, J. L. S., Manchego, A., Rosadio, R., Pezo, D., & Santos, N. (2019). Genetic diversity and zoonotic potential of rotavirus A strains in the southern Andean highlands, Peru. *Transboundary and emerging diseases*, 66(4), 1718-1726.
- Rojas, M., Manchego, A., Rocha, C. B., Fornells, L. A., Silva, R. C., Mendes, G. S., . . . Santos, N. (2016). Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas (*Vicugna pacos*) in the southern Peruvian highland. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(03), 269-274.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172-172. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
- Ryabchevskaya, E., Evtushenko, E., Arkhipenko, M., Donchenko, E., Nikitin, N., Atabekov, J., & Karpova, O. (2020). A Recombinant Rotavirus Antigen Based on the Coat Protein of Alternanthera Mosaic Virus. *Molecular Biology*, 54, 243-248.
- Saldana, S., Esquivel Guadarrama, F., Olivera Flores Tde, J., Arias, N., Lopez, S., Arias, C., . . . Gomez Lim, M. A. (2006). Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. *Viral Immunol*, 19(1), 42-53. doi:10.1089/vim.2006.19.42
- Soltan, M. A., Tsai, Y.-L., Lee, P.-Y. A., Tsai, C.-F., Chang, H.-F. G., Wang, H.-T. T., & Wilkes, R. P. (2016). Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. *Journal of virological methods*, 235, 99-104.
- Tang, B., Gilbert, J. M., Matsui, S. M., & Greenberg, H. B. (1997). Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis. *Virology*, 237(1), 89-96. doi:10.1006/viro.1997.8762
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Parashar, U. D., Agocs, M., Serhan, F., . . . Paladin, F. (2016). Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000–2013. *Clinical Infectious Diseases*, 62(suppl_2), S96-S105. doi:10.1093/cid/civ1013
- Tate, J. E., Mijatovic-Rustempasic, S., Tam, K. I., Lyde, F. C., Payne, D. C., Szilagyi, P., . . . Hall, C. B. (2013). Comparison of 2 assays for diagnosing rotavirus and evaluating vaccine effectiveness in children with gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), 1245.
- Temprana, C. F., Argüelles, M. H., Gutierrez, N. M., Barril, P. A., Esteban, L. E., Silvestre, D., . . . Castillo, A. A. (2018). Rotavirus VP6 protein mucosally delivered by cell wall-derived particles from *Lactococcus lactis* induces protection against infection in a murine model. *PLoS One*, 13(9), e0203700. doi:10.1371/journal.pone.0203700
- Thongprachum, A., Chaimongkol, N., Khamrin, P., Pantip, C., Mizuguchi, M., Ushijima, H., & Maneekarn, N. (2010). A novel multiplex RT-PCR for identification of VP6 subgroups of human and porcine rotaviruses. *Journal of virological methods*, 168(1-2), 191-196.
- Wang, H., Liu, M., Sugata, K., Wang, Y., Hull, J., Foytich, K., & Jiang, B. (2018). Development of a new enzyme immunoassay for improved detection of rotavirus in fecal specimens of vaccinated infants. *J Clin Virol*, 99-100, 44-49. doi:10.1016/j.jcv.2017.12.013
- Ward, R. L., & McNeal, M. M. (2010). VP6: A Candidate Rotavirus Vaccine. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(Supplement_1), S101-S107. doi:10.1086/653556
- Whiley, D. M., Ye, S., Tozer, S., Clark, J. E., Bletchly, C., Lambert, S. B., . . . Nimmo, G. R. (2020). Over-diagnosis of Rotavirus Infection in Infants Due to Detection of Vaccine Virus. *Clin Infect Dis*, 71(5), 1324-1326. doi:10.1093/cid/ciz1196

- Ye, S., Roczo-Farkas, S., Whiley, D., Lambert, S., Robson, J., Heney, C., . . . Kirkwood, C. (2013). Evidence of false-positive results in a commercially available rotavirus assay in the vaccine era, Australia, 2011 to 2012. *Euro Surveill*, *18*(21).
- Zhao, Q., Chen, W., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, J., & Zhang, Z. (2011). Self-assembled virus-like particles from rotavirus structural protein VP6 for targeted drug delivery. *Bioconjug Chem*, *22*(3), 346-352. doi:10.1021/bc1002532
- Zhu, J., Yang, Q., Cao, L., Dou, X., Zhao, J., Zhu, W., . . . Ren, X. (2013). Development of porcine rotavirus vp6 protein based ELISA for differentiation of this virus and other viruses. *Virology journal*, *10*, 91-91. doi:10.1186/1743-422X-10-91