



DETECCION DEL CONSTRUCTO RV1017-pGEM DE ROTAVIRUS POR QPCR

Aurora Mendieta-Mendoza, Janette G. Moreno-González, Ma. Carmen E. Delgado-Gardea, Rocío Rojas-García, Carmen Daniela González-Barriga, María del Carmen González-Horta, Blanca Sánchez-Ramírez, Gilberto Erosa-de la Vega, Rocío Infante-Ramírez.

Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Biotecnología, Nuevo Campus Universitario cp. 31125. Chihuahua, Chihuahua, México.
Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey campus Chihuahua, Chihuahua, Chihuahua, México. rinfante@uach.mx, mema_bora@hotmail.com

Palabras clave: Rotavirus, qPCR, control viral.

Introducción. Rotavirus es el principal patógeno que causa gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años en el mundo entero (1). Es un virus de ssRNA que produce deshidratación severa; causando anualmente 500,000 muertes y más de 60,000 visitas intrahospitalarias (2,3).

La detección clínica de rutina de Rotavirus se realiza por análisis inmunoenzimático (EIA), inmunocromatografía y por reacción de cadena polimerasa retrotranscriptasa en punto final (RT-PCR)(4). Sin embargo la detección de rotavirus en muestras ambientales requiere aumentar la sensibilidad de los métodos moleculares de detección viral. En la detección de carga viral se requiere qRT-PCR. Actualmente en el mercado no existen controles virales para una cuantificación absoluta en muestras de agua, por lo que es necesario desarrollar controles internos.

El propósito de nuestro trabajo fue desarrollar controles internos de Rotavirus para métodos de detección molecular, utilizando cepas circulantes de nuestra región, previamente reportadas.

Metodología. Se desarrollo el constructo RV1017-pGEM con un fragmento de 887 pb del gen que codifica para la proteína VP4 de Rotavirus, como un control positivo interno. Se caracterizó el DNA plasmídico. La curva estándar del control viral se realizó con seis diluciones seriadas de DNA plasmídico. La detección del gen 4 de la proteína VP4 de RV se realizó mediante qPCR SYBR GREEN, utilizando los Primers CON3/IT-I para la generación de un fragmento de 345 pb con una temperatura de disociación de 80°C.

Resultados. El constructo RV1017-pGEM de Rotavirus se obtuvo con la inserción del fragmento del gen que codifica para la proteína VP4 de Rotavirus de la cepa 1017-Coproteca UACH. La caracterización del constructo se mediante una linealización y amplificación por PCR en punto final.

Se observó el fragmento de 887pb característico de Rotavirus en gel de agarosa. La curva de estandarización del control viral en qPCR se realizo utilizando seis diluciones seriadas del DNA plasmídico. La detección de Rotavirus por SYBR GREEN qPCR se realizo con el primer IT-I/CON 3, el cual detecto el fragmento menor de 345 pb del gen 4 para detectar VP4.

Conclusiones. El constructo RV1017-pGEM fue útil en la estandarización de qPCR SYBR GREEN para detectar el gen 4 de la proteína VP4 de RV.

Bibliografía.

1. Gutiérrez-Aguirre, I., Steyer, A., Boben, J., Gruden, K., Poljšak-Prijatelj, M., & Ravnikar, M. (2008). Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription-real-time quantitative PCR assay. *Jcm*, 46(8), 2547-2554.
2. Min, B. S., Noh, Y. J., Shin, J. H., Baek, S. Y., Min, K. I., Ryu, S. R., ... & Ahn, B. Y. (2006). Assessment of the quantitative real-time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus. *Jvm*, 137(2), 280-286.
3. Kottaridi, C., Spathis, A. T., Ntova, C. K., Papaevangelou, V., & Karakitsos, P. (2012). Evaluation of a multiplex real time reverse transcription PCR assay for the detection and quantitation of the most common human rotavirus genotypes. *Jvm*, 180(1), 49-53.
4. Marthaler, D., Homwong, N., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., & Ciarlet, M. (2014). Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *Jvm*, 209, 30-34.
5. Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *Virus research*, 190, 75-96.