



Mandile, Marcelo Gastón

Aspectos epidemiológicos y evolutivos de los rotavirus humanos del grupo A : implicancias en el desarrollo e implementación de vacunas



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Mandile, M. (2016). *Aspectos epidemiológicos y evolutivos de los rotavirus humanos del grupo A: Implicancias en el desarrollo e implementación de vacunas. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2022>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Aspectos epidemiológicos y evolutivos de los rotavirus humanos del grupo A. Implicancias en el desarrollo e implementación de vacunas

TESIS DOCTORAL

Marcelo Gastón Mandile

mgmandile@gmail.com

Resumen

El plan de trabajo pensado para esta tesis involucró como primer objetivo la vigilancia epidemiológica y caracterización de cepas de RVA causantes de diarreas desde el año 2008 hasta el 2014 en la zona de Buenos Aires y Gran Buenos Aires. Este trabajo nos ha permitido detectar cepas emergentes, como fueron las G12 acompañadas por P[8] durante los años 2008 al 2010 y desde el año 2012 hasta el 2014, con altas frecuencias en los años 2009 y 2013. Por otro lado se observó la reemergencia de cepas G2P[4], llegando a frecuencias cercanas al 80% en el año 2011. Por último se ha detectado la reaparición de cepas G1P[8] en el año 2014, alcanzando más del 70% de frecuencia. Los resultados generados han ayudado a establecer el patrón de fluctuación de genotipos en nuestra área en un período en el que muchos países sudamericanos han incorporado alguna de las vacunas contra RVA. Potencialmente, esta inmunización masiva podría afectar el comportamiento natural de dicha fluctuación y nuestro trabajo aporta cierta evidencia al debate sobre este efecto que aún resulta controversial. A partir del 2015 se ha incorporado la vacuna monovalente que contiene una cepa atenuada G1P[8] en el calendario nacional de nuestro país por lo que se abre un período crucial en el que se debe prestar especial atención en la evaluación y monitoreo de los resultados de dicho plan de inmunización.

Tesis de doctorado
Universidad Nacional de Quilmes

**Aspectos epidemiológicos y evolutivos de los rotavirus
humanos del grupo A.
Implicancias en el desarrollo e implementación de
vacunas.**



**Universidad
Nacional
de Quilmes**

Autor: Lic. Marcelo Gastón Mandile

Director: Dr. Alejandro Castello

Laboratorio de Inmunología y Virología

Dpto. de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

Esta tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes fue realizada en el Laboratorio de Inmunología y Virología, perteneciente al Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes gracias a la concesión de Becas de Posgrado tipo I y II otorgadas por la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y financiada por:

- el Programa Microbiología Molecular Básica y Aplicaciones Biotecnológicas de la Universidad Nacional de Quilmes,
- Subsidios de apoyo a la investigación para estudiantes de grado e investigadores en formación de la Universidad Nacional de Quilmes.

Parte de los resultados correspondientes a esta tesis dieron origen a las siguientes publicaciones en revistas y libros científicos:

Mandile, M.G., Esteban, L.E., Argüelles, M.H., Mistchenko, A., Glikmann, G., Castello, A.A. Surveillance of group A Rotavirus in Buenos Aires 2008-2011, long lasting circulation of G2P[4] strains possibly linked to massive monovalent vaccination in the region. *Journal of Clinical Virology* 60:282-289 (2014).

Mandile, M.G., Esteban, L.E., Argüelles, M.H., Rota, R.P., Temprana, C.F., Castello, A.A., Glikmann, G. Rotavirus. Capítulo 10 en *Microbiología Biomédica* (2016 – en prensa)

ÍNDICE

ÍNDICE.....	7
AGRADECIMIENTOS.....	13
ABREVIATURAS.....	15
LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLAS	17
RESUMEN	19
OBJETIVOS	23
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	25
1. Rotavirus humanos del grupo A.....	27
1.1. Impacto de la enfermedad causada por rotavirus.....	27
1.2. Descubrimiento de los rotavirus	28
1.3. Estructura del virión	30
1.4. Genoma.....	32
1.5. Proteínas no estructurales	33
1.6. Clasificación.....	34
1.6.1. Serogrupo, grupo y subgrupo.....	36
1.6.2. Electroferotipos.....	36
1.6.3. Genogrupos	37
1.6.4. Serotipos.....	37
1.6.5. Genotipos	38
1.6.6. Clasificación basada en el genoma completo	38
1.7. Replicación	40
2. Patogénesis	42
2.1. Mecanismos de la diarrea por rotavirus	42
2.2. Inmunidad	42
2.3. Enfermedad, diagnóstico y tratamiento	44
3. Epidemiología.....	45
3.1. Transmisión	45
3.2. Incidencia	45
3.3. Estacionalidad	47

4.	Diversidad genómica y evolución de los rotavirus.....	48
4.1.	Mecanismos asociados con la diversidad	48
4.2.	Distribución de genotipos	50
4.3.	Transmisión interespecie	51
5.	Prevención.....	52
5.1.	Control.....	52
5.2.	Vacunación.....	53
CAPÍTULO I		59
ROTAVIRUS HUMANOS DEL GRUPO A EN MUESTRAS CLÍNICAS. DETECCIÓN Y FLUCTUACIÓN DE GENOTIPOS.....		59
PARTE I		61
COLECCIÓN DE MUESTRAS Y DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE ROTAVIRUS EN CASOS CLÍNICOS. INCIDENCIA Y ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS EN EL GRAN BUENOS AIRES		61
1.	Materiales y Métodos	63
1.1.	Procedencia y preparación de las muestras clínicas.....	63
1.2.	Detección de antígenos de rotavirus por ELISA	64
1.2.1.	ELISA para detección de rotavirus grupo A	64
1.2.2.	ELISA para detección de rotavirus grupo C	64
2.	Resultados y Discusión	65
2.1.	Incidencia de rotavirus en muestras clínicas.....	65
2.2.	Aspectos epidemiológicos de las infecciones por RVA en niños internados	67
2.2.1.	Distribución etaria de las infecciones por RVA	67
2.2.2.	Estacionalidad	69
3.	Conclusiones.....	71
PARTE II		75
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ROTAVIRUS HUMANOS, FLUCTUACIÓN TEMPORAL DE GENOTIPOS.....		75
1.	Materiales y Métodos	77
1.1.	Extracción de RNA.....	77
1.2.	RT-PCR	77
1.3.	Genotipificación por multiplex-PCR	78
1.4.	Visualización de los productos de amplificación de la PCR.....	79

2.	Resultados y discusión	80
2.1.	Distribución de genotipos G y P y su combinación	80
2.2.	Fluctuación de genotipos en el tiempo	85
	Cepas G12P[8]	86
	Cepas G2P[4]	87
	Cepas G1P[8]	88
3.	Conclusiones.....	88
CAPÍTULO II		93
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS INUSUALES DE ROTAVIRUS HUMANOS DEL GRUPO A.....		93
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS EMERGENTES G12		95
1.	Materiales y métodos	97
1.1.	Secuenciamiento nucleotídico	97
1.2.	Análisis molecular y filogenia	97
1.3.	Análisis de coalescencia y filogeografía	98
2.	Resultados y discusión	99
2.1.	Análisis filogenético.....	100
2.1.1.	Gen vp7	100
2.1.2.	Gen vp4	101
2.1.3.	Gen nsp1.....	103
2.2.	Coalescencia y filogeografía de cepas G12 del linaje II	104
2.2.1.	Análisis de coalescencia	105
2.2.2.	Análisis de filogeografía	108
3.	Conclusiones.....	109
CAPÍTULO III		115
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DOMINANTES DE ROTAVIRUS HUMANOS DEL GRUPO A		115
PARTE I		117
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS G2P[4].....		117
1.	Materiales y métodos	119
2.	Resultados y discusión	119
2.1.	Análisis filogenéticos	120
2.1.1.	Gen vp7	120
2.1.2.	Gen vp4	122

2.2.	Caracterización molecular. Análisis de secuencias aminoacídicas.....	124
2.2.1.	Regiones antigénicas de VP7.....	124
3.	Conclusiones.....	126
PARTE II	129
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS G1P[8]	129
1.	Materiales y métodos	131
2.	Resultados y discusión	131
2.1.	Análisis filogenético.....	132
2.1.1.	Gen vp7	132
2.1.2.	Gen vp4	133
2.1.3.	Gen nsp4.....	136
2.2.	Caracterización molecular. Análisis de secuencias aminoacídicas.....	137
2.2.1.	Regiones antigénicas de VP7.....	137
2.2.2.	Regiones antigénicas de VP4.....	138
2.2.3.	Regiones antigénicas de NSP4.....	138
3.	Conclusiones.....	142
CAPÍTULO IV	145
ROTAVIRUS HUMANOS DEL GRUPO A EN MUESTRAS AMBIENTALES	145
1.	Introducción	147
2.	Procedencia de las muestras. Colaboraciones y convenios.....	149
PARTE I	151
PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA DE CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RVA A PARTIR DE EFLUENTES CLOACALES DEL GRAN BUENOS AIRES	151
1.	Materiales y métodos	153
1.1	Control interno. Fago PP7	153
1.2.	Concentración viral	154
1.3.	Extracción de ácidos nucleicos y retrotranscripción.....	155
1.4.	Curvas de calibración y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	156
2.	Resultados y discusión	158
2.1.	qPCR y curvas de calibración.....	158
3.	Conclusiones.....	160
PARTE II	161

ESTUDIOS CUALITATIVOS DE ROTAVIRUS DEL GRUPO A EN AMBIENTE Y COMPARACIÓN CON DATOS CLÍNICOS.....	161
1. Materiales y Métodos	163
2. Resultados y discusión	163
2.1. Frecuencia de genotipos	163
2.2. Análisis filogenéticos	165
2.2.1. Cepas G2.....	165
2.2.2. Cepas G1.....	167
3. Conclusiones.....	168
PARTE III	171
ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE ROTAVIRUS GRUPO A EN AMBIENTE Y COMPARACIÓN CON DATOS CLÍNICOS.....	171
1. Materiales y Métodos	173
2. Resultados y discusión	173
2.1 Carga viral de rotavirus en aguas residuales y comparación con la incidencia de RVA en muestras clínicas	174
3. Conclusiones.....	176
CONCLUSIONES GENERALES	179
BIBLIOGRAFÍA.....	189

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las instituciones que financiaron este trabajo a través de becas y subsidios:

- Universidad Nacional de Quilmes
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Quiero agradecer a la Dra. Graciela Glikmann, directora del Laboratorio de Inmunología y Virología, y al Dr. Alejandro Castello, director de mi trabajo doctoral, por haberme permitido formar parte de su laboratorio, por haberme formado y guiado durante el proceso de aprendizaje de mi tesis de doctorado. También les agradezco su confianza y apoyo en todo momento.

Agradezco a mi familia por haberme brindado la posibilidad de elegir lo que me gusta y apoyarme durante todo este tiempo. Agus, Sere, Hele, Nidina, Paulina, Vieja, Viejo, Delis, Caromica, Tere, Jose, JeiPi, a todos ustedes por acompañarme, preguntarme, bancarme, sostenerme.

Sol, te quiero agradecer a vos en especial por aceptar compartir todo conmigo. Por todo lo que me brindás, por toda la ayuda en muchos momentos distintos, buenos, malos. Por bancar mi mal humor por la humedad, o por reírme solo por algo que está en la tele o por mirar mil horas Los Simpson y querer que los mire conmigo. Por bancarte perder paseos de fin de semana porque tengo un partido de básquet. Por esperarme despierta los días de semana por el mismo motivo. Y por muchas cosas más.

A mis amigos, los de siempre. Gon, Jor, Rali, Juama, Li, Clari, Viky y Ceci. Por las muchas reuniones, aunque cada vez más espaciadas, y reírnos de las mismas anécdotas de hace muchos años.

A mis amigos de la UNQ, Pao, Juli y Juanello. Gracias por haber compartido mucho estudio, mucha salida, mucha lujaneada, mucha catarsis. Si bien cada uno siguió caminos distintos, y nos vemos menos, cada juntada es igual de buena.

A mis amigos de básquet, Alex, Seba, Rubi, Sherman y Scar. Porque compartimos una pasión.

Les agradezco a mis compañeros y ex compañeros del laboratorio porque hicieron que ir a trabajar sea ameno, ya sea aprendiendo alguna técnica o tomando mate. También quiero agradecer a compañeros del pasillo, de otros laboratorios, con los que he compartido mates y buenos momentos. A Ale B y Ro, que nos conocemos desde el día que empecé en el LIV y hoy son ex compañeras, pero sobre todo son amigas.

ABREVIATURAS

RVA: rotavirus del grupo A

RNA: ácido ribonucléico

dsRNA: RNA de doble cadena

TLP: partículas de triple capa (*Triple Layer Particles*)

DLP: partículas de doble capa (*Double Layer Particles*)

nm: nanometros

mRNA: RNA mensajero

ssRNA: RNA de simple cadena

ORF: marco de lectura abierto (*Open Reading Frame*)

ER: retículo endoplasmático

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)

RT: retrotranscripción

Pb: pares de bases

RV1: vacuna monovalente contra rotavirus

RV5: vacuna pentavalente contra rotavirus

CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

PBS: buffer forfato salino

PBS-T: PBS, Tween 0,2 %

PBS-TC: PBS-T, caseína 1 %

OPD: *orto*-fenilendiamina

DO490: densidad óptica a 490 nm

cDNA: DNA complementario

GBA: Gran Buenos Aires

NT: no tipificable

NA: no amplificable

ml: mililitros

μl: microlitros

mM: milimolar

μM: micromolar

BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees

ACMR: Ancestro Común Más Reciente

MCMC: Cadenas de Markov Monte Carlo

SPREAD: Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics

aa: aminoácidos

wt: *wild type*

tc: *tissue culture*

DMSO: dimetilsulfóxido

qPCR: PCR cuantitativa

MA: muestras ambientales

MC: muestras clínicas

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLAS

- Figura 1.** Incidencia de RVA en países en vías de desarrollo y desarrollados.
- Figura 2.** Diagrama esquemático y micrografía de partículas de rotavirus.
- Figura 3.** Organización estructural de los rotavirus. A.
- Tabla 1.** Proteínas de rotavirus.
- Tabla 2.** Estrategias de clasificación para los rotavirus.
- Tabla 3.** Constelaciones de genotipos de cepas humanas seleccionadas.
- Figura 4.** Ciclo de replicación de los rotavirus.
- Figura 5.** Fisiopatología de la diarrea causada por rotavirus.
- Figura 6.** Mortalidad global por diarrea aguda por rotavirus y cobertura de vacunación.
- Figura 7.** Reasociación de segmentos entre dos cepas de rotavirus.
- Figura 8.** Combinaciones de genotipos G-P de rotavirus grupo A.
- Tabla 1.1.1.** Incidencia de RVA y RVA en muestras del Hospital "Dr. E. Oller".
- Tabla 1.1.2.** Incidencia de RVA en muestras del Hospital "Dr. R. Gutierrez".
- Tabla 1.1.3.** Parámetros estadísticos de infección por RVA en niños de 0 a 5 años del Hospital "Dr. R. Gutierrez".
- Gráfico 1.1.1.** Distribución etaria de los pacientes con infección por rotavirus.
- Gráfico 1.1.2.** Porcentaje de infecciones por RVA respecto al total de casos de internación por diarrea.
- Gráfico 1.1.3.** Número de casos de infecciones de RVA positivos y RVA negativos por mes.
- Tabla 1.2.1.** Distribución y frecuencia de los genotipos G y P de RVA detectados en el Gran Buenos Aires desde el 2008 al 2014.
- Gráfico 1.2.1.** Frecuencia de los genotipos G y P en el Gran Buenos Aires, 2008-2014.
- Tabla 1.2.2.** Distribución y frecuencia de combinaciones G/P de RVA en el Gran Buenos Aires, 2008-2014.
- Gráfico 1.2.2.** Frecuencia de combinación G/P de RVA detectados en el GBA, 2008-2014.
- Gráfico 1.2.3.** Fluctuación de los genotipos G a lo largo de los años.
- Gráfico 1.2.4.** Fluctuación de los genotipos P a lo largo de los años.
- Figura 2.1.** Filograma del gen de vp7 de cepas G12.

Figura 2.2. Filograma del gen de vp4 de cepas G12P[8].

Figura 2.3. Filograma del gen de nsp1 de cepas G12.

Tabla 2.1. Tasa de mutación y edades de los ACMR de cepas G12 del linaje II.

Figura 2.4. Análisis de coalescencia de cepas G12 del linaje II basado en el gen vp7.

Figura 2.5. Difusión espacio-temporal desde el año 1999 al 2012 de cepas G12 del linaje II basado en el gen vp7.

Figura 3.1.1. Filograma del gen vp7 de cepas G2P[4].

Figura 3.1.2. Filograma del gen de VP4 de cepas G2P[4].

Tabla 3.1.1. Análisis de regiones antigénicas de la proteína VP7 de cepas G2P[4] de RVA.

Gráfico 3.1.1. Fluctuación de genotipos G a lo largo de los años en Río de Janeiro, Brasil.

Figura 3.2.1. Filograma del gen de VP7 de cepas G1P[8].

Figura 3.2.2. Filograma del gen de VP4 de cepas G1P[8].

Figura 3.2.3. Filograma del gen de NSP4 de cepas G1P[8].

Tabla 3.2.1. Análisis de regiones antigénicas de la proteína VP7 de cepas G1P[8] de RVA.

Tabla 3.2.2. Análisis de regiones antigénicas de la proteína VP4 de cepas G1P[8] de RVA.

Tabla 3.2.3. Análisis de regiones antigénicas de la proteína NSP4 de cepas G1P[8] de RVA.

Figura 4.1. Mapa de cobertura y esquema del sistema de desagüe cloacal operado por la empresa AySA.

Gráfico 4.1.1. Comparación de métodos de concentración viral.

Tabla 4.1.1. Primers y sondas utilizados para detección de RVA y PP7 en qPCR.

Gráfico 4.1.2. Curva de calibración de nsp3 (RVA).

Gráfico 4.1.3. Curva de calibración de PP7.

Tabla 4.2.1. Distribución y frecuencia de genotipos G de RVA en aguas residuales en el GBA.

Gráfico 4.2.1. Frecuencia de tipos G de RVA en muestras clínicas y ambientales.

Figura 4.2.1. Filograma del gen vp7 de cepas G2 de muestras ambientales.

Figura 4.2.2. Filograma del gen vp7 de cepas G1 de muestras ambientales.

Gráfico 4.3.1. Cuantificación de RVA en aguas residuales e incidencia de infecciones causadas en pacientes hospitalizados.

RESUMEN

Aunque más de 20 microorganismos diferentes causan diarrea, los rotavirus del grupo A (RVA) son la causa individual más frecuente de diarrea severa en niños pequeños. Los estudios prospectivos de infecciones naturales permitieron determinar que la infección primaria protege contra la enfermedad severa en infecciones subsecuentes, en particular cuando ambas infecciones se dan por el mismo serotipo. Es por esto que se ha dado énfasis a los desarrollos de vacunas a virus atenuados pertenecientes a serotipos humanos comunes. Dos vacunas han sido licenciadas desde 2006 en diversos países pero persisten dudas acerca de su efectividad en el marco epidemiológico y sanitario de regiones subdesarrolladas. Los rotavirus del grupo A son altamente diversos en sus características antigénicas y genómicas, e infectan a gran cantidad de especies incluyendo mamíferos y aves y, si bien se conocen los mecanismos básicos de su evolución, no es posible aún explicar ni predecir la fluctuación de los serotipos prevalentes en las poblaciones humanas a lo largo del tiempo. La vigilancia epidemiológica de los genotipos y la caracterización de cepas comunes y emergentes en muestras de diarrea constituyen la información básica para la aplicación y evaluación criteriosa de estrategias de inmunización, pero también para intentar comprender la evolución de estos agentes virales. Por otro lado, el estudio de virus en aguas residuales es un método plausible como aproximación epidemiológica alternativa o complementaria al estudio de muestras clínicas que permite establecer adicionalmente la circulación de cepas no asociadas a enfermedad como las vacunales y de las asociadas a infecciones asintomáticas. De esta forma, la muestra cloacal completa el panorama evolutivo y epidemiológico de los rotavirus añadiendo la información sobre el total de las cepas humanas en circulación. La virología ambiental es un área emergente con gran cantidad de temas a resolver como la optimización de metodologías de concentración de aguas, cuantificación viral para determinar la efectividad de métodos de tratamiento y análisis de riesgo.

El plan de trabajo pensado para esta tesis involucró como primer objetivo la vigilancia epidemiológica y caracterización de cepas de RVA causantes de diarreas desde

el año 2008 hasta el 2014 en la zona de Buenos Aires y Gran Buenos Aires. Este trabajo nos ha permitido detectar cepas emergentes, como fueron las G12 acompañadas por P[8] durante los años 2008 al 2010 y desde el año 2012 hasta el 2014, con altas frecuencias en los años 2009 y 2013. Por otro lado se observó la reemergencia de cepas G2P[4], llegando a frecuencias cercanas al 80% en el año 2011. Por último se ha detectado la reaparición de cepas G1P[8] en el año 2014, alcanzando más del 70% de frecuencia. Los resultados generados han ayudado a establecer el patrón de fluctuación de genotipos en nuestra área en un período en el que muchos países sudamericanos han incorporado alguna de las vacunas contra RVA. Potencialmente, esta inmunización masiva podría afectar el comportamiento natural de dicha fluctuación y nuestro trabajo aporta cierta evidencia al debate sobre este efecto que aún resulta controversial. A partir del 2015 se ha incorporado la vacuna monovalente que contiene una cepa atenuada G1P[8] en el calendario nacional de nuestro país por lo que se abre un período crucial en el que se debe prestar especial atención en la evaluación y monitoreo de los resultados de dicho plan de inmunización.

Como parte de la caracterización de cepas, se han seleccionado muestras relevantes para profundizar los estudios mediante el secuenciamiento de genes de importancia como son los de VP7 y VP4. Hemos hallado resultados interesantes al estudiar la identidad nucleotídica así como realizando análisis filogenéticos. En primer lugar, hemos detectado un cambio de linaje en cepas G12, perteneciendo al linaje II las cepas encontradas hasta el año 2007 y al linaje III desde el año 2008 en adelante. Al realizar análisis similares con cepas G2, se ha encontrado que, si bien agrupan dentro de un mismo linaje, se observan dos grandes clados. Uno en el que agrupan cepas argentinas del 2007, que se asocian con cepas brasileras de pocos años antes, y otro donde se ubican cepas de nuestro país del 2010 y 2011 que se agrupan con cepas brasileras del 2009. Esto nos permitió suponer que pueden existir introducciones en diferentes momentos de cepas brasileras en nuestra región. Finalmente, al profundizar los estudios de las cepas G1 encontradas en el 2014, hallamos que las cepas G1 circulantes hasta el 2010 pertenecen al linaje II, mientras que las detectadas en el año 2014 agrupan en el linaje I. Lo que sugiere que pudo haber una

reintroducción. El estudio de secuencias de genes no estructurales nos permitió asimismo derivar algunas conclusiones y sugerencias interesantes. En este sentido, se realizó el estudio de las secuencias de NSP4, la enterotoxina viral, de cepas causando alta morbilidad y el estudio de secuencias de NSP1 de cepas G12P[9] que sugieren un evento de reasociación de segmentos y diseminación a países limítrofes.

Otra parte de esta tesis fue el estudio de la relevancia de muestras de aguas residuales como herramienta epidemiológica mediante la comparación con los resultados de vigilancia a partir de muestras clínicas. En este aspecto hemos llegado a la conclusión que ambas muestras presentan correlación respecto a las cepas prevalentes demostrando la utilidad de la muestra cloacal con fines de vigilancia de virus entéricos. Además, hemos encontrado que en este tipo de muestra ambiental se detectan más genotipos cuyo origen podría ser el de cepas excretadas al ambiente por pacientes asintomáticos, subclínicos o de casos leves domiciliarios e incluso cepas animales que podrían llegar a conductos cloacales. Sumado a esto, a partir de estas muestras se puede realizar la búsqueda de cepas vacunales para establecer la presencia y magnitud de su circulación e investigar su evolución por deriva genética (mutaciones puntuales) e interacción con cepas salvajes. De acuerdo a lo antedicho, la muestra de agua residual tiene varios usos potenciales en investigación de virus entéricos aunque los resultados hasta el momento volcados en esta tesis se circunscriben a la relevancia de esta muestra ambiental en la vigilancia epidemiológica de los RVA y a la puesta a punto de la metodología cuali y cuantitativa. En particular, se han puesto a punto métodos de concentración viral y ensayos de PCR en tiempo real con los que se ha logrado determinar la carga viral de RVA que servirán como punto de partida para continuar con estudios de aplicación en el monitoreo de fluctuaciones estacionales y análisis de riesgo en otros tipos de matrices acuosas para este y otros virus de interés.

OBJETIVOS

Los Rotavirus del grupo A (RVA) son el agente etiológico más importante de gastroenteritis en niños menores de dos años. Se estima que anualmente mueren ~450.000 niños menores a 5 años y es la principal causa de consulta médica e internación por diarrea aguda. Las tasas de infección por RVA no se relacionan con el nivel socioeconómico, afectando por igual a niños independientemente de su condición social. Sin embargo, el 90% de las muertes ocurren en regiones necesitadas, circunstancia que se estima debida a múltiples factores siendo tal vez los más importantes las condiciones precarias de higiene y el difícil acceso a centros de salud. Desde el año 2006 se licenciaron en Argentina dos vacunas contra RVA, una monovalente (RV1), compuesta por una cepa atenuada G1P[8], y otra pentavalente (RV5), mezcla de reasociantes bovino-humana. Muchos países de Latinoamérica han introducido alguna de estas vacunas a sus calendarios de inmunización, siendo Argentina uno de los últimos en sumarse al incorporar RV1 a su calendario a partir de 2015. Tanto en la era pre como en la postvacunal, es de suma importancia saber cuáles son las cepas circulantes de este virus. En nuestro laboratorio se lleva a cabo la vigilancia de genotipos de RVA desde el año 1996. Estos estudios, apoyados por la caracterización por secuenciamiento, permiten obtener información útil sobre las cepas prevalentes, detectar cepas emergentes o reemergentes, la fluctuación de las mismas y las posibles modificaciones por la introducción de vacunas.

La presente propuesta se enmarca en líneas de investigación desarrolladas en el LIV referentes al estudio de los RVA causantes de gastroenteritis en muestras clínicas de nuestra región y, más recientemente, en muestras ambientales. Desde hace varios años el LIV se ha involucrado también en el desarrollo de nuevas aproximaciones vacunales, línea que se nutre de la información sobre prevalencia local y de aislados autóctonos provistos por estudios propios. En este contexto los objetivos generales del LIV en los que se enmarca esta tesis son:

- Seguimiento en el tiempo de las fluctuaciones en los genotipos de RVA causantes de diarreas en Buenos Aires y el Gran Buenos Aires, tema abordado en el capítulo 1 de la presente tesis.
- Caracterización de cepas inusuales/emergentes con potencial capacidad de escape a la protección conferida por vacunas, su origen, mecanismos evolutivos y diseminación regional y global, tema abordado en el capítulo 2 de la presente tesis.
- Caracterización de cepas dominantes, su origen, mecanismos evolutivos y diseminación regional y global, tema abordado en el capítulo 3 de la presente tesis.
- Incrementar la capacidad de estudio de las cepas circulantes, tanto humanas como animales, estudiando muestras ambientales, en particular aguas superficiales y residuales. Establecer correlaciones cuali y cuantitativas entre las cepas detectadas en estudios de muestras clínicas y ambientales, validando la utilización de éstas como aproximación epidemiológica y en estudios evolutivos, temas abordados en el capítulo 4 de la presente tesis.

The image features a vertical yellow bar on the left side. The main area is a painting of a bonsai tree in a pot, set against a textured, golden-brown background. A horizontal green banner is superimposed over the middle of the painting, containing the text "INTRODUCCIÓN GENERAL" in a bold, black, sans-serif font. The bonsai tree has a thick, gnarled trunk that curves elegantly to the right, with dense green foliage. The pot is a simple, rectangular, light-colored container.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. ROTAVIRUS HUMANOS DEL GRUPO A

1.1. *Impacto de la enfermedad causada por rotavirus*

Los rotavirus del grupo A (RVA) son el agente etiológico individual más significativo causante de diarrea severa en niños. Más de 125 millones de infantes y niños jóvenes desarrollan diarrea por rotavirus cada año, a nivel global, resultando en 440.000 muertes (1), siendo la mayoría en países en vías de desarrollo. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad causada por RVA es similar en niños de países en vías de desarrollo así como de países desarrollados (Figura 1). Se ha encontrado que la tasa de detección de infección por rotavirus en niños hospitalizados con diarrea ha sido del 39% en estudios realizados en países en vías de desarrollo y del 44% en países desarrollados (1). Esto indica que la tasa de infección no muestra diferencias entre niños pertenecientes a distintos niveles socioeconómicos, y que el suministro de agua limpia y la correcta higiene tienen poco impacto en la transmisión de los rotavirus. Aun así, los niños de países en desarrollo muestran una mayor mortalidad debido a los pobres sistemas de cuidados médicos y a la malnutrición. Por ejemplo, se ha visto que en países en vías de desarrollo como Bangladesh, los rotavirus causan entre 6.000 y 14.000 muertes al año en niños menores de 5 años, mientras que en un país desarrollado como Estados Unidos, con aproximadamente el doble de habitantes, el número de muertes es menor a 40 (2, 3).

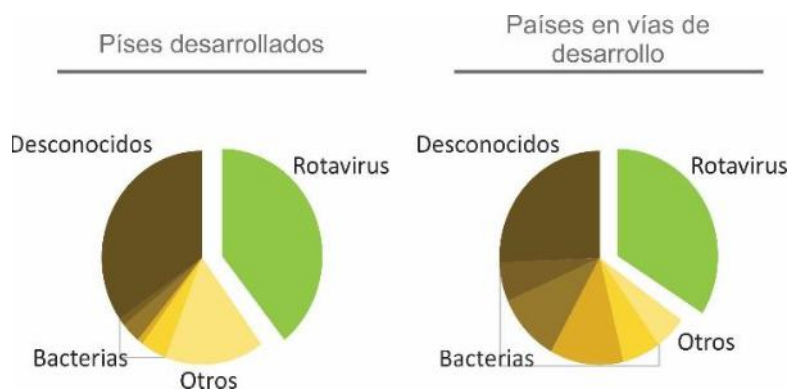


Figura 1. Incidencia de RVA en países en vías de desarrollo y desarrollados. Proporción de agentes etiológicos causantes de diarrea en pacientes hospitalizados en países en vías de desarrollo y desarrollados. Adaptado de Kapikian AZ et al., 2001 (4).

Aunque la mortalidad infantil en países desarrollados es baja, las consecuencias de la enfermedad pueden ser muy costosas y causar significativas pérdidas económicas. Éstas pueden ser directas (costos médicos, visitas de pacientes ambulatorios, diagnóstico y medicamentos) o indirectas (pérdida de horas de trabajo de los adultos a cargo de los niños enfermos). Como ejemplo se puede mencionar que los costos asociados a la enfermedad causada por rotavirus en Estados Unidos alcanzan los U\$S 100-400 millones para el sistema de salud y U\$S 1.000 millones a nivel social (5).

En Latinoamérica se ha estimado que los RVA han sido causantes de aproximadamente 6.300 muertes y cerca de 230.000 hospitalizaciones por año en 14 países en ausencia de vacunación (6). En particular, en Argentina se ha calculado que la enfermedad por estos virus genera alrededor de 150.000 consultas ambulatorias por diarrea, 15.000 internaciones y 30 muertes anuales en niños menores de 5 años (7).

1.2. Descubrimiento de los rotavirus

Los primeros rotavirus en ser descritos, en base a la patología y las características epidemiológicas de la enfermedad, fueron las cepas murinas clasificadas bajo la denominación general de agentes responsables de la “diarrea epizootica de los ratones lactantes” (*epizootic diarrhea of infant mice*: EDIM). Los rotavirus murinos también fueron los primeros en ser visualizados por microscopía electrónica. Al mismo tiempo, se observaron virus con morfología comparable en hisopados rectales de monos. Estos agentes fueron descritos como partículas de 70 nm con apariencia similar a una rueda, por lo que fueron designados como rotavirus en base a la palabra en latín “rota” que significa rueda (Figura 2). En 1969 se demostró la presencia de estas partículas en heces de terneros con diarrea, asociando así a estos virus con la enfermedad en el ganado (8).

La correlación entre la presencia de partículas compatibles con rotavirus y la diarrea severa en niños fue reportada por primera vez en 1973 por Bishop *et. al.* (10, 11) a partir de la microscopía electrónica sobre cortes histológicos de duodeno de niños con

gastroenteritis aguda. Poco después se demostró que las cepas humanas y animales, además de compartir características morfológicas, compartían un antígeno de grupo, y estos virus fueron clasificados como miembros del género *Rotavirus* dentro de la familia *Reoviridae*.

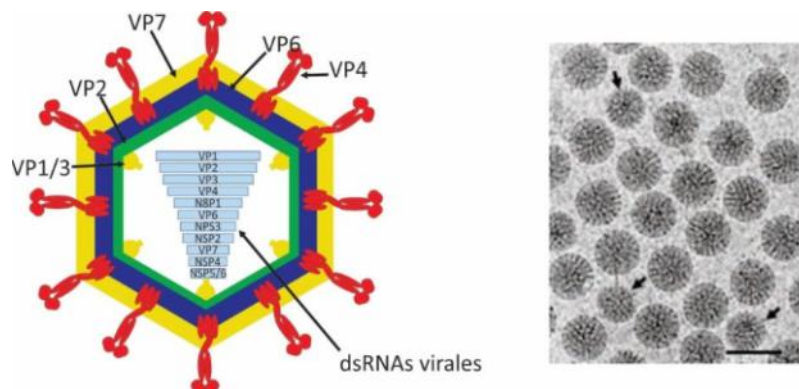


Figura 2. Diagrama esquemático y micrografía de partículas de rotavirus. A. La partícula está compuesta por tres capas proteicas concéntricas (VP7, VP6 y VP2) y espículas formadas por la proteína VP4. Los complejos de transcripción compuestos por las proteínas VP1 y VP3 se encuentran dentro de la capa de VP2. El genoma, de RNA de doble cadena (dsRNA), es segmentado. **B.** Partículas de triple capa (TLP) y unas pocas de doble capa (DLP), indicadas con flechas, visualizadas por microscopía electrónica. La barra indica 100 nm. Adaptado de Estes M y Greenberg H, 2013 (9).

En 1980, se descubrieron en cerdos partículas morfológicamente indistinguibles de las cepas establecidas de rotavirus, sin embargo estas últimas poseían un antígeno de grupo diferente al de los virus previamente caracterizados. Este tipo de hallazgos condujo a la identificación de los rotavirus pertenecientes a seis grupos adicionales (B a G) reservándose el grupo A para las cepas de rotavirus conocidas hasta el momento. Sólo los grupos A, B y C han sido asociados con enfermedad en humanos aunque la mayoría de los casos son causados por las cepas del grupo A (8, 12). Recientemente se ha descrito un octavo grupo (H) en el que se incluyó a un virus asociado a brotes de diarrea en humanos en regiones restringidas de Asia (161), y también detectado en cerdos (162).

1.3. Estructura del virión

Las partículas de rotavirus constan de tres capas proteicas concéntricas: una capa interna formada por VP1, VP2 y VP3 que contiene al genoma, denominada *core*, una capa intermedia formada por VP6 y una capa externa formada por VP7 y VP4 (Figura 3). La estructura tridimensional de las partículas ha sido estudiada por numerosos grupos (13, 14). Se determinó que las tres capas proteicas se encuentran ordenadas a lo largo de los ejes de simetría doble, triple y quíntuple, y están perforadas por 132 canales acuosos en tres arreglos simétricos distintos denominados clases. Los canales de clase I funcionan como salida de los transcriptos de mRNA desde las partículas subvirales (Figura 3) (15).

La proteína VP1 actúa como RNA polimerasa RNA dependiente y se encuentra asociada al mRNA viral. También actúa como replicasa durante la síntesis de dsRNA a partir del molde de ssRNA (RNA simple cadena). VP2 es el principal componente del *core* y forma parte de los viroplasmos, que son cuerpos de inclusión en el citoplasma de las células infectadas. Esta proteína también es necesaria para la síntesis de dsRNA. VP3 es la guanilil-transferasa y metil-transferasa, y es un componente esencial de los complejos de transcripción por lo que sería una enzima multifuncional con la capacidad de modificar el extremo 5' del mRNA para la formación de la estructura *cap* (8, 16).

La proteína VP6 es la más abundante del virión y es el antígeno determinante del grupo y del subgrupo. Es una proteína hidrofóbica que forma trímeros espontáneamente, es altamente inmunogénica y contiene epítopes muy conservados. Por estas razones constituye el blanco más importante para la detección inmunológica de los rotavirus. Además, se une a la proteína no estructural NSP4, mediando la brotación de las partículas inmaduras e incompletas hacia el retículo endoplasmático, donde ocurre la maduración del virus (8, 16).

La proteína VP7 es la glicoproteína de la cápside externa y la segunda en abundancia en el virión. Está involucrada en las interacciones iniciales con las células hospedadoras, coordinando la unión y el ingreso del virus en conjunto con VP4. También es capaz de

inducir la producción de anticuerpos neutralizantes y sus principales determinantes antigénicos se designan A (aa 87-96), B (aa 145-150) y C (aa 211-233) (8, 17).

VP4 es una de las proteínas de la cápside externa, es multifuncional, no glicosilada y presenta propiedades importantes como la unión al receptor celular y la hemaglutinación, y se asocia a las características de virulencia y tropismo. Es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. VP4 es clivada por la tripsina en dos proteínas: VP5* y VP8*, lo cual conduce a un aumento de la infectividad al facilitar la penetración y el desnudamiento del virus (8, 16).

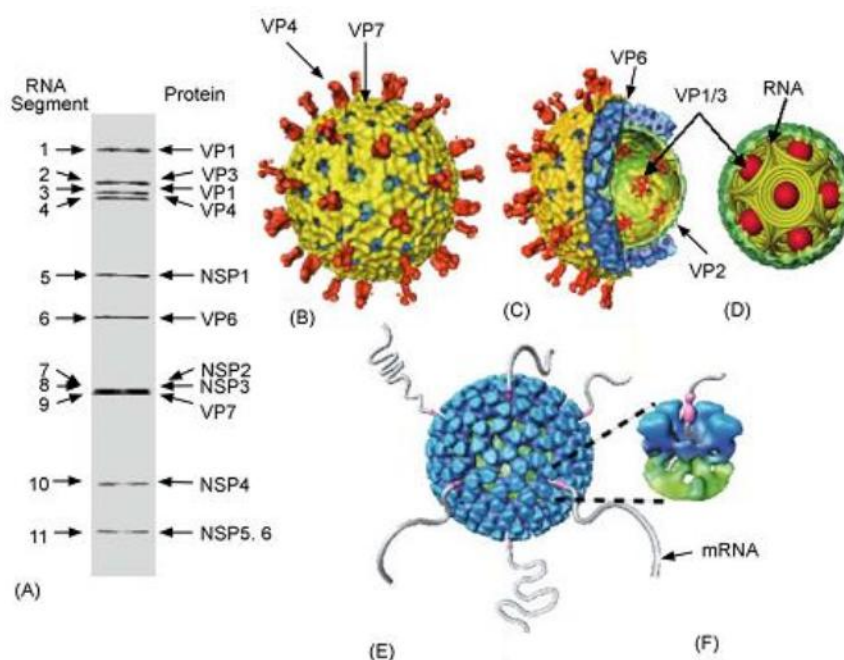


Figura 3. Organización estructural de los rotavirus. **A.** Gel de poliacrilamida mostrando los 11 segmentos genómicos de dsRNA y las proteínas que codifican. **B.** Representación del virión. Se indican las proteínas VP4 (en rojo) y VP7 (en amarillo). **C.** Vista de un corte del virión mostrando la capa intermedia (VP6, en azul) y la capa interna (VP2, en verde y los complejos de VP1 y VP3, en rojo). **D.** Representación esquemática de la organización del genoma en la partícula de rotavirus. Los segmentos genómicos se representan como espirales cónicas invertidos rodeando las enzimas transcripcionales (esferas rojas) dentro de la capa de VP2 (verde). **E y F.** Modelo de las partículas de doble capa (DLP) durante el proceso de transcripción realizado a partir de una reconstrucción de crioelectromicrografías. La transcripción endógena resulta en la liberación simultánea de mRNA (en gris) desde los canales ubicados en los vértices de las DLP icosaédricas. Adaptado de Jayaram et al, 2004 (18).

1.4. Genoma

Los rotavirus poseen un genoma de dsRNA constituido por 11 segmentos, cuyos tamaños varían entre 667 pb (segmento 11) y 3.302 pb (segmento 1) (Figura 3), siendo el genoma de un total aproximado de 18.500 pb (17). Se sabe que los segmentos necesitan de íntimo contacto con proteínas para ser empaquetados. A pesar que sigue siendo una incógnita cuáles son estas proteínas, los candidatos son VP1, VP2 y VP3, pero no se descarta un importante rol de las proteínas no estructurales (19). Dentro de la partícula viral el genoma se encuentra altamente ordenado, formando una estructura de dodecaedro e interactuando con VP2 (17).

Cada segmento genómico comienza con un *cap* en la región 5' no codificante que continúa con un marco de lectura abierto (ORF, del inglés *open reading frame*) que codifica para una proteína, seguido por un codón de *stop*. Para finalizar, se encuentra una secuencia no codificante en el extremo 3'. Casi todos los segmentos finalizan con una secuencia consenso, la cual contiene importantes señales para la expresión génica y la replicación del genoma. Los últimos cuatro nucleótidos de los mRNA funcionan como *enhancers* de la traducción (20). La longitud de los extremos 3' y 5' no codificantes varían para diferentes genes, pero aquellos de cepas homólogas son muy conservados. Otra particularidad de estas regiones es que no se han encontrado secuencias de poliadenilación en los extremos 3' de los genes. Y aunque algunos de los genes poseen ORF adicionales en fase, como los genes 7, 9 y 10, las evidencias indican que todos los genes son monocistrónicos a excepción del gen 11, el cual posee un ORF adicional que se encuentra fuera de fase (9).

Los rotavirus codifican seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6). Se ha establecido una correlación entre genes y proteínas para varias cepas de rotavirus aunque la correlación entre las proteínas y su función sólo se conoce parcialmente (Tabla 1).

1.5. Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales de los rotavirus se encuentran en las células infectadas pero están ausentes en las partículas maduras. La proteína NSP1 exhibe gran variabilidad de secuencia entre cepas de rotavirus y no es esencial para la replicación en cultivo celular. Sin embargo, estudios recientes indican que NSP1 está involucrada en la restricción del rango de hospedador. Además, contrarresta la respuesta innata antiviral y suprime la inducción de la apoptosis durante los estadios tempranos de la infección (21-24).

NSP2 está involucrada en la replicación y encapsidación del genoma. Además, esta proteína interacciona con NSP5 y juntas participan en la formación de los viroplasmos. Una vez formados éstos, interacciona con VP2 y VP1. Por otro lado, NSP2 es una enzima multifuncional: se une a ssRNA y tiene actividad desestabilizadora de hélice, es una nucleósido trifosfatasa (NTPasa), RNA trifosfatasa (RTPasa) y nucleósido difosfato kinasa (25-31).

Los mRNA de los rotavirus poseen *cap* 5', pero no están poliadenilados en sus extremos 3'. En lugar de esto cuentan con una secuencia específica donde se une la proteína NSP3, la cual actúa como análoga a la proteína de unión a poli A. A su vez, la región C terminal de NSP3 interactúa con el factor de iniciación de la traducción 4GI. Como consecuencia de esto, se arresta la traducción de los mensajeros celulares mientras que los transcritos virales son traducidos (23, 33).

NSP4 es la única proteína no estructural que no une RNA. Es la primer enterotoxina viral descrita y funciona como receptor intracelular en la membrana del retículo endoplasmático. Puede afectar la movilización de calcio en las células, lo que sería importante para el ingreso del virus por mecanismos endocíticos dependientes de calcio. Durante la morfogénesis viral, está involucrada en la remoción de la envoltura transitoria (8, 16, 14).

NSP5 es una fosfoproteína de unión a RNA y a otras proteínas virales como NSP2, VP1, VP2 y NSP6. Si bien aún no se ha dilucidado, se cree que esta proteína es autofosforilada. Varios estudios han revelado que NSP5 está involucrada en varios procesos como la dinámica y regulación de los viroplasmos y, junto a NSP2 y otras de las proteínas virales, intervienen en la regulación de los procesos de replicación del genoma y encapsidación (35-40).

A diferencia del resto de las proteínas no estructurales, NSP6 no es codificada por todas las cepas de rotavirus. Para aquellas que sí la expresan, ésta es traducida a partir de un ORF que se encuentra fuera de fase respecto al marco de lectura del ORF de NSP5, el cual está codificado en el mismo segmento 11. NSP6 es una proteína pequeña de unión a RNA y, aunque su función aún no está del todo caracterizada, algunos estudios sugieren que tiene un rol en la replicación viral (41, 42).

1.6. Clasificación

Los rotavirus pueden ser clasificados de distintas maneras (Tabla 2) en base a su diversidad genética y antigénica. Sin embargo, el sistema de clasificación dual en genotipos, basado en las dos proteínas de la cápside externa, VP7 (genotipo G) y VP4 (genotipo P) (8) ha sido el más usado con fines epidemiológicos. Esto obedece a su fuerte correlación con la clasificación en serotipos de los rotavirus del grupo A y la relativa facilidad para su determinación.

Tabla 1. Proteínas de rotavirus.

Segmento genómico	Producto proteico	Peso molecular (kDa)	Localización en el virión	Número de moléculas por virión	Propiedades
1	VP1	125,0	Core	12	RNA polimerasa RNA dependiente, unión a ssRNA, integra el complejo de transcripción con VP3
2	VP2	102,7	Core	120	Unión a RNA, requerida para la actividad replicasa de VP1
3	VP3	88,0	Core	12	Guaniltransferasa, metiltransferasa, integra el complejo de transcripción con VP1
4	VP4 (clivada en VP5* y VP8*)	86,7 (52,9 y 24,7)	Cápside externa	120	Trímeros de VP4 forman espículas, hemaglutinina, unión a receptor celular, antígeno de neutralización específica de tipo P, determinante de la virulencia
5	NSP1	58,6	No estructural	-	Unión a RNA, rol en la supresión de la respuesta de IFN, se asocia al citoesqueleto
6	VP6	44,8	Cápside intermedia	780	Principal proteína del virión, forma trímeros, antígeno de grupo y subgrupo, requerida para la transcripción
7	NSP3	34,6	No estructural	-	Unión a extremo 3' de mRNA virales, forma dímeros, control de la traducción
8	NSP2	36,7	No estructural	-	Unión a RNA, a NSP5 y VP1, NTPasa y helicasa, formación de virosomas
9	VP7	37,4	Cápside externa	780	Glicoproteína, antígeno de neutralización específica de tipo G, unión a calcio en retículo endoplasmático
10	NSP4	20,3	No estructural	-	Glicoproteína no estructural, proteína transmembrana, enterotoxina
11	NSP5	21,7	No estructural	-	Unión a NSP2 y NSP6, forma multímeros, unión a ssRNA, localización en viroplasma
	NSP6	12,0	No estructural	-	Unión a NSP5, localización en viroplasma

Adaptado de Estes y Kapikian, 2007 (8).

1.6.1. Serogrupo, grupo y subgrupo

Los grupos y subgrupos de rotavirus están determinados por epítopes en la proteína VP6, la cual representa más del 51 % del virión. Los grupos pueden caracterizarse por

distintos ensayos serológicos, como inmunofluorescencia, ELISA y microscopía inmunoelectrónica (8). Como alternativa o reemplazo para la clasificación de grupo, desde el año 2012 se ha propuesto que el criterio se base en las secuencias nucleotídicas del gen de VP6. Hasta el momento se han identificado ocho grupos denominados A a H, de los cuales los rotavirus del grupo A son los principales patógenos humanos y animales. Los grupos B y C también infectan humanos pero en menor medida, y por último el grupo H, antes denominado “nuevo rotavirus de diarrea en adultos”, también (43). El resto de los grupos (D a G) solo infectan animales y no han sido detectados en humanos. Estos ocho grupos ya han sido formalizados por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), sin embargo una publicación reciente propone un nuevo candidato de rotavirus detectado en perros en Hungría y sería un potencial grupo I (44).

Entre los rotavirus del grupo A, se han identificado cuatro subgrupos (I, II, I y II, y no I/II) en base a la reactividad con anticuerpos monoclonales contra VP6. El subgrupo I incluye a la mayoría de las cepas de rotavirus animales y el subgrupo II contiene a la mayoría de las cepas humanas. El tercer subgrupo comparte los sitios antigénicos de los subgrupos I y II, mientras que el cuarto subgrupo no comparte ninguno y consiste principalmente en cepas de rotavirus de aves (8).

1.6.2. Electroferotipos

Los rotavirus del grupo A también pueden ser clasificados como de electroferotipo largo o corto en base a la movilidad electroforética del segmento 11 en geles de poliacrilamida (Figura 3a). Mientras que los rotavirus humanos con un patrón corto, exhiben generalmente la especificidad del subgrupo I, aquellos con patrón largo poseen la especificidad del subgrupo II. En contraste, los patrones largos con especificidad del subgrupo I se asocian comúnmente con rotavirus animales (45, 46).

Tabla 2. Estrategias de clasificación para los rotavirus.

Clasificación	Determinantes	Tipos establecidos
Serogrupo	Proteína VP6	Grupos A a H
Subgrupo	Proteína VP6	Subgrupo I, II, I y II, no-I/II
Electroferotipo	Patrón de migración electroforética del segmento genómico 11	Corto, Largo, Súper-corto
Serotipo G	Proteína VP7 (Glicoproteína)	G
Serotipo P	Proteína VP4 (Sensible a Proteasas)	P
Genotipo G	Secuencia del gen de VP7	G
Genotipo P	Secuencia del gen de VP4	P[]
Genogrupo	Hibridación RNA-RNA de los 11 segmentos genómicos	<i>Wa-like</i> , <i>DS-1-like</i> , <i>AU-1-like</i>
Clasificación basada en el genoma completo	Secuencias nucleotídicas de los 11 segmentos genómicos	G, P, I, R, C, M, A, N, T, E, H

1.6.3. Genogrupos

La clasificación en genogrupos se basa en la homología de todos los segmentos de RNA, empleando ensayos de hibridación. Se han definido tres genogrupos entre los rotavirus humanos: *Wa-like*, *DS-1-like* y *AU-1-like*. En este sistema, se considera que una cepa pertenece a cierto genogrupo si contiene al menos siete segmentos genómicos similares a ese genogrupo en particular (47).

1.6.4. Serotipos

Los serotipos se definen empleando ensayos de neutralización (por reducción de placas o focos fluorescentes) empleando antisueros dirigidos contra partículas virales

purificadas. Estos ensayos miden la actividad neutralizante de los anticuerpos dirigidos contra las dos proteínas de la cápside externa y permiten definir los serotipos G (basados en la glicoproteína VP7) y los serotipos P (basados en la proteína sensible a proteasas VP4) (8)

1.6.5. Genotipos

La genotipificación es el sistema más usado para la clasificación de los rotavirus. Los genotipos G y P se basan en la diversidad de las secuencias nucleotídicas que codifican dos proteínas de la cápside externa: VP7 y VP4, respectivamente. Se ha establecido como valor de corte, un porcentaje de identidad nucleotídica del 89 % para definir los distintos genotipos G y P. A la fecha, se han reportado 29 genotipos G y 41 genotipos P en especies de mamíferos y aves (48-51). Todos los genotipos G se correlacionan con los serotipos G; sin embargo, no ha sido posible establecer la correlación genotipo-serotipo P en todos los casos. Por esto, se emplea una nomenclatura dual de tipificación P: se escribe el número de serotipo P (y letra en el caso de subtipos) seguido del número de genotipo P entre corchetes (8). En muchos casos, en la literatura se consignan ambas designaciones, por ejemplo P1A[8] corresponde al serotipo 1A, genotipo 8. Sin embargo, actualmente la tendencia es a determinar y consignar solo el genotipo dadas las dificultades técnicas para serotipificar y establecer nuevas especificidades serológicas.

1.6.6. Clasificación basada en el genoma completo

Recientemente se desarrolló un sistema de genotipificación basado en las secuencias completas de los 11 segmentos genómicos propuesto por Matthijnssens et al. (48). En este sistema, cada uno de los segmentos genómicos de rotavirus es genotipificado empleando un valor de corte del porcentaje de identidad de la secuencia nucleotídica. De acuerdo a este sistema, se han definido 29 genotipos G (Glicoproteína, VP7), 41 P (sensible a Proteasas, VP4), 21 I (capa Intermedia, VP6), 14 R (RNA polimerasa, VP1), 14 C (Core, VP2), 13 M (Metiltransferasa, VP3), 24 A (Antagonista de IFN, NSP1), 14 N (NTPasa, NSP2), 16 T (potenciador de la Traducción, NSP3), 21 E (Enterotoxina, NSP4), y 16 H (Fosfoproteína, NSP5/6) (50). En base a esta clasificación, se demostró que las dos

constelaciones de genotipos que circulan en humanos en todo el mundo y en combinación con diversos genotipos G y P, son: I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (*Wa-like*, similar a la cepa Wa) y I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, (*DS-1-like*, similar a la cepa DS-1) (Tabla 3). Se cree que las cepas humanas *Wa-like* tienen un ancestro común con cepas de rotavirus porcinas, mientras que las cepas *DS-1-like* tendrían un ancestro común con cepas de rotavirus bovinas. Una tercera constelación de genotipos humana que circulan de forma mucho menos extensa es la *AU-1-like*: I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3, la cual se habría originado a partir de cepas de rotavirus de gatos o perros (52).

Tabla 3. Constelaciones de genotipos de cepas humanas seleccionadas.

Cepas de rotavirus	Constelación de genotipos	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P1A[8]	<i>Wa-like</i>	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G3P1A[8]		G3	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/DC5115-Bethesda/1977/G4P[8]		G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BEL/B3458/2003/G9P[8]		G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BEL/B4633/2003/G12P[8]		G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/BRA/IAL28/1992/G5P[8]		G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/CIV/6736/2004/G8P[8]		G8	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/NGA/6717ARN/2002/G10P[8]		G10	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BGD/Matlab36/2002/G11P[8]		G11	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P1B[4]	<i>DS-1-like</i>	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/DEU/GER1H/2009/G8P[4]		G8	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BEL/B1711/2002/G6P[6]		G6	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/COD/DRC88/2003/G8P[8]		G8	P[8]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/COD/DRC86/2003/G8P[6]		G8	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-tc/IND/69M/1980/G8P4[10]		G8	P[10]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/ZAF/GR10924/1999/G12P[6]		G9	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P3[9]	<i>AU-1-like</i>	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
RVA/Human-tc/THA/T152/1998/G12P[9]		G12	P[9]	I3	R3	C3	M3	A12	N3	T3	E3	H6
EVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-9/1992/G1P7[5]	<i>Vacunas</i>	G1	P[5]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3
EVA/Vaccine/USA/RotaTeq-DC2-9/1992/G2P7[5]		G2	P[5]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3
EVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI78-8/1992/G3P7[5]		G3	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
EVA/Vaccine/USA/RotaTeq-BrB-9/1996/G4P7[5]		G4	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
EVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-4/1992/G6P1A[8]		G6	P[8]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
EVA/Vaccine/USA/Rotarrix-RIX4414/1882/G1P1A[8]		G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

Tabla 3. Los genotipos pertenecientes a la constelación *Wa-like*, *DS-1-like* y *AU-1-like* se muestran en verde, rojo y naranja, respectivamente. El genotipo P[6] se muestra en celeste y los genotipos típicamente bovinos se muestran en violeta y lila. Adaptado de Matthijnsens, 2012 (52).

1.7. Replicación

La replicación viral ocurre en las células epiteliales maduras del intestino delgado (enterocitos). Se ha estudiado detalladamente la replicación *in vitro*, cuyo ciclo se encuentra diagramado en la Figura 4. Las partículas de triple capa (TLP, es decir, los viriones infectivos) se unen a la célula hospedadora e ingresan por endocitosis mediada por receptor o por penetración directa. Si bien no se han caracterizado completamente los receptores celulares para rotavirus, se ha establecido que el ingreso viral se da por una secuencia de interacciones con receptores primarios y secundarios (que actúan como co-receptores) (8).

La replicación tiene lugar en el citoplasma. Luego de la remoción de la cápside externa de las TLP mediada por enzimas celulares y por bajos niveles de calcio, emergen las partículas de doble capa (DLP). Las mismas, se vuelven transcripcionalmente activas y un gran número de moléculas de RNA de polaridad positiva (con *cap* pero no poliadeniladas) se transcriben a partir de los 11 segmentos de RNA. Éstos salen de las DLP a través de los 12 canales acuosos de clase I localizados en los extremos de los ejes de simetría quintuple. Las nuevas moléculas de RNA actúan como mRNA (y sus productos de traducción se acumulan en el citoplasma) o son replicadas en los viroplasma. Las dos proteínas no estructurales, NSP2 y NSP5, son las principales componentes de los viroplasma, esenciales para la replicación del RNA y la morfogénesis temprana. Los viroplasma también contienen VP1, VP2, VP3, VP6, NSP4 e inicialmente, los mRNA transcriptos a partir de todos los segmentos genómicos. NSP5 interactúa tanto con VP2 como con VP1 (53).

Se desconoce el orden exacto de los eventos durante la morfogénesis temprana, las interacciones moleculares y los mecanismos de control de la brotación hacia el interior del retículo endoplasmático rugoso, por medio de la interacción entre NSP4 (como receptor intracelular) y VP6. Una envoltura derivada del retículo rodea transitoriamente a las DLP, permitiendo la incorporación de VP7 y VP4. Los viriones infecciosos compuestos por las tres capas proteicas se liberan por lisis de células no polarizadas (como células MA104) o

por salida de células polarizadas (como células Caco-2) antes de observarse efecto citopático. En muestras de materia fecal, pueden observarse tanto TLP como DLP e incluso partículas que no contienen RNA genómico (53).

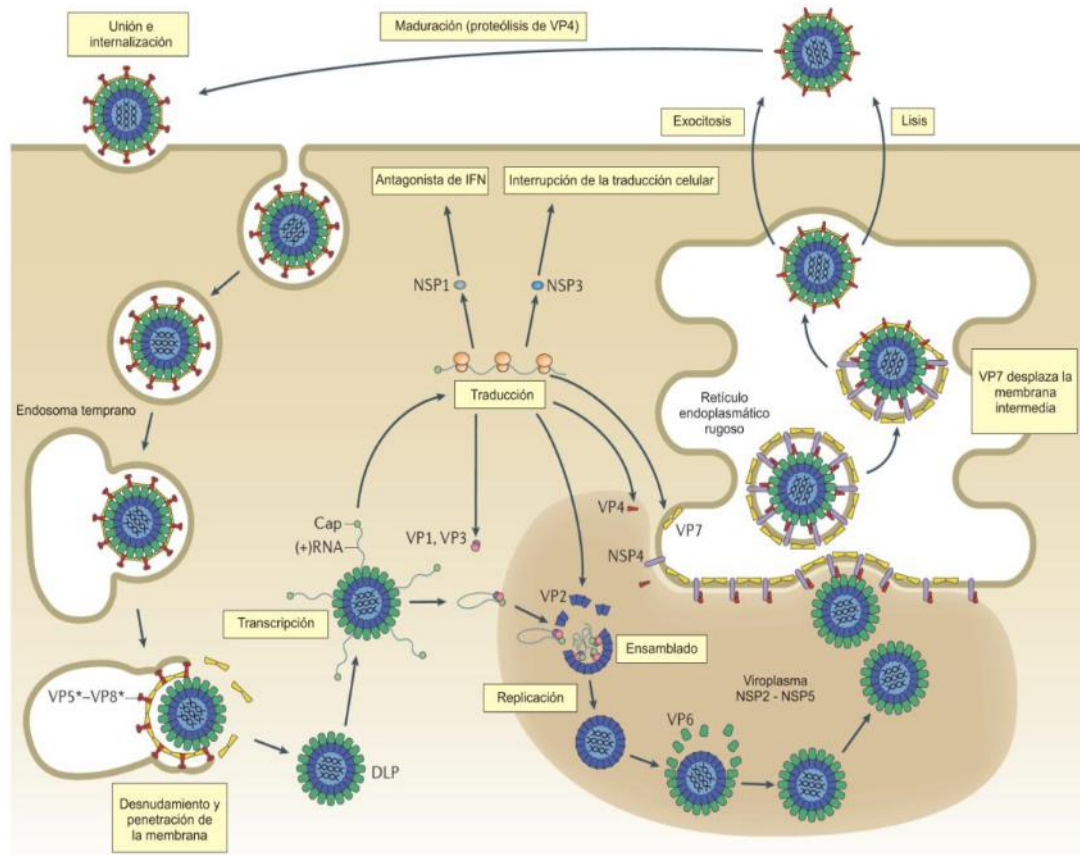


Figura 4. Ciclo de replicación de los rotavirus. El virión (TLP) se une inicialmente a la superficie celular y es internalizado por endocitosis. La pérdida de la cápside externa y la liberación de las DLP al citosol, activa el complejo de polimerasa que transcribe los 11 segmentos genómicos. Éstos funcionan como mRNA para la síntesis de proteínas virales o como molde para la síntesis de dsRNA genómico. En los viroplasmos se localizan los componentes necesarios para la replicación y el ensamblado de las partículas subvirales. Se ha propuesto que el ensamblado de la cápside externa ocurre por reclutamiento de las DLP por NSP4 y la proteína VP4 ubicada en el lado citosólico de la membrana retículo endoplasmático (ER). A través de un mecanismo no definido, el complejo DLP-VP4-NSP4 brota hacia el interior del ER. La remoción de la membrana del ER y de NSP4 permitiría el ensamblado de la proteína VP7 y la formación de las TLP. La liberación de los viriones a partir de las células infectadas, los expone a proteasas del tracto gastrointestinal. Esto resulta en el clivaje específico de VP4 en VP5* y VP8* para producir los viriones infecciosos. IFN: interferón. Adaptado de Trask et al, 2012 (53).

2. PATOGÉNESIS

La infección con rotavirus, produce necrosis celular extensa del epitelio del intestino delgado. Esto conduce a la atrofia de las vellosidades, la pérdida de enzimas digestivas, la reducción en la absorción y un aumento en la presión osmótica del lumen intestinal que desencadena la diarrea. Estos eventos, seguidos por la hiperplasia de las criptas y la secreción de fluidos, contribuyen a la severidad de la diarrea (8).

2.1. *Mecanismos de la diarrea por rotavirus*

El descubrimiento de la propiedad enterotóxica de la proteína NSP4 explica la observación de que los animales infectados por rotavirus presentan una importante diarrea con anterioridad a la detección del daño histológico. NSP4 produce un aumento en la concentración de calcio intracelular y desequilibra la homeostasis de electrolitos. Además es secretada por las células infectadas e inicia cascadas de señalización en células no infectadas (figura 5) (8, 54).

2.2. *Inmunidad*

Las infecciones neonatales o primarias por rotavirus inducen principalmente una respuesta inmune humoral que provee inmunidad homotípica y protección parcial contra infecciones subsecuentes por rotavirus de otros serotipos. La protección aumenta progresivamente con las sucesivas reinfecciones.

Aunque no han sido determinados los correlatos exactos de la inmunidad protectora, el mejor correlato parece ser el nivel de coproanticuerpos del isotipo A (IgA) específicos para rotavirus (56-58). Los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la cápside interna e intermedia, VP2 y VP6, alcanzan títulos altos (59-61) y si bien no son

neutralizantes *in vitro*, son protectores *in vivo* en el modelo de ratón. Se cree que actúan por interacción con las DLP intracelularmente durante la transcitosi de las IgA secretorias previniendo la transcripción y la maduración (neutralización intracelular) (62).

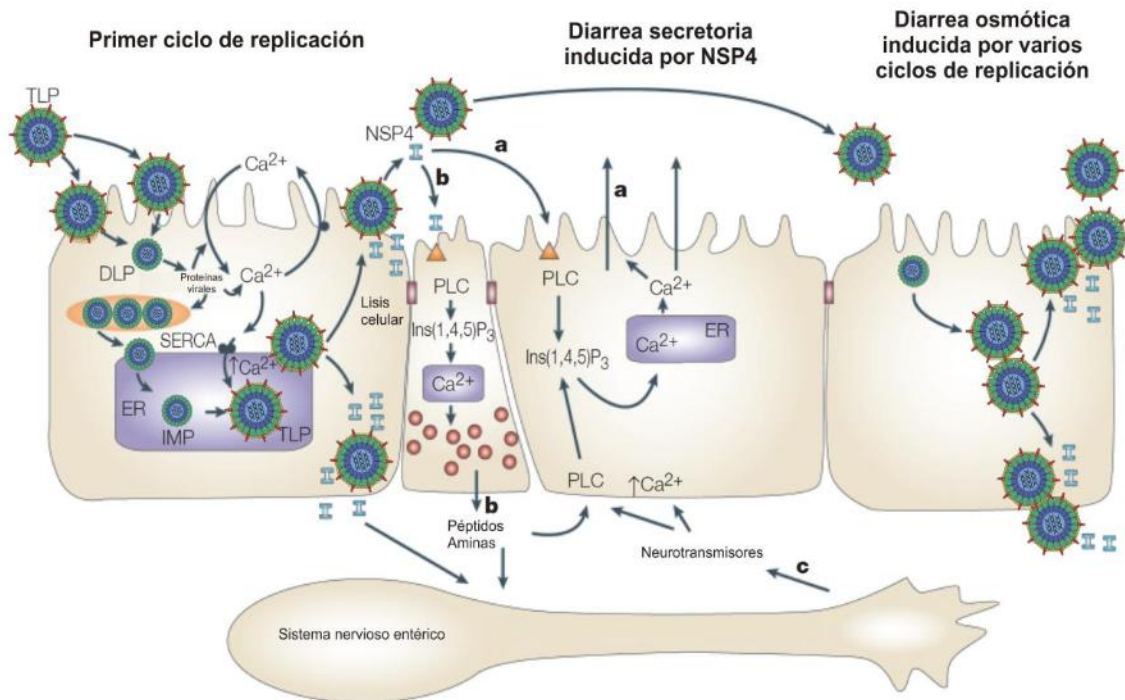


Figura 5. Fisiopatología de la diarrea causada por rotavirus. Durante el primer ciclo de replicación de rotavirus en las células de la mucosa intestinal, la síntesis de las proteínas virales en el citoplasma conduce a: aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática al calcio (Ca), activación de mecanismos regulatorios e incremento en la concentración de Ca en el retículo endoplasmático (ER). Esto promueve la activación de enzimas dependiente de Ca, lo que a su vez induce la lisis celular y liberación de proteínas virales y progenie viral. La proteína NSP4 actúa como enterotoxina sobre células no infectadas e induce diarrea secretoria a través de: a) secreción dependiente de Ca por células intestinales, b) secreción dependiente de Ca de péptidos y aminas que estimulan al sistema nervioso entérico, y c) activación de la secreción de iones cloruro inducida por el sistema nervioso entérico. En paralelo, el virus liberado infecta otras células. Esto conduce a muerte celular masiva y, como consecuencia, a la reducción de la superficie absorbente del epitelio intestinal y al componente osmótico de la diarrea. DLP: partículas de doble capa, TLP: partículas de triple capa, Ins(1,4,5)P₃: inositol 1,4,5-trifosfato, PLC: fosfolipasa C, SERCA: ATPasa dependiente de Ca del ER. Adaptado de Bomsel et al, 2003 (55).

Además existe una respuesta citotóxica específica para rotavirus por parte de células T, pero aún no está claro su rol exacto en la resolución de la infección primaria o en la protección frente a infecciones subsecuentes (63). Distintas líneas de evidencia demuestran que la infección natural o la vacunación, protegen contra la enfermedad severa en infecciones subsecuentes aun cuando el serotipo del virus difiera del correspondiente a infecciones o vacuna previas (64).

2.3. Enfermedad, diagnóstico y tratamiento

Luego de un período corto de incubación de 1 a 2 días, el comienzo de la enfermedad es repentino. Los síntomas incluyen: diarrea de 4 a 7 días de duración, vómitos, fiebre, y deshidratación rápida. El grado de severidad de la enfermedad es variable y se han descrito manifestaciones frecuentes como el desarrollo de infecciones inaparentes por las llamadas “cepas de *nursery*” o muy raras como las infecciones del sistema nervioso central, las infecciones crónicas y la hepatitis en niños con inmunodeficiencias. También son frecuentes los síntomas respiratorios, aunque no hay evidencia de que los rotavirus repliquen activamente en el tejido pulmonar (8, 65).

El diagnóstico de una infección por rotavirus es relativamente sencillo dado que en el estadio agudo de la enfermedad se excretan grandes cantidades de partículas virales (hasta 10^{11} partículas/gramo de heces). Las principales técnicas empleadas son: los ensayos de inmunoenlaces (ELISA), los tests de aglutinación pasiva y la microscopía electrónica (no muy usada actualmente). Asimismo se emplean técnicas moleculares tales como RT-PCR tanto para la detección como para la tipificación. El tratamiento de la enfermedad por rotavirus consiste en rehidratación oral, subcutánea o endovenosa. Las inmunoglobulinas orales parecen tener efecto en la duración de la diarrea y en la excreción del virus pero no se usan de rutina (8, 65).

3. EPIDEMIOLOGÍA

3.1. Transmisión

Los rotavirus son altamente contagiosos y su modo de transmisión es por la vía fecal-oral. Debido a que el virus es muy estable en el ambiente, la transmisión puede ocurrir por contacto persona-persona, a través de comida, agua o por contacto con superficies contaminadas. Así también, las infecciones intrahospitalarias son muy comunes (8, 66). Anteriormente se consideraba que la infección por rotavirus se limitaba al tracto gastrointestinal. Sin embargo, se ha detectado rotavirus en secreciones nasofaríngeas de niños con o sin síntomas gastrointestinales (67), por lo que también podría transmitirse por la vía respiratoria. Las infecciones por rotavirus se asocian comúnmente con antigenemia (presencia de antígenos virales en la sangre) en niños con diarrea y también, aunque menos frecuentemente, presencia de RNA viral en la sangre (68). Además, se ha detectado rotavirus en suero y en múltiples órganos de animales infectados experimentalmente (69), así como en el líquido cefalorraquídeo y en tejidos de niños y adultos. Estos hallazgos demuestran la diseminación de los rotavirus fuera del intestino, y sugieren una posible infección sistémica en niños y animales infectados (8).

3.2. Incidencia

La incidencia de la enfermedad es mayor en niños de entre 6 y 24 meses. Los niños de este rango etario corren mayor riesgo de padecer enfermedad severa por rotavirus y requerir hospitalización. En total, los rotavirus son responsables de entre 25 y 50 % de las hospitalizaciones de niños por diarrea en todo el mundo. Durante los primeros 5 años de vida, virtualmente todos los niños habrán experimentado un episodio de diarrea por rotavirus, tanto en países en desarrollo como en países desarrollados, pero las

consecuencias de la infección son muy diferentes (70). Las infecciones de rotavirus en adultos, por lo general, no causan manifestaciones clínicas o son mínimas, pero ocasionalmente pueden causar enfermedad (8).

Hoy en día, los rotavirus son reconocidos como la principal causa de gastroenteritis infantil severa en todo el mundo (71, 72). Se ha estimado que a nivel global, los rotavirus causan la muerte de 453.000 niños menores de 5 años anualmente (correspondiente al 37 % de las muertes totales por diarrea y al 5 % de las muertes totales en este grupo etario). En Latinoamérica se estima que RVA causa aproximadamente 6.300 muertes y 230.000 hospitalizaciones anualmente (6). En tanto que un estudio reciente calcula que en Argentina 150.000 consultas ambulatorias por diarrea, 15.000 internaciones y 30 muertes anuales en menores de 5 años se deben a este enteropatógeno (73). A pesar de que la proporción de rotavirus detectado en niños hospitalizados con diarrea fue mayor en países desarrollados, la mayoría de las muertes asociadas se detectaron en países en vías de desarrollo en África y Asia. En solo cinco países (India, Nigeria, Pakistán, República Democrática del Congo y Etiopía) se contabilizaron la mitad de las muertes (1, 70). El riesgo elevado de mortalidad por rotavirus en países de bajos ingresos se asocia a una combinación de factores, incluyendo el acceso limitado a la atención médica y a terapias de rehidratación, una mayor prevalencia de desnutrición y otras causas de mortalidad infantil.

Por estos motivos, desde la década de 1980, la investigación se ha enfocado en el desarrollo de vacunas contra rotavirus. Desde el año 2006 se licenciaron dos vacunas en numerosos países, y en algunos de ellos ya han sido incluidas en los planes nacionales de vacunación (Figura 6) (74), como es el caso de Argentina que incorporó la vacuna monovalente en el año 2015 (75).

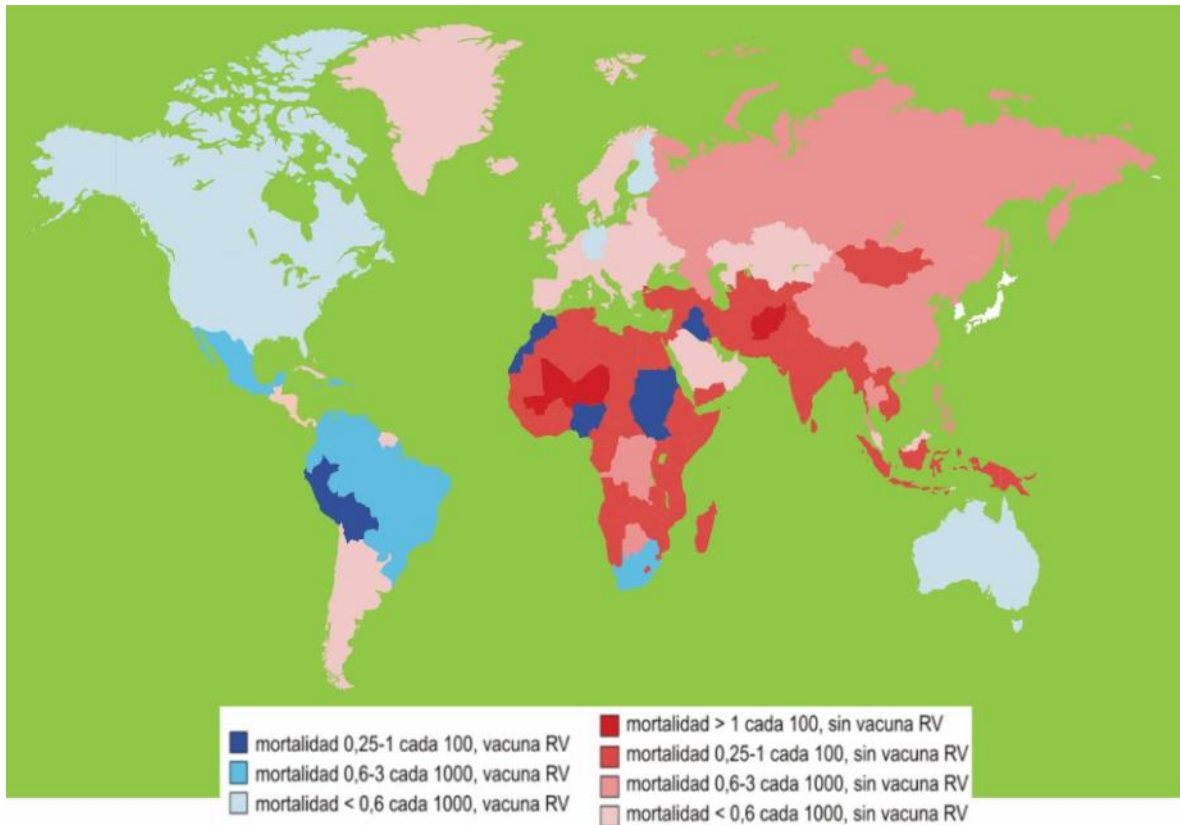


Figura 6. Mortalidad global por diarrea aguda por rotavirus y cobertura de vacunación. Mapa mundial indicando la mortalidad estimada por rotavirus por país. Los distintos tonos indican el riesgo de muerte por niño de hasta los 5 años. Los colores rojo y azul representan a los países sin o con cobertura de vacunación contra rotavirus (RV), respectivamente. Adaptado de Lepage et al, 2012 (76). Debe notarse que a partir del año 2015 Argentina ha incorporado la vacuna monovalente a su Calendario Nacional de Inmunización (75).

3.3. Estacionalidad

Los cambios estacionales son cíclicos, mayormente predecibles, y representan las variaciones externas que afectan a los sistemas naturales y humanos. La mayoría de los casos de infección con rotavirus en países con climas templados, ocurre en el invierno (77-79). En contraste, se pueden aislar rotavirus durante todo el año en países en desarrollo

con climas tropicales o subtropicales (80-82), aunque algunos estudios reportaron picos durante el invierno (8).

4. DIVERSIDAD GENÓMICA Y EVOLUCIÓN DE LOS ROTAVIRUS

4.1. *Mecanismos asociados con la diversidad*

Existen tres mecanismos evolutivos principales que afectan la diversidad genética de los rotavirus: a) la deriva genética (mutaciones puntuales), b) el rearrreglo (recombinación) y c) la reasociación.

La deriva genética por acumulación de mutaciones puntuales da lugar a las variaciones intragenotípicas entre cepas de rotavirus. La frecuencia de mutación es relativamente alta debido a las características de la RNA polimerasa RNA dependiente. Los rearrreglos ocurren por deleciones, inserciones o duplicaciones parciales (8, 46).

La naturaleza segmentada del genoma de los rotavirus permite que ocurran reasociaciones de segmentos. Durante estos eventos, se intercambian uno o más segmentos genómicos provenientes de dos cepas distintas, lo que resulta en una progenie nueva de rotavirus. La frecuencia de reasociaciones aumenta cuando una población mixta de rotavirus se propaga en hospedadores animales y humanos. En teoría, a partir de las posibles combinaciones de los 11 segmentos es posible obtener una enorme variedad de cepas diferentes. Si la reasociación ocurriese al azar, los 11 segmentos de dos cepas parentales de rotavirus podrían dar lugar a 2^{11} (2.048) combinaciones génicas posibles (83). Un posible ejemplo de este fenómeno se esquematiza en la Figura 7.

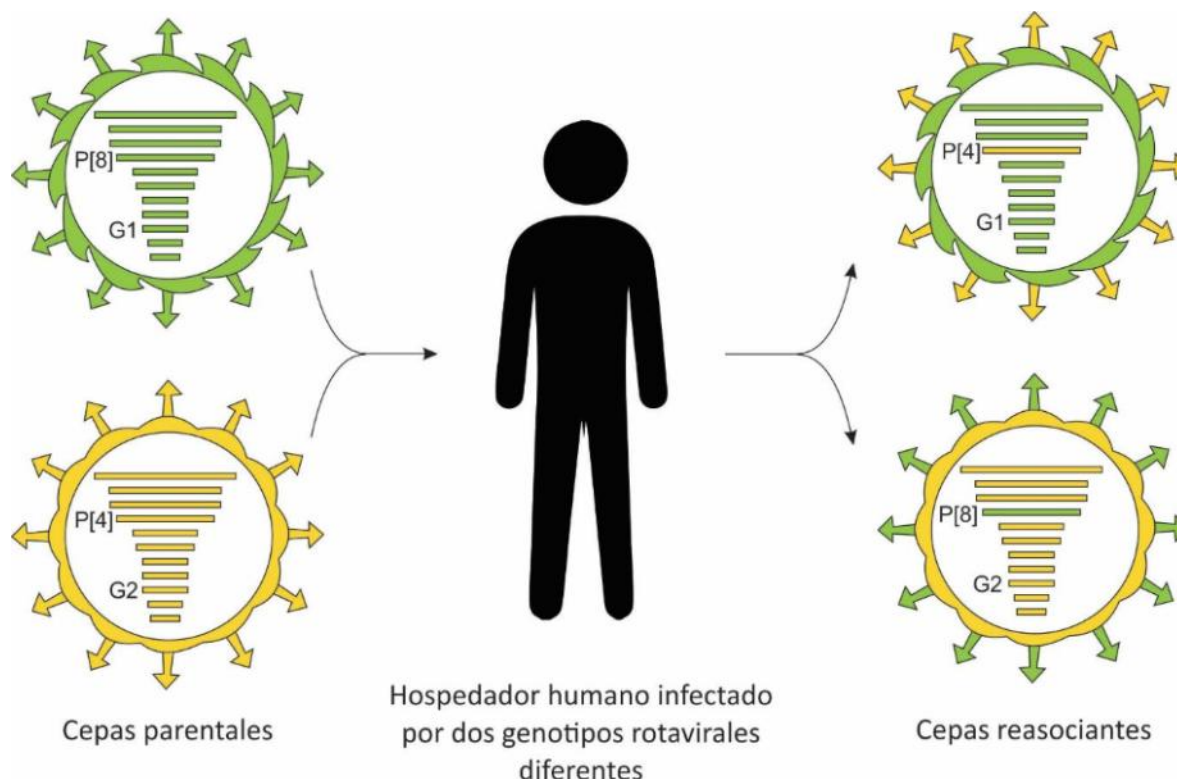


Figura 7. Reasociación de segmentos entre dos cepas de rotavirus. Las cepas parentales G1P[8] y G2P[4] infectan un hospedador humano y pueden generar diferentes progenies. Se ejemplifican dos reasociantes posibles, G1P[4] y G2P[8]. Adaptado de Rahman, 2008 (84).

Debido a que las proteínas de superficie VP7 y VP4 son los principales blancos de la respuesta de anticuerpos neutralizantes del hospedador, las reasociaciones entre cepas pertenecientes a distintos tipos G (VP7) y P (VP4) han sido las más estudiadas. Al momento, se han identificado por lo menos 120 combinaciones G-P diferentes (Figura 8). Afortunadamente, la variabilidad global G-P en cepas de rotavirus causantes de diarreas en humanos es reducida, observándose los genotipos G1, G3, G4, G9 y G12 en asociación preferente con P[8], y el genotipo G2 con P[4] (8, 48, 85). Esto es debido a que, a pesar de que la reasociación es un mecanismo importante para la generación de diversidad en los rotavirus, las cepas humanas epidemiológicamente importantes poseen alguna de las dos constelaciones de genotipos: *Wa-like* que se presenta generalmente con el primer tipo de

asociación G-P descrito arriba o DS-1-like que se presenta generalmente con el segundo tipo de asociación.

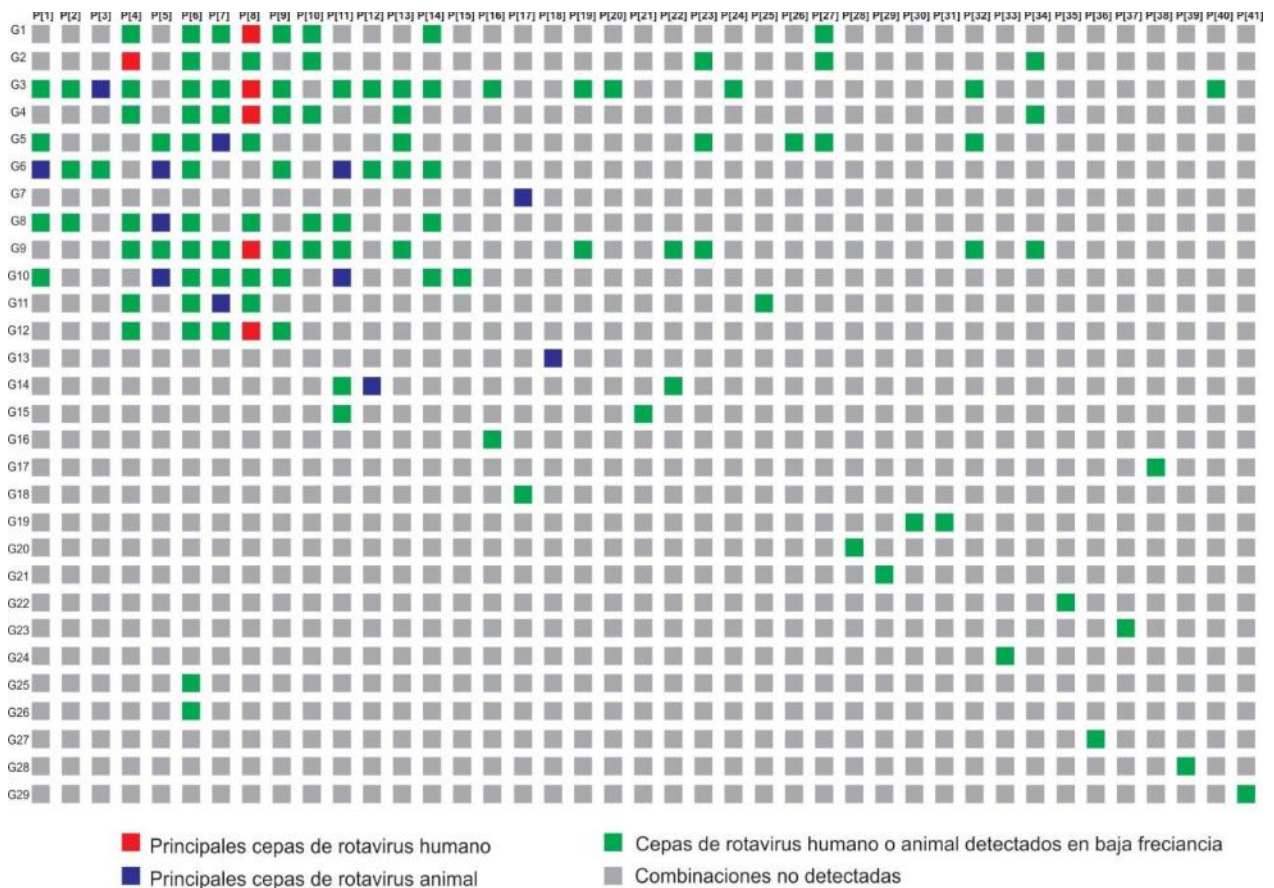


Figura 8. Combinaciones de genotipos G-P de rotavirus grupo A. El esquema muestra en diferentes colores las combinaciones detectadas en humanos, animales, aquellas detectadas en baja frecuencia o las no detectadas. Adaptado de Rahman, 2008 (84).

4.2. Distribución de genotipos

Existe una diversidad considerable de cepas de rotavirus que circulan en distintas regiones geográficas y períodos, además la incidencia de un genotipo individual en una región en particular fluctúa anualmente. Hasta mediados de la década de 1990, el 90 % de las infecciones por rotavirus en humanos en Norteamérica, Europa y Australia, eran causadas principalmente por las cuatro combinaciones de genotipos más prevalentes a

nivel global: G1P[8], G2P[4], G3P[8] y G4P[8]. Sin embargo, en Sudamérica y Asia estos genotipos representaban el 68 % de las infecciones mientras que en África, sólo el 50 %. En particular, la combinación G1P[8] representaba más del 70 % de las infecciones por rotavirus en Norteamérica, Australia y Europa, alrededor del 30 % en Sudamérica y Asia, y sólo el 23 % en África (86-89). Los rotavirus G9 y G12 en combinación con P[8] representan claros ejemplos de combinaciones de genotipos que se consideraban raras, y actualmente son genotipos humanos de los más importantes a nivel global (90-92, 94-98). En Latinoamérica, la cepa más común entre 1977 y 2009 fue G1 (34,2 %) seguida de G9 (14,6 %) y G2 (14,4 %). En esta misma región, los genotipos P más predominantes fueron P[8] y P[4] (56,6 % y 22,1 %, respectivamente) (93).

Distintos estudios han demostrado que otros genotipos, además de G1-G4 y G9, pueden ser importantes regionalmente. En Brasil y en Malawi, los genotipos G5 y G8, respectivamente, fueron altamente prevalentes (99-102). El genotipo G8 también fue epidemiológicamente importante en otras partes de África (103).

Luego de la introducción de las vacunas contra rotavirus en varios países de Latinoamérica, a partir del año 2006, la combinación de genotipos G2P[4] se ha reportado en alta frecuencia en la región. Algunos investigadores creen que este fenómeno puede estar ligado a que la cepa incluida en la vacuna monovalente es G1P[8] y pertenece a otro genogrupo (97, 104-106).

4.3. *Transmisión interespecie*

A pesar de que se consideraba que existía una restricción de hospedador para los rotavirus, un número creciente de artículos que reportan nuevas cepas de rotavirus en humanos sugiere que las transmisiones interespecie contribuyen considerablemente a la diversidad viral. Por ejemplo, se detectó que ciertas cepas de rotavirus animales presentaban características antigénicas similares a algunas cepas de rotavirus humanos.

Además, algunos genotipos de origen animal, como G3, G5, G6, G8, G9 y G10, se han aislado de humanos en todo el mundo (8,107, 108).

Estas cepas pueden haber surgido por transmisión del virión completo de animales a humanos, o como reasociantes génicos entre cepas animales y humanas durante coinfecciones en una misma célula. Este último caso es el más documentado. Los genotipos P raros como P[3], P[9], P[14] e incluso P[8] (que es común en humanos), tienen una relación genética y antigénica cercana con los mismos genotipos detectados en animales.

Existen varios modos por los que los rotavirus animales pueden transmitirse a humanos. En muchos países en desarrollo, los rotavirus pueden transmitirse por contacto directo entre animales de granja infectados y humanos. En áreas con tendencia a inundarse o con climas monzónicos, las probabilidades de contacto con heces de animales son mayores. Las mismas pueden contaminar fuentes de agua, lo que incrementa la probabilidad de transmisión. La manipulación y el cuidado de mascotas infectadas también exponen directamente a los humanos a rotavirus animales (8, 109).

Además, es de notar que la diversidad general de los rotavirus es mayor en países en desarrollo ya que las condiciones epidemiológicas, ambientales y de salud favorecerían una evolución más rápida de los rotavirus, incluyendo el caso particular de la introducción de genes de rotavirus animales por transmisión interespecie (110).

5. PREVENCIÓN

5.1. Control

Los rotavirus son relativamente resistentes a la inactivación por los desinfectantes químicos y antisépticos comúnmente utilizados en hospitales y en otras instituciones. El etanol, el gluconato de clorexidina y compuestos de amonio cuaternarios pueden

inactivar los rotavirus. Sin embargo, ninguno de los desinfectantes empleados comúnmente para el lavado de manos pueden inactivarlos completamente (8, 111).

Las mejoras en los servicios sanitarios e higiene han tenido un gran impacto al reducir la enfermedad por diarrea y las muertes causadas por bacterias y parásitos que se diseminan principalmente a través de agua y comida contaminadas. Sin embargo, estas mejoras han tenido un impacto mucho menor sobre las infecciones por rotavirus, el cual se transmite principalmente por contacto entre personas (112).

Diversos estudios demostraron que niños infectados previamente con rotavirus se encontraban protegidos contra diarreas posteriores por el mismo agente. La protección fue mayor contra la diarrea moderada a severa, y el nivel de protección aumentaba con cada nueva infección. Estos datos sugirieron que una vacuna de rotavirus atenuado que imitara la infección natural podría proveer protección contra la enfermedad, aunque probablemente se requerirían dosis múltiples de la vacuna para conferir una protección óptima (1, 8, 88).

5.2. Vacunación

Las pruebas clínicas y el desarrollo de vacunas contra rotavirus comenzaron hacia finales de la década de 1970. La primer vacuna propuesta fue RIT4237 (monovalente, G6P[1], reasociante bovino-humano). Esta vacuna indujo un 88 % de protección contra la diarrea severa en ensayos clínicos realizados en Finlandia. Sin embargo, no se logró demostrar una eficacia protectora adecuada en países en desarrollo, y su avance se interrumpió a principios de la década de 1980 (8, 113).

En vista de la inconsistencia de estos resultados, se procuró obtener cepas de rotavirus humanos atenuadas o cepas reasociantes que incluyeran genes provenientes de cepas humanas y animales. En 1998, se licenció en Estados Unidos una vacuna tetravalente basada en reasociantes simio-humano: RotaShield® (RRV-TV, Wyeth-Lederle).

Esta vacuna demostró una elevada eficacia protectora en ensayos clínicos en Estados Unidos y Finlandia (114, 115), aunque los niveles de protección fueron nuevamente mucho menores en países latinoamericanos (116, 117). Sin embargo, a menos de un año de su lanzamiento, la vacuna debió ser retirada del mercado debido a que se observó una relación entre los pacientes que recibían la vacuna y casos raros de intususcepción (una obstrucción del intestino potencialmente fatal) (118). La experiencia con esta vacuna estableció un nuevo estándar en lo que respecta al tamaño de los ensayos clínicos para evaluar la seguridad de las vacunas (8).

Posteriormente al retiro de RotaShield®, dos ensayos clínicos grandes de fase III (cada uno incluyendo más de 60.000 niños) demostraron que tanto la vacuna Rotarix® como RotaTeq® eran seguras y mostraban una eficacia entre 85 y 95 %, respectivamente, en la prevención de la gastroenteritis severa por rotavirus (119, 120).

Rotarix® es una vacuna monovalente (RV1) basada en una cepa humana atenuada G1P[8] desarrollada originalmente por pasaje en cultivo celular de un aislamiento humano. La vacuna fue licenciada por GlaxoSmithKline Biologicals (Rixensart, Bélgica) y se licenció inicialmente en Méjico y en República Dominicana en 2004, y desde entonces fue aprobada para su uso en más de 90 países. Esta vacuna se administra por vía oral en dos dosis. RotaTeq® es una vacuna pentavalente (RV5) basada en reasociantes humano-bovino comprendiendo los genotipos humanos G1, G2, G3, G4 y P[8] con el resto de los segmentos pertenecientes a una cepa bovina G6P[5]. Fue licenciada por Merck & Co. (New Jersey, Estados Unidos) en febrero de 2006 para su uso en Estados Unidos y desde entonces fue aprobada en más de 100 países. Esta vacuna se administra por vía oral en tres dosis. Hacia finales del año 2014, 74 países ya habían incluido alguna de las vacunas en sus programas nacionales de vacunación. La cobertura global se estima en un 19 %. El continente con la mayor cobertura es América con el 71 %, en contraste a las regiones del sudeste asiático y el oeste del Pacífico con 0 % y 1 %, respectivamente (75, 121).

Ambas vacunas han demostrado ser eficaces para prevenir la diarrea severa y la mortalidad por rotavirus. De acuerdo a los estudios realizados previamente al

licenciamiento de las vacunas, RV1 prevendría el 86 % de los casos de diarrea severa por rotavirus en países con baja mortalidad, y el 63 % en países con elevada mortalidad. Por otro lado, RV5 prevendría el 87 % de los casos de diarrea severa por rotavirus en países con baja mortalidad, y el 57 % en países con elevada mortalidad (122, 123). Aún no se comprenden bien los motivos de la menor eficacia de las vacunas contra rotavirus en países de bajos ingresos, pero podrían estar relacionados con los elevados títulos de anticuerpos maternos transmitidos en la leche materna o a través de la placenta, las infecciones concurrentes por otros patógenos entéricos, la desnutrición, un microbioma intestinal alterado u otros factores del hospedador. Aun así, el valor absoluto de los casos de diarrea severa que se previenen con la vacunación es mayor en los países en desarrollo, debido a que el nivel de morbilidad en estos países es muy elevado (124).

En el caso de Estados Unidos, desde la introducción de la vacuna, distintos estudios evaluaron la efectividad de RV5 (122). Se demostró una efectividad de entre 78 y 100 % en cuanto a la prevención de la diarrea severa por rotavirus (hospitalizaciones y/o atención médica de emergencia) y un 96 % en cuanto a la prevención de las visitas médicas. Sin embargo, los datos más notables se refieren al efecto de la vacunación sobre el número de muertes por diarrea. En México, luego de la introducción de RV1 en el programa nacional de vacunación, la mortalidad por diarrea infantil disminuyó un 35 % en 2008, al compararse con los valores anuales prevacunación (2003-2006). Asimismo, esta disminución se mantuvo por 4 años desde 2008 a 2011 (124, 125). En muchos otros países de ingresos medios a altos, incluyendo Estados Unidos, Sudáfrica e Israel, se han observado marcados descensos (entre 49 y 89 %) en el número de hospitalizaciones por diarrea severa por rotavirus, dentro de los dos años de introducida la vacuna (122).

Existen candidatos vacunales basados en cepas de rotavirus atenuadas que están en fase clínica para evaluar su efectividad y seguridad (126, 127). Sin embargo, es difícil llevar a cabo estos ensayos clínicos tan grandes, tanto por motivos económicos como éticos. Además, las diferencias en eficacia de las vacunas según la población estimularon el interés en evaluar modificaciones en los calendarios de inmunización, introducir

suplementos probióticos y/o macronutrientes, que permitan mejorar la eficacia de las vacunas en poblaciones con mortalidad elevada. Teniendo en cuenta estos hechos, se investigaron posibles correlatos de protección luego de la vacunación que faciliten el licenciamiento de vacunas o estrategias nuevas, con el objetivo de mejorar la eficacia de las ya existentes. Recientemente, se encontró que los títulos de IgA en suero se correlacionan inversamente con los niveles de mortalidad de niños menores de 5 años y que la eficacia de las vacunas durante los primeros dos años de vida es significativamente menor en países con títulos de IgA bajos a medios. Estos datos sugieren que los anticuerpos IgA rotavirus-específicos podrían ser marcadores de inmunidad a la infección por rotavirus (128).

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es la detección de rotavirus reasociantes derivados de las cepas vacunales asociados a casos de gastroenteritis (129, 130). En estudios realizados en Australia, Estados Unidos y Finlandia, algunos niños se infectaron con una cepa G1P[8] derivada de RV5, resultado de un evento de reasociación entre cepas de la vacuna. También se han detectado con menor frecuencia, reasociantes entre cepas vacunales y cepas *wild type* pero todavía están pendientes los estudios sobre la distribución de cualquiera de estos reasociantes así como sobre la enfermedad asociada (124, 131).

En ausencia de vacunación, existen un sinnúmero de factores que pueden afectar la distribución de genotipos de rotavirus, ya reconocidos por su fluctuación natural tanto geográfica como temporal. Sin embargo, los mecanismos concretos detrás de estas fluctuaciones no se comprenden completamente. Por otro lado, hay una gran diferencia con la presión selectiva que puede introducir la vacunación en masa de una población. En este caso, se expone a niños menores de 8 meses, dos o tres veces a cepas de rotavirus específicas. Se ejerce así, una presión unidireccional que potencialmente favorecería la selección de cepas de rotavirus que son relativamente más distantes de la cepa o cepas vacunales. Tales variantes podrían surgir por adquisición de genotipos G y P no presentes en las formulaciones vacunales (como G8, G9, G12, en combinación con P[4] o P[6]), o por

acumulación de cambios más sutiles como sustituciones aminoacídicas en epítopes inmunogénicos de cualquiera de las proteínas involucradas en la generación de la inmunidad inducida por una vacuna (132).

Diversos estudios han confirmado las consideraciones teóricas de que la vacunación con RV1 (G1P[8], *Wa-like*) aumentaría la prevalencia relativa de las cepas DS-1-*like* (Tabla 3). En distintos países (como Bélgica, Brasil y varios estados de Australia) se detectó un aumento muy marcado en la prevalencia de cepas G2P[4] luego de la introducción de RV1. Nosotros hemos observado lo que consideramos repercusiones de estos fenómenos en el incremento y un largo período de prevalencia de cepas G2P[4] en Argentina e hipotetizamos que el motivo puede ser la vacunación masiva en Brasil (97). En el caso de RV5, esta vacuna contiene el genotipo P[8] que generalmente se asocia con las cepas *Wa-like*, pero también posee una constelación de genotipos bovinos, muchos asociados con cepas DS-1-*like*. Por este motivo las consideraciones teóricas sobre los efectos de esta vacuna no son tan claras y la presión selectiva podría ser menos marcada y más difícil de detectar. En distintos países (como Estados Unidos y varios estados de Australia) se detectó un aumento no esperado pero marcado, en la prevalencia de cepas G3P[8]. Esto podría deberse a una menor respuesta inmunológica al componente G3 de la vacuna o a que en varios casos se detectaron modificaciones en los epítopes de estas cepas al compararlas con las vacunales (132).

CAPÍTULO I

ROTAVIRUS HUMANOS DEL GRUPO A EN MUESTRAS CLÍNICAS. DETECCIÓN Y FLUCTUACIÓN DE GENOTIPOS



PARTE I

COLECCIÓN DE MUESTRAS Y DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE ROTAVIRUS EN CASOS CLÍNICOS. INCIDENCIA Y ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS EN EL GRAN BUENOS AIRES



1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. *Procedencia y preparación de las muestras clínicas*

Se analizó un total de 605 muestras de materia fecal de niños menores de 15 años con diarrea aguda, colectadas entre enero de 2008 y diciembre de 2014. Las mismas procedían de pacientes atendidos en forma ambulatoria (en consultorios externos o guardia médica) en el Hospital Materno Infantil "Dr. Eduardo Oller" de San Francisco Solano (Quilmes, Gran Buenos Aires) o de pacientes internados en el Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez" (HNRG) de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). Las muestras del primer hospital corresponden a los años 2008 a 2010, mientras que las del segundo pertenecen a los años 2010 a 2014. Sin embargo, se cuenta con datos clínicos y de diagnóstico de este último nosocomio para el período completo.

Cabe destacar que a las muestras recibidas del Hospital "Dr. E. Oller" no se les había realizado un diagnóstico virológico de rutina en el centro asistencial, en tanto que las muestras procedentes del Hospital "Dr. R. Gutiérrez" sí habían sido sometidas a un diagnóstico virológico previo. Por este motivo, las muestras enviadas desde este último centro asistencial correspondían a las diarreas con diagnóstico positivo para rotavirus grupo A (RVA). Debido a esto, las muestras procedentes del Hospital "Dr. E. Oller" fueron evaluadas mediante ensayos inmunológicos para detectar la presencia de RVA o de rotavirus grupo C (RVC). A partir de los resultados obtenidos con este grupo de muestras se establecieron los valores de incidencia de ambos patógenos sobre una colección de muestras sin tamizaje previo. Por otro lado, como las muestras procedentes del Hospital "Dr. R. Gutiérrez" correspondían a pacientes internados con diarrea y diagnóstico positivo para RVA, no se las evaluó con los ensayos para detección inmunológica de RVA o RVC.

Las muestras se diluyeron al 10 % con *buffer* fosfato salino (PBS) y se almacenaron a -20 °C. Antes de utilizarlas, las diluciones de las muestras se resuspendieron y centrifugaron a 1.000 g durante 10 minutos.

1.2. Detección de antígenos de rotavirus por ELISA

1.2.1. ELISA para detección de rotavirus grupo A

Se empleó un ELISA desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) para la detección de rotavirus del grupo A. El método consiste en un ELISA de captura que emplea anticuerpos policlonales de cabra anti-RVA. Se sensibilizaron placas de 96 pocillos con una dilución 1/250 de IgG purificada de cabra anti-rotavirus en buffer carbonato pH 9,6, incubando 1 hora a temperatura ambiente. Luego de cada una de las incubaciones, la placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, Tween-20 0,2 %). Las muestras a analizar se diluyeron en PBS-TC (PBS-T, caseína 1 %), se depositaron en los pocillos y se incubaron 1 hora a 37 °C u *overnight* a 4 °C. Luego del lavado se incubó con una dilución 1/1.000 de IgG purificada anti-rotavirus biotinilada en PBS-TC durante 1 hora a 37 °C, se lavó y se incubó 30 minutos con una dilución 1/4.000 de estreptavidina conjugada con peroxidasa (USBiologicals, Swampscott, MA, Estados Unidos) en PBS-TC. Finalmente, y luego de un último lavado, las placas se revelaron con orto-fenilendiamina 1 mg/ml (OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y peróxido de hidrógeno (0,03 % v/v) en *buffer* citrato, pH 5,0. Luego de 15 minutos de desarrollo de color la reacción se frenó con ácido sulfúrico 1 N y se determinó la densidad óptica a 490 nm (DO490) en un lector de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom US, Holliston, MA, Estados Unidos), considerándose positivas aquellas muestras con DO490 mayor a 0,2 (133).

1.2.2. ELISA para detección de rotavirus grupo C

Se empleó un ELISA desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología, UNQ (164) para la detección de las muestras positivas para rotavirus del grupo C. El método consiste en un ELISA de captura que emplea anticuerpos policlonales de conejo específicos de la proteína VP6 de rotavirus del grupo C. Los detalles del protocolo son los mismos que se especificaron en el punto 1.2.1.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. *Incidencia de rotavirus en muestras clínicas*

Debido al sesgo de las muestras procedentes del Hospital “Dr. R. Gutiérrez” se ha calculado la incidencia de infecciones por RVA para la población de cada hospital por separado. Además, se ha calculado la incidencia de casos de diarreas asociadas a RVC solamente en las muestras procedentes del Hospital “Dr. E. Oller”, en cuyo caso debe tenerse en cuenta que se trata de una incidencia calculada únicamente con datos de pacientes ambulatorios. Asimismo, cabe aclarar que los cálculos realizados a partir de muestras provenientes de este hospital involucran un periodo de tiempo más corto (2008-2010) que el periodo total estudiado en esta tesis (2008-2014).

En la Tabla 1.1.1 se muestran los datos de incidencia de RVA y RVC para el Hospital “Dr. E. Oller”, mientras que en la Tabla 1.1.2 se muestran los datos de incidencia de RVA para el Hospital “Dr. R. Gutiérrez”.

Tabla 1.1.1. Incidencia de RVA y RVA en muestras del Hospital “Dr. E. Oller”.

Año	% RVA positivas (n)	% RVA mixtas (n)	% RVC positivas (n)	% mixtas A/C (n)
2008	18,6 % (36/194)	11,1 % (4/36)	1,5 % (3/194)	0,5 % (1/194)
2009	11,7 % (19/163)	26,3 % (5/19)	5,5 % (9/163)	3,7 % (6/163)
2010	14,3 % (8/56)	12,5 % (1/8)	0,0 % (0/56)	0,0 % (0/56)
Total período	15,3 % (63/413)	15,9 % (10/63)	2,9 % (12/413)	1,7 % (7/413)

Como puede observarse en la Tabla 1.1.1, la incidencia de RVA en pacientes ambulatorios varía entre 11,7 % y 18,6 %. El valor obtenido en el periodo 2008-2010 es de 15,3%, valor que coincide con los porcentajes de incidencia reportados anteriormente por nuestro grupo (94, 164). Respecto a la incidencia de RVC, se aprecia una amplia variabilidad. Esto se ve reflejado claramente en los años 2009 y 2010, donde los porcentajes de incidencia son del 5,5 % y 0 %, respectivamente. La incidencia en el período 2008-2010 fue de 2,9 %. Las diferencias interanuales observadas no difieren de

los valores mostrados en estudios de otros investigadores (173-175), y en algunos trabajos se sugiere que este virus podría mantenerse en algún reservorio animal aún desconocido (182). Por último, pudimos observar que las infecciones mixtas, involucrando RVA y RCV, se dieron en un 1,7 % de los casos analizados para el periodo estudiado. Si bien las infecciones por RVC están involucradas tanto en casos esporádicos como en brotes, hay que tener en cuenta que el grupo etario afectado es distinto al de RVA. Las infecciones por el grupo C son más prevalentes en individuos mayores a 4 años de edad, mientras que los rotavirus del grupo A afectan principalmente a niños menores a los 5 años (176). Sabiendo esto, podría suponerse que para obtener valores más fiables de incidencia de RCV el muestreo debería ser más amplio, abarcando grupos etarios mayores y no sólo pacientes pediátricos. De esta manera, se podrían obtener los valores reales de la incidencia de RVC, así como el o los grupos etarios más afectados por este patógeno.

Tabla 1.1.2. Incidencia de RVA en muestras del Hospital “Dr. R. Gutiérrez”.

Año	% RVA positivas (n)	% RVA mixtas (n)
2008	23,1 % (82/355)	Sin información
2009	16,5 % (26/278)	Sin información
2010	29,0 % (162/559)	14,3 % (1/7)
2011	30,4 % (147/484)	7,6 % (6/79)
2012	20,0 % (86/429)	36,0 % (9/25)
2013	18,3 % (67/367)	4,3 % (1/23)
Total período	23,9 % (590/2472)	12,7 % (17/134)

Como se ha mencionado antes, las muestras provenientes del Hospital “Dr. R. Gutiérrez” corresponden a pacientes internados. Este hecho no puede dejarse de lado, ya que puede generar un sesgo a la hora de estudiar la incidencia de las infecciones por RVA. Como ha sido descripto previamente (183), la frecuencia de hallazgo de RVA aumenta con la severidad de los casos. Así, la incidencia de RVA del período 2008-2014 para los pacientes hospitalizados por diarrea en el Hospital “Dr. R. Gutiérrez” es de 23,9 % (Tabla 1.1.2), valor que difiere de la incidencia calculada para las muestras de pacientes

ambulatorios del Hospital "Dr. E. Oller" (15,3 % valor promedio obtenido al considerar las temporadas promedio de tres temporadas 2008, 2009 y 2010).

En la Tabla 1.1.2 se puede observar que la incidencia se mantiene dentro de los valores esperados en la mayoría de los años según lo reportado en bibliografía (164). Sin embargo, llama la atención que la incidencia de RVA fue particularmente alta en los años 2010 y 2011, 29,0 % y 30,4 %, respectivamente. Como se discutirá más adelante, no está claro el porqué de este sesgo durante esos años. Posiblemente esté asociada al ingreso o reingreso de algún genotipo o cepa en particular, pero para afirmar esto es necesario profundizar los estudios.

Si bien los datos de circulación de genotipos son introducidos en la próxima sección, los porcentajes de infecciones mixtas por RVA, es decir muestras en las que se han detectado más de un tipo G o P, son mostrados en las tablas 1.1.1 y 1.1.2 por su interés en la presente discusión. Se observa que los valores de este fenómeno fueron de 15,9 % y 12,7 % para el Hospital "Dr. E. Oller" y el Hospital "Dr. R. Gutiérrez", respectivamente. Dichos porcentajes fueron calculados sobre el total de muestras tipificadas. Estos valores son altos en comparación a los países desarrollados y son característicos de medios en los cuales las condiciones higiénico-sanitarias son deficientes y los inóculos virales son mayores (110).

2.2. Aspectos epidemiológicos de las infecciones por RVA en niños internados

A partir de la información brindada por la Dra. Alicia Mistchenko, directora del laboratorio de Virología del Hospital "Dr. R. Gutiérrez", se analizó la distribución etaria, la estacionalidad e incidencias anuales de los pacientes hospitalizados por diarreas asociadas a RVA.

2.2.1. Distribución etaria de las infecciones por RVA

Las edades de los pacientes incluidos en este estudio abarcan de 0 a 60 meses de nacidos (5 años). En la Tabla 1.1.3 se muestran algunos parámetros estadísticos

descriptivos de las infecciones por RVA. Según los datos obtenidos, la media calculada fue de 9,9 meses y la mediana de 7,9 meses.

Tabla 1.1.3. Parámetros estadísticos de infección por RVA en niños de 0 a 5 años del Hospital “Dr. R. Gutiérrez”.

Parámetro (meses)	2008	2009	2010	2011	2012	2013	General en el periodo de 6 años
Media	10,7	10,5	9,5	10,7	8,9	9,4	9,9
Mediana	8,1	7,5	7,9	9,0	6,7	7,6	7,9
Desviación estándar	9,4	8,3	7,7	7,4	6,4	8,4	8,0

Por otro lado, se ha calculado el número de casos de infecciones asociadas a RVA por grupo etario, tomando intervalos de un mes, y la frecuencia acumulada de estos casos en el tiempo (Gráfico 1.1.1). Se observa que el 50 % de los niños infectados dentro de este grupo son menores de 9 meses de edad y la mayoría de los infectados (80 %) son menores a 14 meses. Las edades calculadas para las cuales se dan las infecciones por RVA son bajas en comparación a países desarrollados y, una vez más, podrían explicarse por las características sanitarias y epidemiológicas de los países en vías de desarrollo, según lo antes mencionado (110).

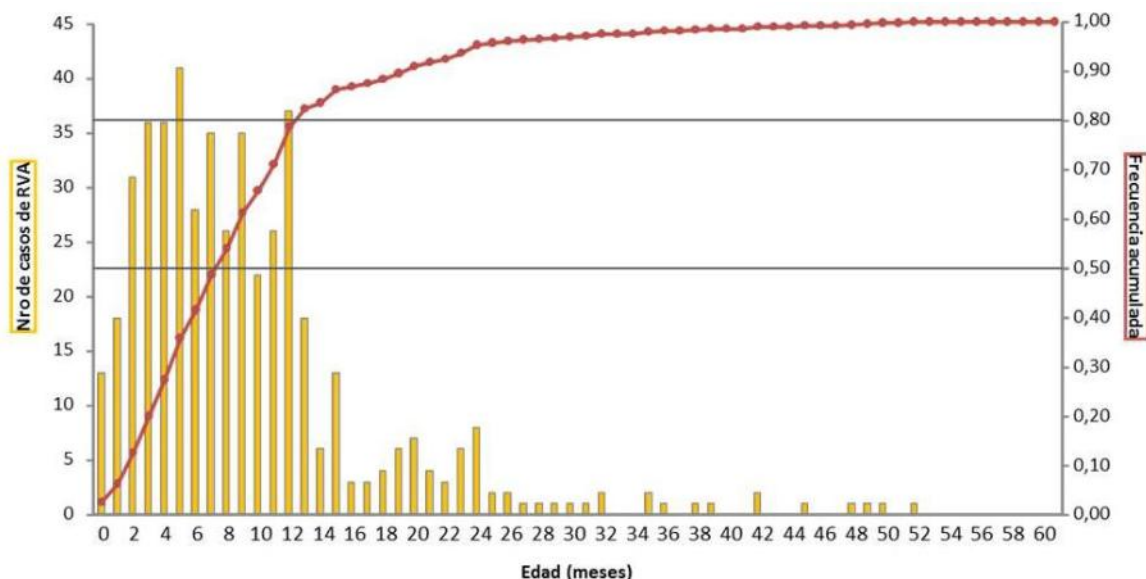


Gráfico 1.1.1. Distribución etaria de los pacientes con infección por rotavirus. En el gráfico se muestra la frecuencia relativa para cada grupo etario (meses) en el eje izquierdo y la frecuencia acumulada en el eje derecho. Se muestran dos líneas de la cuadrícula para resaltar el 0,5 y el 0,8 de la frecuencia acumulada.

2.2.2. Estacionalidad

El pico de incidencia de las infecciones por rotavirus en países templados se da durante los meses fríos del año (77-79), al mismo tiempo que pueden ocurrir otras infecciones comunes de los niños como las del virus respiratorio sincitial o influenza. La coocurrencia de estos virus invernales en chicos puede hacer que los centros sanitarios se vean saturados en esta época. La estacionalidad de estos virus se puede explicar por la mayor aglomeración en lugares cerrados durante los meses fríos, dándose una alta probabilidad de contacto directo persona a persona.

En el caso de Argentina, más precisamente en el Gran Buenos Aires, donde el clima es templado, se observa este fenómeno de estacionalidad de las infecciones por RVA. En el Gráfico 1.1.2 puede apreciarse claramente que el porcentaje de infecciones por rotavirus respecto al total de infecciones con cuadro de diarrea aumenta en los meses fríos. Estos aumentos tienen lugar, en general, desde el mes de mayo hasta agosto.

Es llamativo observar que los picos invernales por RVA de los años 2010 y 2011 son particularmente altos. Estos puntos coinciden con la reemergencia de cepas G2P[4], las cuales aparecieron con altas frecuencias. Estos aspectos se mostrarán y discutirán en el capítulo III de esta tesis. Sin embargo, no está claro si estos hechos están relacionados, por lo que habría que profundizar el estudio en este sentido para lograr determinar si la aparición o reaparición de un nuevo genotipo tiene influencia en la cantidad y severidad de los casos de infecciones por este virus. Luego de estos años se observa que la incidencia de rotavirus en los meses fríos baja hasta los niveles reportados en años anteriores (2008 y 2009).

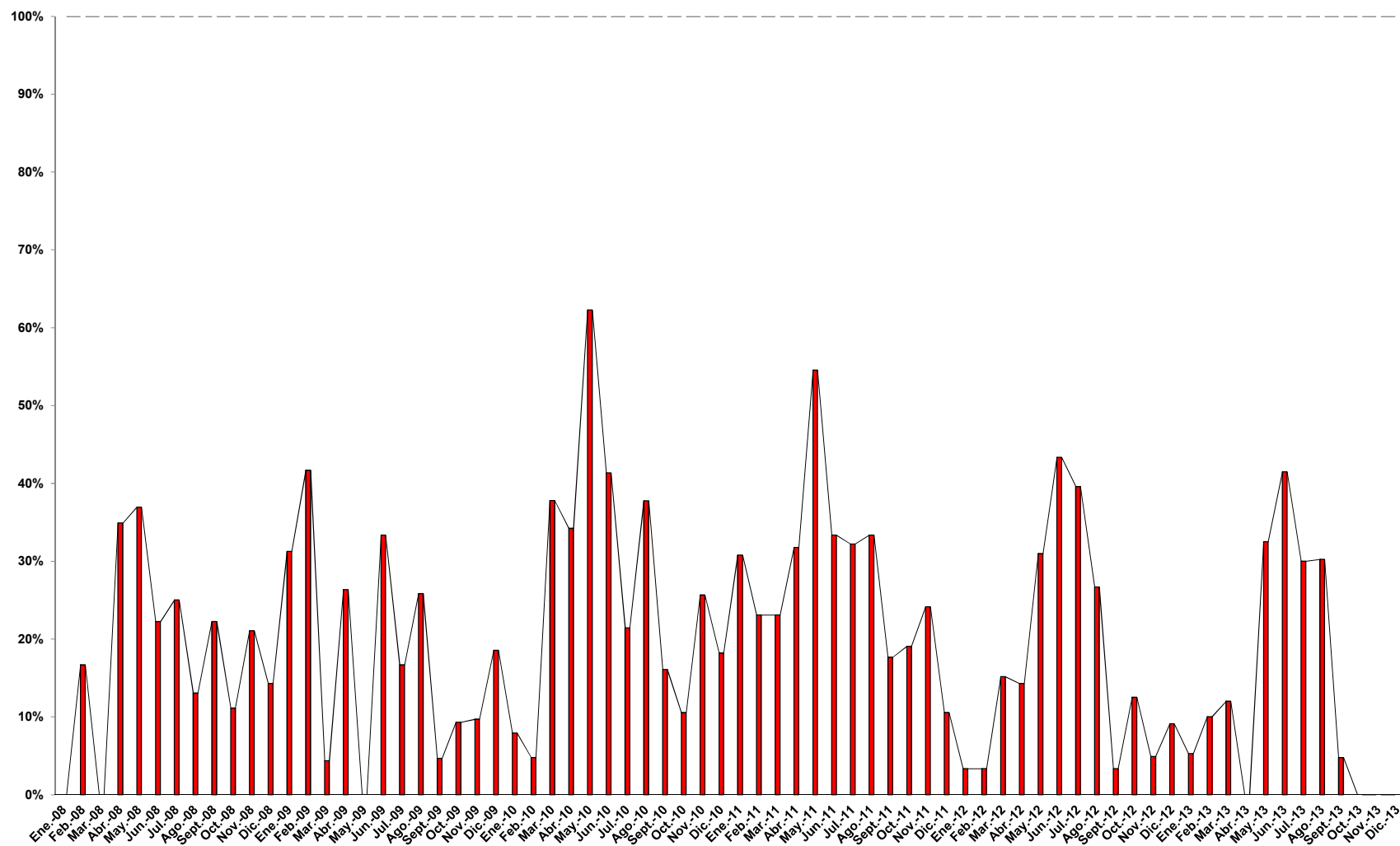


Gráfico 1.1.2. Porcentaje de infecciones por RVA respecto al total de casos de internación por diarrea. Se muestran los datos del período 2008-2013 para el Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez ubicado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Por otro lado, al observar el Gráfico 1.1.3, en el cual se tomaron la totalidad de los datos obtenidos del estudio del período 2008-2013 y se analizaron los casos de infecciones de RVA por mes, se puede apreciar más claramente la estacionalidad invernal en el GBA, que varios investigadores han descripto previamente en distintos escenarios (77-79).

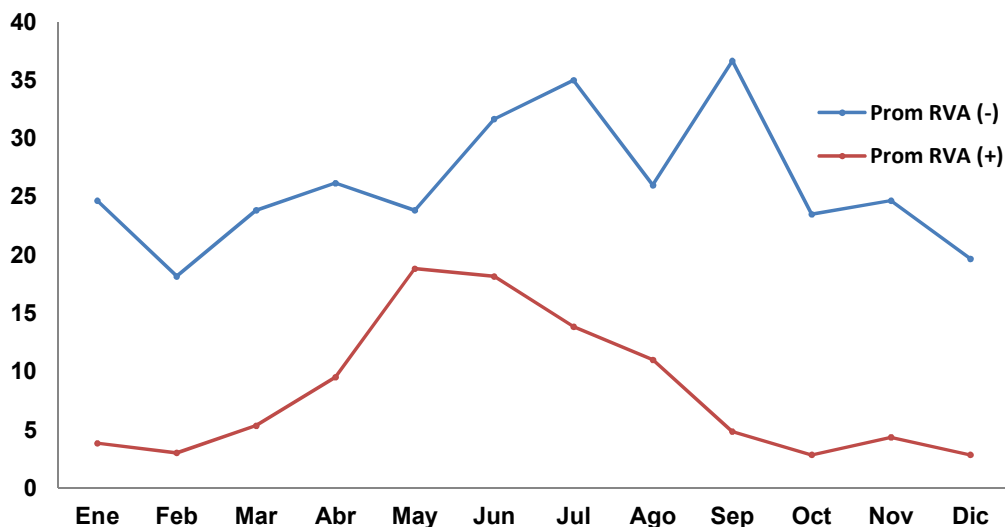


Gráfico 1.1.3. Número de casos de infecciones de RVA positivos y RVA negativos por mes. En el gráfico se muestran los números de casos promedio por mes para el período 2008-2013 de hospitalizaciones por diarreas positivas y negativas para rotavirus en el Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez.

Tanto en gráfico 1.1.3 como en el 1.1.2 se puede ver que las infecciones por rotavirus no están ausentes durante los meses cálidos del año, aunque la incidencia es muy baja.

3. CONCLUSIONES

En esta primera parte hemos obtenido un perfil epidemiológico de la circulación del RVA en el período estudiado. Esto fue posible debido a una extensa colección de muestras

de casos de diarreas de pacientes ambulatorios e internados provenientes de distintos hospitales de la región metropolitana así como de los datos aportados por el servicio de Virología del Hospital "Dr. R. Gutiérrez".

Se han podido determinar una mayor prevalencia en casos severos hospitalizados que en los casos ambulatorios, una marcada, aunque no absoluta, estacionalidad en los meses fríos y una distribución etaria típica de primoinfecciones en edades tempranas.

La frecuencia de infecciones mixtas (15,9 % para el Hospital "Dr. E. Oller" y 12,7 % para el Hospital "Dr. R. Gutiérrez") resultó ser elevada durante el período estudiado. Este es un aspecto de suma importancia debido a que estos hechos facilitan la evolución del virus por reasociación de segmentos. Estas coinfecciones se han documentado mejor en entornos de bajos recursos donde las infecciones entéricas son más comunes (88). Se han detectado frecuencias de hasta 44,0 % con un promedio de 12,0 % en Latinoamérica (86). Para mejorar la investigación sobre la frecuencia de reasociación y su influencia en la evolución de los RVA es necesario contar con la información completa de todos sus segmentos de manera de identificar el origen de cada uno. Este tipo de estudios es el que se lleva a cabo actualmente en nuestro laboratorio y en otros interesados en la epidemiología y evolución de los rotavirus.

Otro aspecto abordado en esta sección fue la distribución etaria de las infecciones por rotavirus. Se ha detectado que dichas infecciones se dan a muy temprana edad, siendo la mayoría de los infectados (80 %) menores a 14 meses de edad. Esta información es de vital importancia al considerar esquemas de inmunización contra RVA. Respecto a este tema, a partir de enero del año 2015 el Programa Nacional de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles de Argentina decidió administrar la vacuna monovalente para la inmunización contra rotavirus. El esquema de vacunación involucra dos dosis, la primera a los dos meses de edad y la segunda a los cuatro (75). De esta manera se espera que la incidencia de la enfermedad por rotavirus disminuya en los próximos años, por lo que este tipo de estudios seguirán siendo de gran importancia.

Por último, se estudiaron la cantidad de casos de infecciones por RVA mes a mes en el período que involucra 6 temporadas invernales consecutivas (2008-2013). Los resultados muestran un marcado aumento de los casos durante los meses fríos, coincidiendo con lo reportado por numerosos investigadores (77-79). En general, se da un aumento abrupto a partir de mayo, se mantiene las frecuencias altas hasta agosto, para luego decaer hasta la próxima temporada invernal. A pesar de esto, se observa que en los meses cálidos las infecciones no desaparecen.

PARTE II

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ROTAVIRUS HUMANOS, FLUCTUACIÓN TEMPORAL DE GENOTIPOS



1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Extracción de RNA

Se diluyeron 100 µl de la muestra de materia fecal con 200 µl de Tris-HCl 50 mM. Se agregaron 300 µl de Vertrel XF (DuPont Chemicals, Wilmington DE, Estados Unidos), se mezcló durante 1 minuto y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 g. Se recuperaron 200 µl de sobrenadante y se combinaron con 400 µl de solución de lisis (isotiocianato de guanidinio 4 M, EDTA 0,02 M y Tritón X-114 (Sigma, St Louis MO, Estados Unidos) 0,01 %) y 40 µl de una suspensión de sílica preparada según fue descrito previamente por Boom et al. (134). Se mezcló y se incubó a temperatura ambiente en agitación durante 15 minutos. Luego se centrifugó a 1000 g durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de sílica con 600 µl de solución de lavado (isotiocianato de guanidinio 4 M y EDTA 0,02 M). Luego se centrifugó nuevamente a 1000 g durante 1 minuto. A continuación se realizaron 3 lavados con 500 µl de etanol 70 % cada uno, centrifugando entre los lavados a 1000 g durante 1 minuto y después del tercer lavado, a 10.000 g durante 2 minutos. Se removió todo el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Luego se resuspendió el *pellet* de sílica con 35 µl de agua destilada, se incubó a 65 °C durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000 g durante 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se repitieron todos los pasos desde la resuspensión con agua destilada para recuperar finalmente 60 µl de RNA. Se almacenó a -20 °C. Antes de usar se incubó a 65 °C durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000 g durante 2 minutos. Esta técnica permitió obtener dsRNA purificado para su empleo en RT-PCR (134).

1.2. RT-PCR

Para la RT-PCR se emplearon 0,6 µl del extracto de dsRNA como molde para la síntesis de cDNA de segmentos específicos de los genes de VP7 y VP4. Se empleó el kit comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Alemania) y los *primers* que fueron

descriptos previamente. En el caso de VP7 se emplearon RA1 y RA4 (135) que permiten amplificar el gen completo de VP7 (1062 pb) o VP7F y VP7R que generan un amplicón de 881 pb (222) y en el caso de VP4 se emplearon con3dg y con2dg, *primers* basados en las secuencias de con3 y con2 (136) que permiten amplificar un segmento del gen de VP4 (876 pb) o VP4F y VP4R (664 pb) (223). Los 0,6 µl de molde se calentaron a 97 °C durante 5 minutos con una mezcla de los dos *primers* específicos en un volumen final de 5 µl. La solución se enfrió rápidamente en hielo durante 2 minutos y se agregó la mezcla de reacción para la RT-PCR de manera que la concentración final de los *primers* fue 0,6 µM e incluyendo 6 unidades del inhibidor de ribonucleasa RNAsin (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) en un volumen final de 10 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, Waltham, MA, Estados Unidos) en tubos de polipropileno de pared delgada. La RT se llevó a cabo a 45 °C durante 30 minutos y a continuación se realizó la amplificación de las secuencias de interés. El perfil de ciclado de la PCR fue el siguiente: 15 minutos a 95 °C; treinta ciclos de 94 °C, 30 segundos; 45 °C, 30 segundos y 72 °C, 75 segundos, seguidos por 10 minutos finales a 72 °C (137).

1.3. Genotipificación por multiplex-PCR

Como molde para la múltiplex PCR se emplearon 0,4 µl del amplicón obtenido por RT-PCR. Para la detección de los genotipos G se utilizaron los *pool* GH1 (135) y *pool* GH2 (138) de *primers*, los que permiten tipificar: G1-4, 8 y 9. Cuando alguna muestra no pudo ser tipificada con este set de *primers*, se utilizó el *pool* GIG, que permite detectar: G1-4, 8-10 y 12 (224, 225). Para la detección de genotipos P se utilizó el *pool* de *primers* PH, con el que se puede tipificar: P[4], [6], [8]-[10] (136, 139). En el caso del *pool* de *primers* para la tipificación de los genotipos P se reemplazó el *primer* de P[8] por un *primer* llamado 1T-1 modificado (94). En el caso de los genotipos G el *pool* se empleó en combinación con RA4 (*pool* GH1), 9con1 (*pool* GH2) o VP7R (*pool* GIG) y en el caso de los genotipos P el *pool* se empleó en combinación con con3dg o VP4F.

El empleo de distintos conjuntos de primers para la tipificación de los genotipos G se debe a que se ha detectado que el primer de G1 del pool GH2 falla en detectar algunas cepas G1, las cuales pueden ser correctamente identificadas con el primer de G1 del pool GH1 (140) o del pool GIG. Además, se ha detectado que el primer de G9 del pool GH1 puede generar resultados falsos positivos con cepas G9, produciendo amplicones que por su tamaño serían compatibles con los generados por cepas G3. Esto podría llevar a identificar a una cepa G9 como una cepa G3 o como una combinación de G9 con G3. Para una correcta detección de las cepas G9 se emplea el primer G9 del pool GH2 (141) o del pool GIG.

En la mezcla de reacción para la PCR las concentraciones finales de los reactivos fueron: 0,5 μ M de cada *primer* (excepto los *primers* comunes RA4, 9con1 y con3dg que se emplearon en el doble de concentración), 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 0,5 unidades de GoTaq DNA Polimerasa (Promega, Madison WI, Estados Unidos), 20 mM Tris-HCl pH 8,4 y 50 mM KCl en un volumen final de 10 μ l. El perfil de ciclado fue el siguiente: un minuto a 94 °C; treinta ciclos de 94 °C, 30 segundos; 42 °C, 30 segundos y 72 °C un minuto, seguidos por 5 minutos finales a 72 °C.

1.4. Visualización de los productos de amplificación de la PCR

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2 % Ultra Pure (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) con SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) en *buffer* TAE (0,089 M Tris, 0,089 M ácido acético y 0,002 M EDTA, pH 7,5) durante 45 minutos a 100 V y visualizados con el transiluminador Safe Imager Blue-Light (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). En el mismo gel se corrió un marcador de peso molecular 100 pb (PB-L, Bernal, Argentina) y controles de tamaño molecular obtenidos por amplificación de cepas prototipo.

NOTA: En el caso de aquellas muestras a las que no se les pudo asignar un genotipo G, P o ninguno de los dos, se llevó a cabo una *nested* PCR con un *primer* interno que permitió discriminar entre muestras G o P no tipificables (NT) *nested* PCR positivas, y

muestras no amplificables (NA) *nested* PCR negativas. En el caso de VP7 se empleó RA2 en combinación con RA498 y en el caso de VP4 se empleó con1dg2 en combinación con con2d.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. *Distribución de genotipos G y P y su combinación*

Durante el período estudiado (2008-2014) se analizaron un total de 2930 muestras de materia fecal. El 23,3 % de los especímenes fecales analizados por ELISA fueron positivos para RVA (datos mostrados en la parte I de este capítulo). De este total, 255 muestras fueron sometidas a genotipificación G y P. Del total de muestras para las cuales se obtuvieron resultados de amplificación de al menos un producto (muestras amplificables: 226), se logró determinar el genotipo G en el 98,2 % de las muestras y el genotipo P en el 87,2 %. Un total de 33 muestras (14,6 %) fueron no tipificables (G o P) y un total de 32 muestras (14,2 %) mostraron infecciones mixtas (más de un tipo G y/o P). Los resultados por año se muestran en la tabla 1.2.1.

Entre los genotipos G detectados en el periodo estudiado, se observa que durante los primeros tres años el dominante fue G3. Las frecuencias fueron 25,0 % para el 2008, 48,0 % para el 2009 y 47,1 % en el 2010. Además, fue el tipo dominante en el año 2012 con un porcentaje de 38,2 %. Durante el año 2009 el genotipo codominante fue G12, con una frecuencia de 44,0 %, que además fue el genotipo más abundante en el año 2013, con una frecuencia aproximada del 60 %. Un hecho particular es que las cepas del tipo G12 fueron detectadas ininterrumpidamente durante el periodo 2008-2014, demostrando que en nuestra casuística ha pasado a formar parte de los tipos humanos más prevalentes además de G1 a G4 y G9.

Tabla 1.2.1. Distribución y frecuencia de los genotipos G y P de RVA detectados en el Gran Buenos Aires desde el 2008 al 2014.

Genotipo	2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		Total	% en el periodo de 7 años
	nro. de muestras	%	nro. de muestras	%	nro. de muestras	%	nro. de muestras	%	nro. de muestras	%	nro. de muestras	%	nro. de muestras	%		
G1	6	15,0	1	4,0	1	5,9	0	0,0	0	0,0	1	4,3	22	68,8	31	12,1
G2	3	7,5	0	0,0	5	29,4	65	76,5	9	26,5	2	8,7	3	9,4	87	34,0
G3	10	25,0	12	48,0	8	47,1	15	17,6	13	38,2	5	21,7	0	0,0	63	24,6
G4	7	17,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	2,9	0	0,0	0	0,0	8	3,1
G9	9	22,5	1	4,0	1	5,9	2	2,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0	13	5,1
G10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	2,9	0	0,0	0	0,0	1	0,4
G12	4	10,0	11	44,0	2	11,8	2	2,4	10	29,4	14	60,9	6	18,8	49	19,1
GNT	1	2,5	0	0,0	0	0,0	1	1,2	0	0,0	1	4,3	1	3,1	4	1,6
Total	40	100	25	100	17	100	85	100	34	100	23	100	32	100	256	100
P[4]	1	2,9	0	0,0	6	40,0	62	78,5	8	32,0	2	9,1	3	10,0	82	36,4
P[6]	1	2,9	0	0,0	0	0,0	1	1,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	0,9
P[8]	24	68,6	16	84,2	9	60,0	5	6,3	14	56,0	18	81,8	25	83,3	111	49,3
P[9]	1	2,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,4
PNT	8	22,9	3	15,8	0	0,0	11	13,9	3	12,0	2	9,1	2	6,7	29	12,9
Total	35	100	19	100	15	100	79	100	25	100	22	100	30	100	225	100

GNT: G no tipificable. PNT: P no tipificable.

En el año 2011 el genotipo dominante fue G2, con un porcentaje de 76,5 %. Asimismo, se ha detectado en frecuencias medias a altas en los años 2010 y 2012, y sólo se ausentó en el año 2009. El último año analizado (2014) tuvo como genotipo reemergente y dominante a G1, con una frecuencia cercana al 70 %.

Los genotipos P dominantes fueron P[8] para todos los años del periodo, excepto para el año 2011 en el que el tipo dominante fue el P[4]. Este hecho era esperable, ya que las combinaciones más comunes son G1, G3, G4, G9 y G12 con P[8] y G2 con P[4].

Si se analizan las frecuencias en el periodo completo (gráfico 1.2.1), se observa que el genotipo G dominante fue G2 con una frecuencia de 34,0 %. Los tipos que evidenciaron frecuencias menores fueron G3 con 24,6 %, G12 con 19,1 % y G1 con 12,1 %. Además, el genotipo P que dominó el periodo estudiado fue P[8] con un porcentaje cercano al 50 %, seguido por P[4] con 36,4 %.

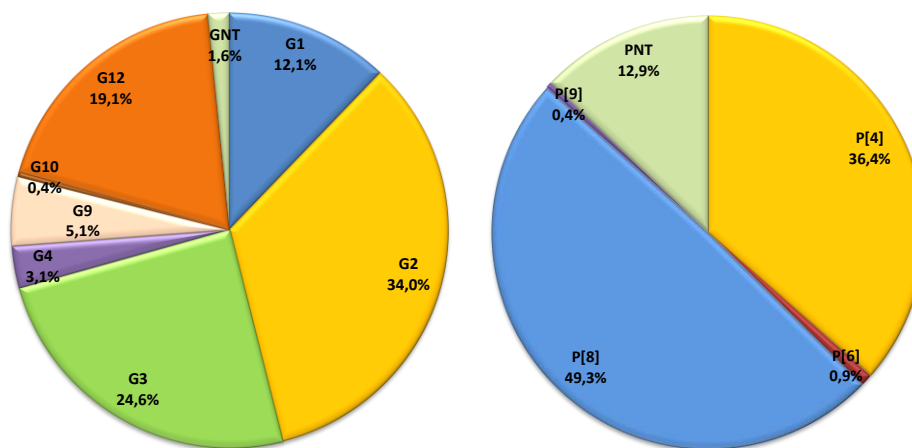


Gráfico 1.2.1. Frecuencia de los genotipos G y P en el GBA, 2008-2014. Porcentajes de genotipos G (izquierda) y genotipos P (derecha) de RVA detectados en Buenos Aires en el período 2008-2014. GNT: G no tipificables, PNT: P no tipificables.

Cuando se examina las frecuencias de los distintos genotipos año a año es posible observar las fluctuaciones de las mismas en el tiempo y la emergencia, reemergencia y desaparición de los distintos tipos de RVA circulando en nuestro medio (ver tabla 1.2.1 y gráficos 1.2.3 y 1.2.4). El primer año del periodo estudiado en este trabajo fue marcado por una gran diversidad de cepas donde no se distingue un genotipo dominante. Dos tipos

G comparten las mayores frecuencias: G3 con 25 % y G9 con el 22,5 %, pero los tipos G1, G2, G4 y G12 circulan también con frecuencias apreciables entre un 7 % y un 17 %. Durante el 2009 hubo codominancia entre G3 y G12 en combinación con P[8], con frecuencias de 48 % y 44 %, respectivamente. En 2010 el tipo G3 mantuvo la frecuencia observada anteriormente, mientras que G12 disminuyó su prevalencia a expensas de la reemergencia de cepas G2, las que alcanzan a representar cerca de un 30 %. La frecuencia del tipo G2 durante el 2011 fue muy alta, superando el 76 %, y disminuyó al 26 % al año siguiente, compartiendo la dominancia con cepas G12 y G3 con porcentajes similares. En el año 2013 se observó nuevamente la dominancia absoluta de las cepas G12, con una frecuencia de alrededor del 60 %; y en el último año, 2014, reemergieron las cepas G1, las cuales mostraron una clara dominancia con una frecuencia cercana al 70 %.

En la tabla 1.2.2 se muestran las frecuencias de las combinaciones G/P detectadas en cada uno de los años del período estudiado. Como se discutió anteriormente para los tipos G, se observa que cada año existe una combinación dominante o codominancia de dos cepas. En este caso, en contraste a los valores arrojados por el análisis de los genotipos G, se observan ciertas diferencias. Por ejemplo, para el primer año del estudio, 2008, la combinación dominante fue G4P[8] con una frecuencia del 20 %. En el año 2009 se observa codominancia de cepas G3P[8] y G12P[8] con la misma frecuencia (31,6 %), siendo que las cepas G3 mantuvieron su dominancia durante el año siguiente. La combinación dominante para el año 2011 fue G2P[4] con una frecuencia muy alta, mayor al 70 %. Al año siguiente, su frecuencia bajó al 28 %, aunque se mantuvo su dominancia. Al observar las combinaciones del 2013, aparecen las cepas G12P[8] como dominantes con un porcentaje elevado, cercano al 60 %. Por último, se observa para el último año estudiado la reemergencia de cepas G1P[8] con una frecuencia del 58,6 %.

En el Gráfico 1.2.2 se muestran las prevalencias totales de las distintas combinaciones G/P para el período completo. Se aprecia que la combinación dominante fue G2P[4] con una frecuencia de 31,7 %, seguido por G12P[8] con 12,1 %, G3P[8] con 10,3 % y G1P[8] que alcanzó un 9,8 %. Además es notable el hallazgo de combinaciones mixtas

(más de un tipo G y/o P) con frecuencias elevadas. El porcentaje para el periodo fue de 14,3 % y, como se ha discutido con anterioridad, estos valores son típicos para entornos de países en desarrollo y su estudio es de gran interés ya que facilitan la evolución del virus por reasociación de segmentos (88).

Tabla 1.2.2. Distribución y frecuencia de combinaciones G/P de RVA en el Gran Buenos Aires, 2008-2014.

Genotipo	2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		Total	% en el periodo de 7 años
	no.	%	no.	%	no.	%	no.	%	no.	%	no.	%	no.	%		
G1P[8]	4	11,4									1	4,5	17	58,6	22	9,8
G1P[6]	1	2,9													1	0,4
G1PNT													2	6,9	2	0,9
G2P[4]	1	2,9			4	26,7	56	70,9	7	28,0	2	9,1	1	3,4	71	31,7
G2P[8]							3	3,8							3	1,3
G2PNT	1	2,9					2	2,5	1	4,0					4	1,8
G3P[4]					1	6,7	2	2,5							3	1,3
G3P[8]	6	17,1	6	31,6	5	33,3	1	1,3	3	12,0	2	9,1			23	10,3
G3PNT	4	11,4	1	5,3			6	7,6	2	8,0	2	9,1			15	6,7
G4P[8]	7	20,0							1	4,0					8	3,6
G9P[8]	4	11,4			1	6,7									5	2,2
G9PNT	2	5,7	1	5,3											3	1,3
G12P[8]			6	31,6	2	13,3			2	8,0	13	59,1	4	13,8	27	12,1
G12PNT							1	1,3							1	0,4
GNTP[4]							1	1,3					1	3,4	2	0,9
GNTP[8]											1	4,5			1	0,4
GNTP[9]	1	2,9													1	0,4
G1+2P[8]													1	3,4	1	0,4
G1+3P[8]					1	6,7									1	0,4
G1+12P[8]	1	2,9											2	6,9	3	1,3
G2+3P[4]					1	6,7	2	2,5							3	1,3
G2+3P[8]							1	1,3							1	0,4
G2+12P[4]									1	4,0					1	0,4
G2+12P[8]	1	2,9													1	0,4
G3+9PNT							1	1,3							1	0,4
G3+10P[8]									1	4,0					1	0,4
G3+12P[8]			4	21,1					7	28,0	1	4,5			12	5,4
G3+12PNT							1	1,3							1	0,4
G9+12P[8]	1	2,9													1	0,4
G9+12PNT	1	2,9													1	0,4
G2P[4]+[8]													1	3,4	1	0,4
G3P[4]+[6]							1	1,3							1	0,4
G1+3+12PNT			1	5,3											1	0,4
G2+3+9P[4]							1	1,3							1	0,4
Total	35	100	19	100	15	100	79	100	25	100	22	100	29	100	224	100

GNT: G no tipificable. PNT: P no tipificable.

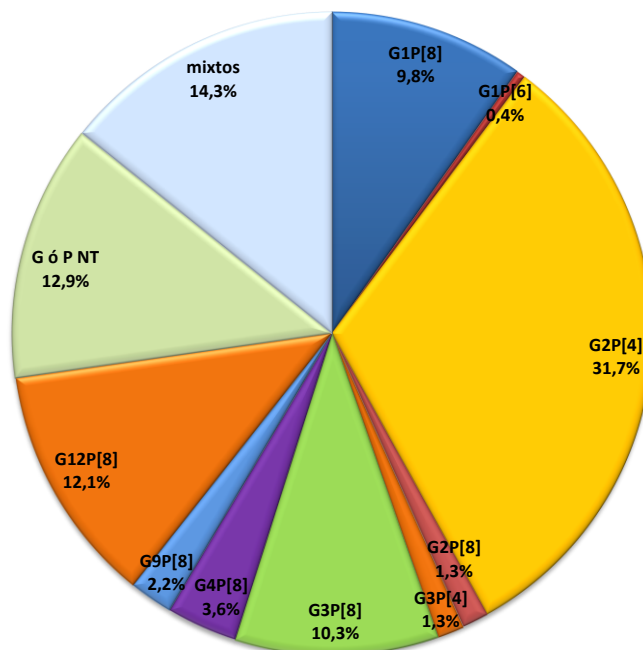


Gráfico 1.2.2. Frecuencia de combinación G/P de RVA detectados en el Gran Buenos Aires, 2008-2014. Mixtos: más de un genotipo G o P para una misma muestra. G o P NT: genotipo G o P no tipificable.

2.2. Fluctuación de genotipos en el tiempo

En las tablas y gráficos anteriores que ilustran los valores totales del período se observa la gran diversidad de tipos G y P que han circulado en el GBA a lo largo de los siete años reportados. No obstante, al analizar la circulación de cepas año a año, generalmente, se observa que en cada período hay una o dos cepas dominantes. En los Gráficos 1.2.3 y 1.2.4 se compilan dichas observaciones en función del tiempo desde 1996 realizadas desde nuestro laboratorio.

En el período estudiado en esta tesis (2008-2014) se evidenciaron tres fenómenos remarcables, los cuales se han profundizado mediante la caracterización de cepas descriptas en las próximas secciones. La primera de estas observaciones es la emergencia de cepas G12P[8] en 2008, que alcanzan el máximo valor de frecuencia en 2009 (31,6 %).

El segundo es la sostenida circulación de cepas G2P[4] durante varios años y su alta dominancia en 2011 (70,9 %). Y el tercero es la alta prevalencia de cepas G1P[8] durante el último año de estudio, hecho que fue acompañado por una notoria incidencia de diarreas severas. Asimismo cabe destacar otras dos observaciones interesantes: la emergencia en la zona del GBA de cepas G3P[8] en 2009, que se transformaron en las cepas dominantes durante el 2010, y la virtual ausencia o muy baja frecuencia de infecciones simples por cepas G1P[8] hasta la mencionada reemergencia abrupta en el 2014.

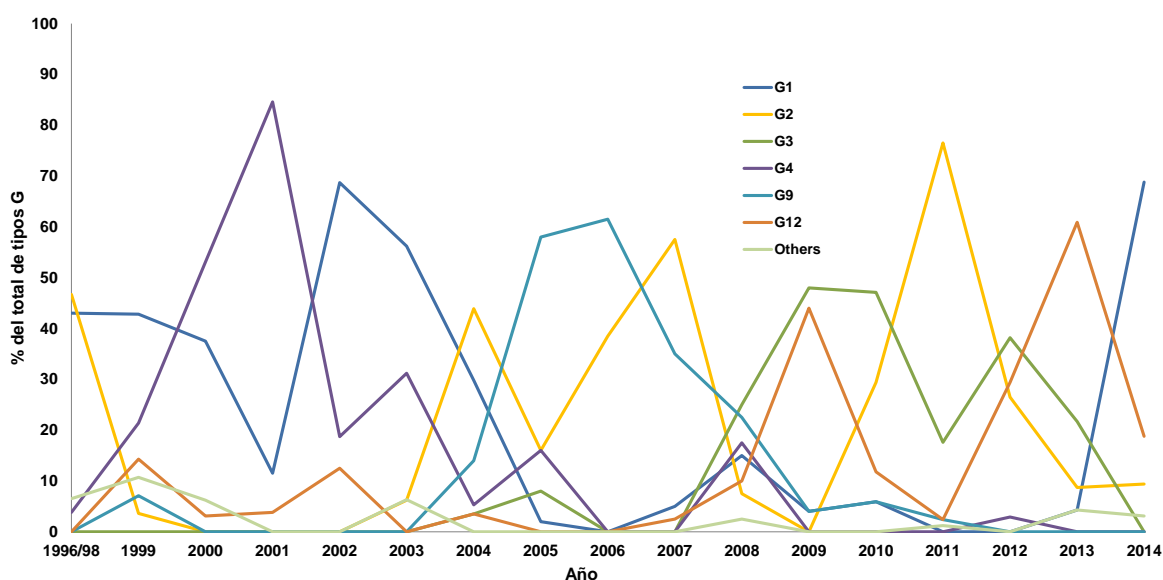


Gráfico 1.2.3. Fluctuación de los genotipos G a lo largo de los años. Se muestra la frecuencia de cada tipo G detectado desde el año 1996 hasta el 2014. En este período están incluidos los años analizados en esta tesis (2008-2014) y estudios reportados anteriormente por nuestro grupo (94, 97, 133, 164).

Cepas G12P[8]

La emergencia descrita aquí se relaciona, y es co-temporal, con su emergencia global. A diferencia de las cepas G12P[9] detectadas en baja frecuencia entre 1999 y 2007 en GBA, en el período reportado en este trabajo el genotipo G12 en combinación con P[8]

fue altamente prevalente. Esta combinación se ha detectado cada año del período 2008-2014 y, en particular ha sido co-dominante con G3 en 2009, con G2 y G3 en 2012 y es el genotipo dominante en 2013, representando alrededor del 59,1 % de las infecciones caracterizadas.

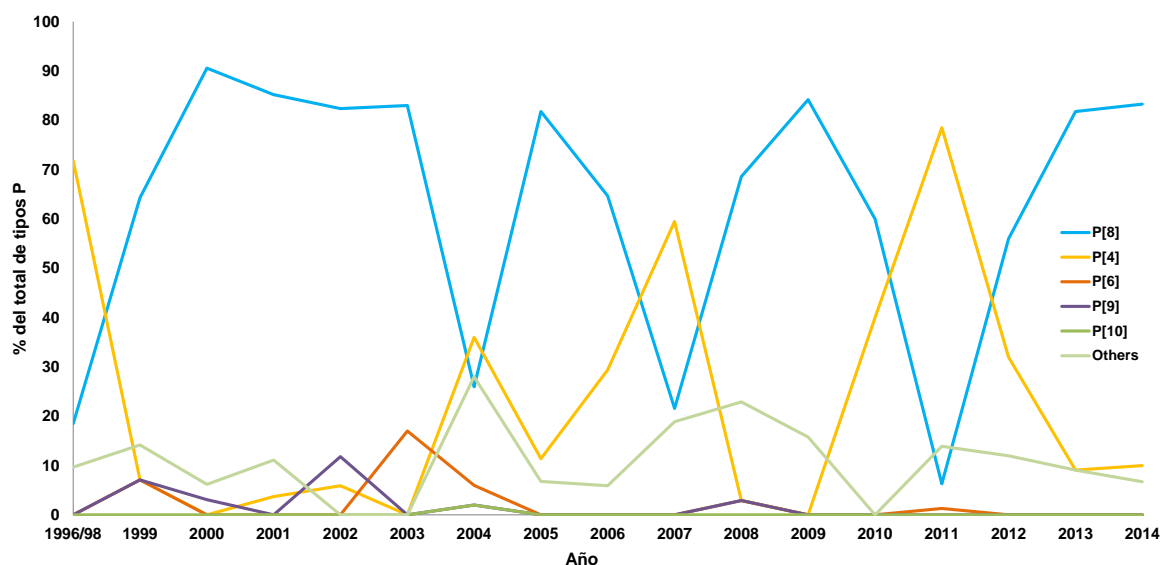


Gráfico 1.2.4. Fluctuación de los genotipos P a lo largo de los años. Se muestra la frecuencia de cada tipo P detectado desde el año 1996 hasta el 2014. En este período están incluidos los años analizados en esta tesis (2008-2014) y estudios reportados anteriormente por nuestro grupo (94, 97, 133, 164).

Cepas G2P[4]

Esta combinación G/P se ha detectado en el GBA con frecuencias variables desde su emergencia en el año 2004 estando ausente únicamente en el año 2009. Así mismo representó el genotipo dominante durante los años 2004, 2007, 2011 y 2012. En 2011, la combinación G2P[4] fue la más frecuente (70,9 %), desplazando a los genotipos G3P[8] y G12P[8]. Su presencia es también muy importante en el 2012 disminuyendo en el 2013 y el 2014. De esta manera, en un lapso de 10 años, se ha podido observar una persistente circulación de este tipo de cepas y un llamativo incremento de su incidencia durante el octavo año de este período. En dicho lapso, la prevalencia de las cepas G2P[4] muestra

dos fases, la primera de ellas se extiende hasta el año 2009 y la segunda desde dicho año en adelante.

Cepas G1P[8]

Durante los seis primeros años de este estudio sólo se han detectado cinco infecciones simples ocasionadas por esta combinación de genotipos, cuatro en el primer año y una en el 2013. Además, se ha detectado una infección en la que se ha identificado la combinación de genotipos G1P[6] en 2008 y solo otras tres detecciones del genotipo G1 en infecciones mixtas durante el período 2009-2013. Este bajo o casi nulo nivel de detección durante un largo período es interrumpido abrupta y sorpresivamente por el alto nivel de detección alcanzado en 2014. En este año las cepas G1P[8] son halladas en el 58,6 % de las muestras analizadas, y este porcentaje que se eleva a más del 70 % cuando se consideran únicamente las detecciones del tipo G, entre las cuales se incluyen no sólo la combinación con P[8] sino también las combinaciones con genotipos P no tipificables y las presentes en infecciones mixtas.

3. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta tesis, junto con resultados previos (94, 133, 165), completan 18 años de continua vigilancia de genotipos en áreas densamente pobladas del Gran Buenos Aires (Argentina). Este lapso comprende un primer período, entre 1996 y 2007, que corresponde a la era previa a la vacunación en el subcontinente sudamericano y reflejaría el patrón natural de fluctuaciones de los genotipos circulantes, mostrando diferencias en las frecuencias y reemplazos que varían en cada uno de los años estudiados. En el presente estudio, llevado a cabo desde el 2008 hasta el 2014, se incluye un período durante el cual varios países del subcontinente han incorporado la vacunación masiva en sus programas. Además, la Argentina licenció las vacunas que, mayormente, se

han usado en la práctica privada. Por esta razón, en nuestro medio la cobertura no ha sido significativa, alcanzando aproximadamente el 7 % de las cohortes (Dr. Eduardo López, comunicación personal).

En el contexto descripto, la circulación de genotipos detallada en los resultados precedentes ofrece algunas particularidades que motivaron la profundización del estudio, caracterizando por secuenciamiento genes específicos de varias cepas de interés. Estos resultados se describen y analizan en las secciones siguientes. Los hallazgos más llamativos y relevantes en cuanto a su posible influencia en el desempeño de la vacuna monovalente seleccionada por todos los países sudamericanos son: i) La emergencia de cepas G12P[8], ii) La reemergencia y prolongada persistencia de cepas G2P[4] y iii) La reemergencia y alta morbilidad de cepas G1P[8].

Como se ha descripto en la introducción, se han definido tres constelaciones genómicas para los RVA humanos cada uno caracterizado por las cepas Wa (*Wa-like*), DS-1 (*DS-1-like*) o AU-1 (*AU-1-like*), siendo las dos primeras mucho más comúnmente detectadas en estudios epidemiológicos que la última (165). En general, las cepas tipo Wa incluyen las combinaciones de genotipos G1, G3, G4, o G9 con P[8] y la vacuna monovalente Rotarix, ampliamente aplicada en Sudamérica, pertenece a este tipo de cepas en tanto que las cepas tipo DS-1 incluyen típicamente la combinación de genotipos G2 con P[4]. Si bien se han observado durante largos períodos y en base a extensos estudios epidemiológicos que las combinaciones antes mencionadas son las más comunes en humanos, estudios filodinámicos han determinado que cepas nuevas pueden evolucionar y adquirir aptitud para diseminarse globalmente en un tiempo relativamente corto de unos 10 años (92).

Durante la segunda mitad de la década de 1990 diferentes cepas con el genotipo G12 han emergido en varios países, y nuestro grupo ha demostrado previamente la introducción, en 1999, en Argentina de una cepa rara del tipo AU-1 con un gen vp7 del tipo G12 linaje II en combinación con P[9] (94, 166). Como se describe más adelante estas cepas han sido detectadas en el GBA hasta el año 2007. El marcado incremento de las

tasas de detección del tipo G12 a partir del año 2008 (Gráfico 1.2.3) forma parte de la emergencia global de una cepa totalmente distinta. La presencia de este genotipo a tasas medias a altas durante todo el período estudiado y su alta prevalencia en 2013, año en que G12 fue el genotipo dominante, evidencia su alta aptitud para la diseminación y persistencia en poblaciones humanas, lo que amerita la realización de estudios de caracterización y su vigilancia continua.

Varios estudios reportan la alta eficacia y efectividad de la vacuna monovalente (tipo Wa) contra cepas del tipo G2P[4] (tipo DS-1). Sin embargo, aún existe cierta controversia, como por ejemplo el hecho de que algunos resultados sugieran que la inmunidad inducida por la vacuna decrece en el segundo año de vida (167-169). Asumiendo que exista alguna diferencia, aunque sea escasa, en la protección inducida hacia los dos tipos de cepas, la generalización del uso de la vacuna monovalente podría hipotéticamente seleccionar cepas G2P[4] (u otras DS-1-like) incrementando su abundancia en el ambiente. Este incremento podría ser independiente de la morbilidad observada ya que los estudios muestran cantidad de casos y severidad, pero no es posible evaluar la cantidad de casos leves e infecciones asintomáticas. De esta forma, dado que la vacuna no induce inmunidad “esterilizante”, las infecciones siguen produciéndose continuamente y el *output* medido por los estudios (protección contra enfermedad y severidad) puede perfectamente indicar altos niveles de protección, y aun así registrarse una selección y enriquecimiento de la circulación de ciertas cepas de forma inaparente.

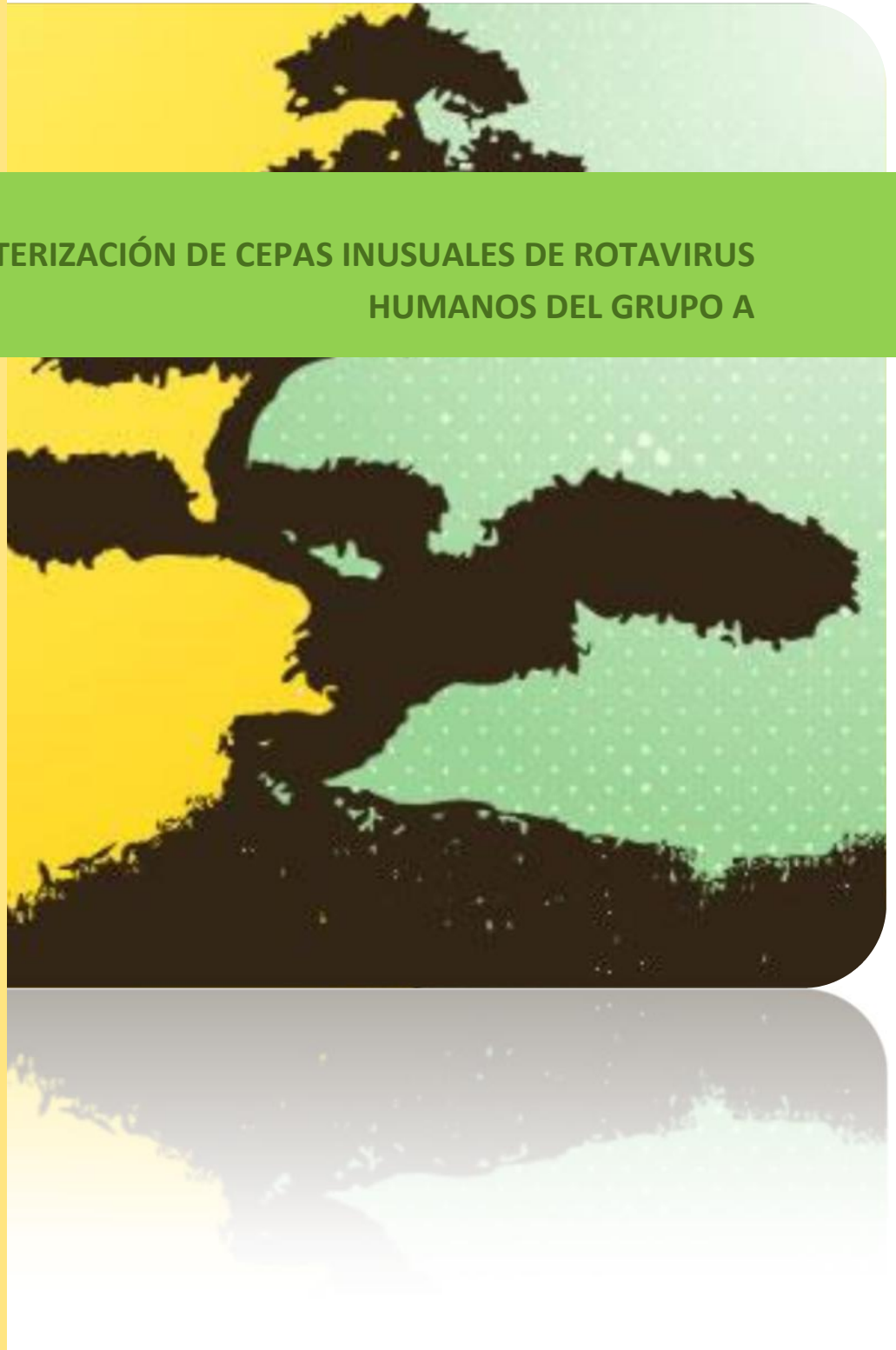
En algunos estudios se sugiere que, naturalmente, las cepas G2P[4] incrementan su circulación cada 8 a 10 años (167, 170, 171) y el incremento observado en Sudamérica en años pasados ha sido atribuido a este ciclo normal (164, 170). Efectivamente, la observación de los resultados integrados de nuestra vigilancia en GBA muestra que el incremento observado en el año 2004 podría atribuirse a esta tendencia natural ya que las cepas G2P[4] habían sido prevalentes previamente durante el período 1996-1998. Estos niveles se mantienen altos a medios desde el 2004 hasta el 2008, no registrándose muestras con este genotipo en nuestra colección en el año 2009. Sin embargo, hay una

reemergencia “atípica” en el 2010, con niveles extremos próximos al 70 % en 2011, altos en 2012 y medios a bajos en 2013 y 2014.

Otro hecho para destacar es la detección de G3P[8] como cepa codominante en 2008 y 2009 y claramente dominante en 2010 ya que es, hasta donde sabemos, la primera vez que el genotipo G3 es detectado con altas frecuencias en Buenos Aires desde mediados de los '90. Esta tendencia también fue detectada por el Sistema de Vigilancia Nacional de Rotavirus (172). Finalmente, el período estudiado se cierra en el año 2014 en cuya estación invernal se registran muchos casos severos e incluso 5 decesos asociados a infecciones por RVA. La genotipificación de estas cepas marca la reemergencia del genotipo G1P[8], cepas ausentes durante un largo tiempo de nuestra casuística. Este hecho es en sí mismo bastante atípico ya que según la experiencia epidemiológica sobre estos virus, ésta es la combinación G/P más frecuentemente detectada.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS INUSUALES DE ROTAVIRUS HUMANOS DEL GRUPO A





CARACTERIZACIÓN DE CEPAS EMERGENTES G12



1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Secuenciamiento nucleotídico

Los amplicones de las muestras seleccionadas para secuenciar fueron purificados a partir del gel de agarosa proveniente de las electroforesis que se utilizaron para determinar el tamaño de las bandas. Para llevar a cabo este proceso se utilizó el *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El secuenciamiento se llevó a cabo en Macrogen Inc., Seúl, República de Corea, utilizando el secuenciador automático ABI3730XL y el *kit* Big Dye Terminator (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos).

Las secuencias nucleotídicas presentadas en esta sección fueron depositadas en la base de datos de secuencias genéticas GenBank del NIH (*National Institutes of Health*) bajo los siguientes números de acceso: KF920553 y KF920563-KF920577 para vp7; KF920585-KF920590 para vp4.

1.2. Análisis molecular y filogenia

Los cromatogramas enviados por Macrogen Inc. fueron analizados utilizando el *software* Chromas (Technelysium, Australia). Para solucionar problemas de ambigüedad o de sectores de poca resolución se contó con dos secuencias por muestra, una realizada con un *primer* directo y otra con uno reverso.

Una vez analizadas las secuencias individuales, se realizaron alineamientos múltiples utilizando el *software* ClustalW (184) contrastando con secuencias relacionadas

disponibles en la base de datos GenBank. A partir de aquí se dedujo la secuencia aminoacídica y se analizaron las distintas regiones antigénicas.

Por otro lado, a partir de los alineamientos ya mencionados, se reconstruyeron árboles filogenéticos a nivel nucleotídico con el método de *neighbor-joining*, calculando la distancia evolutiva con *Kimura 2* parámetros. Como método de soporte se utilizó el *bootstrap*, con 1000 veces de remuestreo. Estos análisis fueron realizados utilizando el *software* MEGA versión 5.1 (185).

1.3. Análisis de coalescencia y filogeografía

Para realizar los ensayos de coalescencia y filogeografía se empleó un *software* llamado BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) (193). Este es un *software* que permite realizar inferencias evolutivas a partir de secuencias moleculares. En este caso se realizaron análisis acerca de la edad del ancestro común más reciente (ACMR) y de relaciones filogeográficas.

Las reconstrucciones filogenéticas bayesianas se llevaron a cabo usando métodos de Monte Carlo basados en cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) implementadas en BEAST. Este *software* incorpora modelos de reloj molecular para estimar la edad de la raíz de los árboles filogenéticos y de cada nodo. Los archivos de entrada para el programa BEAST son generados con otro *software* llamado BEAUti. En éste se debe ingresar el archivo de secuencias alineadas a ser analizado para luego incorporar los datos de fecha y locación, y también los ajustes necesarios para llevar a cabo el análisis. Estos estudios se realizaron usando un modelo de sustitución nucleotídica HKY con grado de variación de distribución gamma y un modelo de reloj molecular relajado lognormal (194). Una vez generados los archivos de entrada para BEAST, los análisis de MCMC fueron corridos con 100 millones de generaciones y examinados con Tracer (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>). Los árboles del clado de máxima credibilidad

(MCCT) fueron anotados usando TreeAnnotator y visualizados en FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Para realizar los análisis de filogeografía se empleó el *software* SPREAD (Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics) (195). Este programa permite visualizar reconstrucciones filogeográficas bayesianas incorporando difusión temporo-espacial. Este programa, además, implementa el cálculo del factor de Bayes para evaluar el soporte de las hipótesis de la difusión histórica entre pares de locaciones discretas. La visualización de estos procesos de difusión se ejecuta a través de un visor de imágenes y con el *software* Google Earth.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de la evolución de ciertas cepas de RVA es uno de los temas centrales de esta tesis. En este capítulo se muestran los análisis de filogenia, coalescencia y filogeografía de las cepas del tipo G12 argentinas para comprender cómo se relacionan entre sí, con cepas del mismo tipo de la región y del resto del mundo.

Es interesante el estudio de estas cepas ya que son consideradas emergentes globales. El genotipo G12 fue detectado por primera vez en Argentina y en la región en el año 1999. Desde ese momento hasta 2007 dichas cepas fueron detectadas en forma esporádica y siempre en baja frecuencia. Durante esta etapa siempre se las encontró asociadas al genotipo P[9]. Sin embargo, como se mostró en el primer capítulo de esta tesis, a partir del año 2008 el genotipo G12 se detectó casi ininterrumpidamente a lo largo de los años y con frecuencias mucho mayores, pero esta vez en asociación al genotipo P[8]. Es por esto que se le ha dado gran importancia a estas muestras y en las secciones siguientes se presentan y discuten los resultados de los estudios realizados sobre varios genes de los dos tipos de cepas G12 que han estado circulando en nuestra región.

2.1. *Análisis filogenético*

2.1.1. Gen vp7

En este estudio se secuenció el gen vp7 de un total de 17 cepas G12 detectadas en muestras pertenecientes a nuestra colección correspondientes a los años 2002 (1 muestra), 2007 (1 muestra), 2008 (2 muestras), 2009 (11 muestras) y 2010 (2 muestras), las cuales se analizaron en conjunto con las dos secuencias adicionales provenientes de muestras del año 1999 y reportadas por nuestro grupo (94, 166). A través de análisis filogenéticos de esas secuencias, así como de otras obtenidas de Argentina, Sudamérica y cepas representantes del genotipo G12 a nivel mundial, se observó que en Buenos Aires desde 1999 y hasta el año 2007 ha circulado el linaje II mientras que desde el año 2008 las cepas circulantes pertenecen al linaje III (figura 2.1). Estos grupos de cepas además de pertenecer a linajes distintos en base a las secuencias del gen vp7 pueden ser diferenciados por su asociación con dos genotipos distintos del gen de la proteína VP4. Las cepas del linaje II (1999-2007) aparecen combinadas con el genotipo P[9] (al menos en aquellos casos en los cuales pudo determinarse el genotipo P) mientras que las del linaje III se combinan con el genotipo P[8] (94, 166).

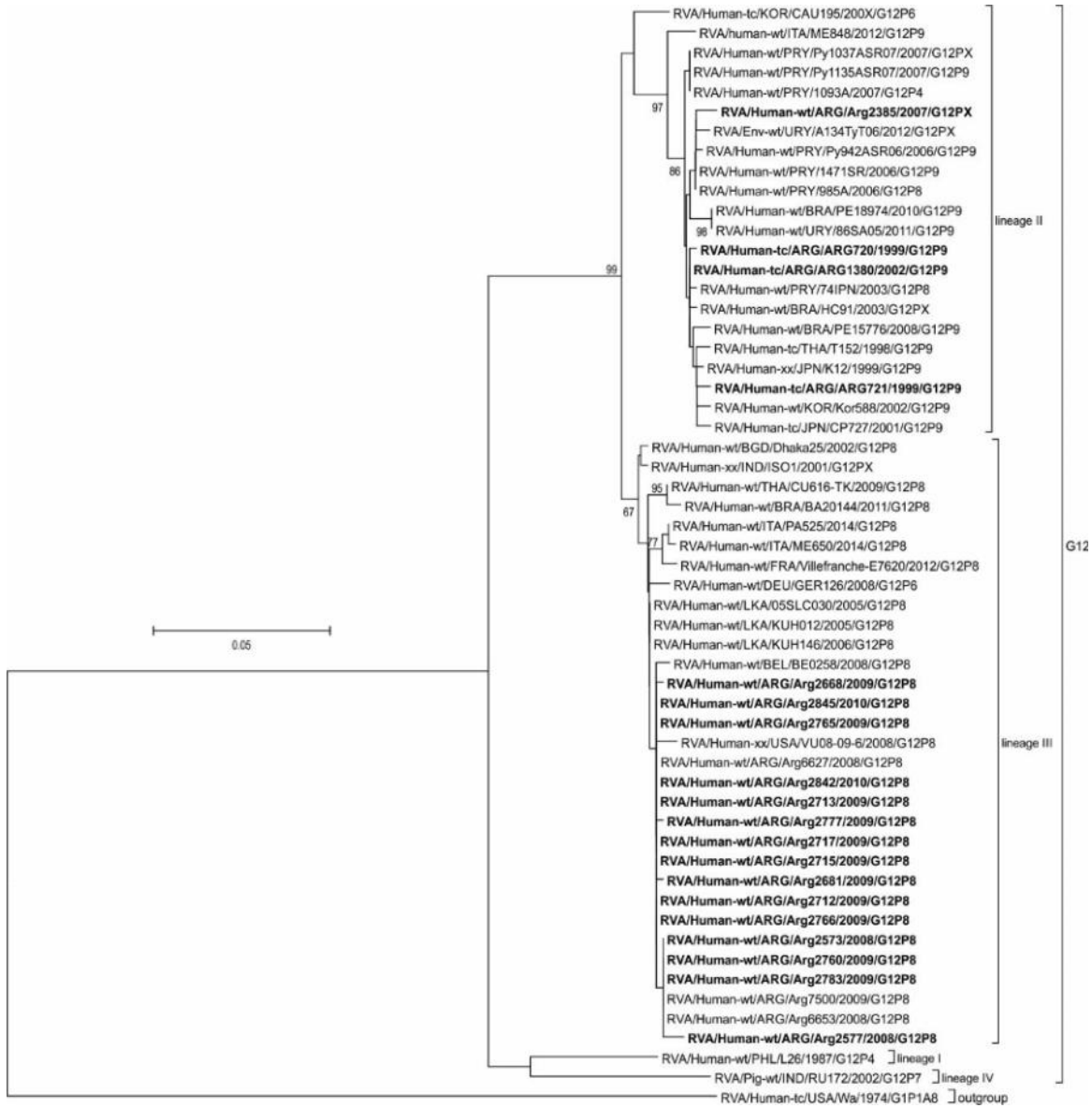


Figura 2.1. Filograma del gen de vp7 de cepas G12. Las ramas que representan las secuencias argentinas obtenidas en el LIV se encuentran resaltadas en negrita.

2.1.2. Gen vp4

Se obtuvo la secuencia del gen vp4 solo en los casos de las muestras caracterizadas como infecciones simples de cepas G12P[8] para evitar ambigüedades al asignar el gen a

una u otra cepa en el caso de las infecciones mixtas. Seis muestras satisficieron esta condición y todas fueron de 2009 (Figura 2.2).

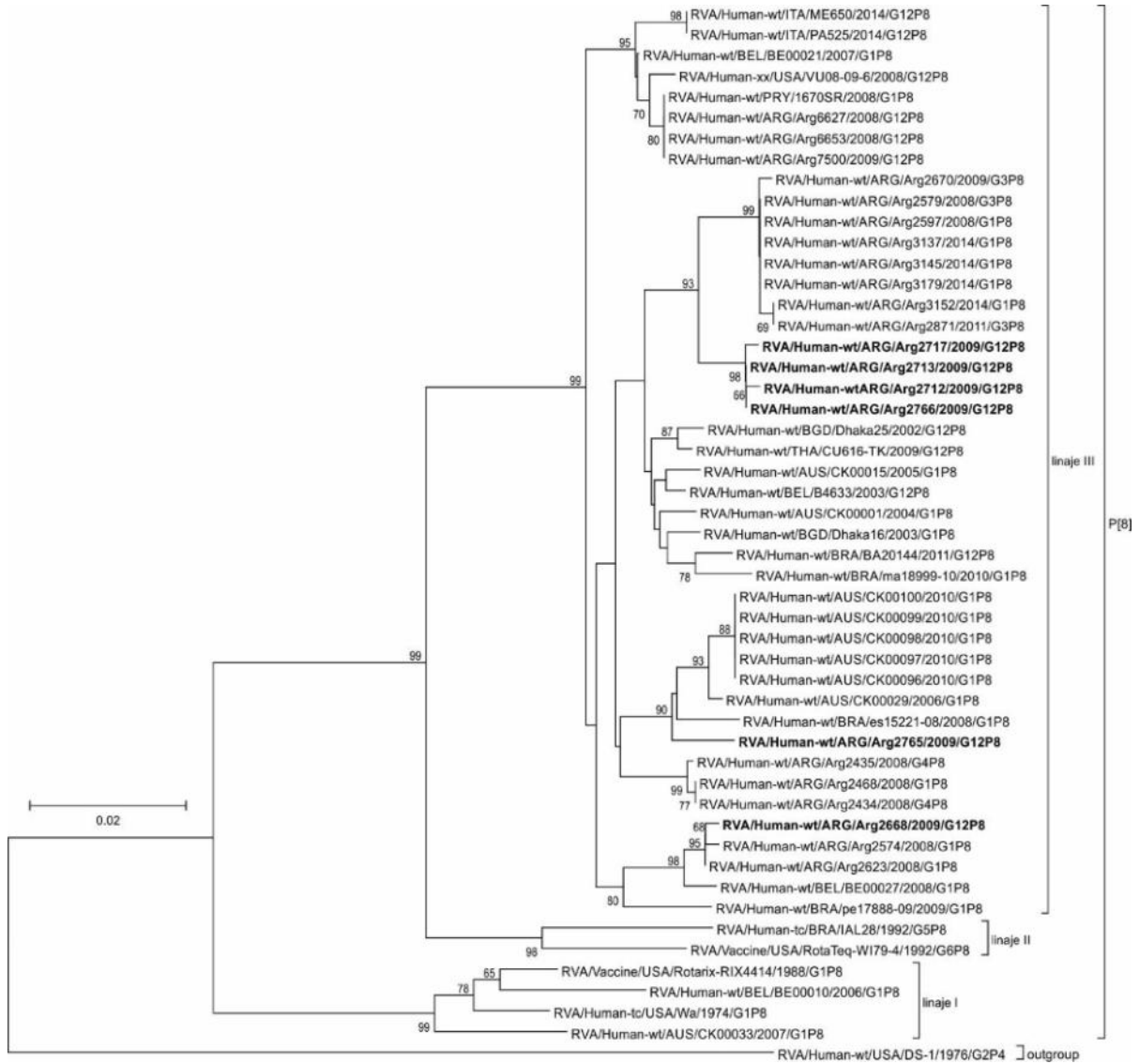


Figura 2.2. Filograma del gen de vp4 de cepas G12P[8]. Las ramas que representan las secuencias argentinas obtenidas en el LIV se encuentran resaltadas.

A partir de las secuencias nucleotídicas se realizó un examen filogenético, el cual indicó que estas secuencias pertenecen al linaje III del genotipo P[8] pero se separan en 3 grupos diferentes, respaldado por altos valores de *bootstrap*. El primer grupo incluye las cepas Arg2712, Arg2713, Arg2717 y Arg2766, las cuales se encuentran asociadas a un grupo de cepas G3P[8] argentinas del 2008, 2009 y 2011, y un grupo G1P[8] que incluye una cepa del 2008 y varias del 2014. El segundo grupo incluye la cepa Arg2765, la cual se asocia con una cepa G1P[8] brasilera del 2008 y un grupo de cepas australianas incluidas en un estudio en el que se reportó un brote de infecciones por RVA de genotipo G1P[8] en un entorno en el cual se aplica la vacuna monovalente (178). Por último, el tercer grupo incluye la cepa Arg2668, y también se observa que esta cepa agrupa con muestras G1P[8] del año 2008 analizadas en nuestro laboratorio. Este análisis deja en claro que no se puede establecer un patrón tan marcado de segregación como el que pudo observarse para el gen vp7. A la vez nos permitió ver que las secuencias del gen vp4 de cepas con genotipo P[8] modernas agrupan todas dentro del linaje III sin importar si están asociadas a G1, G3, G4 o G12.

2.1.3. Gen nsp1

Como parte de un estudio en curso de caracterización y búsqueda de eventos de reasociación de cepas G12 del linaje II, se realizó el secuenciamiento del gen nsp1 de una cepa del año 2002 aprovechando el hecho de que ese gen había sido estudiado en dos muestras del año 1999 (166). Como se observa en la Figura 2.3, la secuencia en cuestión (muestra Arg1380) agrupa con otras secuencias de cepas G12 pertenecientes al genotipo A3 de países vecinos como Paraguay y Brasil, y a su vez este clado se asocia con otros que contienen varias cepas bovinas (en su mayoría), algunas humanas (entre las que se encuentra la cepa de referencia del tercer genogrupo en orden de abundancia en humanos, AU-1) y la cepa de la vacuna pentavalente (RotaTeq) que es un reasociante bovino-humano. En contraste, los aislados originales Arg720 y Arg721 de 1999 pertenecen al linaje A12 y se asocian sólo con secuencias de nsp1 de cepas humanas G12P[9], como la

primera detectada a nivel mundial T152, y otras de referencia a nivel mundial como las K12 y Kor588.

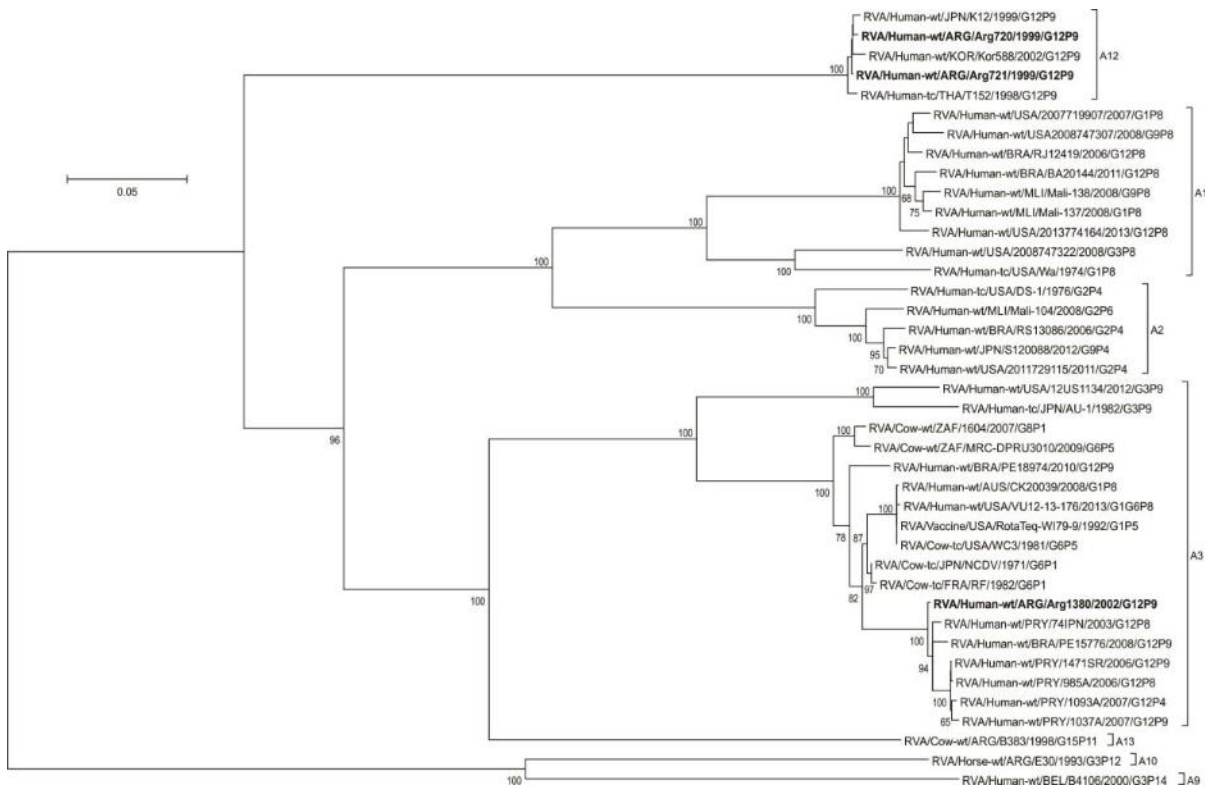


Figura 2.3. Filograma del gen de nsp1 de cepas G12. Las ramas que representan las secuencias argentinas obtenidas en el LIV se encuentran resaltadas.

2.2. Coalescencia y filogeografía de cepas G12 del linaje II

Dada la elevada relación filogenética de cepas G12 del linaje II Asiáticas, argentinas, de la región Sudamericana y europeas que han circulado entre mediados de la década de 1990 hasta años recientes (Italia en 2012) decidimos realizar estudios de coalescencia y filogeográficos sobre las 23 secuencias disponibles de cepas G12 de este linaje.

2.2.1. Análisis de coalescencia

Las secuencias a estudiar son las que conforman el clado del linaje II en el árbol filogenético mostrado en la figura 2.1. Se decidió realizar la inferencia del ancestro común más reciente (ACMR) sólo de este linaje de cepas G12 ya que es un grupo que despierta particular interés en nuestro laboratorio debido a que en 1999 fue hallada la primer muestra G12 de Argentina y de la región. Esta muestra es la Arg720 que, junto con la Arg721 fueron previamente estudiadas por genoagrupado en colaboración con el Dr. Nakagomi en Japón y se ha demostrado que son cepas que se habían introducido prácticamente sin cambios desde el lejano Oriente en Argentina hacia el final de la década de 1990 (166). Además, sólo existe una muestra, a nivel mundial, que data de antes que la argentina y es la tailandesa T152. De aquí en adelante se han reportado casos esporádicos de cepas con estas características de genotipo y linaje en varios países asiáticos y en la región sudamericana, más específicamente en Brasil, Paraguay y Uruguay. La última cepa detectada en Argentina, que forma parte de nuestro muestrario, es la Arg2385 del año 2007. Mientras que las cepas G12 del linaje II más modernas reportadas corresponden a Brasil (2010), Uruguay (2011) e Italia (2012). Es importante aclarar que para realizar este tipo de estudios es necesario contar con las fechas de cada cepa.

En la Tabla 2.1 se muestran los datos de ACMR y tasa de mutación obtenidos a partir del análisis de coalescencia. La tasa de mutación se muestra en sustituciones nucleotídicas por sitio por año, y también se muestran las edades e intervalos de confianza del ACMR del linaje II de cepas G12 y de los nodos en los que están involucradas las cepas argentinas. Además, esta última información se esquematiza en el árbol de la Figura 2.4.

Como puede apreciarse en la tabla 2.1, la tasa de mutación del gen de VP7 de las cepas del linaje II del genotipo G12 es de $1,26 \times 10^{-3}$ ($0,59 - 2,04 \times 10^{-3}$) sustituciones/sitio/año. Estas tasas de evolución son elevadas, pero si se tienen en cuenta las tasas de mutación que se han reportado para varios virus con genoma de RNA se mantienen dentro de los valores esperados (215). Además, los valores obtenidos aquí

resultaron comparables con los ya reportados para el genotipo G12, que son de $1,66 \times 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año (92).

Tabla 2.1. Tasa de mutación y edades de los ACMR de cepas G12 del linaje II.

Parámetro	Cepa	Valor
Tasa de mutación	Global	$1,26 \times 10^{-3}$ [0,59 - 2,04]
	Global	1994 [1988 - 1998]
ACMR (años)	Arg720	1998 [1996 - 1999]
	Arg721	1997 [1994 - 1999]
	Arg1380	2001 [2000 - 2002]
	Arg2385	2005 [2004 - 2006]

La **tasa de mutación** se indica en sustituciones nucleotídicas/sitio/año.

AMRC: ancestro común más reciente.

Por otro lado, se logró inferir la edad del ancestro común más reciente del linaje II y se halló que está datado en 1994 (1988 – 1998). Esto nos indica que es un grupo de cepas relativamente moderno y que a pesar que su primer hallazgo fue en 1998, es posible que circule desde algunos años antes. Si se analizan las dos cepas argentinas de 1999, primeras en la región sudamericana, se observa que el año del nodo de la Arg720 es 1998 y de la Arg721 es 1997. El hecho de apreciar este tipo de diversidad en cepas aisladas dentro del mismo mes (Arg720 colectada el 12-10-99 y Arg721 el 21-10-99) indicaría que la introducción desde Oriente fue relativamente abundante o que estuvo circulando durante algún tiempo como para permitir apreciar cierta heterogeneidad. Asimismo, se aprecia que el nodo de la Arg1380 de 2002 proviene de un nodo ancestral común con una cepa paraguaya datado en 2001 y por último el de la Arg2385 de 2007 deriva de un nodo del año 2005 que da origen a la cepa Argentina y otra de Paraguay.

2.2.2. Análisis de filogeografía

Una de las principales ventajas de implementar el análisis de filogeografía es que nos permite enmarcar el proceso de dispersión de las cepas de rotavirus estudiadas en escalas de tiempo. Al igual que para los ensayos de coalescencia, se utilizaron sólo las cepas correspondientes al linaje II del genotipo G12. Éstas son las mismas 23 incluidas desde el análisis filogenético del gen vp7 que se mostró en la Figura 2.1, donde se encuentran las cuatro cepas argentinas de nuestra colección pertenecientes a este linaje y genotipo.

Se muestra en la Figura 2.5 el proceso de dispersión temporo-espacial de las cepas ya mencionadas. Los colores de las líneas indican la temporalidad, siendo de color violeta las más antiguas y virando al amarillo para las más modernas. Además se muestran círculos en las distintas locaciones y el tamaño de éstos aumenta de acuerdo al número de cepas reportadas en cada ciudad. La primer cepa, T152, fue reportada en Tailandia en 1998. Se observa en la figura que desde aquí se habría dispersado a dos regiones bien distantes hacia el fin de la década de 1990, la zona de Japón y Corea y la región Sudamericana. Hay varias cepas identificadas en Japón entre 1999 y 2001 desde donde podría haberse trasladado a Corea del Sur con identificaciones de linaje II en el año 2002 y según este análisis no hubo difusiones posteriores desde este sitio. El segundo lugar hacia donde la cepa tailandesa se habría dispersado fue Buenos Aires, donde se han hallado las cepas Arg720 y Arg721 en 1999. Una vez establecidas en Argentina, con otra aparición en el año 2002, estas cepas se dispersaron por la región hacia Brasil y Paraguay en 2003. Según datos de prevalencia, este tipo de cepas circuló durante varios años (aunque a bajo nivel), y se dispersó en los países del Cono Sur de Latinoamérica. Según el presente análisis filogeográfico podría incluso postularse un intercambio de ida y vuelta entre países, lo que puede inferirse del hecho de que las primeras detecciones fueron en el GBA pero la última muestra de este tipo hallada en Buenos Aires en 2007, la Arg2385, habría proveniendo de recirculación desde Paraguay.

De esta forma, hasta el año 2011 habría habido varios procesos de difusión entre Argentina, Brasil y Paraguay y en este mismo año se halló por primera vez una cepa de genotipo G12 del linaje II en Uruguay, la cual habría migrado desde Brasil. La última hallada en la región sudamericana fue en el 2012 también en Uruguay, proveniente de Paraguay, pero esta vez se aisló de una muestra ambiental. El último hallazgo de estas cepas se reportó en Italia, en la ciudad de Mesina en el año 2012 y el análisis indicaría su origen en cepas de Paraguay.

3. CONCLUSIONES

Como se comentó previamente, el genotipo G12 ha sido reportado de forma creciente desde mediados de los 90's en muchos países hasta convertirse en uno de los principales genotipos circulantes de forma global en los últimos años (92). A lo largo del tiempo en que hemos mantenido la vigilancia de cepas de RVA en el Gran Buenos Aires hemos podido describir la emergencia de dos tipos principales de cepas G12. Las primeras detectadas durante septiembre de 1999 fueron caracterizadas como del tipo AU-1 y con la combinación de genotipos G12P[9]. Posteriormente, emergen en el 2008 cepas del tipo Wa y con la combinación G12P[8]. Considerando el hecho de que pertenecen a dos constelaciones genómicas totalmente diferentes y el hecho de que las detectadas más recientemente corresponden al tipo más común en humanos y parecen ser el producto de la evolución de 10 años, no es extraño que éstas últimas aparezcan con frecuencias mucho mayores. Este tipo de cepas G12 han llegado a ser dominantes en varias temporadas en el GBA y han persistido con frecuencias importantes hasta el último año de estudio de esta tesis.



Figura 2.5. Difusión espacio-temporal desde el año 1999 al 2012 de cepas G12 del linaje II basado en el gen vp7. La imagen fue generada con el programa SPREAD. El color de las líneas indica la edad del proceso de dispersión entre las distintas locaciones, siendo violeta para los procesos más antiguos y virando al rojo cuanto más moderno es. Además se muestran círculos en cada locación donde el tamaño del mismo aumenta de acuerdo al número de cepas reportadas en esa ciudad.

No obstante sus bajos niveles de frecuencia, las cepas del tipo AU-1 han persistido durante varios años en el GBA y se han detectado en otros países de la región (188, 197-199) en años posteriores a su aparición en Argentina. Estas cepas son de interés dado que son las más divergentes genética y serotípicamente con respecto a las cepas vacunales con el consiguiente riesgo de que se comporten como cepas con mayor capacidad de evasión a la respuesta protectora inducida por aquellas. Es con esta lógica que, como parte de un proyecto en curso, se realizaron estudios de secuencia en tres cepas de tipo AU-1 de años posteriores a su detección inicial para obtener datos sobre su evolución por reasociación de segmentos y mutaciones puntuales. En el caso del gen *vp7*, se han secuenciado en éste y en estudios previos un total de cuatro cepas, dos del año 1999, las Arg720 y 721, una del 2002, la Arg1380 y otra (la última detectada en Argentina) del año 2007, la Arg2385. Si bien una de las cepas de 1999 (720) es prácticamente igual a la del 2002, es posible observar en la Figura 2.1 una cierta divergencia con respecto a la otra de 1999 (721) y a la del año 2007. De hecho, según el análisis de coalescencia (Figura 2.4) la cepa Arg720 o un ancestro muy próximo sería el origen de las cepas diseminadas a los países vecinos y de la última cepa detectada en Italia.

En base al estudio de la proteína NSP1 de estas cepas es posible sugerir que el aislado del año 2002 (Arg1380) sería un producto de reasociación de cepas relacionadas a Arg720 con cepas bovinas o humanas relacionadas a cepas animales. La caracterización por secuenciamiento del gen *nsp1* y su estudio filogenético lo ubican como perteneciente al genotipo A3 en un clúster bien diferenciado. En la Figura 2.3 se han incluido todas las cepas reportadas a la fecha con dicho genotipo y se aprecia que las secuencias que agrupan en el mencionado clúster se han reportado exclusivamente en cepas G12 de la región y siempre detectadas posteriormente respecto a las argentinas de 2002, lo cual sugiere que podrían configurar derivados de la Arg1380.

A partir de los ensayos de coalescencia y filogeografía del gen *vp7* se pudo estudiar y profundizar acerca de la evolución de cepas G12 del linaje II, que por lo general se encuentran asociadas a P[9]. Por un lado se halló que el ancestro común más reciente de

estas cepas data del año 1994 (con un rango entre 1988 y 1998), lo cual ubica el primer reporte en Tailandia algunos años después del surgimiento del linaje. Esto indica que pudo haber circulado desde antes, tal vez a muy bajo nivel, sin ser detectado. Por otro lado, mediante filogeografía, se trazó la historia espacio-temporal de las cepas de este linaje, la cual indicó que la cepa comenzó su circulación conocida desde Tailandia hacia otros países asiáticos y hacia Sudamérica, más específicamente hacia Argentina. Y una vez en la región latinoamericana puede trazarse una historia de propagación a varios países de la zona como Brasil, Paraguay y Uruguay, donde ha circulado durante más de 10 años. Por último, es posible decir que la historia conocida de esta dispersión finalizaría con una migración desde la región Sudamericana hacia Europa en los últimos años. Los últimos reportes de estas cepas fueron de Uruguay en 2011 (198) e Italia en 2012 (216).

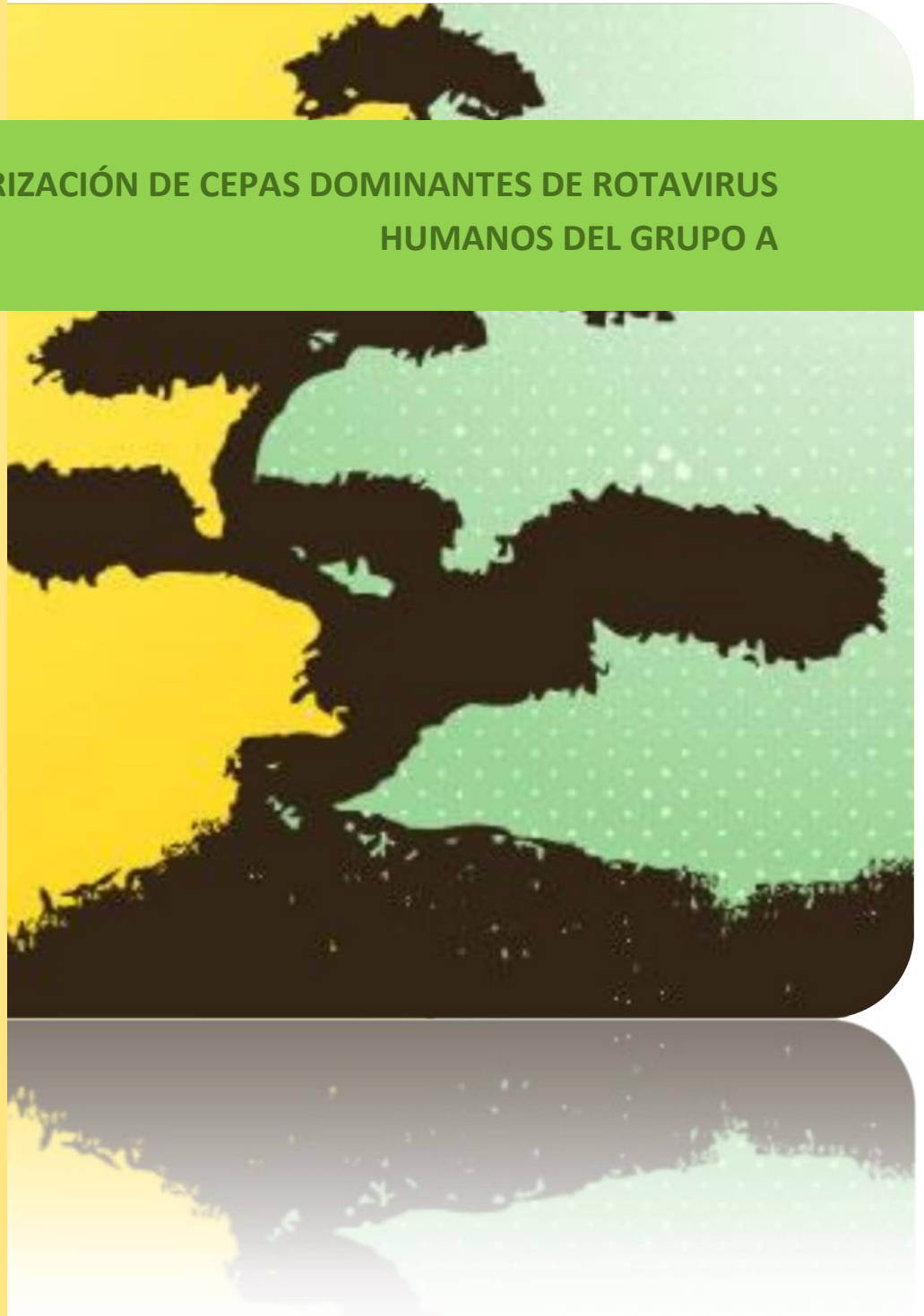
Si bien las cepas G12 del linaje II no aparecen en nuestra casuística desde el 2007, sí aparecieron en otros países de Sudamérica y en Europa. Mediante los estudios de secuenciación, y las inferencias filogenéticas, filogeográficas y de coalescencia a las que se pueden acceder hoy en día podemos sumar información valiosa para estudiar en profundidad el comportamiento evolutivo de cepas de este tipo. Creemos que un estudio profundo de este tipo es valioso por las consideraciones hechas más arriba, y por el hecho de que, como indicaría la detección de un posible reasociante bovino-humano, podrían ser cepas con cierta facilidad para infectar humanos y animales, pudiendo establecer reservorios en estos últimos.

Desde un punto de vista genómico, las cepas G12P[8] emergentes a partir del año 2008 son totalmente distintas a las discutidas en los párrafos previos siendo las primeras del tipo Wa con un gen vp7 G12 del linaje III y las últimas del tipo AU-1 con un gen vp7 G12 del linaje II. Mientras estas últimas fueron detectadas inicialmente en Tailandia, países del lejano Oriente y el cono sur de América a bajas tasas de frecuencia (188, 197, 198), las cepas tipo Wa actuales parecen ser el resultado de la evolución de distintos tipos de cepas G12 del linaje III y se hallan en altas frecuencias globalmente distribuidas (92). Las cepas G12P[8] caracterizadas por secuenciamiento en esta tesis son detectadas

simultáneamente a nivel nacional y reportadas por el Sistema Nacional de Vigilancia (172). En dicho trabajo se las estudia por genoma completo confirmando su pertenencia al tipo Wa con la combinación de genotipos siguiente: G12-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1. En nuestro estudio las cepas G12P[8] se mantienen con prevalencias medias a altas desde 2008 hasta 2014. Esta persistencia y altas frecuencias (más del 60% en 2013) en el GBA se observa en otros estudios a nivel global sugiriendo que esta cepa representa un producto de 10 años de evolución altamente adaptado para la infección y diseminación en humanos (85, 92, 165). La emergencia de estas cepas G12 a nivel global genera ciertas dudas sobre la efectividad de las vacunas contra ellas aunque un estudio de neutralización cruzada ha establecido que, en principio, existen buenos niveles de respuestas con cepas tipo Wa. Por esta razón los autores concluyen que, en principio, sería esperable obtener buenos niveles de protección contra enfermedad ocasionada por las cepas G12P[8] aplicando vacunas del tipo Wa como la monovalente Rotarix (196).

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DOMINANTES DE ROTAVIRUS HUMANOS DEL GRUPO A



PARTE I

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS G2P[4]



1. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología referida a secuenciamiento nucleotídico, análisis de secuencias y reconstrucción de árboles filogenéticos y análisis de regiones antigénicas se detalla en la sección I del capítulo II.

Las secuencias nucleotídicas presentadas en esta sección fueron depositadas en la base de datos de secuencias genéticas GenBank del NIH (*National Institutes of Health*) bajo los siguientes números de acceso: KF920554- KF920562 para vp7; KF920578- KF920580, KF920584 y KF920591- KF920596 para vp4.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como fue discutido en secciones anteriores, se observó a partir de estudios de la fluctuación de genotipos la predominancia de las cepas G2P[4] en un largo período de tiempo. Debido a este hecho remarcable se decidió profundizar el estudio de estas cepas mediante análisis filogenéticos para determinar las relaciones evolutivas con cepas pares de la región y mundiales tanto del gen de VP7 como el de VP4. Además, se realizaron estudios de las regiones antigénicas de la proteína VP7, codificada por el segmento 9 de los rotavirus.

2.1. Análisis filogenéticos

2.1.1. Gen vp7

Se obtuvo un total de 9 secuencias del gen vp7 a partir de las muestras caracterizadas como G2P[4]. Tres de ellas fueron colectadas en el año 2007 y 6 en el período 2010 - 2011 (3 de cada año), siendo representativas de las dos fases de las cepas G2 circulantes antes mencionadas.

Para realizar los alineamientos que se utilizaron como partida al realizar los árboles filogenéticos, se ha realizado una búsqueda de secuencias nucleotídicas de los genes vp7 y vp4 de cepas caracterizadas como G2P[4] en la base de datos GenBank a nivel mundial y prestando especial atención a las cepas regionales.

El análisis filogenético del gen vp7 indica que todas las secuencias de esta colección pertenecen al linaje II del genotipo G2, pero segregan en grupos diferentes. Las cepas G2 correspondientes a 1997, secuenciadas previamente (164), y las de 2007, secuenciadas en el marco de esta tesis, están más relacionadas entre sí que las del grupo obtenido durante 2010-2011, que contiene 6 secuencias de vp7 casi idénticas (Figura 3.1.1). Resulta interesante notar que las cepas que circularon en Brasil durante 2008 y 2009 están muy relacionadas con este grupo que emergió en Argentina en el año 2010. De manera similar, algunas secuencias de cepas circulantes en Brasil durante 2005 y 2006 están cercanamente relacionadas a cepas argentinas aisladas en el 2007.

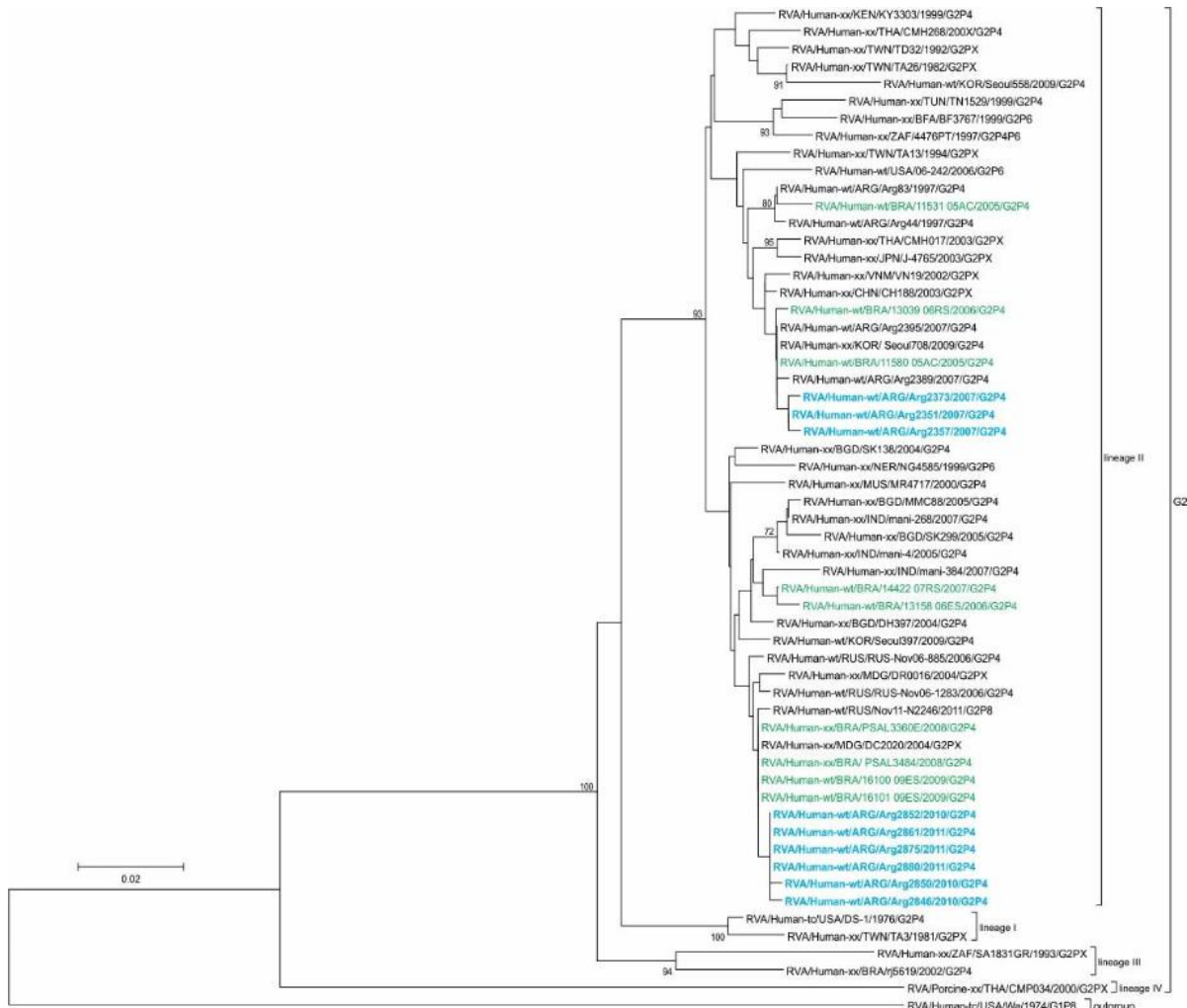


Figura 3.1.1. Filograma del gen vp7 de cepas G2P[4]. Las ramas que representan las secuencias argentinas obtenidas en el LIV y secuenciadas en este trabajo se encuentran resaltadas de color celeste, mientras que las cepas brasileras relacionadas se encuentran resaltadas en color verde.

Cabe señalar que las Figuras 3.1.1 y 3.1.2 se incluyen solo algunas secuencias representativas de un gran número de secuencias casi idénticas depositadas en GenBank y reportadas para Brasil durante el período 2005-2009 (106). Además, para el análisis

filogenético se utilizaron todas las secuencias disponibles en GenBank, pero para mayor claridad, solo se muestran en las figuras las secuencias representativas más relacionadas.

2.1.2. Gen vp4

Por otro lado, se obtuvo la secuencia del gen vp4 de 10 muestras caracterizadas como G2P[4]. De éstas, 3 son de 2007, 1 de 2008, 3 de 2010 y 3 de 2011. Todas las secuencias pertenecen al genotipo P[4] linaje V. El análisis filogenético confirmó las relaciones establecidas en base al gen vp7 de las cepas argentinas entre sí y con las cepas brasileras (Figura 3.1.2).

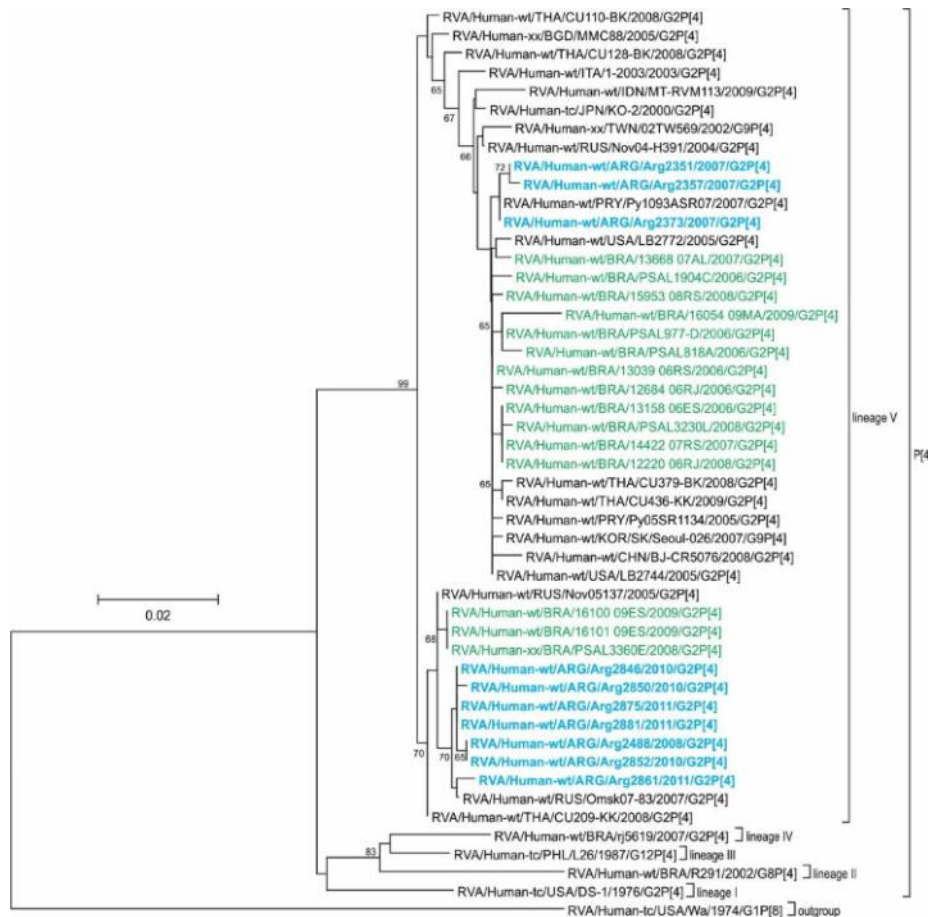


Figura 3.1.2. Filograma del gen de VP4 de cepas G2P[4]. Las ramas que representan las secuencias argentinas obtenidas en el LIV se encuentran resaltadas en negrita y de color celeste, mientras que las cepas brasileras relacionadas se encuentran resaltadas en color verde.

Se han definido tres constelaciones de genotipos para los RVA humanos: *Wa-like*, *DS-1-like* y *AU-1-like*, siendo los dos primeros mucho más comunes en estudios epidemiológicos, mientras que el último es muy poco común (165). En general, los genogrupos *Wa-like* incluye genotipos combinados de G1, G3, G4 o G9 con P[8] (como la cepa incluida en la formulación de la vacuna monovalente Rotarix) mientras que *DS-1-like* incluye combinaciones del genotipo G2 con P[4]. Como se ha discutido en la parte II del capítulo I de esta tesis, los altos niveles de eficacia y efectividad de la vacuna monovalente contra las cepas G2P[4] se ha demostrado en varios estudios, pero aún existen algunas preocupaciones y controversias sobre el tema. Como ha sido mencionado, algunos resultados sugieren que la inmunidad disminuye en el segundo año de vida de los niños vacunados (167-169). Asumiendo esto, la generalización del uso de una vacuna monovalente podría seleccionar cepas *DS-1-like*, como las G2P[4], incrementando la abundancia de éstas. En algunos estudios se describió un ciclo de recurrencia para las cepas G2P[4] cada 10 años (167, 170, 171) y el incremento observado en Sudamérica durante los últimos 10 años se ha atribuido a fluctuaciones normales (164, 170). En nuestro caso, mostramos aquí una larga prevalencia de cepas G2P[4] en Buenos Aires que resulta llamativa y atípica, la cual se produjo en 2 fases comenzando en 2004 y reemergiendo en 2010, año en el que las cepas se volvieron altamente prevalentes. Luego de un año de ausencia (2009), esas cepas alcanzaron casi un 30 % de los tipos G detectados en 2010 y más del 75 % en 2011. Las secuencias de VP4 y VP7 de esas cepas circulantes durante 2010 y 2011 fueron altamente similares a un subgrupo circulante en Brasil en 2008 y 2009. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que esas cepas G2P[4] se introdujeron en Argentina desde Brasil.

2.2. Caracterización molecular. Análisis de secuencias aminoacídicas

2.2.1. Regiones antigénicas de VP7

De acuerdo a los resultados arrojados por el análisis filogenético de esta sección, se ha decidido contrastar las secuencias aminoacídicas de la proteína VP7, más específicamente algunas de las regiones antigénicas, de las cepas G2P[4] argentinas con sus pares brasileñas. Como fue explicado anteriormente, a partir de los alineamientos de secuencias nucleotídicas se dedujeron las secuencias aminoacídicas para poder realizar la comparación de las regiones antigénicas. Además de las cepas argentinas y brasileñas, se incluyeron la cepa de referencia DS-1, la cepa Wa y las cepas vacunales de Rotarix y de Rotateq.

El análisis de las secuencias aminoacídicas predichas de las regiones antigénicas B, C y F de VP7 mostró solamente una sustitución (242 S → N) consistente entre las cepas circulantes en ambas fases en Argentina, mientras que el mismo análisis realizado para la proteína VP4 no mostró ningún cambio significativo (no mostrado). Este cambio en la región antigénica F de la secuencia de la proteína VP7 también se comparte con las cepas circulantes en Brasil durante 2006 (Tabla 3.1.1). Es difícil relacionar este tipo de cambios a la selección de cepas por inmunidad inducida por la vacuna. Para ayudar a esclarecer este punto sería necesario establecer si hay cambios significativos en ensayos de neutralización de sueros provenientes de individuos vacunados contra ambas variantes de las cepas G2 o contra recombinantes que llevan ambas variantes de VP7 en un mismo genoma. Sin embargo, debido a que los epítopes T o B en varias proteínas de rotavirus no relacionadas a las regiones clásicas de neutralización de VP7 podrían estar implicados en la protección cruzada producida por vacunas que contienen cepas Wa-like contra cepas DS-1-like (186, 128), sería muy interesante extender este análisis a una comparación de genomas completos.

Tabla 3.1.1. Análisis de regiones antigénicas de la proteína VP7 de cepas G2P[4] de RVA.

Cepa	Regiones antigénicas de la proteína VP7																																		
	B (142-152)											C (208-221)											F (233-242)												
	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242
RVA/Human-wt/USA/DS-1/USA/1976/G2P[4]	M	R	Y	D	N	T	S	E	L	D	A	K	T	T	D	V	N	T	F	E	I	V	A	S	S	V	N	H	K	I	N	I	S	I	N
RVA/Human-wt/ARG/Arg44/1997/G2P[4]
RVA/Human-wt/ARG/Arg83/1997/G2P[4]
RVA/Human-wt/ARG/Arg2351/2007/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/ARG/Arg2357/2007/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/ARG/Arg2373/2007/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/ARG/Arg2389/2007/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/ARG/Arg2395/2007/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/ARG/Arg2846/2010/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/ARG/Arg2850/2010/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/ARG/Arg2852/2010/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/ARG/Arg2861/2011/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/ARG/Arg2875/2011/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/ARG/Arg2881/2011/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/BRA/rj5619/2002/G2P[4]
RVA/Human-wt/BRA/rj5323/2002/G2P[4]	S
RVA/Human-wt/BRA/11531_05AC/2005/G2P[4]
RVA/Human-wt/BRA/11580_05AC/2005/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/BRA/13039_06RS/2006/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/BRA/14422_07RS/2007/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/BRA/15894_08ES/2008/G2P[4]	D	L
RVA/Human-wt/BRA/15863_08MA/2008/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/BRA/15900_08MG/2008/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/BRA/16064_09MA/2009/G2P[4]	D
RVA/Human-wt/BRA/16101_09ES/2009/G2P[4]	D
RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P[8]	.	K	.	.	Q	N	L	Q	.	.	N	.	D	S	.	.	M	.	.	N	I	L	T	T	T	
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-9/1992/G1P[5]	.	K	.	.	Q	S	L	Q	.	.	N	.	D	S	.	.	M	I	.	N	I	L	T	T	T	
RVA/Human-tc/USA/wa/1974/G1P[8]	.	K	.	.	Q	S	L	Q	.	.	N	.	D	S	.	.	M	I	.	N	I	L	T	T	T	

3. CONCLUSIONES

Los países vecinos del Cono Sur de América Latina están conectados epidemiológicamente y la circulación de cepas se comparte, como claramente se ilustra en el estudio de las cepas G12P[9] que primero circularon en Argentina y luego se dio la propagación a Brasil y Paraguay (92, 166, 187, 188). Esto también se puede verificar al hacer una comparación de nuestros resultados de fluctuación de genotipos G para el período 1996-2007 en el Gran Buenos Aires (Gráfico 1.2.3 de la parte II del Capítulo I) con las fluctuaciones observadas en Río de Janeiro (Brasil), ya que esta última es la única locación del Cono Sur que ha reportado resultados por un período comparable. La recopilación de estos resultados, a partir de estudios de varios autores (139, 189-192) se ilustra en el Gráfico 3.1.1 y permite observar un patrón de fluctuaciones bastante similar al mostrado para el Gran Buenos Aires. En esta figura puede observarse, como algunos ejemplos, el paralelismo en la disminución de las cepas G1, la escalada de las cepas G2 y la emergencia de las cepas G9 en los últimos años así como la prevalencia de las cepas G4 a principios de la década.

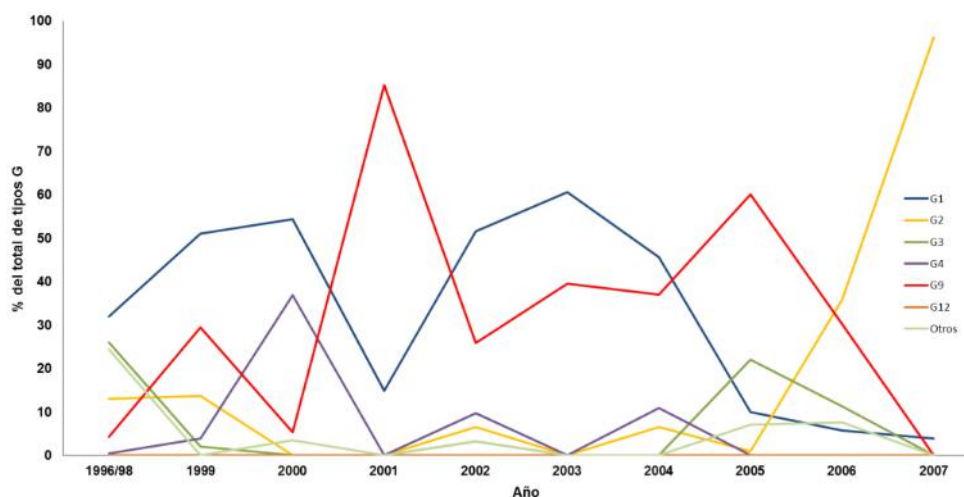


Gráfico 3.1.1. Fluctuación de genotipos G a lo largo de los años en Río de Janeiro, Brasil. Se muestra la frecuencia de cada tipo G detectado desde el año 1996 hasta el año 2007 (139, 189-192).

Por lo tanto, es posible que la abundancia relativa de las cepas *DS-1-like* o la disminución de cepas *Wa-like* en el país más grande y más poblado de nuestra región introduzca un sesgo en la sustitución usual de serotipos. Argentina, en ese entonces sin vacunación universal, podría actuar como amplificador de este efecto visualizado a través de la llamativa reducción de la prevalencia de las cepas G1P[8] y la persistencia de las cepas G2P[4] en los últimos años. Para determinar si éste es un sesgo producido por las fluctuaciones normales de las frecuencias de genotipos causada por la selección de la vacuna monovalente, se requerirán posteriores seguimientos de los genotipos en Brasil y en otros países de la región. Además, la caracterización por secuenciación de genomas completos de cepas argentinas y brasileñas permitirá confirmar la identidad y el origen de los rotavirus que se propagan en la región. Los estudios de genomas completos serán también de interés para establecer las relaciones entre los dos tipos de cepas G2 circulando antes y después de la introducción de la vacuna en Brasil, fin para el cual serán de gran utilidad también los estudios de neutralización mencionados previamente.

PARTE II

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS G1P[8]



1. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología referida a secuenciamiento nucleotídico, análisis de secuencias y reconstrucción de árboles filogenéticos y análisis de regiones antigénicas se detalla en la sección 1 del capítulo II. Las secuencias nucleotídicas presentadas en esta sección fueron depositadas en la base de datos de secuencias genéticas GenBank del NIH (*National Institutes of Health*) bajo los siguientes números de acceso: KU145642 – KU145654 para vp7, KU145632 – KU145641 para vp4 y KU145625 – KU145631 para nsp4.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se profundiza el estudio de las cepas G1P[8] detectadas en nuestro laboratorio a través del secuenciamiento de los genes que codifican las proteínas VP7, VP4 y NSP4 y el análisis filogenético y de regiones antigénicas de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas. Dichos estudios se realizaron con la finalidad de indagar en las relaciones evolutivas y filogenéticas entre las cepas de este genotipo circulantes en el GBA en distintos años y su relación con otras de circulación global y regional. Por otro lado, es de interés intentar establecer si existe alguna relación entre la alta morbilidad de los casos de infección por RVA que se dieron en el año 2014 en Buenos Aires con la reemergencia de estas cepas. En este sentido, resulta interesante determinar si estos linajes habían circulado previamente o si aparecen por primera vez en nuestro medio, y si los genes de las proteínas NSP4 tienen alguna particularidad o están relacionados con cepas causantes de brotes similares en el mundo. Por último, es también de gran interés establecer las eventuales modificaciones en las regiones antigénicas de las proteínas de superficie con respecto a sus homólogos en la cepa vacunal utilizada masivamente en la región a partir de 2007.

2.1. *Análisis filogenético*

2.1.1. *Gen vp7*

El estudio filogenético de este gen se ha representado en el árbol de la figura 3.2.1 incluyendo todas las secuencias argentinas y regionales disponibles. Diez de las secuencias fueron obtenidas en el contexto de esta tesis y se incluyen secuencias de cepas presentes en muestras clínicas colectadas entre los años 2008 y 2014. Como puede apreciarse en la figura, a lo largo de los años han circulado cepas de distintos linajes y sublinajes del genotipo G1 indicando distintas introducciones y relaciones con cepas de circulación global. Así, de la información disponible se pueden observar cepas del linaje IV en 1986, linaje Ic en 1996, linaje IIb en 2003 y distintos subgrupos del linaje Ic en 2006, 2008 y 2010 en muestras clínicas. Las cepas G1 secuenciadas del brote del 2014, año de la reemergencia, y la única que pudo ser secuenciada del 2013 pertenecen al linaje IIc. Estas secuencias presentan un elevado grado de similitud con otras secuencias depositadas en GenBank de cepas europeas y sudafricanas que circularon entre los años 2009 y 2011.

En nuestra casuística el genotipo G1 se ha detectado a muy bajas o nulas frecuencias desde el año 2005 al año 2013, con la excepción del año 2008 en el cual alcanzan un 15 %. Sin embargo, en los años subsiguientes y anteriores se lo detecta en muy pocos casos y en general en infecciones mixtas. Este largo período de baja prevalencia es interrumpido abruptamente en el año 2014 con una muy alta tasa de infecciones por cepas G1P[8]. La alta homogeneidad genética del gen vp7 de las cinco cepas del 2014 y el hecho de que sean de un linaje no detectado previamente en el país, sugieren una introducción reciente. Llamativamente, la única cepa G1 que pudo ser secuenciada del año 2013 presenta una secuencia altamente relacionada, hecho que indicaría la posibilidad de que las cepas causantes del brote epidémico de alta morbilidad del 2014 ya habrían estado circulando en 2013. No obstante, esto no puede ser afirmado con seguridad sobre la base de un solo gen. Lo ideal sería generar secuencias de varios genes de las cepas G1 de ambas temporadas para confirmar la identidad éstas. Otra posibilidad es que las cepas del 2014 sean reasociantes que incorporaron el gen vp7 de las cepas del 2013 sobre un

background que les confirió mayor aptitud para diseminarse en la población. Esta última posibilidad explicaría porqué el genotipo se vuelve dominante en el 2014 y es casi indetectable en el 2013.

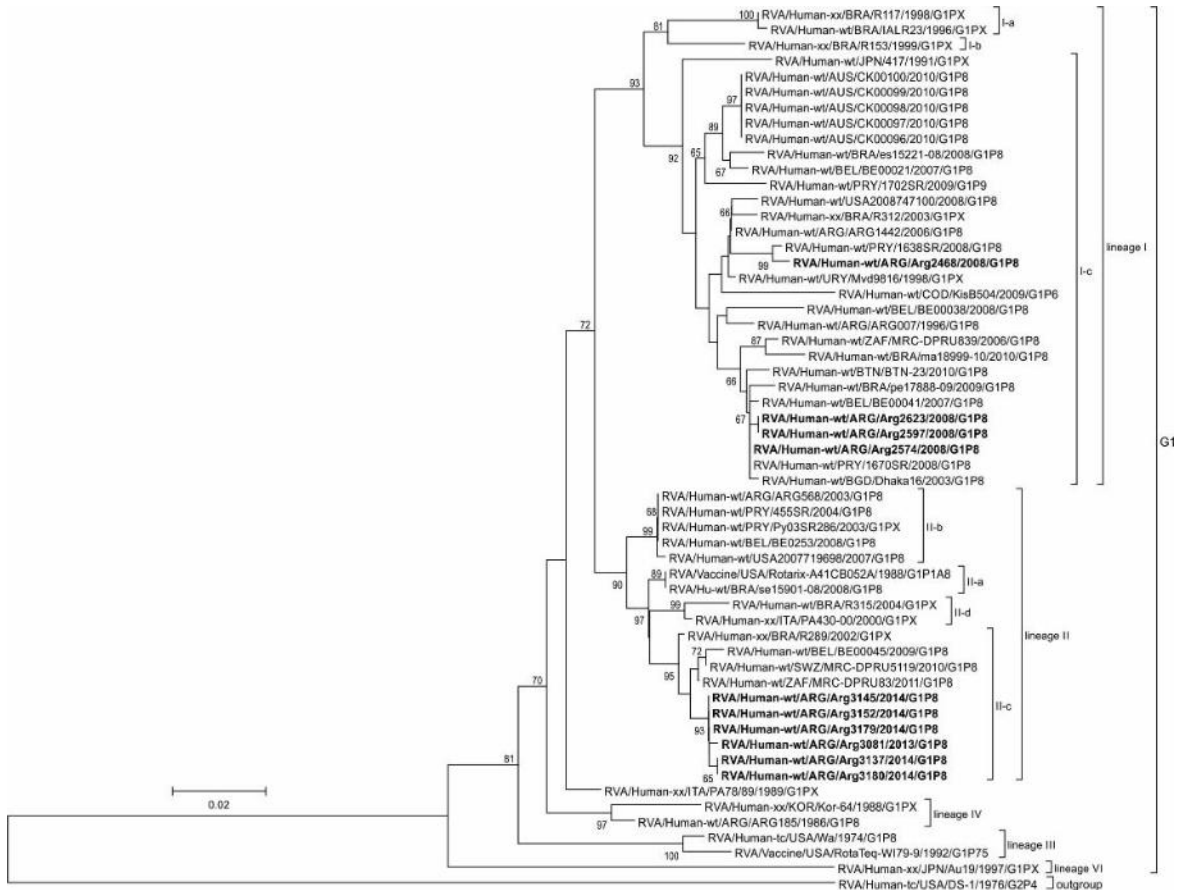


Figura 3.2.1. Filograma del gen de VP7 de cepas G1P[8]. Las ramas que representan las secuencias argentinas obtenidas en el LIV se encuentran resaltadas.

2.1.2. Gen vp4

En este trabajo se han logrado secuenciar ocho genes vp4 del genotipo P[8] asociado a cepas G1 más algunas secuencias del mismo genotipo asociado a los genotipos G12, G4 y G3. Cuando se estudia la filogenia de estas secuencias, representada en el árbol de la Figura 3.2.2, se observa que todas las cepas argentinas caracterizadas hasta la fecha pertenecen al linaje III, pero presentan una gran heterogeneidad ya que se distribuyen en

seis *clusters* distintos, identificados con números del 1 al 6 en la figura. En particular, las secuencias asociadas a cepas G1 se distribuyen en tres de estos clados y pertenecen a las cepas del año 2008 y a las pertenecientes al brote del 2014. Del filograma se puede observar claramente que, a pesar de contar con pocas secuencias, se advierte una mayor heterogeneidad en las del primer año cuyas secuencias se distribuyen en tres *clusters* (2, 4 y 6) mientras que las del 2014 son muy similares entre si agrupando en el *cluster* 2. En este último agrupan, además de la mencionada cepa G1 del 2008, cepas G3 del 2008, 2009 y 2011. Dado que este último genotipo fue altamente prevalente hasta el 2013, no es descabellado postular que las cepas G1P[8] emergentes en el 2014 sean reasociantes entre estas cepas G3 (aportando al menos el gen de VP4) y las cepas G1 de bajo nivel de circulación del 2013, pero con un alto nivel de identidad con las de 2014 (ver arriba). Para clarificar este punto sería necesario obtener más secuencias de distintos genes tanto de las cepas G3 del 2013 como de las G1 del 2013 y 2014.

Los datos de secuencia del gen de VP4 presentados confirman lo que se sugiere a partir de la información de secuencia del gen de VP7 indicando la introducción reciente de una cepa G1P[8] de alta homogeneidad genética y de amplia distribución. Como se discute en el párrafo anterior, el origen de estas cepas puede ser tanto interno, por reasociación de cepas cocirculantes en 2013 como del extranjero. En cualquier caso, es altamente llamativo el bajo o nulo nivel de circulación de cepas G1P[8] (las más comunes en humanos) durante ocho temporadas de un lapso total de nueve, entre 2005 y 2013. De la misma forma que para las cepas G2P[4] podrían describirse dos fases en las que la primera (2005-2007) coincidiría con la fluctuación natural de alternancia con cepas G2P[4]. En 2008, el nivel de circulación aumenta a un 15 %, pero baja nuevamente a niveles casi nulos hasta el 2014 a expensas de las cepas G3, G12 y G2. De esta forma podría postularse, al igual que para las cepas G2P[4], que hacia los años 2004-2005 se inicia un ciclo de reemplazo natural de la dominancia de cepas tipo Wa por cepas tipo DS-1 que debería revertirse hacia 2007-2008. La introducción de la inmunización masiva con la vacuna monovalente G1P[8] en el año 2007 en Brasil y en otros países de Sudamérica podría haber alterado este reemplazo natural con un rebrote de cepas G2P[4] y la

ausencia relativa de cepas G1P[8]. De esta forma los patrones bifásicos de alta prevalencia de las cepas G2 (2004-2008 y 2010-2013) y de baja prevalencia de las cepas G1 (2005-2007 y 2009-2013) se explicarían atribuyendo la primera fase a la fluctuación natural, y la segunda a una alteración producida por la introducción de la vacunación. Cabe destacar nuevamente que las observaciones antedichas pueden realizarse sobre la prevalencia de las cepas en casos clínicos en nuestro país porque durante todo el período Argentina fue un país prácticamente sin cobertura vacunal.

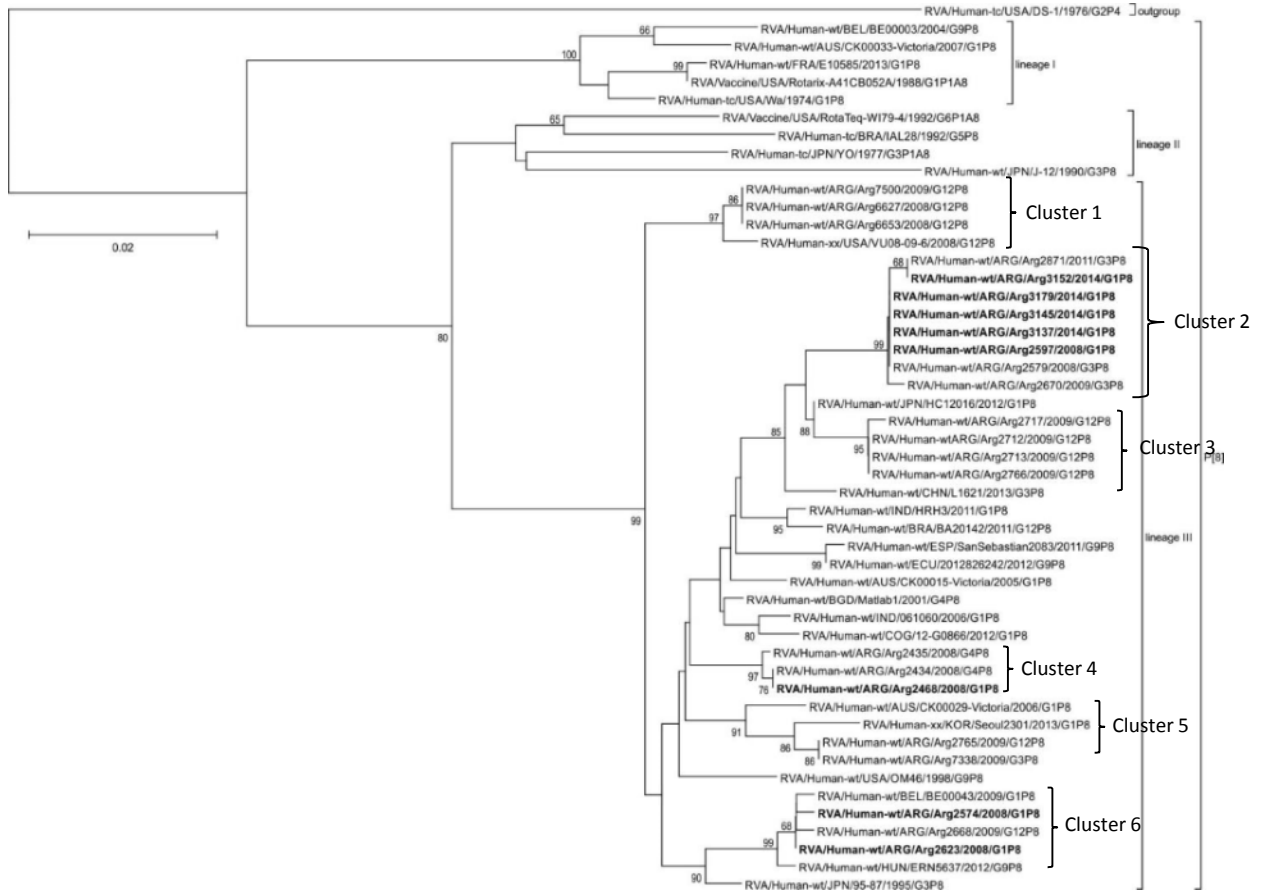


Figura 3.2.2. Filograma del gen de VP4 de cepas G1P[8]. Las ramas que representan las secuencias argentinas obtenidas en el LIV se encuentran resaltadas.

2.1.3. Gen nsp4

El secuenciamiento de este gen se realizó como parte de la caracterización de las cepas causantes de alta morbilidad en el año 2014 con el propósito de establecer su filogenia, genotipificar y hacer estudios de secuencia aminoacídica de este gen relacionado a la virulencia. En principio, como puede apreciarse en el filograma de la Figura 3.2.3, todas las cepas secuenciadas, cinco del 2014 y dos del 2008, pertenecen al genotipo E1, linaje E1a, aunque agrupadas en dos *clusters* diferenciados para cada año. También puede apreciarse que, confirmando los estudios de secuencia de los genes vp7 y vp4, todas las cepas del 2014 tienen un alto grado de similitud en el gen nsp4. Estas cepas, al igual que lo verificado para el gen vp7, se relacionan cercanamente con una cepa Sudafricana del 2011 mientras que las cepas G1P[8] del 2008 poseen secuencias de nsp4 altamente relacionada a cepas circulantes en Europa y el continente Americano entre 2001 y 2008.

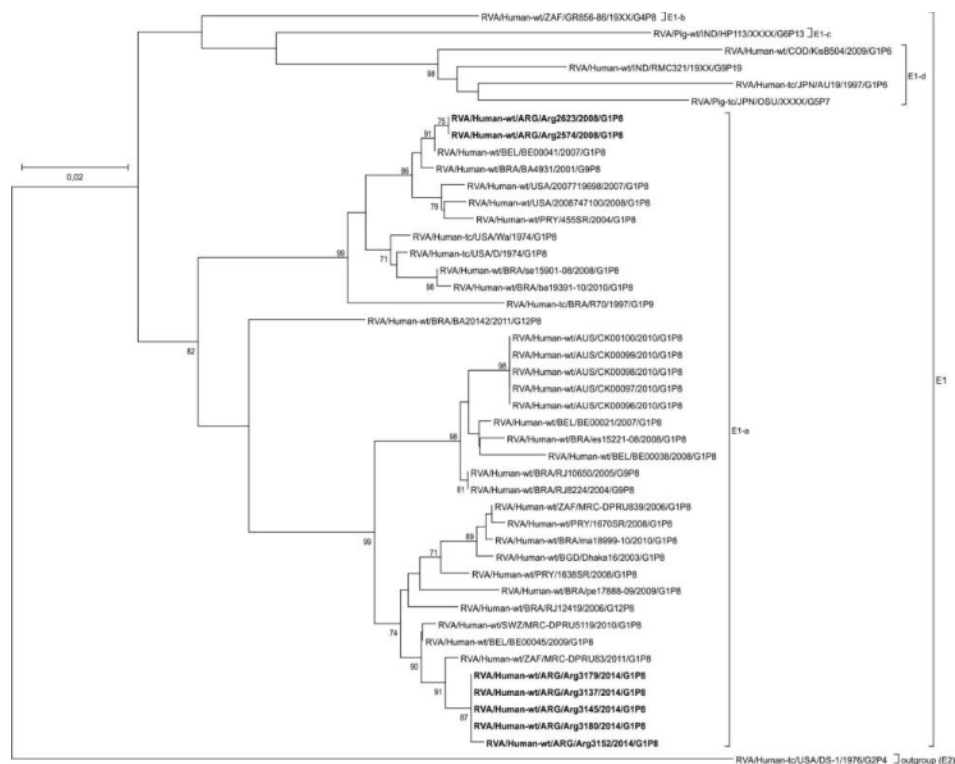


Figura 3.2.3. Filograma del gen de NSP4 de cepas G1P[8]. Las ramas que representan las secuencias argentinas obtenidas en el LIV se encuentran resaltadas.

2.2. Caracterización molecular. Análisis de secuencias aminoacídicas

2.2.1. Regiones antigénicas de VP7

El análisis de las secuencias deducidas de aminoácidos de las regiones antigénicas A, B, C y F de la proteína VP7 de muestras G1P[8] de nuestra colección nos permitió hallar algunos cambios consistentes entre cepas argentinas del 2008 al 2012 con respecto a las del 2013 y 2014 (ver Tabla 3.2.1). Se incluyeron en esta etapa diez muestras clínicas (cuatro del 2008, una del 2013 y cinco del 2014) y cuatro provenientes de muestras ambientales (dos del 2009, una del 2010 y una del 2012), las cuales se indican con la palabra “Env” en lugar de “Human”. Las secuencias aminoacídicas de las proteínas VP7 de estas muestras fueron comparadas con aquellas obtenidas en el banco de datos GenBank de cepas G1P[8] de la región sudamericana y de un conjunto de cepas australianas de un estudio realizado en el que se reportó un brote de diarrea por infección por cepas G1P[8] de RVA en la era vacunal (178). Además se incluyeron secuencias de las cepas patrón Wa, DS-1 y las correspondientes a las vacunas monovalente y pentavalente (sólo el componente G1 de esta última).

Al analizar los alineamientos es posible observar algunos cambios en regiones antigénicas de VP7 entre las cepas emergentes del 2014 y las que circulaban previamente en Argentina. En particular se destacan dos cambios que podrían ser significativos los cuales se resaltan en negrita en la Tabla 3.2.1. El primero de ellos se detectó dentro de la región B (N147D). Llamativamente, este cambio sólo está presente en las cepas argentinas del 2014 y la única detectada del 2013, y no se ha registrado en otras cepas de la región ni tampoco lo contienen las cepas vacunales. Esta sustitución, de asparagina a aspartato, implica que hubo un cambio de un aminoácido polar sin carga neta a uno con carga neta negativa. El segundo cambio se detectó en la región C. En este caso, siempre haciendo referencia a la secuencia de la cepa Wa, se observó que en las muestras de la primera

etapa del análisis (2008-2012) hubo un cambio de metionina a treonina en el aminoácido 217 (M217T). Sin embargo, esta sustitución revirtió al aminoácido original en las muestras del 2013 y 2014.

2.2.2. Regiones antigénicas de VP4

Como puede apreciarse en el alineamiento de secuencias aminoacídicas mostrado en la tabla 3.2.2, en este caso y a diferencia de la proteína VP7, no es posible observar cambios claros en las regiones antigénicas de la VP4 de las cepas emergentes en 2014. No obstante esto no significa necesariamente que las características antigénicas de la proteína completa no sean diferenciales con respecto a las cepas circulando previamente.

2.2.3. Regiones antigénicas de NSP4

Debido a que la proteína NSP4 ha sido descrita como una enterotoxina (179), se han realizado alineamientos de secuencias de aminoácidos para explorar la diversidad antigénica y otras regiones asociadas a la patogenicidad sobre las secuencias de las cepas G1P[8] que reemergieron en nuestro país en el año 2014 (tabla 3.2.3). Para esto se realizó un análisis similar al mencionado en la sección anterior haciendo foco en las regiones antigénicas relevantes de NSP4 (180, 181). Las muestras de nuestra colección incluidas en este estudio fueron siete, dos del año 2008 y cinco del 2014. Estas secuencias se compararon con las de cepas obtenidas de la región, con las cepas australianas que ocasionaron un brote en individuos vacunados (información mencionada en la sección 2.2.1 (178)), las cepas vacunales y las de referencia (Wa y DS-1).

Tabla 3.2.1. Análisis de regiones antigénicas de la proteína VP7 de cepas G1P[8] de RVA.

Cepa	Regiones antigénicas de la proteína VP7																								
	Región B (142-152)											Región C (208-221)													
	142	143	144	145	146	147	148	##	150	151	152	208	209	210	211	212	213	214	##	216	217	218	219	220	221
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P[8]	M	K	Y	D	Q	S	L	E	L	D	M	Q	T	T	N	V	D	S	F	E	M	I	A	E	N
RVA/Human-wt/ARG/Arg2468/2008/G1P[8]	N	T	.	T	.	.
RVA/Human-wt/ARG/Arg2574/2008/G1P[8]	N	T	V	.	.	.
RVA/Human-wt/ARG/Arg2597/2008/G1P[8]	N	T	V	.	.	.
RVA/Human-wt/ARG/Arg2623/2008/G1P[8]	N	T	V	.	.	.
RVA/Env-wt/ARG/Arg304_MA/2009/G1G3G12P[X]	N	T	V	.	.	.
RVA/Env-wt/ARG/Arg357_MA/2009/G1P[X]	N	T	V	.	.	.
RVA/Env-wt/ARG/Arg659_MA/2010/G1P[8]	N	T	V	.	.	.
RVA/Env-wt/ARG/Arg234_MA/2012/G1P[X]	N	T	T	V	.	.	.
RVA/Human-wt/ARG/Arg3081/2013/G1P[8]	D	V	.	.	.
RVA/Human-wt/ARG/Arg3137/2014/G1P[8]	D	V	.	.	.
RVA/Human-wt/ARG/Arg3145/2014/G1P[8]	D	V	.	.	.
RVA/Human-wt/ARG/Arg3152/2014/G1P[8]	D	V	.	.	.
RVA/Human-wt/ARG/Arg3179/2014/G1P[8]	D	V	.	.	.
RVA/Human-wt/ARG/Arg3180/2014/G1P[8]	D	V	.	.	.
RVA/Human-wt/ARG/ARG185/1986/G1P[8]	N	V	.	.	.
RVA/Human-wt/ARG/ARG007/1996/G1P[8]	N	T	V	.	.
RVA/Human-wt/ARG/ARG568/2003/G1P[8]	V	.	.
RVA/Human-wt/PRY/455SR/2004/G1P[8]	V	.	.
RVA/Human-wt/ARG/ARG1442/2006/G1P[8]	N	T	V	.	.
RVA/Human-wt/PRY/1670SR/2008/G1P[8]	N	T	V	.	.
RVA/Human-wt/BRA/es15221-08/2008/G1P[8]	N	T	.	.	.
RVA/Human-wt/BRA/pe17888-09/2009/G1P[8]	N	F	T	V	.	.
RVA/Human-wt/BRA/ma18999-10/2010/G1P[8]	N	T	V	.	.
RVA/Human-wt/AUS/CK00015/2005/G1P[8]	N	V	.	.
RVA/Human-wt/AUS/CK00029/2006/G1P[8]	N	F	T	V	.	.
RVA/Human-wt/AUS/CK00033/2007/G1P[8]	N	V	.	.
RVA/Human-wt/AUS/CK00096/2010/G1P[8]	N	T	V	.	.
RVA/Human-wt/AUS/CK00097/2010/G1P[8]	N	T	V	.	.
RVA/Human-wt/AUS/CK00098/2010/G1P[8]	N	T	V	.	.
RVA/Human-wt/AUS/CK00099/2010/G1P[8]	N	T	V	.	.
RVA/Human-wt/AUS/CK00100/2010/G1P[8]	N	T	V	.	.
RVA/Vaccine/USA/Rotarix-A41CB052A/1988/G1P1A[8]	N	V	.	.
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-9/1992/G1P7[5]
RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P[4]	.	R	.	.	N	T	S	.	.	.	A	K	.	.	D	.	N	T	.	.	I	V	.	S	S

Tabla 3.2.3. Análisis de regiones antigénicas de la proteína NSP4 de cepas G1P[8] de RVA.

Cepa	Regiones antigénicas de la proteína NSP4																																				
	Región II (136-150)															Región I (151-169)																					
	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169			
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P[8]	T	R	P	V	D	V	I	D	M	S	K	E	F	N	Q	K	N	I	K	T	L	D	E	W	E	S	G	K	N	P	Y	E	P	S			
RVA/Human-wt/ARG/Arg2574/2008/G1P[8]	A	K	
RVA/Human-wt/ARG/Arg2623/2008/G1P[8]	A	K	
RVA/Human-wt/ARG/Arg3137/2014/G1P[8]	I	V	.	.	T	E	.	.	.	N	I	
RVA/Human-wt/ARG/Arg3145/2014/G1P[8]	I	V	.	.	T	E	.	.	.	N	I	
RVA/Human-wt/ARG/Arg3152/2014/G1P[8]	I	V	.	.	T	E	.	.	.	N	I	
RVA/Human-wt/ARG/Arg3179/2014/G1P[8]	I	V	.	.	T	E	.	.	.	N	I	
RVA/Human-wt/ARG/Arg3180/2014/G1P[8]	I	V	.	.	T	E	.	.	.	N	I	
RVA/Human-wt/PRY/455SR/2004/G1P[8]	A	K	
RVA/Human-wt/PRY/1670SR/2008/G1P[8]	I	V	.	.	T	I
RVA/Human-wt/BRA/es15221-08/2008/G1P[8]	.	.	.	I	.	T	.	.	.	T	N	I	
RVA/Human-wt/BRA/se15901-08/2008/G1P[8]	I
RVA/Human-wt/BRA/pe17888-09/2009/G1P[8]	I	V	.	.	T	M	.	V	N	I	
RVA/Human-wt/BRA/ma18999-10/2010/G1P[8]	I	V	.	.	T	I
RVA/Human-wt/AUS/CK00015/2005/G1P[8]	I	V	.	.	T	N	I
RVA/Human-wt/AUS/CK00029/2006/G1P[8]	I	V	.	.	T	V	N	I
RVA/Human-wt/AUS/CK00033/2007/G1P[8]	I
RVA/Human-wt/AUS/CK00096/2010/G1P[8]	T	.	.	.	T	N	I
RVA/Human-wt/AUS/CK00097/2010/G1P[8]	T	.	.	.	T	N	I
RVA/Human-wt/AUS/CK00098/2010/G1P[8]	T	.	.	.	T	N	I
RVA/Human-wt/AUS/CK00099/2010/G1P[8]	T	.	.	.	T	N	I
RVA/Human-wt/AUS/CK00100/2010/G1P[8]	T	.	.	.	T	N	I
RVA/Vaccine/USA/Rotarix-AROLA490AB/1988/G1P1A[8]
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-9/1992/G1P7A[5]	I	.	A	.	.	E	.	.	.	T	.	.	I	V	.	.	.	E	.	.	.	N	K	
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-WI79-4/1992/G6P1A[8]	I	.	A	.	.	E	.	.	.	T	.	.	I	V	.	.	.	E	.	.	.	N	K	
RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P[4]	V	.	S	T	.	E	.	.	.	T	.	.	I	V	R	.	.	E	.	.	.	N	K	

En forma similar al análisis realizado para la glicoproteína VP7, se han encontrado varias sustituciones aminoacídicas consistentes al comparar secuencias del 2008 con las del brote del 2014. A pesar de ser varios los cambios, el más notorio fue el del aminoácido 157 donde un aspartato es reemplazado por glutamato. Lo interesante en este caso es que el mencionado cambio sólo se encontró en las cepas argentinas del año 2014 y en la secuencia proteica de NSP4 de la vacuna pentavalente (de origen bovino), no así en el resto de las secuencias humanas analizadas.

3. CONCLUSIONES

En esta sección se analizaron cepas G1 que reemergieron en el año 2014, llegando a frecuencias cercanas al 70 %, luego de cinco años de mantenerse casi indetectables. Este genotipo desplazó a las cepas de los genotipos G3 y G12 que dominaron en los años anteriores y, además, esta reaparición coincidió con una alta morbilidad de infecciones por RVA, un aumento de la incidencia (Dr. Alberto Rodríguez, Hosp. Eurnekian de Ezeiza; Dra. Alejandra Musto, Hosp. Evita de Lanús; Dra. Alicia Mistchenko, HNRG, comunicaciones personales) y varios casos fatales en el conurbano bonaerense que fueron de dominio público.

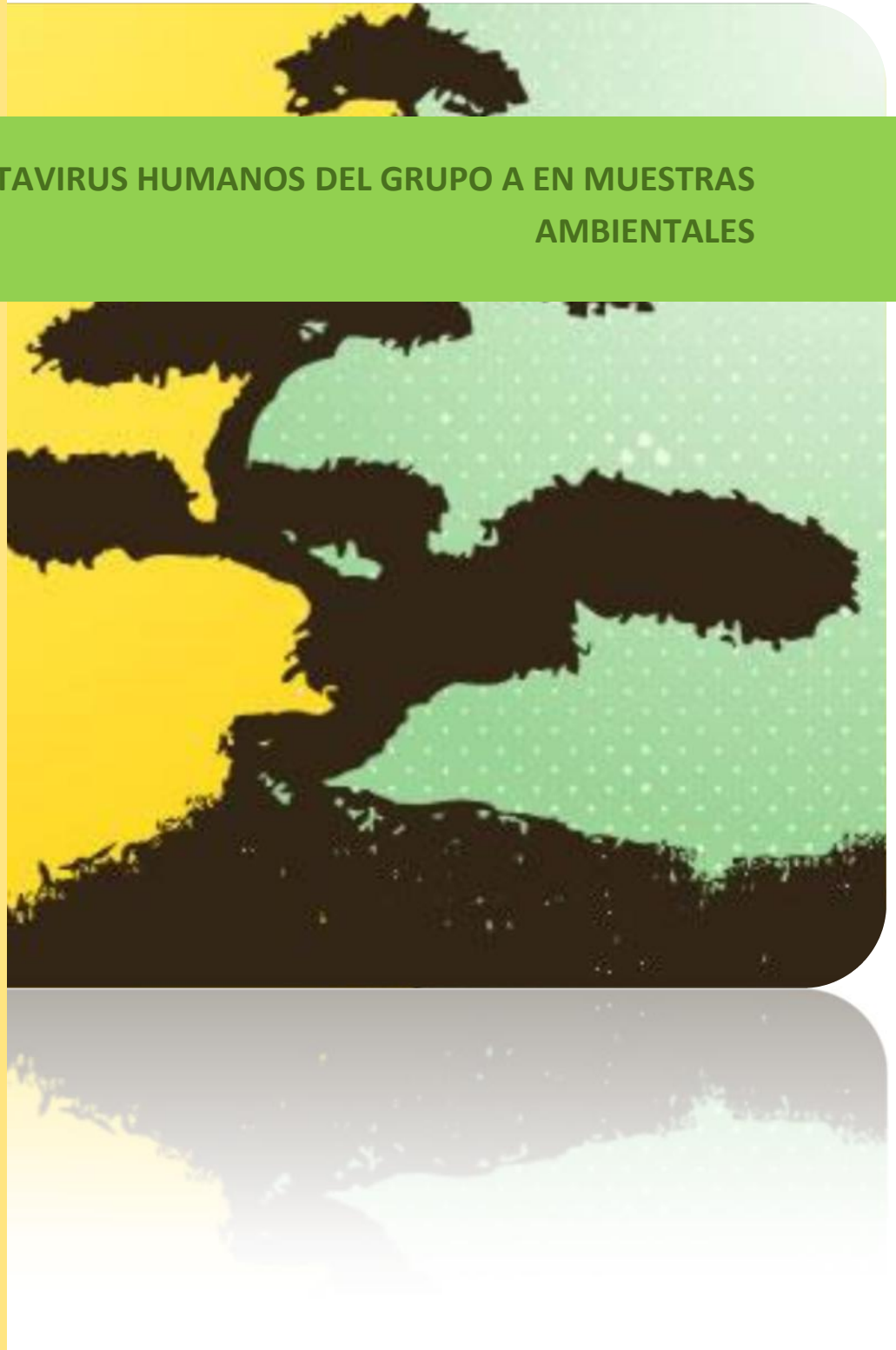
De acuerdo a los análisis filogenéticos del gen de VP7 se demostró que las cepas aparecidas en 2014 y la única detectada en 2013 pertenecen al linaje II, sublinaje IIc, mientras que las detectadas en años anteriores agrupan junto a las del linaje I (Figura 3.2.1). Por otro lado, el filograma obtenido para el gen de NSP4 muestra resultados similares, pero no a nivel de linaje (Figura 3.2.3). Estos resultados sugieren que la reintroducción de cepas G1 del año 2014 que se asocian con una marcada morbilidad corresponde a una cepa emergente sin circulación previa en el país.

Además de los análisis de filogenia, se han realizado análisis de secuencias de aminoácidos de las proteínas VP7 (tabla 3.2.1), VP4 (tabla 3.2.2) y NSP4 (tabla 3.2.3). Estos resultados apoyan lo visto en los estudios filogenéticos, ya que se observaron cambios aminoacídicos tanto en regiones antigénicas de VP7 como de NSP4 al comparar las secuencias de las cepas del 2013 (VP7) y 2014 (VP7 y NSP4). Sería necesario realizar estudios de seroneutralización con suero de individuos vacunados comparando los títulos contra ambos tipos de cepas para verificar la relevancia que estos cambios. En el caso de que las diferencias sean significativas (con títulos menores para las cepas del 2014) podría postularse algún efecto de selección de cepas por efecto de la vacunación masiva.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la zona secuenciada de NSP4 muestra también diferencias entre las cepas previas al 2014 y las re-emergentes, en particular, seis diferencias en las zonas antigénicas I y II. Estas regiones analizadas se encuentran contenidas dentro de la secuencia del péptido secretorio de la proteína (aa 112-175). Adicionalmente se analizó la zona que abarca desde el aminoácido 114 al 135, previamente relacionada a la patogenicidad (179, 180), pero no se han hallado cambios significativos (no mostrado).

CAPÍTULO IV

ROTAVIRUS HUMANOS DEL GRUPO A EN MUESTRAS AMBIENTALES



1. INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales urbanas son una de las fuentes de diseminación de virus entéricos más importantes. Esto obedece a que grandes cantidades de dichos virus son eliminados diariamente a través del sistema de saneamiento hacia las redes de aguas cloacales y plantas de tratamientos de aguas residuales. Finalmente estas aguas son volcadas a cuerpos de agua mayores, siendo el Río de la Plata en el caso de CABA y el Gran Buenos Aires. A pesar de los diversos tratamientos a los que se somete al agua residual de forma previa a su descarga en cursos de agua naturales, numerosos trabajos a nivel mundial evidencian la resistencia de los virus entéricos y la capacidad que poseen de conservar su infectividad en los efluentes (154-158). Estos cuerpos de agua luego son utilizados para generar agua de consumo y aguas con diversos fines en los que está involucrada la población, y de esta manera los virus entéricos de transmisión hídrica son una de las principales causas de enfermedades relacionadas con el agua (142, 151-153). Desde el punto de vista de la sanidad es interesante destacar que los estudios de potabilidad en nuestro medio incluyen análisis bacteriológicos aunque no virológicos.

Hoy en día se sabe que la lista de virus presentes en el agua es muy extensa y diversa. Sólo para mencionar algunos ejemplos de virus de interés sanitario en humanos se han encontrado en aguas residuales adenovirus, enterovirus, poliomavirus, rotavirus, norovirus, entre otros (142, 150). Es por esto que uno de los principales objetivos de la virología ambiental es el análisis de la presencia de virus humanos de transmisión hídrica. En este sentido, esta disciplina estudia, entre otras cosas, la incidencia y comportamiento de los virus en las distintas matrices acuosas, el riesgo de infección de un individuo que entra en contacto con éstas aguas, la eficiencia de los procesos de tratamiento y desinfección de aguas residuales.

Desde el punto de vista de la epidemiología viral, el estudio del ambiente en general y de las aguas residuales en particular también aporta conocimiento al monitoreo

rutinario de ciertos virus o cepas de virus en una población dada (152, 153). Más de 140 tipos de virus que causan una amplia variedad de enfermedades en humanos pueden ser encontrados en aguas como resultado de la contaminación con desechos (200, 201). Las aguas residuales contienen patógenos que provienen de individuos infectados, y la detección y caracterización molecular de virus humanos en aguas residuales de zonas urbanas han sido extensamente utilizadas para obtener información de los patógenos virales capaces de afectar a la población humana (160, 202, 207). Varios de estos virus han sido asociados a brotes de gastroenteritis, y uno de los principales agentes etiológicos es RVA (200, 201, 207, 208).

Los viriones de RVA son liberados al ambiente en concentraciones extremadamente altas. Deben considerarse dos aspectos fundamentales: i) que se han detectado hasta de 10^{13} partículas virales/gr en heces de niños infectados con gastroenteritis aguda, y ii) que los RVA pueden persistir en el ambiente por largos períodos de tiempo. Por otro lado, la dosis infectiva es muy baja (entre 10 y 100 partículas virales) y las características de los viriones, incluyendo estabilidad en medios acuosos y resistencia a tratamientos, pueden facilitar la transmisión a humanos desde aguas contaminadas (144, 147, 151, 209, 210).

Los RVA han sido detectados en muestras ambientales utilizando diferentes métodos de concentración y detección (203, 207, 211, 212). Sin embargo, se debe tener en cuenta que en este tipo de muestras es común la presencia de inhibidores naturales que pueden interferir principalmente en los métodos basados en biología molecular utilizados para la detección de estos virus (213, 214).

Si bien los RVA excretados al ambiente provienen principalmente de pacientes pediátricos o adultos mayores con gastroenteritis aguda, también pueden provenir de otras poblaciones como pueden ser: i) individuos de todas las edades, sean estos sintomáticos o asintomáticos, ii) virus de origen animal, siendo que algunas de estas cepas animales pueden tener un potencial zoonótico importante, y iii) cepas vacunales. De esta manera, la vigilancia ambiental de RVA presentes en aguas residuales urbanas, es una herramienta muy útil y potente para obtener un panorama completo de la diversidad

genética viral que circula en todos los individuos de la población. Así, se pueden obtener datos que reflejen por si solos (o complementen estudios realizados con muestras clínicas), los RVA que están infectando una población específica en un tiempo y lugar determinado, permitiendo realizar estudios de epidemiología molecular de estos virus en dicha población (142, 151-153).

2. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS. COLABORACIONES Y CONVENIOS.

De acuerdo a la problemática presentada en la sección anterior y brindando especial importancia a la virología ambiental, se formaron dos redes de laboratorios dedicados al desarrollo de metodologías y al estudio de virus en aguas de distinto origen (PICT REDES Nº 00276/2006 y Red trinacional Brasil, Argentina, Chile en el proyecto ProSul Edital CNPq No. 005/2007), en las cuales nuestro laboratorio comenzó a formar parte a partir del año 2009. Estas colaboraciones nos han permitido trabajar en virología ambiental y hemos contribuido al desarrollo de metodología importante en lo que respecta a la búsqueda de virus en aguas, desde la concentración hasta su detección y cuantificación.

Para emprender estos proyectos se procedió a la búsqueda de muestras de aguas residuales. Así, en el año 2009 establecimos colaboraciones con el Dr. Daniel Cisterna, del área de Neurovirología del Instituto Malbrán, quien nos proveyó de muestras de descargas cloacales provenientes de varias plantas de la empresa Agua y Saneamientos Argentinos S.A. (AySA). Estas relaciones han sido muy beneficiosas ya que perduran hasta la actualidad y nos han permitido obtener gran cantidad de muestras. Además, desde el año 2014 establecimos una relación directa con dicha empresa para obtener una muestra por mes de la planta de purificación de aguas residuales situada en el partido de Berazategui (Planta del Bicentenario). Estas muestras resultan de mucho valor ya que provienen de redes de descargas que abarcan gran parte de la Capital Federal y el Conurbano Sur del Gran Buenos Aires (Figura 4.1).

La Planta del Bicentenario drena los efluentes provenientes del Establecimiento Wilde, conducidos a través de la 1° cloaca máxima, la cual cuenta con una capacidad instalada de 6.500.000 de habitantes. El Establecimiento Wilde es una planta elevadora y de bombeo donde confluyen los efluentes de los partidos de zona norte (parte de San Isidro y Vicente López), de la zona oeste (Tres de Febrero, San Martín, Morón y parte de La Matanza), Capital Federal y los partidos de zona sur (Avellaneda, Lanús, Lomas de Zamora, Almirante Brown, Echeverría y Quilmes) (http://www.aysa.com.ar/index.php?id_seccion=69).

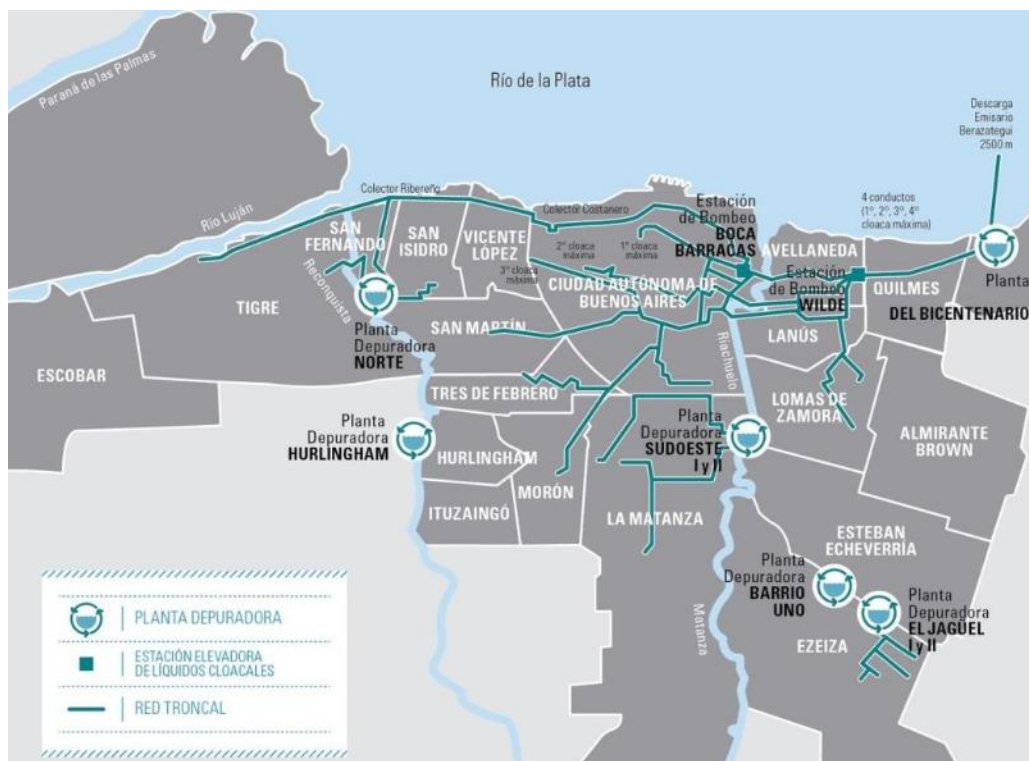
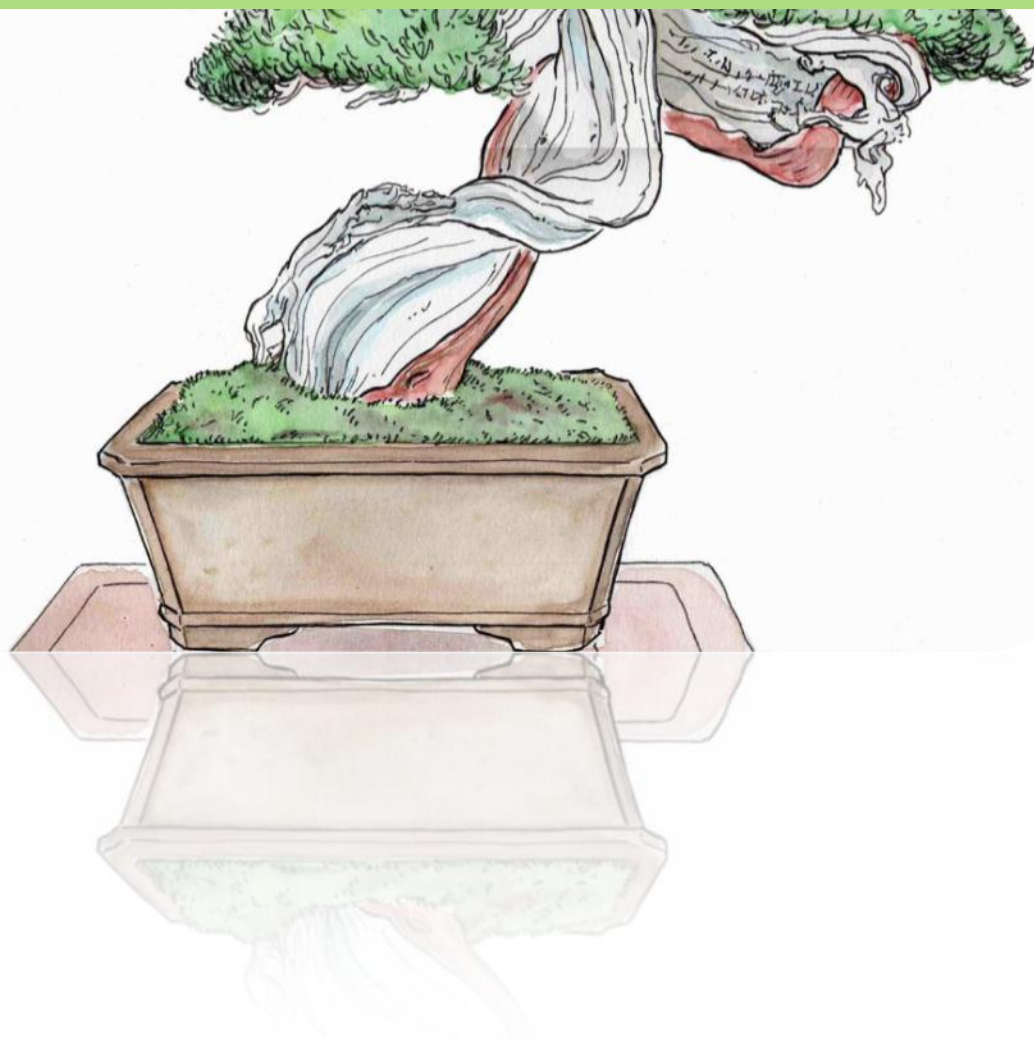


Figura 4.1. Mapa de cobertura y esquema del sistema de desagüe cloacal operado por la empresa AySA

PARTE I

PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA DE CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RVA A PARTIR DE EFLUENTES CLOACALES DEL GRAN BUENOS AIRES



1. MATERIALES Y MÉTODOS

Como se mencionó anteriormente, los virus entéricos de transmisión hídrica son una de las principales causas de enfermedades relacionadas con el agua, por lo que trabajamos en el análisis de muestras ambientales para la detección de estos virus, en particular los rotavirus del grupo A. A continuación, se detallan los procedimientos llevados a cabo para tal fin.

1.1 Control interno. Fago PP7

El tipo de muestra de partida utilizada en esta parte del trabajo proviene del ambiente, más específicamente de aguas residuales, por lo que puede traer consigo numerosos contaminantes e inhibidores que pueden interferir en los procesos que se llevaron a cabo *a posteriori* (213, 214). Estas muestras, además de ser vertidos cloacales, pueden contener vertidos de desechos industriales, lo que suma un número desconocido de sustancias posiblemente inhibidoras. La presencia de estas sustancias puede afectar los procesos de concentración, y sobre todo los procesos subsiguientes como son la extracción de ácidos nucleicos y los procesos basados en biología molecular que involucran enzimas como retrotranscriptasas y polimerasas.

Para poder detectar posibles casos de inhibición y como control de los procesos de concentración y purificación de genoma viral, se utilizó el agregado de un fago a cada una de las muestras a procesar. En estudios previos (159), realizados por la Dra. Verónica Rajal (Universidad Nacional de Salta) con el grupo de Stefan Wuertz en la Universidad de California (Davis, USA) se ha considerado la elección del fago PP7 de *Pseudomonas aeruginosa* para estudios ambientales en matrices acuosas por sus características similares a los enterovirus más pequeños. Este fago posee un tamaño de unos 25 nm, y un

genoma de RNA de simple hebra de polaridad positiva de 3.588 nucleótidos, el cual se encuentra rodeado de 180 unidades de la proteína de cubierta (226). Estas características de los fagos PP7 y el hecho de que no hayan sido detectados en ambientes acuáticos naturales permiten que sean utilizados como un buen control en procesos que impliquen ultrafiltración y detección de RNA (tanto en forma cualitativa como cuantitativa) en matrices acuosas.

Durante el proceso de cuantificación aquí descrito se siembra una cantidad conocida del fago en la muestra problema y se utiliza la detección y cuantificación molecular de un segmento de su genoma para establecer si existe inhibición de alguno de los procesos involucrados (concentración, extracción, retrotranscripción, amplificación y cuantificación por *real time* PCR) (159).

1.2. Concentración viral

Los procesos de concentración viral son variados y la elección debe ser criteriosa, ya que pueden introducir sesgos en los análisis posteriores. En el caso de muestras ambientales se debe tener en cuenta principalmente la procedencia y la cantidad de muestras a procesar. Debido a que se utilizaron muestras de agua residual donde se han vertido descargas cloacales y por ello las cargas virales pueden ser altas (154), el volumen de cada muestra a procesar es de tan solo 50 ml. El hecho de que estos volúmenes se consideren chicos se hace en forma relativa a la cantidad que se suele procesar para el caso de muestras de aguas de ríos, flujos de agua natural o aguas recreacionales, donde los volúmenes a procesar son del orden de los litros.

Dentro de uno de los proyectos antes mencionado, ProSul, se estudiaron y compararon métodos de concentración diferentes. Por un lado la ultracentrifugación y por otro, métodos de adsorción-elución. Se encontró que el método más eficiente para

procesar este tipo de muestras es la ultracentrifugación, como se muestra en el Gráfico 4.1.1 (160).

El método utilizado consistió en ultracentrifugar la muestra a 100.000 x g durante 1 hora a 4 °C utilizando el rotor Type 45Ti (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA). Luego se resuspendió el *pellet* conteniendo las partículas virales (junto con impurezas) en 3,5 ml de *buffer* glicina 0,25 N pH 9,5 y se incubó por 30 minutos en baño de agua-hielo con agitación. A continuación se neutralizó la muestra con PBS 2X pH 7,2. Esta muestra se clarificó por centrifugación a 12.000 x g durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se realizó una nueva ultracentrifugación a 100.000 x g por 1 hora a 4 °C en el rotor SW40 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA). Por último se resuspendió el *pellet* en 200 µl de agua destilada o PBS y se lo almacenó a -80 °C hasta su posterior uso (160).

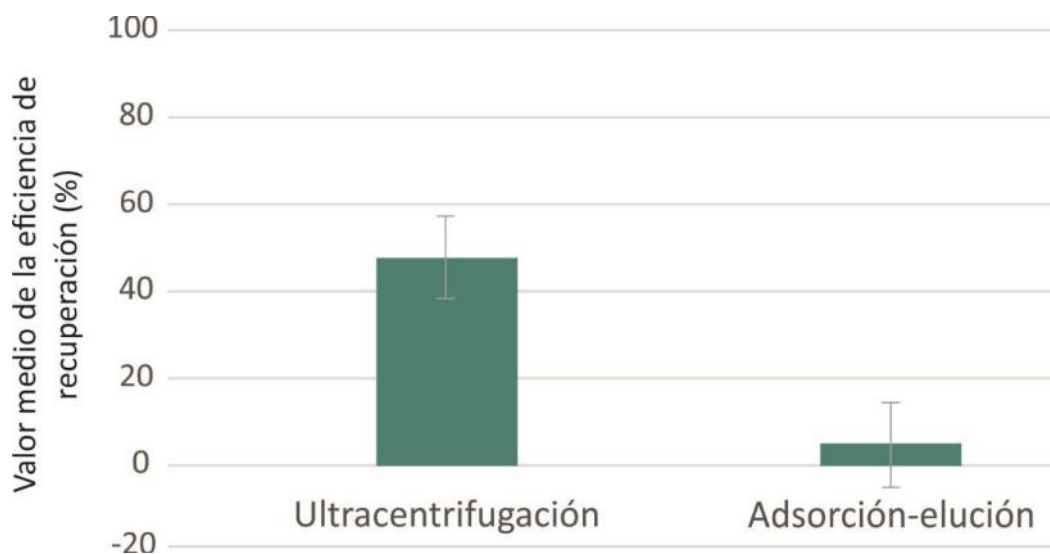


Gráfico 4.1.1. Comparación de métodos de concentración viral. El gráfico de barras muestra la eficiencia de recuperación viral luego de los procesos de concentración por ultracentrifugación o adsorción-elución. Adaptado de Fumian et al. (160).

1.3. Extracción de ácidos nucleicos y retrotranscripción

La extracción de RNA se realizó utilizando la totalidad del concentrado viral. La metodología llevada a cabo es la misma que se encuentra descripta en la parte II del primer capítulo de esta tesis.

Una vez obtenido el RNA se procedió a generar el cDNA con la retrotranscriptasa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) y *primers* al azar (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Para realizar una reacción de 50 µl de volumen final, primero se incubaron 12 µl de RNA con 2 µl de DMSO a 95 °C durante 7 minutos para permitir la desnaturalización inicial. Luego se realizó una mezcla con 200 unidades de enzima, 50 ng de *primers*, 4 µl de dNTP 2,5 mM, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 5 µl del buffer 10X provisto junto con la enzima y agua estéril c.s.p 50 µl finales. A continuación se agregó 38 µl de la mezcla al tubo con el RNA y DMSO y, según recomendaciones del fabricante, el proceso consistió en las siguientes incubaciones: 25 °C durante 5 minutos, 50 °C durante 1 hora y 70 °C durante 20 minutos.

1.4. Curvas de calibración y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para realizar las curvas de calibración, necesarias para poder cuantificar, se utilizaron plásmidos que contienen una copia del segmento a amplificar, tanto para rotavirus como para PP7, provistos gentilmente por la Dra. Marize Miagostovich (Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Río de Janeiro, Brasil). Estos plásmidos se generaron en el vector de clonado pCR[®] 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El segmento a amplificar de RVA corresponde al gen de NSP3 y comprende desde el nucleótido 963 al 1049, lo que genera un producto de 86 pb. Para PP7 se amplifica un sector del gen de la replicasa que abarca desde el nucleótido 247 al 339 dando un amplicón de 92 pb.

Las curvas de calibración consisten en diluciones en base diez que abarcan el siguiente rango de números de copias por microlitro: $1 \times 10^1 - 1 \times 10^7$.

Las reacciones de PCR cuantitativas, desarrolladas en el FIOCRUZ en el marco del ProSul y adaptadas al termociclador Cepheid Smart Cycler V 2.0d presente en la Universidad Nacional de Quilmes, se llevaron a cabo aplicando la tecnología TaqMan (160). Para esto se utilizaron *primers* que amplifican los sectores mencionados en la sección anterior y sondas que hibridan en el sector interno comprendido entre los *primers* para nsp3 (217) o para la replicasa de PP7 (59). Tanto las secuencias de los *primers* como la de las sondas y sus fluoróforos y apantalladores asociados se detallan en la Tabla 4.1.1.

Tabla 4.1.1. *Primers* y sondas utilizados para detección de RVA y PP7 en qPCR.

Virus	Primer o sonda (s)	Secuencia (5' - 3') y modificación	Tamaño de amplicón (pb)	Posición
RV	NSP3 f	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG*	86	963 - 988
	NSP3 r	GGTCACATAACGCCCTATAGC		1028 - 1049
	NSP3 s	VIC-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA-MGB		995 - 1017
PP7	247 f	GTTATGAACCAATGTGGCCGTTAT	92	247 - 270
	320 r	CGGGATGCCTCTGAAAAAAG		320 - 339
	274 s	FAM-TCGGTGGTCAACGAGGAACTGGAAC-TAMRA		274 - 298

*código IUB: W = A/T, R = A/G

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo con un volumen final de 25 μ l, conteniendo 12,5 μ l de *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystem, CA, USA), 1,25 μ l de cada *primer*, 0,3 μ l de la sonda para PP7 o 0,5 μ l de la sonda para RVA, 5 μ l de cDNA molde y agua estéril para completar el volumen. Las concentraciones iniciales de *primers* y sondas fueron de 10 μ M. Las reacciones llevadas a cabo en el termociclador Smart Cycler consistieron en una incubación inicial de 2 minutos a 50 °C, una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C y 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Los resultados fueron visualizados a través del *software* proveído por el fabricante del termociclador.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. *qPCR y curvas de calibración*

En primer lugar se evaluaron los resultados obtenidos a partir de las curvas de calibración y se pusieron a punto las reacciones de qPCR para RVA y para el fago PP7 con las que se podrá cuantificar la cantidad de rotavirus presente en las muestras a analizar y si existe o no inhibición, respectivamente.

A continuación se mostrarán las curvas de calibración confeccionadas a partir de las diluciones de los plásmidos que representan desde 10 a 5×10^7 copias cada 5 μ l para RVA y de 25 a 5×10^7 copias cada 5 μ l para PP7. Cada punto de la curva se evaluó por triplicado y se incluyeron controles negativos en cada reacción que consistieron en agregar agua estéril en lugar de molde.

En primera instancia se aprecia que las reacciones de PCR fueron satisfactorias y los valores de fluorescencia medidos disminuyeron conforme aumenta la dilución de la molécula blanco. Por otro lado, y no menos importante, se observó que no hubo fluorescencia basal en los controles negativos.

Con los valores obtenidos a partir de la qPCR de nsp3 se generó la curva de calibración (Gráfico 4.1.2). Se puede observar que el R^2 es de 0,972 y que las réplicas se comportan mejor cuanto más concentrada es la muestra, habiendo más dispersión en las diluciones mayores. El rango dinámico ensayado abarca de 10 a 50 millones de copias contenidas en 5 μ l de cada dilución de plásmido.

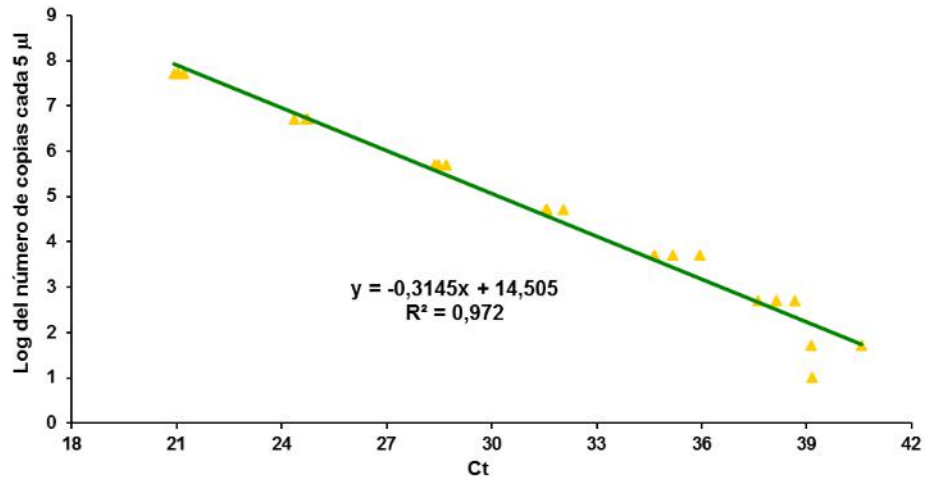


Gráfico 4.1.2. Curva de calibración de nsp3 (RVA). La curva fue construida a partir de triplicados de diferentes diluciones de plásmidos conteniendo una copia del segmento a amplificar por qPCR.

Se observa un comportamiento similar al analizar la curva de calibración correspondiente a PP7, pero esta vez el R^2 fue mayor, arrojando un valor de 0,9806 (Gráfico 4.1.3). El rango dinámico de detección para este virus se establece desde 25 a 50 millones de copias cada 5 µl de cada dilución de plásmido.

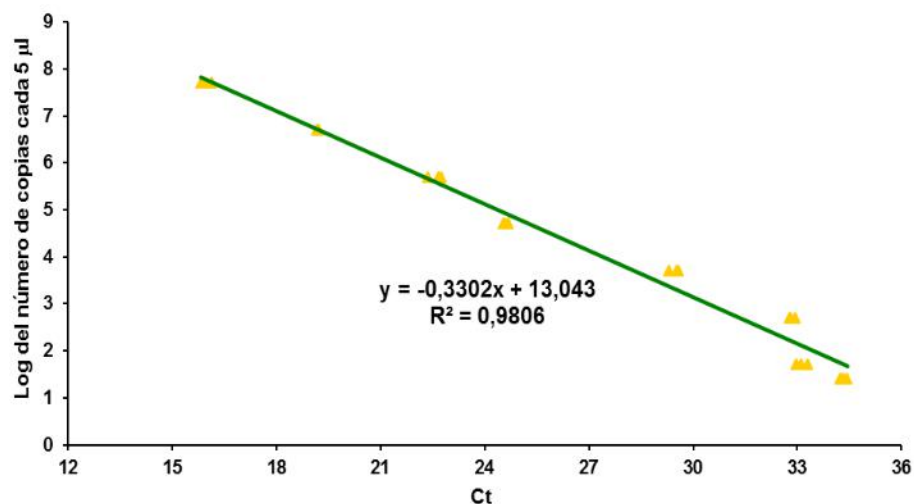


Gráfico 4.1.3. Curva de calibración de PP7. La curva fue construida a partir de triplicados de diferentes diluciones de plásmidos conteniendo una copia del segmento a amplificar por qPCR.

3. CONCLUSIONES

Las metodologías de concentración de virus a partir de matrices acuosas son aún un tema en desarrollo y se aplican múltiples versiones de una misma técnica en los distintos centros de investigación. Lo mismo puede decirse de los métodos de cuantificación y sobre los controles internos que hacen confiable la misma. En este caso, los métodos preferidos hacen uso en general de la qPCR pero los resultados de esta técnica son dependientes de los equipos disponibles y siempre requieren de una cuidadosa puesta a punto. Nuestro laboratorio ha participado de dos proyectos en red que nos han permitido adquirir experiencia en los procesos básicos que aplican a la investigación de virus a partir de distintos tipos de muestras de aguas. En base a dicha experiencia hemos decidido trabajar con efluentes cloacales ya que los consideramos una muestra de sumo interés con posibilidad de obtener resultados aplicables a los campos de la epidemiología, estudios evolutivos y también para desarrollos tecnológicos de control de la polución humana.

En esta sección hemos presentado la puesta a punto de las técnicas de concentración viral y de cuantificación de genomas que nos permitieron el estudio de muestras cloacales. En este sentido se ha logrado adaptar las reacciones de PCR en tiempo real desarrolladas en el marco del ProSul al equipamiento presente en la Universidad Nacional de Quilmes con resultados satisfactorios.

Por otro lado, como indican los resultados expuestos, se ha logrado generar curvas de calibración para la cuantificación de muestras de RVA y para el control interno, que consistente en el fago PP7. Con la primera se podrá cuantificar RVA en muestras ambientales y con la segunda se podrá determinar la presencia o no de inhibidores que afecten alguno de los procesos. Los rangos dinámicos en los cuales las curvas de calibración nos permiten extrapolar valores son extensos, siendo de 10 a 50 millones de copias cada 5 μ l para RVA y de 25 a 50 millones de copias cada 5 μ l para PP7.

PARTE II

ESTUDIOS CUALITATIVOS DE ROTAVIRUS DEL GRUPO A EN AMBIENTE Y COMPARACIÓN CON DATOS CLÍNICOS



1. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos referidos al estudio de genotipos se detallan en la parte II del primer Capítulo y los referidos a secuenciamiento nucleotídico, análisis de secuencias y reconstrucción de árboles filogenéticos se detallan en el capítulo II.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Frecuencia de genotipos

En esta sección se mostrarán los resultados de la tipificación del gen de VP7 de todas las muestras de aguas residuales procesadas. El período abarcado va desde septiembre del año 2009 a agosto del 2012. En la Tabla 4.2.1 se muestran los resultados detallados por año.

Tabla 4.2.1. Distribución y frecuencia de genotipos G de RVA en aguas residuales en el GBA.

Genotipo	2009		2010		2011		2012		Total	% en el periodo Sep-2009 a Ago-2012
	nro. de muestras	%	nro. de muestras	%	nro. de muestras	%	nro. de muestras	%		
G1	2	18,2%	11	37,9%	3	12,5%	1	25,0%	17	25,0%
G2	1	9,1%	6	20,7%	11	45,8%	3	75,0%	21	30,9%
G3	4	36,4%	7	24,1%	5	20,8%	0	0,0%	16	23,5%
G8	1	9,1%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	1,5%
G12	3	27,3%	5	17,2%	5	20,8%	0	0,0%	13	19,1%
Total	11	100%	29	100%	24	100%	4	100%	68	100%

Analizar la distribución de genotipos G año a año nos permitió detectar cuál fue el dominante en cada temporada y con qué frecuencia. En el año 2009 se observó que el genotipo detectado mayoritariamente fue G3 con un porcentaje de 36,4 % respecto al total. Al analizar el año siguiente se aprecia un cambio de dominancia hacia G1, que se

impone con un 37,9 %. En los años siguientes, tanto 2011 como 2012, se observa que las cepas dominantes pertenecen al genotipo G2.

Algo interesante para resaltar es que, si se comparan con los resultados expuestos en la parte II del primer capítulo, los tipos dominantes de la mayoría de los años aquí analizados coinciden con aquellos provenientes de muestras clínicas. Solo se observó que no hubo coincidencia en el año 2010 en el que el genotipo dominante en muestras ambientales es G1, mientras que en las muestras clínicas G3.

Por otro lado, se analizaron los resultados de la genotipificación de vp7 de los RVA del período completo de muestras de ambiente y se los compararon con los resultados compilados para el mismo período de muestras clínicas (Gráfico 4.2.1).

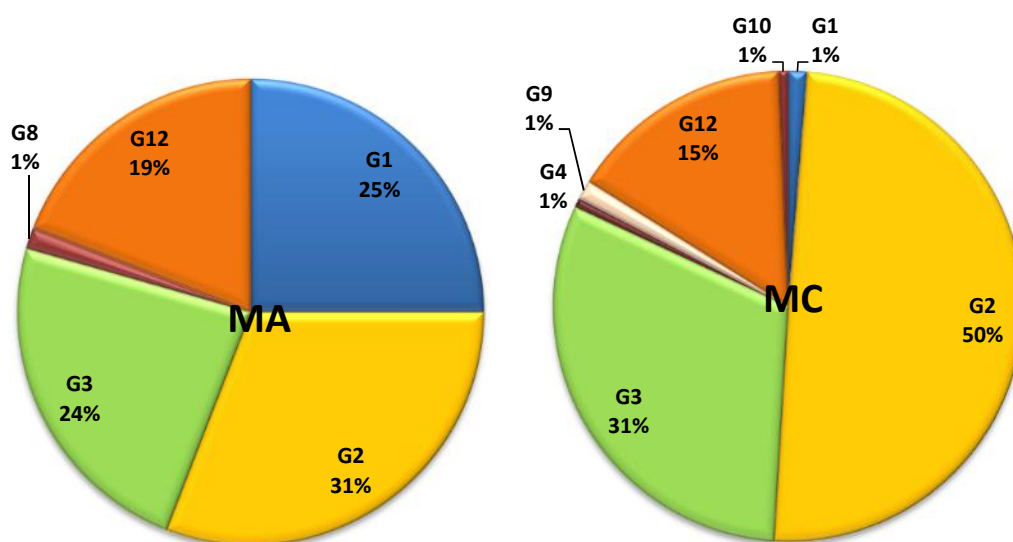


Gráfico 4.2.1. Frecuencia de tipos G de RVA en muestras clínicas y ambientales. Porcentajes de genotipos G de RVA para muestras ambientales (izquierda) y para muestras clínicas (derecha) en el período de septiembre de 2009 a agosto de 2012 detectados en Buenos Aires. MA: muestras ambientales, MC: muestras clínicas.

Como puede observarse en el Gráfico 4.2.1, el genotipo mayoritario en ambos casos fue el G2, con un 31 % para aguas residuales y un 50 % en muestras clínicas. Si bien para las muestras de ambiente el segundo tipo dominante con un 25 % es el G1, existe

codominancia con G3 que alcanza un 24 % respecto al total. Y en este sentido, también es un dato coincidente con muestras clínicas donde G3 alcanza una frecuencia de 31 %. Otras cepas que surgen con frecuencias medias son las de genotipo G12, alcanzando 19 % en las muestras ambientales y 15 % en las muestras clínicas.

Tanto analizando año por año como a nivel global, queda demostrado que existe una marcada correlación entre los tipos encontrados en las muestras provenientes de aguas residuales y aquellas derivadas de centros hospitalarios. Además, se observa que en las muestras ambientales el genotipo G1 se hace presente en frecuencias medias, y estos resultados discrepan con lo observado en muestras provenientes de pacientes hospitalarios. Esto indica que estas cepas podrían ser vertidas a las redes de descargas cloacales por personas con infecciones asintomáticas, por animales o bien podrían corresponder a la cepa vacunal Rotarix, la cual contiene una cepa atenuada G1P[8]. Sin embargo, para confirmar o descartar esta última opción habría que realizar estudios que nos permitan discriminar entre cepas salvajes o cepa vacunal, como los que han realizado Fumian y colaboradores utilizando enzimas de restricción sobre el gen de NSP3 (218).

2.2. *Análisis filogenéticos*

2.2.1. *Cepas G2*

Como ya se discutió en el apartado anterior, en ambos tipos de muestras el genotipo dominante en el año 2011 fue G2. En el capítulo II, parte I, se estudiaron las cepas G2 de muestras clínicas de varios años mediante análisis filogenético. Aprovechando esto, se decidió sumar a estos estudios varias cepas G2 provenientes de aguas residuales. En particular, las cepas incluidas en este análisis fueron 8 y todas del año 2011.

En la reconstrucción del árbol filogenético, mostrado en la Figura 4.2.1, se puede observar que prácticamente todas las cepas provenientes de muestras ambientales agrupan en un mismo clado. Además, estas secuencias agrupan junto a las cepas argentinas provenientes de muestras clínicas estudiadas con antelación en esta tesis.

A estas alturas, ya se ha demostrado que los genotipos encontrados en cada tipo de muestra suelen ser los mismos, y en este apartado queda demostrado además que las cepas provenientes del ambiente son prácticamente idénticas en secuencia a las que proceden de pacientes hospitalarios. Estos resultados apoyan y refuerzan la hipótesis de que existe correlación en la frecuencia de genotipos de RVA encontrados en muestras clínicas y aquellos hallados en muestras cloacales. Asimismo, la comprobación de la identidad de secuencias respalda dicha hipótesis y la relevancia epidemiológica de esta muestra ambiental.

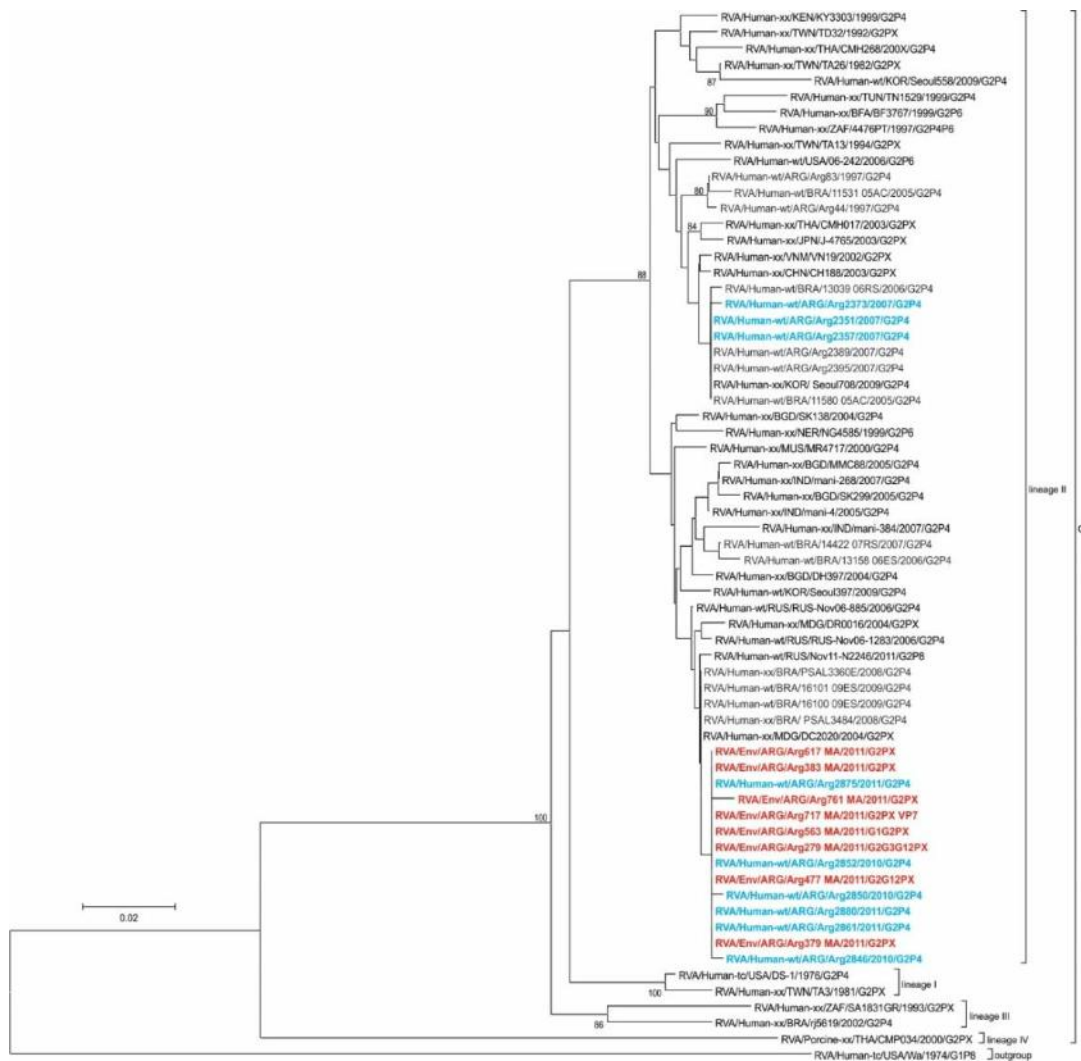


Figura 4.2.1. Filograma del gen vp7 de cepas G2 de muestras ambientales. Las ramas que representan cepas argentinas secuenciadas en este trabajo se encuentran resaltadas en color rojo para las muestras ambientales, y en celeste para las muestras clínicas.

2.2.2. Cepas G1

Además del estudio de las cepas G2, se estudiaron algunas de las cepas G1 detectadas en muestras ambientales. En este caso las muestras secuenciadas e incluidas en los estudios filogenéticos fueron tres: una del año 2009, una del 2010 y otra del 2012.

La Figura 4.2.2 muestra el árbol filogenético donde puede observarse que las tres cepas estudiadas agrupan dentro del linaje I, sublinaje I-c, al igual que las cepas G1 de muestras clínicas. Si bien las secuencias de casos clínicos no agrupan en el mismo clado, tampoco pertenecen al mismo año que las muestras ambientales dada la ausencia casi completa de casos clínicos asociados a cepas G1 entre 2009 y 2012. De esta forma, la relación algo distante entre las muestras clínicas del 2008 y las ambientales del 2009 en adelante podría interpretarse como el reflejo de la evolución de cepas del sublinaje I-c que continúan replicando en casos leves y/o subclínicos. Por lo tanto, consideramos que, al igual que para las cepas G2, estos resultados sugieren una relación directa entre las cepas encontradas en el ambiente y en las muestras clínicas.

Lamentablemente no contamos con muestras ambientales analizadas desde el año 2013 en adelante. Este año y los siguientes resultan de gran interés ya que, como se discutió en el capítulo III, se detectó la reaparición de una cepa del genotipo G1 y en 2014 se produjo un brote con alta morbilidad en el Gran Buenos Aires asociado a este genotipo. Sin embargo, se puede observar con claridad que al menos hasta el año 2012 las cepas G1 circulantes en el ambiente corresponden al tipo de cepas que circulaban con anterioridad al año 2013 en muestras clínicas.

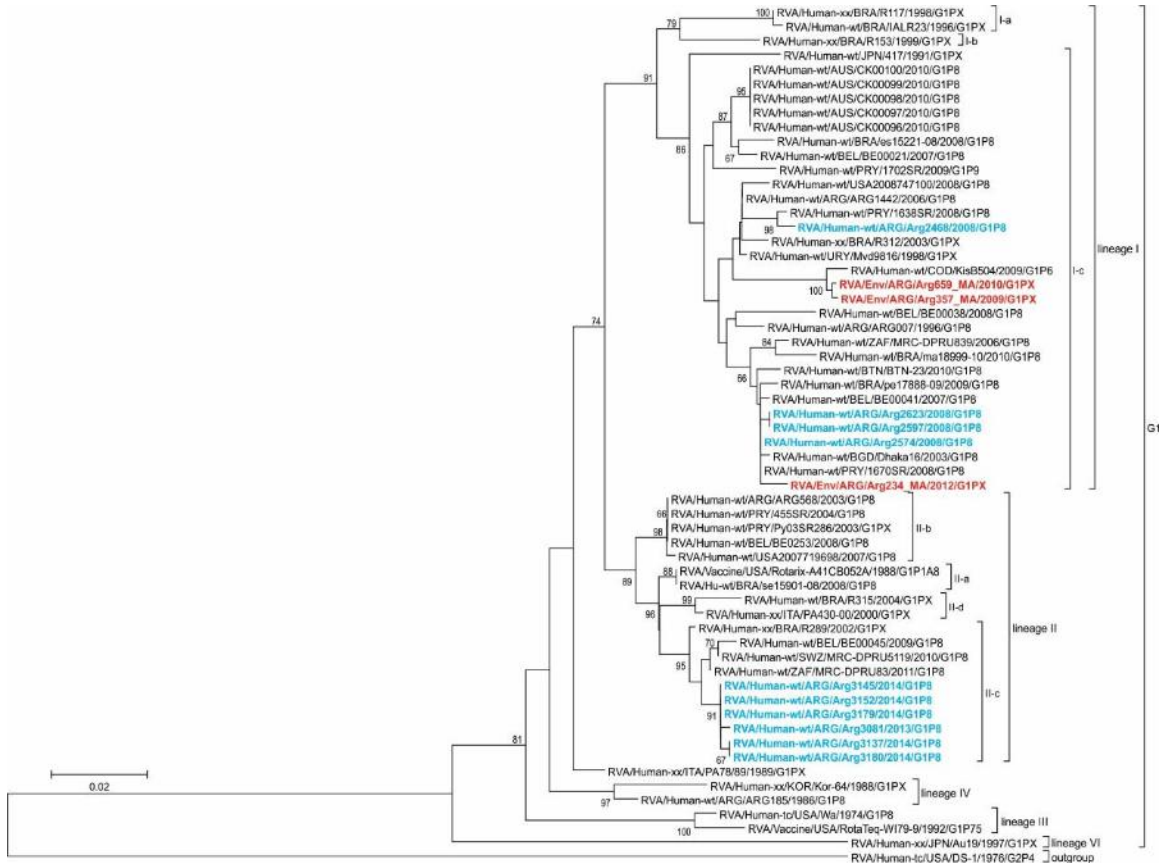


Figura 4.2.2. Filograma del gen vp7 de cepas G1 de muestras ambientales. Las ramas que representan cepas argentinas secuenciadas en este trabajo se encuentran resaltadas en color rojo para las muestras ambientales, y en celeste para las muestras clínicas.

3. CONCLUSIONES

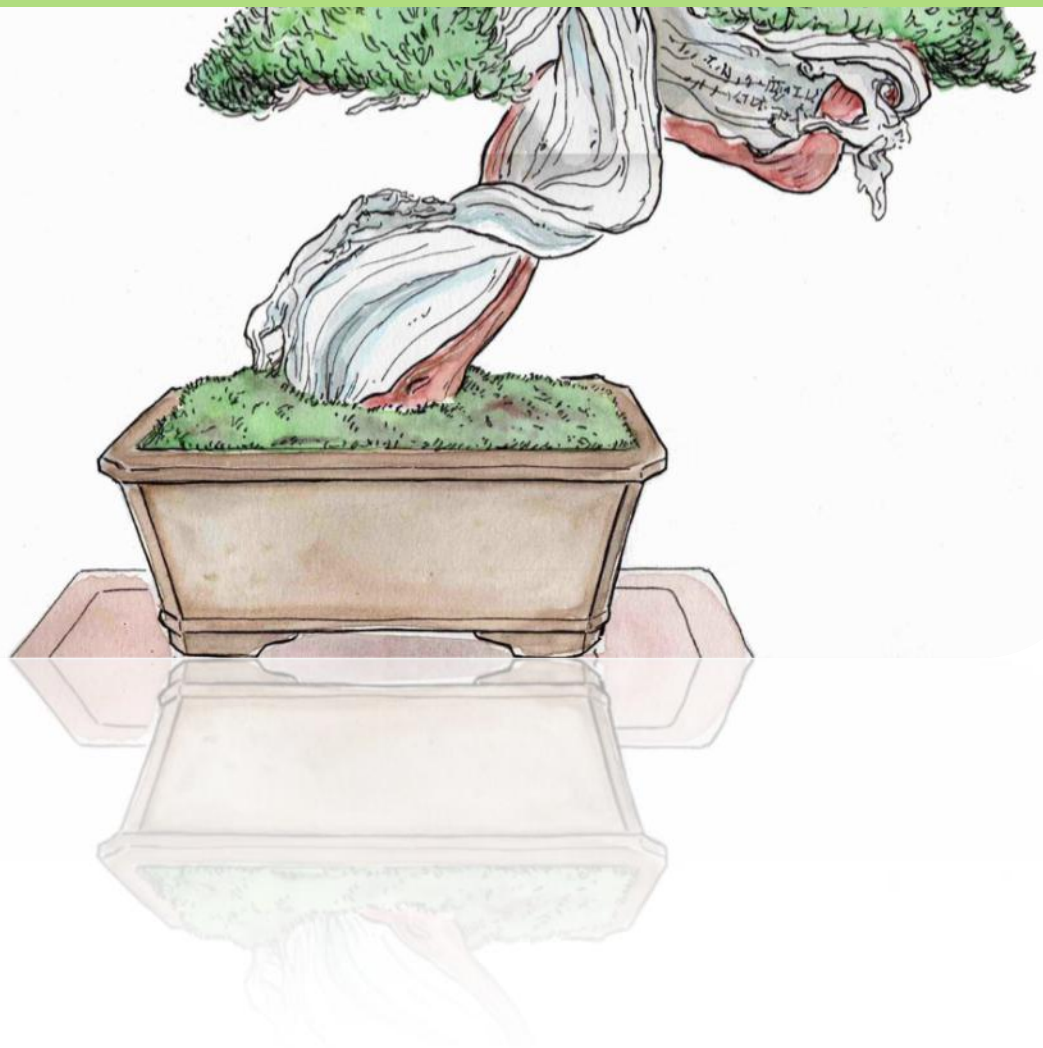
Estos resultados han sido de gran importancia para adquirir conocimiento acerca de qué cepas de RVA son las que circulan en la población general independientemente de la producción de casos de gastroenteritis, ya que éste no es un campo muy explorado. Si bien existe coincidencia con los resultados arrojados del análisis de muestras clínicas en

cuanto al genotipo, en esta sección se analizó también las secuencias nucleotídicas y sus relaciones filogenéticas. De acuerdo con estos estudios, se demostró que las cepas procedentes de ambos tipos de muestra son prácticamente idénticas.

De esta manera, podemos concluir que existe una correlación entre las muestras de aguas residuales y las muestras clínicas, avalando la hipótesis de que las primeras pueden ser una herramienta útil para los estudios de epidemiología molecular de los RVA. Por otro lado, las muestras de ambiente tienen un valor extra ya que a partir de éstas se pueden revelar cepas que no se detectan en muestras clínicas como aquellas derivadas de personas infectadas sin presentaciones clínicas, cepas provenientes de animales o cepas vacunales. Con esta información se puede tener un panorama más amplio y claro del *pool* de genes que circulan y potencialmente contribuyen a la evolución de los RVA. Por estos motivos, consideramos de gran importancia el estudio de la muestra cloacal con fines epidemiológicos y de estudios evolutivos. A todo ello se suma la posibilidad de detectar y seguir la evolución de las cepas vacunales que, por definición, generan infecciones asintomáticas.

PARTE III

**ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE ROTAVIRUS GRUPO A EN
AMBIENTE Y COMPARACIÓN CON DATOS CLÍNICOS**



1. MATERIALES Y MÉTODOS

Los concentrados de las muestras de agua residual fueron sometidos a extracción de material genético viral y posteriormente el mismo fue retrotranscripto con *primers* consistentes en hexámeros al azar (ver protocolos en parte I de este capítulo). Cada muestra de cDNA, correspondiente a cada muestra de agua residual procesada, se analizó por duplicado en reacciones de qPCR. En el mismo proceso se incluyeron duplicados de tres puntos de la curva de calibración de nsp3 y del fago PP7 (diluciones de los plásmidos control) para la cuantificación adecuada de RVA y el control interno, respectivamente. Los detalles de esta técnica y de los reactivos utilizados así como las secuencias de *primers* y sondas, se detallan en la parte I de este capítulo.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar una comparación adecuada entre muestras clínicas y de aguas residuales en el marco de esta tesis doctoral se muestran los resultados cuantitativos del año 2011 para el cual se cuenta con muestras de cada mes. Estos resultados son expresados en copias de genoma de RVA por mililitro de agua residual. Se destaca el hecho de que en todas las muestras pudo ser detectado el control interno (PP7), hallazgo que nos permitió determinar que los procesos de extracción fueron eficientes y que los procesos de copia y amplificación no fueron inhibidos, al menos completamente, por contaminantes en la muestra cloacal. Existe una gran diversidad de sustancias que pueden inhibir las enzimas utilizadas en biología molecular y el hecho de que no hayan sido inhibidas, al menos de manera total, puede indicar cosas diferentes en cada caso: bajo o nulo nivel de partículas virales de RVA en la muestra original o remoción efectiva por los métodos de extracción y purificación de los ácidos nucleicos.

Debido a que cada muestra se procesó por duplicado, los valores se expresan como el promedio de los dos valores obtenidos para cada mes. Excepto en la muestra del mes de diciembre, en las 11 muestras restantes se detectó RVA. Dado los niveles variables de inhibición, el hecho de que una detección sea negativa no necesariamente debe interpretarse como ausencia de partículas virales, sino que también puede corresponder a niveles bajos que quedan por debajo del corte que determina la sensibilidad del método y el grado de inhibición de esa muestra en particular.

2.1 Carga viral de rotavirus en aguas residuales y comparación con la incidencia de RVA en muestras clínicas

En el Gráfico 4.3.1 se muestran los resultados de la cuantificación de RVA proveniente de aguas residuales del año 2011, mes a mes, y además se los contrasta con la incidencia de infecciones por rotavirus reportados en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (HNRG) para el mismo año.

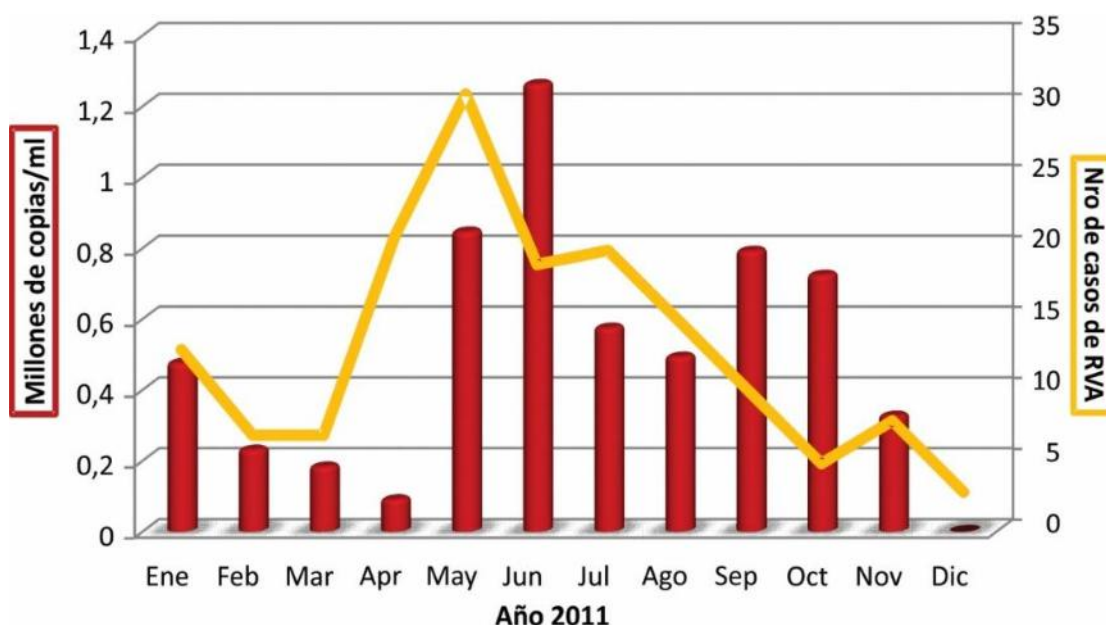


Gráfico 4.3.1. Cuantificación de RVA en aguas residuales e incidencia de infecciones causadas en pacientes hospitalizados. En el gráfico se muestra la cuantificación de RVA a lo largo de los meses en muestras ambientales (eje izquierdo) y el número de muestras de reportes de infecciones por RVA reportados en el HNRG (eje derecho).

Los valores de RVA detectados por qPCR varían desde aproximadamente 91 mil copias de genoma/ml en el mes de abril hasta más de 1,2 millones de copias de genoma/ml en el mes de junio, sin tener en cuenta el valor cero del mes de diciembre. De acuerdo a estos resultados se determina que existe gran variabilidad dependiendo del mes del año que se analiza.

Si se analizan estos valores mes a mes, se aprecia que los RVA detectados en descargas cloacales sufren un aumento abrupto a partir del mes de mayo representando un pico en los meses fríos del año. Observaciones similares han sido reportadas previamente para la ciudad de Córdoba, Argentina (221), la ciudad de Salto en Uruguay (199) y en otros países (220).

La descripción de un pico invernal en descargas cloacales coincide con la estacionalidad ya descrita de las infecciones de RVA en pacientes hospitalarios (77-79). Si bien existe un corrimiento de un mes en el pico de RVA para muestras ambientales, el comportamiento es llamativamente similar a la incidencia en muestras clínicas. Esto se puede deber a que existe una mayor descarga de rotavirus por parte de la población en los meses fríos del año, lo cual se vería reflejado como un aumento de la cantidad de genomas de RVA detectados en aguas residuales. De esta manera, se demuestra que existe correlación entre el número de casos de infecciones por rotavirus grupo A y la cantidad de partículas virales liberadas al ambiente. Es notable el paralelismo entre el número de casos de diarreas severas en pacientes hospitalizados por RVA y la concentración de genomas en aguas residuales a lo largo del año.

Es posible observar el reflejo del pico estacional de diarreas entre mayo y agosto con un retraso, ya que se observa aumento o disminución de las copias de genomas al mes siguiente en agua residual. Posteriormente, el número de diarreas desciende consistentemente hasta diciembre pero durante esta etapa las concentraciones en aguas residuales se sostienen relativamente altas. Esto podría reflejar un período de infecciones secundarias en poblaciones de individuos menos susceptibles a la enfermedad severa como hermanos mayores o padres dentro del grupo familiar.

3. CONCLUSIONES

Las comparaciones de las características genotípicas y de secuencia entre muestras clínicas y de aguas residuales presentadas previamente permiten afirmar que los mismos virus se hallan en ambos tipos de muestras. La comparación de la cantidad de casos severos con la concentración de virus en aguas residuales presentadas en esta parte nos ha permitido observar un paralelismo entre el pico invernal de diarreas por RVA y aumentos de concentración en el agua cloacal. Este paralelismo aporta otra evidencia a la idea ya planteada que confirma que los virus excretados durante el invierno corresponden a los casos clínicamente severos avalando la utilización de la muestra ambiental en estudios epidemiológicos. Un estudio exhaustivo de genotipos y secuencias mes a mes podría confirmar esto y la posible correspondencia de casos secundarios sub-clínicos por los mismos genotipos en meses subsiguientes al pico.

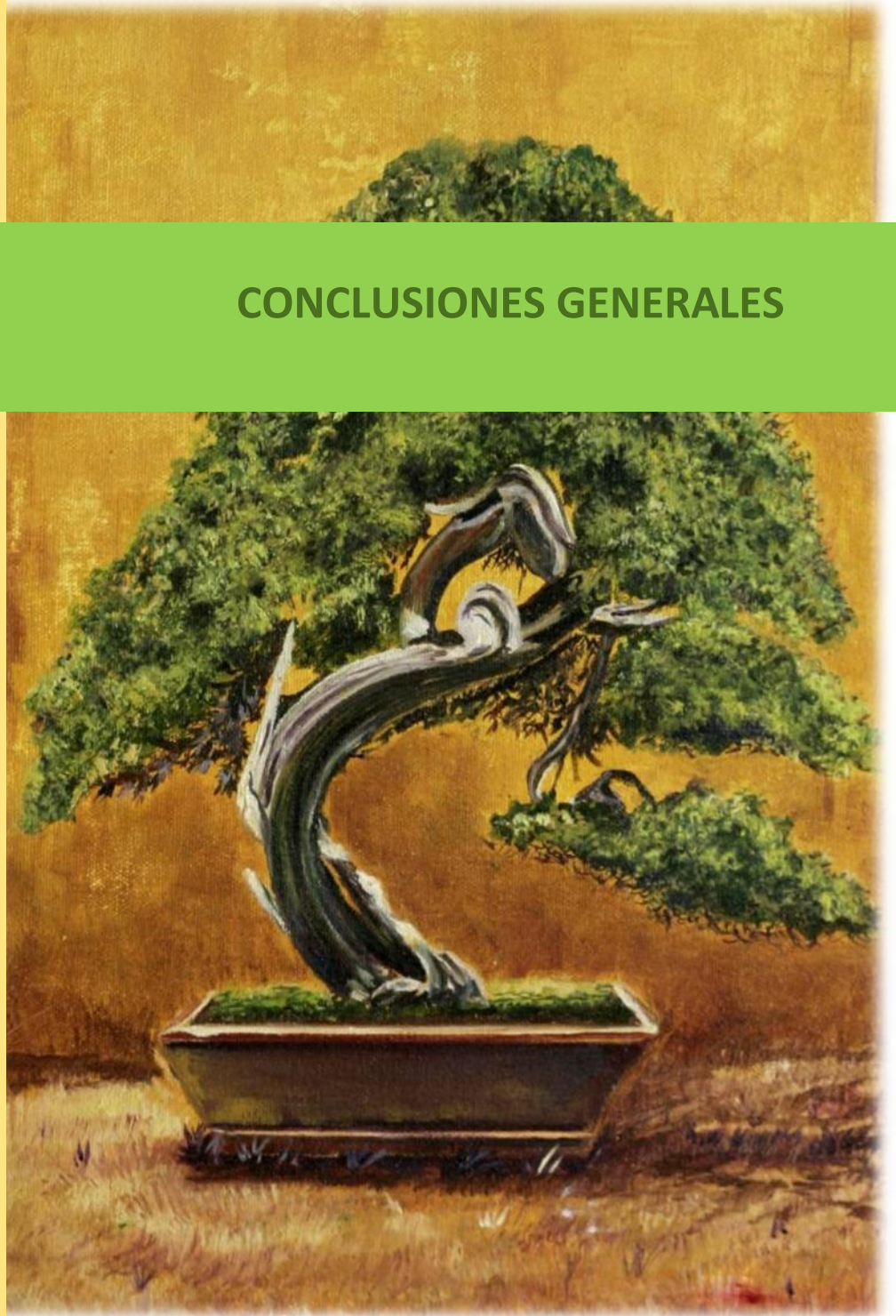
Lo anterior, entonces, nos permite concluir que existe una correlación entre los virus excretados por la población con los que causan la incidencia de la enfermedad por RVA en pacientes hospitalarios. Sin embargo, no hay que perder de vista que en las descargas cloacales potencialmente se pueden detectar genomas de rotavirus grupo A provenientes de cepas animales, de infecciones asintomáticas o de cepas vacunales. Un indicio de esto lo hemos presentado en secciones anteriores en las que mostramos la detección de ciertos genotipos en muestras ambientales no hallados en muestras de casos severos.

Estos hallazgos refuerzan la idea de utilizar la muestra ambiental como una herramienta para estudiar la circulación de los genotipos principales causantes de enfermedad, pero también sería posible implementar estudios evolutivos. Esto se comprende conceptualmente al considerar que la muestra de agua residual refleja la dotación genética total circulante en la población humana, no solo la asociada a enfermedad (hallada, por definición, en la muestra clínica). Estos conceptos son también aplicables a estudios de circulación y evolución de cepas vacunales, las cuales han sido

recientemente adoptadas en nuestro país en programas de vacunación masiva así como en casi todo el continente.

Cabe comentar, como perspectiva, que será de gran interés aplicar métodos de secuenciamiento de nueva generación y estrategias de metagenómica a muestras ambientales para lograr los objetivos antes mencionados.

CONCLUSIONES GENERALES



Epidemiología de los RVA en el Gran Buenos Aires

En esta primera parte, tomando ventaja de una extensa colección de muestras de casos de diarreas en pacientes ambulatorios e internados de distintos hospitales de la región metropolitana y de los datos aportados por el servicio de Virología del HNRG, hemos obtenido un perfil epidemiológico de la circulación del RVA en un período que involucra 6 temporadas invernales (2008-2013). Las observaciones principales son:

- Mayor prevalencia de RVA en casos severos (hospitalizados) que en casos ambulatorios.
- Marcada estacionalidad en los meses fríos. En general se da un aumento abrupto a partir de mayo con frecuencias altas hasta agosto para luego decaer. Sin embargo se observa que en los meses cálidos las infecciones no desaparecen.
- Distribución etaria típica de primoinfecciones en edades tempranas con la mayoría de los infectados (80%) siendo menores de 14 meses de edad.
- Frecuencia elevada de infecciones mixtas (15,9 % para el hospital de Solano y 12,7% para el Hospital Gutiérrez), aspecto de suma importancia debido a que este tipo de infección dinamiza la evolución del virus.

Circulación de genotipos de RVA en el Gran Buenos Aires.

Nuestro laboratorio ha mantenido la vigilancia de genotipos desde el año 1996 por lo que su análisis ofrece la oportunidad de estudiar posibles cambios producidos entre la era prevacunación y postvacunación en la región. Durante el primer período, que involucra hasta el año 2007, se registraría un patrón natural de fluctuaciones en las frecuencias de los genotipos circulantes mientras que desde 2008 varios países del subcontinente han incorporado la vacunación masiva en sus calendarios de inmunización. En la Argentina la vacunación contra RVA se incorporó al Programa Nacional en 2015, por

lo que durante el período de análisis que abarca esta tesis el país puede considerarse como virtualmente sin vacunación ya que la cobertura por vacunas licenciadas indicadas en la práctica privada no ha sido de gran significación, alcanzando aproximadamente el 7% de las cohortes. Varias observaciones de interés en relación a este contexto pueden hacerse en base a los resultados integrados:

- Las cepas G12P[9] tipo AU-1, genómicamente y antigénicamente diversas con respecto a las vacunales, han circulado en el GBA desde 1999 hasta el año 2007. Si bien a bajos niveles de frecuencia, estas cepas han persistido durante varios años en el GBA y se han detectado en otros países de la región en años posteriores a su aparición en Argentina.

- Cepas G12P[8] han emergido desde el 2008 y fueron de prevalencia muy significativa durante el período posterior en el GBA. La presencia de este genotipo a tasas medias a altas durante todo el período estudiado y reportes similares en todo el mundo, evidencian su alta aptitud para la diseminación y persistencia en poblaciones humanas.

- La observación de los resultados integrados desde 1996 en GBA muestra que el incremento observado en 2004 de cepas G2P[4] podría atribuirse a la tendencia natural a reemerger cada 8-10 años. Estos niveles se mantienen altos a medios desde el 2004 hasta el 2008 desapareciendo en 2009. Sin embargo hay una reemergencia atípica en 2010, con niveles extremos cercanos al 70% en 2011, altos todavía en 2012 y medios a bajos en 2013 y 2014, pero aun persistiendo.

- La detección de G3P[8] como cepa codominante en 2008 y 2009 y dominante en 2010 es de resaltar ya que, hasta donde sabemos, es la primera vez que el genotipo G3 es detectado en altas frecuencias en Buenos Aires desde que se realiza vigilancia de sero o genotipos circulantes.

- En 2014 se registraron elevada morbilidad y mortalidad asociadas a infección por RVA. La genotipificación de estas cepas marca la reemergencia del genotipo G1P[8], cepas ausentes durante un largo tiempo en nuestra casuística.

Caracterización molecular de cepas de interés.

En el contexto antes mencionado se ha orientado el estudio a la profundización del análisis sobre los hallazgos más llamativos y relevantes en cuanto a su posible relación con el desempeño de la vacuna monovalente utilizada por todos los países sudamericanos. Dichos hallazgos son: i) La emergencia de cepas G12, ii) La reemergencia y prolongada persistencia de cepas G2P[4] y iii) La reemergencia y alta morbilidad de cepas G1P[8].

Cepas G12.

El análisis detallado de algunos aspectos de las cepas G12 permite destacar las siguientes conclusiones:

- Se ha secuenciado el gen de VP7 de cuatro cepas G12P[9] , dos del año 1999, una del 2002, y otra del año 2007. Todas pertenecen al linaje II y según el análisis de coalescencia una cepa de 1999 o un ancestro muy próximo sería el origen de las cepas diseminadas a los países vecinos y de la última cepa detectada en Italia. En base al secuenciamiento del gen de la proteína NSP1 es posible sugerir que el aislado del 2002 sería un producto de reasociación de cepas relacionadas a las de 1999 con cepas bovinas o humanas relacionadas a cepas animales. Su estudio filogenético ubica a este gen de NSP1 como perteneciente al genotipo A3 en un clúster bien diferenciado. En base a la filogenia de todas las cepas reportadas a la fecha con dicho genotipo se aprecia que las secuencias que agrupan en el mencionado clúster se han reportado exclusivamente en cepas G12 de la región y siempre detectadas posteriormente a las argentinas de 2002, lo cual sugiere que podrían configurar derivados de la misma.

- A partir de los ensayos de coalescencia y filogeografía del gen vp7 se pudo estudiar y profundizar acerca de la evolución de cepas G12 del linaje II, que por lo general se encuentran asociadas a P[9]. Según esta historia espacio-temporal el linaje se origina

probablemente a principios de la década de 1990 con la primera detección conocida en Tailandia y de ahí hacia otros países asiáticos y hacia Argentina desde donde puede trazarse una historia de propagación a varios países de la zona como Brasil, Paraguay y Uruguay, donde ha circulado durante más de 10 años con dispersión hacia Europa en los últimos años siendo el último reporte en Italia en 2012.

- Mientras que las cepas tipo AU-1 descritas arriba fueron siempre detectadas a frecuencias medias a bajas en países del lejano Oriente y el cono sur de América, las cepas tipo Wa G12P[8] actuales se hallan en altas frecuencias y globalmente distribuidas y parecen ser el producto de unos diez años de evolución que culmina en un tipo de cepa con alto *fitness* e importancia epidemiológica.

- En Buenos Aires desde 1999 y hasta el año 2007 han circulado cepas G12 del linaje II y desde 2008 en adelante las cepas pertenecen a VP7 G12 linaje III

- Las cepas G12 linaje III han aparecido en nuestra casuística siempre asociadas al genotipo P[8] y son detectadas simultáneamente a nivel nacional y caracterizadas como del tipo Wa.

- Las cepas G12P[8] se mantienen en medias a altas prevalencias desde 2008 prácticamente todos los años hasta 2014. Esta persistencia y altas frecuencias (más del 60% en 2013) en el GBA se observa en otros estudios a nivel global ilustrando su alto nivel de aptitud para la infección y diseminación en humanos.

- Si bien los estudios de secuencia permiten apreciar un alto nivel de identidad nucleotídica en el gen de VP7 de aislados de tres años distintos, la heterogeneidad de genes VP4 asociados a cepas G12P[8] permite considerar que las introducciones en nuestro país han sido masivas y probablemente también múltiples. Asimismo esta observación habla de una cierta diversidad de estas cepas G12.

Cepas G2P[4]

Sin poner en duda la alta eficacia y efectividad de la vacuna monovalente (tipo Wa) contra casos severos por cepas del tipo G2P[4] (tipo DS-1), es posible suponer que la inmunidad inducida hacia los dos principales tipos de cepas humanas no es exactamente igual. La protección contra enfermedad severa inducida por la vacuna monovalente no necesariamente implica que no existan casos leves y asintomáticos, los cuales, en base a esta selección podrían tratarse mayormente de cepas G2P[4]. En esta línea de razonamiento, el hecho de que exista algún mínimo nivel de selección en el marco de inmunizaciones masivas, podría dar lugar a algunas de las observaciones epidemiológicas singulares descritas en este trabajo de tesis:

- La circulación y reemplazo natural de genotipos observados por nuestro grupo a lo largo casi dos décadas registra un re-incremento inesperado de la circulación de cepas G2P[4] luego del período de prevalencia natural.

- El análisis filogenético del gen vp7 indica que todas las secuencias de esta colección pertenecen al linaje II del genotipo G2, pero segregan en grupos diferentes.

- Las cepas G2 correspondientes a los años 1997 y 2007 están más relacionadas entre sí y a su vez con algunas secuencias de cepas circulantes en Brasil durante 2005 y 2006.

- Las cepas que circularon en Brasil durante 2008 y 2009 están muy relacionadas con el grupo de cepas argentinas altamente homogéneas que emergieron en 2010.

- El análisis filogenético de las secuencias del gen de VP4 confirmó las relaciones establecidas en base al gen vp7 de las cepas argentinas entre sí y con un subgrupo circulante en Brasil en 2008 y 2009. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que esas cepas G2P[4] se introdujeron en Argentina desde Brasil.

- El análisis de las secuencias aminoacídicas predichas de las regiones antigénicas B, C y F de VP7 mostró una sustitución (242 S → N) consistente entre las cepas circulantes en

ambas fases en Argentina. Este cambio también se comparte con las cepas circulantes en Brasil aunque es difícil relacionar este tipo de cambios a la selección de cepas por inmunidad inducida por vacunas.

Estas evidencias entre las frecuencias de los genotipos dominantes y algunos raros circulantes en el Cono Sur sugieren que estos países vecinos están conectados epidemiológicamente. Por lo antedicho, es posible que la abundancia relativa de cepas DS-1-like o la disminución de cepas Wa-like en Brasil haya introducido un sesgo en la sustitución usual de serotipos en Argentina. De esta manera nuestro país, sin vacunación universal en los años del estudio, podría actuar como amplificador de este efecto visualizado a través de la llamativa reducción de la prevalencia de cepas G1P[8] y la persistencia de G2P[4] en los últimos años.

Cepas G1P[8]

- De acuerdo a los análisis filogenéticos del gen de VP7 se demostró que las cepas aparecidas en 2014 y la única detectada en 2013 pertenecen al linaje II, sublinaje IIc, mientras que las detectadas en años anteriores agrupan junto a las del linaje I.

- El filograma obtenido para el gen de NSP4 confirma estas relaciones, lo cual sugiere que la reintroducción de cepas G1 del año 2014 corresponde a una cepa emergente sin circulación previa en el país. Si bien hay diferencias en zonas antigénicas y de péptido secretado no es posible vincular estos cambios a una diferencia en patogenicidad.

- Análisis de secuencias de aminoácidos de las proteínas VP7, VP4 y NSP4 apoyan lo visto en los estudios filogenéticos y se destaca el hecho de que hay cambios en dos regiones antigénicas de la VP7 con respecto a cepas circulando previamente y con respecto a la cepa vacunal incluida en Rotarix. En caso de poder demostrarse diferencias

significativas en estudios de seroneutralización comparando estas cepas con la vacunal podría postularse algún efecto de selección de cepas por efecto de la vacunación masiva.

Virología Ambiental. Estudios y puesta a punto de metodología

- Se han puesto a punto técnicas de concentración viral y de cuantificación de genomas que nos permitieron el estudio de muestras cloacales.

- El uso del control interno consistente en el fago PP7 permite determinar y valorar de forma aproximada la presencia o no de inhibidores que afecten alguno de los procesos.

- Los rangos dinámicos en los cuales las curvas de calibración nos permiten extrapolar valores son extensos (50 a 50 millones de copias cada 5 μ l para RVA y de 25 a 50 millones de copias cada 5 μ l para PP7).

- Se analizó y comparó la frecuencia de detección de genotipos entre la muestra cloacal y la clínica encontrándose correlación entre ellas.

- Se confirmó la identidad de las cepas en ambos tipos de muestras mediante secuenciamiento, avalando la hipótesis de que la muestra cloacal puede ser una herramienta útil para los estudios de epidemiología molecular de los RVA.

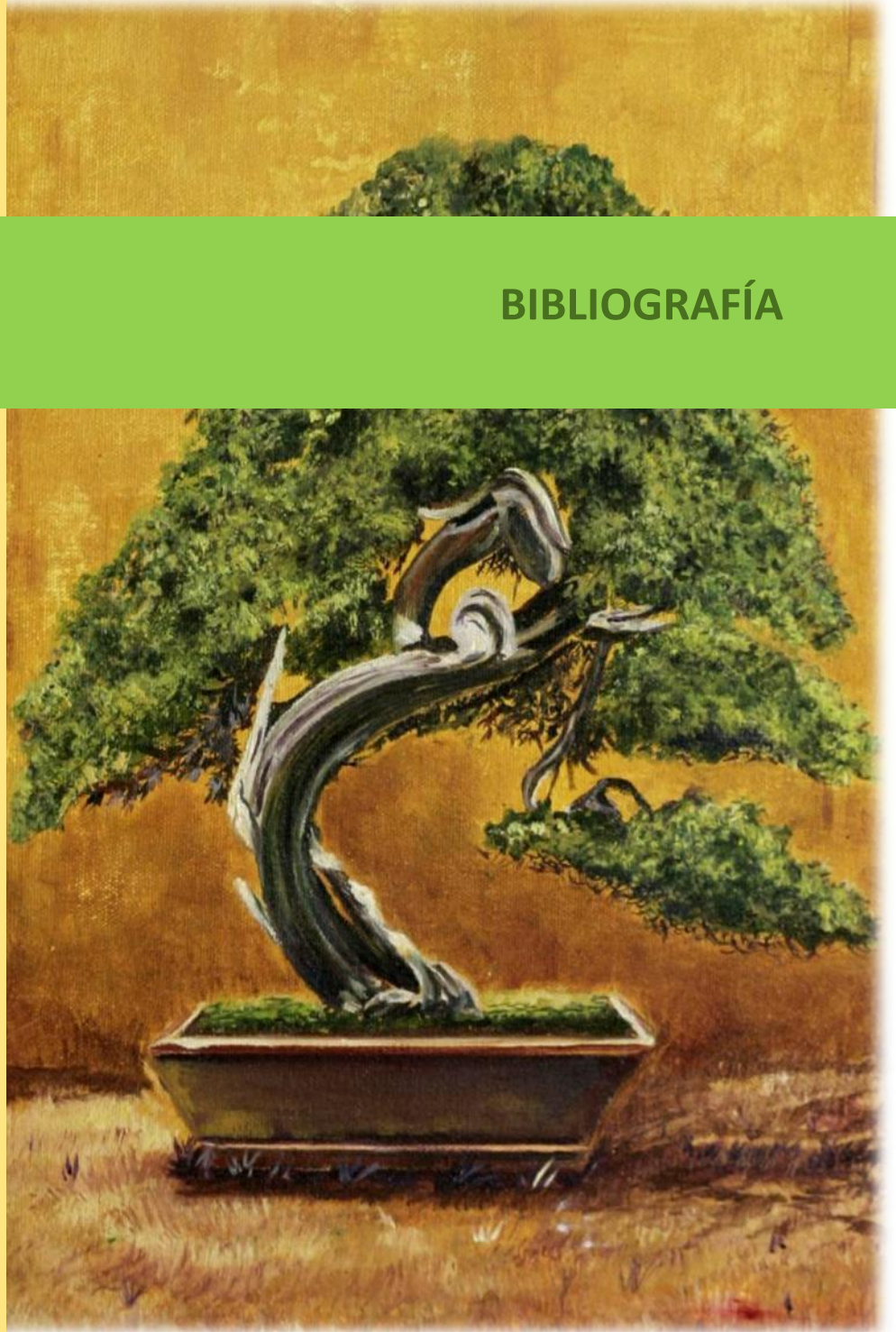
Las muestras de ambiente tienen un valor extra ya que a partir de éstas se pueden revelar cepas que no se detectan en muestras clínicas como aquellas derivadas de personas infectadas sin presentaciones clínicas, cepas provenientes de animales o cepas vacunales. Con esta información se puede tener un panorama más amplio y claro del todos los genes que circulan y potencialmente contribuyen a la evolución de los RVA.

Además, la comparación de la cantidad de casos severos con la concentración de virus en aguas residuales permite observar un paralelismo entre el pico invernal de diarreas por RVA y aumentos de concentración en el agua cloacal. Esta semejanza aporta

evidencia a la idea de que los virus excretados durante el invierno corresponden a los casos clínicamente severos avalando la utilización de la muestra ambiental en estudios epidemiológicos. Sin embargo, es importante considerar que en las descargas cloacales potencialmente se pueden detectar genomas provenientes de cepas animales, de infecciones asintomáticas o de cepas vacunales.

Todos estos hallazgos en conjunto refuerzan la idea de utilizar a la muestra ambiental como herramienta para estudiar la circulación de los genotipos principales causantes de enfermedad pero también sería posible implementar estudios evolutivos.

BIBLIOGRAFÍA



1. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. Estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012;12:136-41 (2008).
2. International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh. Estimated deaths due to rotavirus in Bangladesh. *Health and Science Bulletin* 4:6–10 (2006).
3. Raebel, M. A., and B. S. Ou. Rotavirus disease and its prevention in infants and children. *Pharmacotherapy* 19:1279-95 (1999).
4. Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, and R. M. Chanock. Rotaviruses, p. 1787-1833. In H. P.M. (ed.), *Fields virology*, 4th ed, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 13 (2001).
5. Tucker, A. W., A. C. Haddix, J. S. Bresee, R. C. Holman, U. D. Parashar, and R. I. Glass. Cost-effectiveness analysis of a rotavirus immunization program for the United States. *JAMA* 279:1371-6 (1998).
6. Desai R, Parashar UD, Lopman B, Oliveira LH, Clark AD, Sanderson CFB, Tate JE, Matus CR, Andrus JK, Patel MM. Potential intussusception risk versus health benefits from rotavirus vaccination in Latin America. *Clin Infect Dis* 54: 1397-1405. (2012)
7. Degiuseppe JI, Giovacchini C, Stupka JA and Red Nacional de Vigilancia de Gastroenteritis Virales. Vigilancia epidemiológica de rotavirus en la Argentina: 2009-2011. *Arch Argent Pediatr* 111(2):148-154. (2013).
8. Estes MK, Kapikian AZ: Rotaviruses. In: *Fields Virology*, Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Ed.). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2007).
9. Estes M y Greenberg H. Capítulo Rotavirus en *Fields Virology*, 6th Edition Edited by David M. Knipe and Peter M. Howley. p 1347-1401 (2013)
10. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2(7841), 1281-1283 (1973).
11. Flewett TH, Bryden AS, Davies H: Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2(7844), 1497 (1973).
12. Iturriza Gomara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J: Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol* 76(13), 6596-6601 (2002).
13. Prasad BV, Wang GJ, Clerx JP, Chiu W: Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* 199(2), 269-275 (1988).

14. Yeager M, Dryden KA, Olson NH, Greenberg HB, Baker TS: Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol* 110(6), 2133-2144 (1990).
15. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV: Comparative structural analysis of transcriptionally competent and incompetent rotavirus-antibody complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10), 5428-5433 (1999).
16. Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BV: Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* 309, 189-219 (2006).
17. Estes MK, Cohen J: Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53(4), 410-449 (1989).
18. Jayaram H, Estes MK, Ventakaram Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res.* 101(1):67-81. (2004)
19. Cohen, J. Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 36:395-402. (1977)
20. Chizhikov V, Patton JT. A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *RNA* ;6:814-825 (2000)
21. Arnold MM, Patton JT: Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *Journal of Virology*, 85:1970-1979. (2011)
22. Bagchi P, Dutta D, Chattopadhyay S, Mukherjee A, Halder UC, Sarkar S, Kobayashi N, Komoto S, Taniguchi K, Chawla-Sarkar M: Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection. *Journal of Virology*, 84:6834-6845. (2010)
23. Graff JW, Ettayebi K, Hardy ME: Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathogens*, 5:e1000280. (2009)
24. Graff JW, Ewen J, Ettayebi K, Hardy ME: Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *Journal of General Virology*, 88:613-620. (2007)
25. Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR: Two nonstructural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasmlike structures in vivo. *Journal of General Virology*, 80(Pt 2):333-339. (1999)
26. Patton JT, Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Taraporewala ZF: Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 309:169-187. (2006)

27. Prasad BV, Rothnagel R, Zeng CQ, Jakana J, Lawton JA, Chiu W, Estes MK: Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature*, 382:471-473. (1996)
28. Taraporewala ZF, Patton JT: Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *Journal of Virology*, 75:4519-4527. (2001)
29. Taraporewala Z, Chen D, Patton JT: Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *Journal of Virology*, 73:9934-9943. (1999)
30. Vasquez-Del Carpio R, Gonzalez-Nilo FD, Riadi G, Taraporewala ZF, Patton JT: Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities. *Journal of Molecular Biology*, 362:539-554. (2006)
31. Kumar M, Jayaram H, Carpio RV, Jiang X, Taraporwala ZF, Jacobson RH, Patton JT, Prasad BV: Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals an NDP kinase like activity. *Journal of Virology*, 81 :12272-12284. (2007)
32. Deo RC, Groft CM, Rajashankar KR, Burley SK: Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell*, 108:71-81. (2002)
33. Groft CM, Burley SK: Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Molecular Cell*, 9:1273-1283. (2002)
34. Patton JT: Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol* 76 (Pt 11), 2633-2644 (1995).
35. Sen A, Sen N, Mackow ER: The formation of viroplasm-like structures by the rotavirus NSP5 protein is calcium regulated and directed by a C-terminal helical domain. *Journal of Virology*, 81:11758-11767. (2007)
36. Arnoldi F, Campagna M, Eichwald C, Desselberger U, Burrone OR: Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *Journal of Virology*, 81:2128-2137. (2007)
37. Berois M, Sapin C, Erk I, Poncet D, Cohen J: Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *Journal of Virology*, 77:1757-1763. (2003)
38. Torres-Vega MA, Gonzalez RA, Duarte M, Poncet D, Lopez S, Arias CF: The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *Journal of General Virology*, 81 :821-830. (2000)
39. Vende P, Taraporewala ZF, Patton JT: RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *Journal of Virology*, 76:5291-5299. (2002)

40. Contin R, Arnoldi F, Campagna M, Burrone OR: Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. *Journal of General Virology*, 91 :1782-1793. (2010)
41. Mattion NM, Mitchell DB, Both GW, Estes MK: Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11 . *Virology*, 181 :295-304. (1991)
42. Rainsford EW, McCrae MA: Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus Research*, 130:193-201. (2007)
43. Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol* 157:1177–1182. (2012)
44. Mihalov-Kovács E, Gellért A, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M, Jakab F, Martella V, Bányai K. Candidate New Rotavirus Species in Sheltered Dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis*. 21(4):660-3. (2015)
45. Cunliffe NA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI, Hart CA: The expanding diversity of rotaviruses. *Lancet* 359(9307), 640-642 (2002).
46. Taniguchi K, Urasawa S: Diversity in rotavirus genomes. *Virology* 6, 123-131 (1995).
47. Nakagomi O, Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N: Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization. *Mol Cell Probes* 3(3), 251-261 (1989).
48. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E et al.: 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. *J Virol* 82(7), 3204-3219 (2008).
49. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM et al.: Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156(8), 1397-1413 (2011).
50. <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
51. Trojnar E, Sachsenroder J, Twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R: Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol* 94(Pt 1), 136-142 (2013).
52. Matthijnssens J, Van Ranst M: Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol* 2(4), 426-433 (2012).
53. Trask SD, McDonald SM, Patton JT: Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol* 10(3), 165-177 (2012).
54. Zhang M, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK: A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol* 74(24), 11663-11670 (2000).
55. Bomsel M, Alfsen A: Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(1), 57-68 (2003).

56. Feng N, Burns JW, Bracy L, Greenberg HB: Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J Virol* 68(12), 7766-7773 (1994).
57. Franco MA, Angel J, Greenberg HB: Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 24(15), 2718-2731 (2006).
58. Yuan L, Ward LA, Rosen BI, To TL, Saif LJ: Systematic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J Virol* 70(5), 3075-3083 (1996).
59. Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB: Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 272(5258), 104-107 (1996).
60. Ishida SI, Feng N, Gilbert JM, Tang B, Greenberg HB: Immune responses to individual rotavirus proteins following heterologous and homologous rotavirus infection in mice. *J Infect Dis* 175(6), 1317-1323 (1997).
61. Svensson L, Sheshberadaran H, Vene S, Norrby E, Grandien M, Wadell G: Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J Gen Virol* 68 (Pt 3), 643-651 (1987).
62. Cortesy B, Benureau Y, Perrier C et al.: Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *J Virol* 80(21), 10692-10699 (2006).
63. Franco MA, Greenberg HB: Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol* 69(12), 7800-7806 (1995).
64. Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ et al.: Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med* 335(14), 1022-1028 (1996).
65. Desselberger U, Manktelow E, Li W, Cheung W, Iturriza-Gomara M, Gray J: Rotaviruses and rotavirus vaccines. *Br Med Bull* 90, 37-51 (2009).
66. Dennehy PH: Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *Pediatr Infect Dis J* 19(10 Suppl), S103-105 (2000).
67. Zheng BJ, Chang RX, Ma GZ et al.: Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *J Med Virol* 34(1), 29-37 (1991).
68. Blutt SE, Matson DO, Crawford SE et al.: Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med* 4(4), e121 (2007).
69. Fenaux M, Cuadras MA, Feng N, Jaimes M, Greenberg HB: Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *J Virol* 80(11), 5219-5232 (2006).
70. Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI: Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12(2), 304-306 (2006).

71. Degiuseppe JI, Giovacchini C, Stupka JA and Red Nacional de Vigilancia de Gastroenteritis Virales. Vigilancia epidemiológica de rotavirus en la Argentina: 2009-2011. *Arch Argent Pediatr* 111(2):148-154. (2013)
72. Black RE, Cousens S, Johnson HL et al.: Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 375(9730), 1969-1987 (2010).
73. Glass RI, Bresee J, Jiang B, Parashar U, Yee E, Gentsch J: Rotavirus and rotavirus vaccines. *Adv Exp Med Biol* 582, 45-54 (2006).
74. WHO: Rotavirus vaccines. WHO position paper - January 2013. *Wkly Epidemiol Rec* 88(5), 49-64 (2013).
75. Fundamentos de la introducción de la vacuna contra rotavirus al Calendario Nacional de Inmunizaciones 2015. Ministerio de Salud de la República Argentina. (2014)
76. Lepage P, Vergison A: Impact of rotavirus vaccines on rotavirus disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10(5), 547-561 (2012).
77. Berner, R., R. F. Schumacher, S. Hameister, and J. Forster. Occurrence and impact of community-acquired and nosocomial rotavirus infections--a hospital-based study over 10 years. *Acta Paediatr Suppl* 88:48-52. (1999)
78. Desenclos, J. C., I. Rebiere, L. Letrillard, A. Flahault, and B. Hubert. Diarrhoearelated morbidity and rotavirus infection in France. *Acta Paediatr* 88:S42-7. (1999)
79. Van der Donck, I., L. van Hoovels, K. de Leener, T. Goegebuer, L. Vanderwegen, J. Frans, M. Rahman, and M. van Ranst. Severe diarrhea due to rotavirus infection in a Belgian hospital 1981-2002. *Acta Clin Belg* 58:12-8. (2003)
80. Cook, S. M., R. I. Glass, C. W. LeBaron, and M. S. Ho. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ* 68:171-7. (1990)
81. ak. Cunliffe, N. A., P. E. Kilgore, J. S. Bresee, A. D. Steele, N. Luo, C. A. Hart, and R. I. Glass. Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Africa: a review to assess the need for rotavirus immunization. *Bull World Health Organ* 76:525-37. (1998)
82. al. Parashar, U. D., J. S. Bresee, J. R. Gentsch, and R. I. Glass. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 4:561-70. (1998)
83. Gouvea V, Brantly M: Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol* 3(4), 159-162 (1995).
84. Rahman M: Molecular epidemiology of human group A rotaviruses. *Faculteit Geneeskunde PhD*, (2008).
85. Rahman M, Matthijnsens J, Yang X et al.: Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J Virol* 81(5), 2382-2390 (2007).
86. Castello AA, Arvay ML, Glass RI, Gentsch J: Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. *Pediatr Infect Dis J* 23(10 Suppl), S168-172 (2004).

87. Desselberger U, Wolleswinkel-van den Bosch J, Mrukowicz J, Rodrigo C, Giaquinto C, Vesikari T: Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 25(1 Suppl), S30-41 (2006).
88. Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B et al.: Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis* 192 Suppl 1, S146-159 (2005).
89. Santos N, Hoshino Y: Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 15(1), 29-56 (2005).
90. Cunliffe NA, Dove W, Bunn JE et al.: Expanding global distribution of rotavirus serotype G9: detection in Libya, Kenya, and Cuba. *Emerg Infect Dis* 7(5), 890-892 (2001).
91. Linhares AC, Verstraeten T, Wolleswinkel-van den Bosch J, Clemens R, Breuer T: Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. *Clin Infect Dis* 43(3), 312-314 (2006).
92. Matthijnsens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M: Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol* 27(10), 2431-2436 (2010).
93. Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A et al.: Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*, (2011).
94. Castello AA, Arguelles MH, Rota RP et al.: Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. *J Clin Microbiol* 44(6), 2046-2050 (2006).
95. Matthijnsens J, Bilcke J, Ciarlet M et al.: Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol* 4(10), 1303-1316 (2009).
96. Samajdar S, Varghese V, Barman P et al.: Changing pattern of human group A rotaviruses: emergence of G12 as an important pathogen among children in eastern India. *J Clin Virol* 36(3), 183-188 (2006).
97. Mandile MG, Esteban LE, Argüelles MH, Mistchenko A, Glikmann G, Castello AA. Surveillance of group A Rotavirus in Buenos Aires 2008–2011, long lasting circulation of G2P[4] strains possibly linked to massive monovalent vaccination in the region. *J Clin Virol*. Jul;60(3):282-9. (2014)
98. Wangchuk S, Mitui MT, Tshering K, Yahiro T, Bandhari P, Zangmo S, Dorji T, Tshering K, Matsumoto T, Nishizono A, Ahmed K. Dominance of emerging G9 and G12 genotypes and polymorphism of VP7 and VP4 of rotaviruses from Bhutanese

- children with severe diarrhea prior to the introduction of vaccine. *PLoS One*. Oct 20;9(10). (2014)
99. Alfieri AA, Leite JP, Nakagomi O et al.: Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Arch Virol* 141(12), 2353-2364 (1996).
 100. Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M et al.: Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 174 Suppl 1, S30-36 (1996).
 101. Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N: Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol* 32(5), 1408-1409 (1994).
 102. Leite JP, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR: Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol* 141(12), 2365-2374 (1996).
 103. Steele AD, Peenze I, de Beer MC et al.: Anticipating rotavirus vaccines: epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa. *Vaccine* 21(5-6), 354-360 (2003).
 104. Bucardo F, Nordgren J. Impact of vaccination on the molecular epidemiology and evolution of group A rotaviruses in Latin America and factors affecting vaccine efficacy. *Infect Genet Evol.* Aug;34:106-13. (2015)
 105. Quaye O, McDonald S, Esona MD, Lyde FC, Mijatovic-Rustempasic S, Roy S, Banegas DJ, Quiñonez YM, Chinchilla BL, Santiago FG, Lozano HG, Rey-Benito G, de Oliveira LH, Gentsch JR, Bowen MD. Rotavirus G9P[4] in 3 countries in Latin America, 2009-2010. *Emerg Infect Dis.* Aug;19(8):1332-3. (2013)
 106. Gómez MM, de Mendonça MC, Volotão Ede M, Tort LF, da Silva MF, Cristina J, Leite JP. Rotavirus A genotype P[4]G2: genetic diversity and reassortment events among strains circulating in Brazil between 2005 and 2009. *J Med Virol.* Jun;83(6):1093-106. (2011)
 107. Degiuseppe JI, Beltramino JC, Millan A, Stupka JA, Parra GI: Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. *Clin Microbiol Infect*, (2013).
 108. Palombo EA: Genetic analysis of Group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. *Virus Genes* 24(1), 11-20 (2002).
 109. Kobayashi N, Mahub Alam M, Kojima K, Ishino M, Sumi A: Genomic diversity and evolution of rotaviruses: An overview. In: *Genomic diversity and molecular epidemiology of rotaviruses*, Kobayashi N (Ed.). Research Signpost, India 75-89 (2003).

110. Bresee JS, Glass RI, Ivanoff B, Gentsch JR: Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. *Vaccine* 17(18), 2207-2222 (1999).
111. Ansari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Tostowaryk W: Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *J Clin Microbiol* 26(8), 1513-1518 (1988).
112. Bishop RF: Natural history of human rotavirus infection. *Arch Virol Suppl* 12, 119-128 (1996).
113. Vesikari T, Ruuska T, Delem A, Andre FE, Beards GM, Flewett TH: Efficacy of two doses of RIT 4237 bovine rotavirus vaccine for prevention of rotavirus diarrhoea. *Acta Paediatr Scand* 80(2), 173-180 (1991).
114. Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH et al.: Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines--report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Pediatrics* 97(1), 7-13 (1996).
115. Vesikari T, Joensuu J: Review of rotavirus vaccine trials in Finland. *J Infect Dis* 174 Suppl 1, S81-87 (1996).
116. Lanata CF, Black RE, del Aguila R et al.: Protection of Peruvian children against rotavirus diarrhea of specific serotypes by one, two, or three doses of the RIT 4237 attenuated bovine rotavirus vaccine. *J Infect Dis* 159(3), 452-459 (1989).
117. Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD et al.: Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belem, Brazil. *Bull World Health Organ* 74(5), 491-500 (1996).
118. CDC: Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. Centers for Disease Control. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48(43), 1007 (1999).
119. Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR et al.: Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 354(1), 11-22 (2006).
120. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P et al.: Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 354(1), 23-33 (2006).
121. Global Immunization Data. World Health Organization (WHO). July 2015.
122. Dennehy PH: Treatment and prevention of rotavirus infection in children. *Curr Infect Dis Rep* 15(3), 242-250 (2013).
123. Fischer Walker CL, Black RE: Rotavirus vaccine and diarrhea mortality: quantifying regional variation in effect size. *BMC Public Health* 11 Suppl 3, S16 (2011).
124. Parashar U, Steele D, Neuzil K et al.: Progress with rotavirus vaccines: summary of the Tenth International Rotavirus Symposium. *Expert Rev Vaccines* 12(2), 113-117 (2013).

125. Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M et al.: Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med* 362(4), 299-305 (2010).
126. Bhandari N, Sharma P, Taneja S et al.: A dose-escalation safety and immunogenicity study of live attenuated oral rotavirus vaccine 116E in infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 200(3), 421-429 (2009).
127. Dang DA, Nguyen VT, Vu DT et al.: A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine* 30 Suppl 1, A114-121 (2012).
128. Patel M, Glass RI, Jiang B, Santosham M, Lopman B, Parashar U: A Systematic Review of Anti-Rotavirus Serum IgA Antibody Titer as a Potential Correlate of Rotavirus Vaccine Efficacy. *J Infect Dis*, (2013).
129. Boom JA, Sahni LC, Payne DC et al.: Symptomatic infection and detection of vaccine and vaccine-reassortant rotavirus strains in 5 children: a case series. *J Infect Dis* 206(8), 1275-1279 (2012).
130. Hemming M, Vesikari T: Vaccine-derived human-bovine double reassortant rotavirus in infants with acute gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 31(9), 992-994 (2012).
131. Bowen MD, Payne DC: Rotavirus vaccine-derived shedding and viral reassortants. *Expert Rev Vaccines* 11(11), 1311-1314 (2012).
132. Matthijnsens J, Nakagomi O, Kirkwood CD, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M: Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? *Expert Rev Vaccines* 11(11), 1347-1354 (2012).
133. Argüelles MH, Villegas GA, Castello A et al.: VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol* 38(1), 252-259 (2000).
134. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noorda J: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3), 495-503 (1990).
135. Gouvea V, Glass RI, Woods P et al.: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28(2), 276-282 (1990).
136. Gentsch JR, Glass RI, Woods P et al.: Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(6), 1365-1373 (1992).
137. DiStefano DJ, Kraiouchkine N, Mallette L et al.: Novel rotavirus VP7 typing assay using a one-step reverse transcriptase PCR protocol and product sequencing and

- utility of the assay for epidemiological studies and strain characterization, including serotype subgroup analysis. *J Clin Microbiol* 43(12), 5876-5880 (2005).
138. Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG et al.: Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 32(7), 1820-1822 (1994).
 139. Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C: Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol* 32(5), 1338-1340 (1994).
 140. Rahman M, Sultana R, Podder G et al.: Typing of human rotaviruses: nucleotide mismatches between the VP7 gene and primer are associated with genotyping failure. *Virol J* 2, 24 (2005).
 141. Santos N, Volotao EM, Soares CC et al.: VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. *Virus Res* 93(1), 127-138 (2003).
 142. Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol*, 49:461 -87. (1995)
 143. Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol & Mol Biol Rev*, 69(2): 357-371. (2005)
 144. Olives JP, Mas E. Viral Acute Diarrhea: Clinical and Evolutive Aspects. *Arch Pediatr*, 14(3):S152-5. (2007)
 145. Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol*, 1;107(6):1769-80. (2009)
 146. Verreault D, Moineau S, Duchaine C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(3):413-44. (2008)
 147. Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol*, 98(6):1354-80. (2005)
 148. Asano T, Cotruvo JA. Groundwater recharge with reclaimed municipal wastewater: health and regulatory considerations. *Water Res*, 38(8):1941 -51. (2004)
 149. Sattar SA. Microbicides and the environmental control of nosocomial viral infections. *J Hosp Infect*, 56 Suppl 2:S64-9. (2004)
 150. Aw TG, Howe A, Rose JB. Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater. *J Virol Meth*, 210C, p.15-21. (2014)
 151. Bosch A, Guix S, Sano D, et al. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol*, 19(3):295-301. (2008)

152. Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol*, 98(6):1354-80. (2005)
153. Bosch, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol*, 1(3), p.191 -196. Review. (1998)
154. Kitajima M, Iker BC, Pepper IL, et al. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes-identification of potential viral indicators. *Sci Tot Env*, (488-489), p.290-296. (2014)
155. Hata A, Kitajima M, Katayama H. Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan. *J App Microbiol*, 114(2), p.545-554. (2013)
156. Francy DS, Stelzer EA, Bushon et al. Comparative effectiveness of membrane bioreactors, conventional secondary treatment, and chlorine and UV disinfection to remove microorganisms from municipal wastewaters. *Water Res*, 46(13), p.4164-4178. (2012)
157. Schlindwein AD, Rigotto C, Simões CM, et al. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Sci Technol*, 61(2):537-44. (2010)
158. Morsy El-Senousy, W., Guix, S., Abid, I., et al. Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *App Env Microbiol*, (73), p.164–167. (2007)
159. Rajal V, McSwain B, Thompson D, Leutenegger C, Kildare B, Wuertz S. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res*. 41:1411-1422. (2007)
160. Fumian TM, Leite JP, Castello AA, Gaggero A, Caillou MS, Miagostovich MP. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods Dec*;170(1-2):42-6. (2010)
161. Yang H, Makeyev EV, Kang Z, Ji S, Bamford DH, van Dijk AA. Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A, B, C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. *Virus Res*. 106:15–26. (2004)
162. Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis*. 17:1491–3 (2011)
163. Castello AA, Argüelles MH, Villegas GA, López N, Ghiringhelli PD, Semorile L, Glikmann G. Characterization of human group C rotavirus in Argentina. *J Med Virol*. 62(2):199-207. (2000)
164. Esteban LE, Rota RP, Gentsch JR, Jiang B, Esona M, Glass RI, Glikmann G, Castello AA. Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004-

- 2007: reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. *J Med Virol.* 82(2):1083-93 (2010)
165. McDonald SM, Matthijssens J, McAllen JK, Hine E, Overton L, Wang S, Lemy P, Zeller M, Van Ranst M, Spiro DJ, Patton JT. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 5(10):e1000634 (2009)
166. Castello AA, Nakagomi T, Nakagomi O, Jiang B, Kang JO, Glass RI, Glikmann G, Gemtsch JR. Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strain from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. *J Med Virol.* 81(2): 371-81 (2009)
167. Justino MC, Linhares AC, Lanzieri TM, Miranda Y, Mascarenhas JD, Abreu E, Guerra SF, Oliveira AS, da Silva VB, Sanchez N, Meyer N, Shafi F, Ortega-Barria E, Soriano-Gabarró M, Colindres RE. Effectiveness of monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P[4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. *Pediatr Infect Dis J.* 30(5):396-401 (2011)
168. Correia JB, Patel MM, Nakagomi O, Montenegro FM, Germano EM, Correia NB, Cuevas LE, Parashar UD, Cunliffe NA, Nakagomi T. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J Infect Dis.* 201(3):363-9 (2010)
169. Snelling TL, Andrews RM, Kirkwood CD, Culvenor S, Carapetis JR. Case-control evaluation of the effectiveness of G1P[8] human rotavirus vaccine during an outbreak of rotavirus G2P[4] infection in central Australia. *Clin Infect Dis* 52(2):191-9 (2011)
170. Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(8):745-53 (2008)
171. Bishop RF, Unicomb LE, Barnes GL. Epidemiology of rotavirus serotype in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. *J Clin Microbiol* 29(5):862-8 (1991)
172. Stupka JA, Degiuseppe JI, Parra GI. Argentinean National Rotavirus Surveillance Network. Increased Frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008-2009: whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains. *J Clin Virol* 54(2):162-7 (2012)
173. Lobo PD, Guerra SF, Siqueira JA, Soares LD, Gabbay YB, Linhares AC, Mascarenhas JD. Phylogenetic analysis of human group C rotavirus in hospitalized children with gastroenteritis in Belém, Brazil. *J Med Virol* doi:10.1002/jmv.24379 (2015)
174. El-Senousy WM, Ragab AM, Handak EM. Prevalence of Rotaviruses Groups A and C in Egyptian Children and Aquatic Environment. *Food Environ Virol* doi:10.1007/s12560-015-9184-6 (2015)

175. Kumazaki M, Usuku S. Epidemiological and genetic analysis of human group C rotaviruses isolated from outbreaks of acute gastroenteritis in Yokohama, Japan, between 2006 and 2012. *Arch Virol* 159(4):761-71 (2014)
176. Oishi I, Yamazaki K, Minekawa Y. An occurrence of diarrheal cases associated with group C rotavirus in adults. *Microbiol Immunol* 37(6):505-9 (1993)
177. Dowell SF. Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 7(3):369-74 (2001)
178. Donato CM, Cowley D, Snelling TL, Akopov A, Kirkness EF, Kirkwood CD. Characterization of a G1P[8] rotavirus causing an outbreak of gastroenteritis in the Northern Territory, Australia, in the vaccine era. *Emerg Microbes Infect* 3(7):e47 doi:10.1038/emi.2014.47 (2014)
179. Zhang M, Zeng CQ, Dong Y, Ball JM, Saif LJ, Morris AP, Estes MK. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol* 72(2):3666-72 (1998)
180. Jagannath MR, Kesavulu MM, Deepa R, Sastri PN, Kumar SS, Suguna K, Rao CD. N- and C-terminal cooperation in rotavirus enterotoxin: novel mechanism of modulation of the properties of a multifunctional protein by a structurally and functionally overlapping conformational domain. *J Virol* 80(1):412-25 (2006)
181. Borgan MA, Mori Y, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N. Antigenic analysis of nonstructural protein (NSP) 4 of group A avian rotavirus strain PO-13. *Microbiol Immunol* 47(9):661-8 (2003)
182. Iturriza-Gómara M, Clarke I, Desselberger U, Brown D, Thomas D, Gray J. Seroepidemiology of group C rotavirus infection in England and Wales. *Eur J Epidemiol* 19(6):589-95 (2004)
183. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12(2):304-6 (2006)
184. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-80 (1994)
185. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10):2731-9 (2011)
186. Vizzi E, Calviño E, González R, Pérez-Schael I, Ciarlet M, Kang G, Estes MK, Liprandi F, Ludert JE. Evaluation of serum antibody responses against the rotavirus nonstructural protein NSP4 in children after rhesus rotavirus tetravalent vaccination or natural infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(10):1157-63 (2005)

187. Pietruchinski E, Benati F, Lauretti F, Kisielius J, Ueda M, Volotão EM, Soares CC, Hoshino Y, Linhares RE, Nozawa C, Santos N. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. *J Med Virol* 78(9): 1241-9 (2006)
188. Martínez M, Amarilla AA, Galeano ME, Aquino VH, Fariña N, Russomando G, Parra GI. Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asunción, Paraguay, 2006-2007. *Arch Virol* 155(4):525-33 (2010)
189. Santos N, Lima RC, Pereira CF, Gouvea V. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol* 36(9):2727-9 (1998)
190. Gouvea VS, Domingues AL, Naveca FG, Pedro AR, Bevilacqua CC. Changing epidemiology of rotavirus-related hospitalizations in Río de Janeiro, Brazil, from 2002 to 2006. *Open Virol J* 1:47-50 (2007)
191. Volotao EM, Soares CC, Maranhao AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol* 78(2):263-72 (2006)
192. Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins CM, Bóia MN, Leite JP. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* 15(1):95-7 (2009)
193. Drummond AJ, Rambaut A, BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214 (2007)
194. Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4:e88 (2006)
195. Bielejec F, Rambaut A, Suchard MA, Lemey P. SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics* 27(20):2910-2 (2011)
196. Sharma S, Nakagomi T, Nakagomi O, Paul VK, Bhan MK, Ray P. Convalescent phase sera from children infected with G12 rotavirus cross-neutralize rotavirus strains belonging to the Wa genogroup. *J Gen Virol* 91:1794-9 (2010)
197. Gómez MM, Resque HR, Volotao Ede M, Rose TL, da Silva MF, Heylen E, Zeller M, Matthijnssens J, Leite JP. Distinct evolutionary origins of G12P[8] and G12P[9] group A rotavirus strains circulating in Brazil. *Infect Genet Evol* 28:385-8 (2014)
198. Tort LF, Victoria M, Lizasoain AA, Castells M, Maya L, Gómez MM, Arreseigor E, López P, Cristina J, Leite JP, Colina R. Molecular epidemiology of group A rotavirus among children admitted to hospital in Salto, Uruguay, 2011-2012: first detection of the emerging genotype G12. *J Med Virol* 87(5):754-63 (2015)
199. Tort LF, Victoria M, Lizasoain A, García M, Berois M, Cristina J, Leite JP, Gómez MM, Miagostovich MP, Colina R. Detection of common, emerging and uncommon VP4,

- and VP7 human group A rotavirus genotypes from urban sewage samples in Uruguay. *Food Environ Virol* 7(4):342-53 (2015)
200. Gerba CP, Rose JB, Haas CN. Sensitive populations: who is at the greatest risk? *Int J Food Microbiol* 30(1-2):113-23 (1996)
 201. Kukkula M, Arstila P, Klossner ML, Maunula L, Bonsdorff CH, Jaatinen P. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis* 29(4):415-8 (1997)
 202. Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol* 66(1):238-45 (2000)
 203. Ferreira FF, Guimaraes FR, Fumian TM, Victoria M, Vieira CB, Luz S, Shubo T, Leite JP, Miagostovich MP. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. *Water Sci Technol* 60(3):633-42 (2009)
 204. Pintó RM, Alegre D, Domínguez A, El-Senousy WM, Sánchez G, Villena C, Costafreda MI, Aragones L, Bosch A. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiol Infect* 135(2):270-3 (2007)
 205. Rodríguez-Díaz J, Querales L, Caraballo L, Vizzi E, Liprandi F, Takiff H, Betancourt WQ. Detection and characterization of waterborn gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Appl Environ Microbiol* 75(2):387-94 (2009)
 206. Victoria M, Guimaraes FR, Fumian TM, Ferreira FF, Vieira CB, Shubo T, Leite JP, Miagostovich MP. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health* 8(1):158-65 (2010)
 207. Villena C, El-Senousy WM, Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. *Appl Environ Microbiol* 69(7):3919-23 (2003)
 208. Hewitt J, Bell D, Simmons GC, Rivera-Aban M, Wolf S, Greening GE. Gastroenteritis outbreak caused by waterborne norovirus at a New Zealand ski resort. *Appl Environ Microbiol* 73(24):7853-7 (2007)
 209. Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreak. *Rev Infect Dis* 13(3): 448-61 (1991)
 210. Espinosa AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndez E, Arias CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Res* 42(10-11):2618-28 (2008)
 211. Kittigul L, Ekchaloemkiet S, Utrachakij F, Siripanichgon K, Sujirarat D, Pungchitton S, Boonthum A. An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental water samples. *J Virol Methods* 124(1-2):117-22 (2005)

212. Mehnert DU, Stewien KE, Hársi CM, Queiroz AP, Candeias JM, Candeias JA. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92(1):97-100 (1997)
213. Ijzerman MM, Dahling DR, Fout GS. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 63(1-2):145-53 (1997)
214. Schwab KJ, De Leon R, Sobsey MD. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 61(2):531-7 (1995)
215. Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol* 54(2):156-65 (2002)
216. De Grazia S, Giammando GM, Dóro R, Bonura F, Marton S, Cascio A, Martella V, Bányai K. Identification of a multi-reassortant G12P[9] rotavirus with a novel VP1, VP2, VP3 and NSP2 genotypes in a child with acute gastroenteritis. *Infect Genet Evol* 35:34-7 (2012)
217. Zeng sq, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 153(2):238-40 (2008)
218. Rose TL, Miagostovich MP, Leite JP. Rotavirus A genotype G1P[8]: a novel method to distinguish wild-type strains from the Rotarix vaccine strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(8):1068-72 (2010)
219. Barril PA, Giordano MO, Isa MB, Masachessi G, Ferreyra LJ, Castello AA, Glikmann G, Nates SV. Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. *J Med Virol* 82(7):1277-81 (2010)
220. Li D, GU AZ, Zeng SY, Yang W, He M, Shi HC. Monitoring and evaluation of infectious rotaviruses in various wastewater effluents and receiving waters revealed correlation and seasonal pattern of occurrences. *J Appl Microbiol* 110(5):1129-37 (2011)
221. Barril PA, Fumian TM, Prez VE, Gil PI, Martínez LC, Giordano MO, Masachessi G, Isa MB, Ferreyra LJ, Ré VE, Miagostovich M, Pavan JV, Nates SV. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. *Environ Res* 138:409-15 (2015)
222. Iturriza Gómara M, Cubitt D, Desselberger U, Gray J. Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *J Clin Microbiol* 39(10):3796-8 (2001)

223. Simmonds MK, Armah G, Asmah R, Banerjee I, Damanka S, Esona M, Gentsch JR, Gray JJ, Kirkwood C, Page N, Iturriza-Gómara M. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *J Clin Virol* 42(4):368-73 (2008)
224. Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* 31(4):259-65 (2004)
225. Banerjee I, Ramani , Primrose B, Iturriza-Gómara M, Gray JJ, Brown DW, Kang G. Modification of rotavirus multiplex RT-PCR for the detection of G12 strains based on characterization of emerging G12 rotavirus strains from South India. *J Med Virol* 79(9):1413-21 (2007)
226. Olsthoorn RC, Grade G, Dayhuff T, Atkins JF, Van Duin J. Nucleotide sequence of a single-stranded RNA phage from *Pseudomonas aeruginosa*: kinship to coliphages and conservation of regulatory RNA structures. *Virology* 206(1):611-25 (1995)