

RIDAA Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes



Barril, Patricia Angélica

Epidemiología molecular y filogenia intragenotípica de cepas de rotavirus humano grupo a circulantes en Córdoba, Argentina, durante el período 1979-2006



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:

Barril, P. A. (2011). Epidemiología molecular y filogenia intragenotípica de cepas de rotavirus humano grupo a circulantes en Córdoba, Argentina, durante el período 1979-2006. (Tesis doctoral). 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/20.500.11807/77

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



Roque Sáenz Peña 352 // Bernal Buenos Aires // Argentina t.: (+41 11) 4365 7100 f.: (+54 11) 4365 7101 info@unq.edu.ar

Epidemiología molecular y filogenia intragenotípica de cepas de rotavirus humano grupo a circulantes en Córdoba, Argentina, durante el período 1979-2006

TESIS DOCTORAL

Patricia Angélica Barril

patricia_barril@yahoo.com.ar

Resumen

Los rotavirus humanos grupo A son los principales agentes etiológicos de gastroenteritis aguda en niños en todo el mundo y una importante causa de muerte por deshidratación crítica en los países en desarrollo. Morfológicamente, los rotavirus son partículas icosahédricas que consisten en 11 segmentos de ARN doble cadena, rodeados por una triple cápside proteica. Las proteínas de la cápside externa, VP7 y VP4, contienen los epitopes que inducen anticuerpos neutralizantes específicos en el hospedador infectado y definen los serotipos G (VP7) y P (VP4). Los principales G y P tipos (G1-G4, P[8]) han sido blanco para el desarrollo de las vacunas actualmente licenciadas.

Ante la introducción de una nueva vacuna en un área geográfica determinada es necesario conocer la epidemiología natural de base del virus en la región. Con este objeto, se analizó la circulación de las variantes genotípicas e intragenotípicas G y P de rotavirus grupo A en Córdoba, Argentina, durante el período 1979-2006. El trabajo de investigación mostró una dinámica compleja de circulación de genotipos G y P, que estuvo caracterizada por aspectos locales propios, tales como una alta tasa de infecciones mixtas y co-circulación de distintos genotipos. Los tipos G1 y P[8] fueron los dominantes a lo largo del tiempo y el genotipo G9, emergente a nivel mundial durante la última década, se detectó en Córdoba desde el año 1980.

Durante todo el período estudiado se observó un mismo comportamiento de circulación para los genotipos G4, G2 y P[4]. Así, el genotipo G4 mostró una circulación continua durante los 28 años de estudio, sin llegar a ser, durante todo el período estudiado, el G tipo dominante, y G2 y P[4] revelaron frecuencias de detección cíclicas y acompañadas en el tiempo. El genotipo G3 que circuló durante 25 años en baja frecuencia y esporádicamente, mostró un incremento significativo en el año 2006. Los genotipos mundialmente infrecuentes, P[6], P[9], G5 y G8, se identificaron en Córdoba en frecuencias de circulación menores al 5%.

Los sistemas de vigilancia clínica y ambiental revelaron una distribución similar de genotipos G de rotavirus con características genéticas y antigénicas comparables. De este modo, la detección de virus a partir de aguas residuales sería una fuente alternativa a la vigilancia clínica para el monitoreo molecular de la epidemiología de rotavirus en la comunidad.

El análisis evolutivo de cepas mostró la circulación continua de una misma variante genética del genotipo

emergente G9, aislada de muestras de pacientes infectados y aguas ambientales. Por el contrario, los genotipos de mayor prevalencia a nivel local, G1 y P[8], revelaron sustituciones temporales de variantes intragenotípicas y antigénicas. La distribución de G1 y P[8] en distintos linajes no se correlacionó con sustituciones aminoacídicas presentes en regiones antigénicas o variables, respectivamente. De este modo, la circulación continua y dominante de estos genotipos en el tiempo no estaría ligada a la emergencia de variantes antigénicas en la comunidad sino que estaría facilitada por la capacidad replicativa significativamente mayor de las cepas G1 y potencialmente P[8] respecto a otros genotipos. Así, la historia natural de circulación de rotavirus en Córdoba refleja una historia de fuerzas y balances entre los genotipos dominantes, infrecuentes, emergentes y/o de circulación cíclica que conforman el escenario epidemiológico local. Las cepas G1 y P[8] de circulación natural y vacunales presentaron diferencias aminoacídicas en sitios antigénicos, las cuales podrían tener implicancias en la eficacia de las vacunas actualmente licenciadas. Es entonces de importancia que la introducción de las vacunas sea acompañada por sistemas de vigilancia clínica o ambiental a los fines de evaluar su impacto en la dinámica de circulación y diversidad de cepas de RV-A en la comunidad.

Summary

Group A human rotaviruses are the main etiologic agents of acute gastroenteritis in children worldwide and a major cause of death by critical dehydration in developing countries.

Morphologically, rotaviruses are icosahedral particles consisting of 11 segments of double-stranded RNA surrounded by a triple capsid protein. The outer capsid proteins, VP7 and VP4, contain epitopes that induce neutralizing antibodies in the infected host and define specific G (VP7) and P (VP4) serotypes. The main G and P types (G1-G4, P [8]) have been targeted for the development of currently licensed vaccines.

Previous to the introduction of a new vaccine in a given geographic area is necessary to know the natural baseline epidemiology of the virus in the region. With this aim, the G and P rotavirus genotype and intragenotipic circulation was analyzed in Cordoba, Argentina, during the period 1979-2006. The research showed a complex dynamic of G and P genotypes circulation, which was characterized by own local features, such as a high rate of mixed infections and co-circulation of different genotypes. G1 and P[8] types were dominants over time and G9 genotype, emergent worldwide during the last decade, was detected in Córdoba since 1980.

G4, G2 and P[4] types depicted a same circulation performance throughout the studied period. Thus, G4 circulation was continuous during the 28-years period of study, but was not, during the whole studied period, the dominant genotype; G2 and P[4] types revealed cyclic detection rates that were accompanied in the time. G3 type, which circulated in low rates and sporadically during 25-years, showed a significant increase in the year 2006. Worldwide unusual genotypes, P[6], P[9],G5 and G8, were identified in Córdoba at circulation rates lower than 5%.

Clinical and environmental surveillance revealed a similar distribution of rotavirus G genotypes with comparable genetic and antigenic characteristics. Thus, virus detection from wastewater would be an alternative source to clinical surveillance to molecular monitoring rotavirus epidemiology in the community.

Evolutionary analysis of strains showed continuous circulation of the same genetic variant of the emerging G9 genotype, strains isolated from samples of infected patients and environmental waters. On the other hand, the local most prevalent genotypes, G1 and P[8], revealed temporal sustitutions of genetic and antigenic variants. The distribution of G1 and P[8] in lineages did not correlate with the presence of amino acid substitutions in antigenic or variable regions, respectively. In this way, the continuous and dominant circulation of G1 and P[8] over time would not be related to the emergence of antigenic variants in the

community, but would be provided by the significantly higher fitness of G1 and potencially P[8] strains than the other genotypes. Thus, rotavirus natural circulation history in Córdoba depicts a history of forces and balances between the dominant, infrequent, emergent and/or cyclic circulation genotypes which constitute the local epidemiological scenario. Naturally circulating and vaccinal G1 and P[8] strains showed amino acid differences in antigenic sites, which could have implications in the effectiveness of currently licensed vaccines. Therefore, the introduction of vaccines must be accompanied by clinical or environmental surveillance systems to assess their impact on the dynamics of circulation and diversity of RV-A strains in the community.

Agradecimientos

A la **Dra. Silvia Nates**, directora de tesis, por su invaluable apoyo, por todo su conocimiento compartido sin egoísmo, y por su guía y enseñanzas aportadas en el día a día.

A la **Dra. Graciela Glikmann**, quien me hizo conocer el mundo de la virología, y cuyo generoso apoyo e interés hicieron posible el inicio y realización de esta tesis doctoral.

A todos y cada uno de los **integrantes del Laboratorio de Gastroenteritis Virales y Sarampión** del Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", por aguantar, ayudar, discutir... por ser parte de este aprendizaje continuo, dentro y fuera del laboratorio.

A mis **compañero y amigos del Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella**" por hacer más entretenido el trabajo.

Al **CONICET** por haberme otorgado 5 años de beca doctoral.

A cada uno de mis **amigos**, por haber sido el apoyo y la compañía imprescindible que necesité todos estos años.

Y a mi **familia**, que me ha acompañado, respetado, guiado y apoyado incondicionalmente.

A todos ellos mi mayor agradecimiento y gratitud.

Patricia

Índice

INTRODUCCIÓN

IMPACTO DE LAS DIARREAS VIRALES EN SALUD

IMPACTO DE LOS ROTAVIRUS EN LA DIARREA INFANTIL

CLASIFICACIÓN DE LOS ROTAVIRUS: FAMILIA, GÉNERO, GRUPOS Y SUBGRUPOS ARQUITECTURA Y BIOLOGÍA DE LOS ROTAVIRUS HUMANOS GRUPO A

Morfología y genoma

Proteínas virales Proteínas VP4 y VP7: Base de la clasificación serológica y genómica Ciclo replicativo

TRATAMIENTO Y MEDIDAS DE PREVENCIÓN PARA LA GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS

Tratamiento Medidas preventivas PLANTEO DEL PROBLEMA

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS PARTICULARES

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

- A) Muestras de materia fecal recolectadas durante el período 1979-2003
- B) Muestras de materia fecal recolectadas en el año 2006
- C) Muestras de aguas cloacales recolectadas en el año 2006

MÉTODOS

A) Detección de muestras rotavirus positivas

B) Genotipificación de muestras rotavirus positivas

C) Revelado de los productos de amplificación por PAGE/SS y por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (AGE/EB)

D) Competencia replicativa de G tipos en el curso de coinfecciones por rotavirus

E) Vigilancia ambiental de circulación de G tipos de rotavirus grupo A

F) Análisis estadísticoG) Análisis filogenético

RESULTADOS

PERFIL GENOTÍPICO Y DINÁMICA NATURAL DE CIRCULACIÓN DE ROTAVIRUS GRUPO A EN CÓRDOBA, ARGENTINA. PERÍODO 1979-2003

Perfil genotípico de la proteína VP4

Perfil genotípico de la proteína VP7

Análisis de infecciones G tipo mixtas

Competencia replicativa de genotipos G

Discusión

ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE VIGILANCIA CLÍNICA Y AMBIENTAL PARA LA DETECCIÓN DE G TIPOS DE ROTAVIRUS QUE CIRCULAN EN CÓRDOBA

Identificación de G tipos mediante vigilancia clínica. Año 2006

Identificación de G tipos mediante vigilancia ambiental. Año 2006

Perfil estacional de G tipos de RV-A identificados por vigilancia clínica y ambiental Discusión

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE GENOTIPOS: INFERENCIAS EVOLUTIVAS DE ROTAVIRUS GRUPO A

Filogenia del genotipo G1

Filogenia del genotipo G9

Filogenia del genotipo P[8]

Discusión

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS INTERNACIONALES

TRABAJO EN PROCESO DE ESCRITURA

COMUNICACIONES EN JORNADAS, SIMPOSIOS Y/O CONGRESOS

Introducción

Impacto de las diarreas virales en salud

La diarrea aguda es reconocida desde la antigüedad como una de las causas de morbimortalidad más frecuente en humanos en todo el mundo, principalmente en niños menores de 5 años (OMS, 1996).

Más de 1000 millones de individuos en el mundo sufren cada año uno o más eventos de diarrea aguda, reconociéndose en la actualidad que la enfermedad diarreica está en estrecha relación con el deterioro físico-cognitivo de los individuos que la padecen (Guerrant y colab., 2002; Kozek y colab., 2003; Parashar y colab., 2006). En los últimos años se ha dedicado especial atención a campañas de educación sanitaria basadas en normas de higiene básicas y utilización de sales de rehidratación oral. Con esto se ha logrado reducir globalmente la mortalidad por enfermedad diarreica; sin embargo, ésta todavía provoca aproximadamente 2 millones de muertes anuales a nivel mundial.

Los países en vías de desarrollo son el escenario más fértil para la enfermedad grave, ya que desde el punto de vista ecológico la enfermedad diarreica surge como consecuencia de la interacción entre un hospedador susceptible y un agente patógeno, como así también por la concurrencia de un conjunto de factores cuya relación de causalidad es tan fuerte y determinante como para considerarlos factores etiológicos. Entre estos factores cabe destacar: a) las condiciones sanitarias, que determinan la diseminación y la carga viral en el ambiente, b) el evidente sinergismo entre la enfermedad y la desnutrición, c) pautas culturales, edad y estado inmunitario del hospedador, y d) características genéticas y antigénicas de la cepa viral infectante en particular y de la población viral circulante en general, entre otros.

Los avances en Bacteriología y Parasitología de los últimos 100 años permitieron identificar la etiología de algunas enfermedades diarreicas, sin embargo en la gran mayoría de los casos el agente causal permaneció desconocido.

A partir de los años '70, con el descubrimiento del virus Norwalk y su asociación con gastroenteritis epidémica en jóvenes y adultos (Kapikian y colab., 1972), seguido del hallazgo de rotavirus humano y su asociación con gastroenteritis endémica grave en niños (Bishop y colab., 1973), comenzó a revelarse la importancia de los virus en la etiología de la enfermedad diarreica aguda.

La diarrea viral, también llamada gastroenteritis aguda, es una entidad clínica que se define como una alteración en el movimiento intestinal caracterizado por un incremento en el contenido líquido, volumen o frecuencia de las deposiciones (más de tres por día), con una duración menor a 14 días (Guerrant y colab., 2001).

Impacto de los rotavirus en la diarrea infantil

Los conocimientos actuales en virología y la disponibilidad de técnicas diagnósticas hacen, en la actualidad, a un mejor diagnóstico de los agentes etiológicos de las diarreas virales.

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por rotavirus es una de las principales causas de gastroenteritis aguda en niños, tanto en países desarrollados como en desarrollo (Bern y colab., 1992; Parashar y colab., 1998). Estos agentes afectan por igual a niños de todos los niveles socio-económicos, por lo tanto, la distribución porcentual de la morbilidad similar es en países desarrollados y en desarrollo (*Figura 1*).



Figura 1. Estimación de la frecuencia de los agentes causantes de diarrea aguda en niños hospitalizados en países desarrollados y en desarrollo (Kapikian y colab., 1993).

La estimación del impacto de la enfermedad por rotavirus a nivel mundial muestra que cada año la infección por rotavirus causa aproximadamente 111 millones de episodios de gastroenteritis que requieren sólo cuidado domiciliario, 25 millones de visitas médicas, 2 millones de hospitalizaciones y entre 352000 y 592000 (media 440000) muertes en niños menores de 5 años de edad. De este modo, a la edad de 5 años todos los niños habrán sufrido al menos un episodio de diarrea por rotavirus, 1 de cada 5 requerirá atención médica, 1 de cada 65 será hospitalizado y aproximadamente 1 de cada 293 morirá a causa de la severidad del cuadro diarreico (*Figura 2*) (Parashar y colab., 2003). Resultados comparables fueron obtenidos en un estudio realizado en Argentina en el año 1995 por Gómez y colab.

(2002). Si bien las tasas de morbilidad por rotavirus son similares en el mundo, en los países en desarrollo se registran tasas significativamente mayores de la enfermedad diarreica grave y de letalidad respecto a las de los países desarrollados (Kapikian y colab., 2001; Parashar y colab., 2003). Esto se debe a que, una vez instalada la infección por rotavirus, cobra especial relevancia el estado inmunológico y nutricional del niño para limitar la infección en curso, como así también la posibilidad de acceder a la terapia de rehidratación oral para evitar la deshidratación. Entonces, aunque la incidencia de la infección es comparable en países industrializados y en desarrollo, las consecuencias son muy distintas. Es así que de la cantidad de muertes contabilizadas a nivel mundial, el 82% se registran en países en desarrollo (Parashar y colab., 2003). Esto remarca la importancia del escenario epidemiológico y socio-cultural en el que transcurre la infección por rotavirus.



Figura 2. Situación global de la enfermedad por rotavirus. (Parashar y colab., 2003).

Las infecciones por rotavirus son en general asintomáticas en neonatos y adultos, tal vez debido a la inmunidad adquirida en forma pasiva y activa, respectivamente (Haffejee, 1991; Anderson y colab., 2004). En la vida adulta la alta prevalencia de anticuerpos contra rotavirus sugiere la existencia de reinfecciones subclínicas.

En áreas geográficas con climas templados las diarreas por rotavirus en niños ocurren principalmente en los meses más fríos y menos húmedos del año. Este patrón estacional parece ser menos marcado o no existir en absoluto en regiones tropicales (Cook y colab., 1990). Se desconocen las causas que determinan este patrón, pero podría deberse a cambios en la susceptibilidad del hospedador a las infecciones de acuerdo a las horas de exposición a la luz diurna, como así también a una mayor supervivencia de estos virus en superficies debido a la baja humedad relativa durante los meses fríos del año.

Clasificación de los rotavirus: familia, género, grupos y subgrupos

Los rotavirus integran uno de los once géneros dentro de la familia *Reoviridae*, que incluye patógenos humanos, animales y plantas (*Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Seadornavirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Entomoreovirus*, *Phytoreovirus*, *Fijivirus* y *Oryzavirus*).

El género *Rotavirus*, a su vez, incluye 7 grupos virales (denominados con letras de la A a la G) clasificados en base a diferencias antigénicas en la proteína más abundante del virus (VP6). Los grupos A, B y C han sido aislados tanto en humanos como en animales, mientras que los grupos D, E, F y G sólo han sido aislados en animales (Kapikian y colab., 2001). Es ampliamente reconocido a nivel mundial que más del 90% de las infecciones por rotavirus en humanos son causadas por rotavirus del grupo A (RV-A).

A su vez, los RV- A pueden ser divididos en subgrupos (SG), atendiendo a la presencia o ausencia de los epitopes I y II en la proteína VP6. Al presente, se identificaron cuatro subgrupos (SGI, SGII, SGI+II, y SG no-I, no-II), desconociéndose aún la implicancia de estas variantes antigénicas en la patogenicidad del virus (Greenberg y colab., 1983). Más recientemente, en base al secuenciamiento de la VP6 sólo dos grupos (denominados genogrupos I y II) han sido distinguidos entre los rotavirus humanos grupo A, el genogrupo I que se corresponde con el subgrupo SGI, y el genogrupo II que incluye a los subgrupos SGII, SGI+ II, y SG no-I, no-II (Iturriza-Gomara y colab., 2002).

Arquitectura y biología de los rotavirus humanos grupo A

Morfología y genoma

Los rotavirus son virus desnudos, de simetría icosahédrica, de aproximadamente 75 nm de diámetro. Su apariencia al microscopio electrónico es característica y le da el nombre de rotavirus (del latín *rota: rueda*) por su similitud a una rueda de rayos cortos y borde externo liso (*Figura 3*).



Figura 3. Microscopía electrónica de rotavirus. Tinción negativa con acetato de uranilo. La barra indica un tamaño de 100 nm. (Laboratorio de Gastroenteritis Virales. Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella". Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, 2001)

La información genética viral está contenida en 11 segmentos de ARN doble cadena (ARNdc), rodeado por tres cápsides proteicas concéntricas: la externa, la media y la interna o core (*Figura 4*).



Cápside externa

Cápside media Cápside interna

Figura 4. Esquema del virión. (Adaptado de Jayaram, 2004 y Angel, 2007)

Esta estructura viral de tres capas concéntricas permite observar, mediante técnicas de microscopía electrónica, tres morfologías distintas de viriones de rotavirus (*Figura 5*):

- La partícula completa (triple cápside proteica), la cual tiene un aspecto semejante a una rueda de rayos cortos y borde externo liso.
- La partícula carente de la capa más externa, conocida como partícula de doble cápside, que presenta una morfología redondeada y muy rugosa.
- La partícula de capa simple, la cual sólo contiene el core y muestra morfología redondeada. Normalmente no presenta genoma y tiende a agregarse.



Figura 5. Estructuras y propiedades biológicas de las partículas de rotavirus. La barra indica un tamaño de 100 nm (Estes, 2001).

En una misma muestra de materia fecal de un individuo infectado por rotavirus es posible observar las tres estructuras virales y por lo tanto las distintas morfologías de partícula (*Figura* 3).

El genoma de los rotavirus puede ser separado por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), dando un patrón diferencial de bandas denominado *electroferotipo*. Los 11 segmentos genómicos de los rotavirus agrupan en cuatro clusters migratorios. El patrón de migración característico de los rotavirus grupo A consiste en 4 segmentos de alto peso molecular, 2 segmentos medianos, 1 triplete característico y 2 segmentos menores distribuidos en los clusters 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Este patrón es descripto como 4-2-3-2 (*Figura 6*).

Cada uno de los segmentos codifica para una proteína, excepto el segmento 11 que posee dos marcos de lectura abiertos (ORF). De las proteínas codificadas, seis son estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis no estructurales (NSP1-NSP6) (Estes, 2001).





Figura 6. Genoma viral resuelto en un gel de poliacrilamida, donde se indican las proteínas codificadas por cada uno de los 11 segmentos genómicos. En el esquema de la derecha se encuentra representada la ubicación del genoma viral y las proteínas estructurales (VP1-VP7) (Adaptado de Estes, 2001 y Jayaram, 2004).

Los segmentos génicos del 1 al 10 muestran una estrategia común de codificación de proteínas. Así, cada hebra positiva de los segmentos de ARN comienza con una guanidina en el extremo 5', seguida de una secuencia conservada no codificante. Posteriormente, se encuentra una región codificante (ORF), seguida de una segunda región no codificante que contiene una secuencia que termina invariablemente en dos citosinas en el extremo 3' (*Figura 7*). La longitud de las secuencias no codificantes varía para cada uno de los genes. Las secuencias de ARN genómicas de rotavirus son ricas en bases de A+U (58-67%) y no presentan una señal de poliadenilación final (Estes, 2001).

| 5' | Región no codificante | | ORF | Región no codificante | 3' |
|----|-----------------------|-----|-----|-----------------------|----|
| | G | AUG | | CC | |

Figura 7. Estructura general de un segmento genómico de rotavirus.

Proteínas virales

Las características generales y funciones de las 12 proteínas codificadas por los 11 segmentos génicos de rotavirus se indican en la *Tabla 1*.

| Proteína | Características y función | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|
| VP1 | ARN polimerasa, unión al ARN simple cadena (ARNss), participa en la transcripción viral junto con VP3 y en la replicación viral junto con VP2 | | |
| VP2 | ARN ligasa, unión al ARNdc y ARNss, requerida para la actividad replicasa de VP1 | | |
| VP3 | Guanidiltransferasa, metiltransferasa, unión a ARNss, participa en la transcripción viral junto con VP1 | | |
| VP4 | Antígeno neutralizante, hemaglutinina, potenciación de la infectividad por proteasa, adhesión a la célula, induce protección | | |
| VP6 | Antígeno de grupo y subgrupo, hidrofóbica, proteína mayoritaria | | |
| VP7 | Antígeno neutralizante, glicoproteína integrada en la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), unión al Ca ⁺² , induce protección | | |
| NSP1 | ARN ligasa, unión al ARNsc, anillo de zinc | | |
| NSP2 | ARN ligasa, unión al ARNsc, actividad de nucleósido trifosfatasa (NTPasa), involucrada en la formación del viroplasma junto con NSP5 | | |
| NSP3 | ARN ligasa, unión extremo 3' del ARNm viral, involucrada en la regulación de la traducción viral | | |

| NSP4 | Enterotoxina, glicoproteína de transmembrana del RER, induce |
|------|----------------------------------------------------------------------|
| | protección |
| NSP5 | ARN ligasa, unión al ARNsc, fosfoproteína, interacción con VP2, NSP2 |
| | y NSP6, involucrada en la formación del viroplasma junto con NSP2 |
| NSP6 | Interacción con NSP5, presente en viroplasmas y en la mayoría de |
| | cepas, función desconocida |

Tabla 1. Características y función de las proteínas de rotavirus

Las proteínas estructurales VP4, VP6 y VP7 y la proteína no estructural NSP4 de los rotavirus han sido estudiadas extensamente debido a que han mostrado ser el blanco de la respuesta inmune inducida por el hospedador y jugar un rol importante en la replicación y ensamblaje del virus.

VP4

Es una proteína no glicosilada que se encuentra en la cápside externa del virión, constituyendo espículas virales (*Figura 6*). Es la principal responsable de la adhesión a la célula (Crawford y colab., 1994), cumpliendo también funciones en la penetración celular, actividad hemaglutinante, neutralización y virulencia (Kalica y colab., 1983; Estes, 2001).

La VP4 tiene un tamaño de 775 aminoácidos en las cepas de rotavirus humanos y 776 aminoácidos en las cepas animales (Maunula y van Bonsdorff, 1998). El clivaje proteolítico de la proteína VP4 en las proteínas VP5* y VP8* confiere un aumento en la infectividad viral, incrementándose la penetración del virus a la célula (Espejo y colab., 1981; Estes y colab., 1981; Kaljot y colab., 1988). Por este motivo, la proteólisis constituye un paso fundamental en la eficiente penetración de los rotavirus a las células, lo cual es particularmente relevante considerando que los rotavirus infectan los enterocitos del intestino delgado, un ambiente rico en proteasas (Jayaram y colab., 2004). El producto de clivaje VP5* sería el involucrado en el proceso de unión del virus a la célula infectada, presentando un dominio putativo de fusión entre los aminoácidos 384 y 404 (Figura 8). Sin embargo, la identidad del receptor celular de los rotavirus aún permanece desconocida. Estudios recientes han demostrado que muchas cepas de rotavirus requerirían la presencia de ácido siálico para su ingreso a la célula, mientras que para otras cepas esta unión no sería un paso esencial y la dependencia de ácido siálico estaría correlacionada con las variantes serotípicas de la proteína VP4 (Ciarlet y colab., 2002a). Respecto al otro producto de clivaje proteolítico, VP8*, éste es el que porta la mayor diversidad nucleotídica entre cepas. La mayor variación se encuentra entre los aminoácidos 71 y 204 (Figura 8). Dentro de esta región, la variabilidad de secuencia entre los

aminoácidos 84 y 180 se correlaciona con diferentes serotipos de la proteína VP4 (Larralde y colab., 1991; Larralde y Gorziglia, 1992).

Los anticuerpos dirigidos contra VP4 neutralizan al virus in vitro (Hoshino y colab., 1985; Taniguchi y colab., 1985) y protegen pasivamente a ratones in vivo (Offit y colab., 1986). Estudios posteriores han demostrado que la proteína VP4 es capaz de inducir inmunidad protectora en animales y es inmunogénica en niños y animales (Svensson y colab., 1987; Conner y colab., 1988).



Figura 8. Esquema de la estructura de la proteína VP4. Se muestran las regiones variables (en recuadros negros), la zona de clivaje por tripsina (señalada con flechas) y los productos de esa acción proteolítica, VP8* y VP5* (Kapikian y colab., 2001).

Es una proteína glicosidada que constituye aproximadamente el 30% de la masa proteica viral (Mattion y colab., 1994) y, junto con la proteína VP4, conforma la cápside externa del virión (*Figura 6*).

La VP7 es traducida y posteriormente glicosidada con oligosacáridos N-ligados de alta manosa mientras es insertada en la membrana del retículo endoplásmico. Esta inserción es dirigida por una secuencia señal de corte encontrada en el extremo amino terminal de la proteína (*Figura 9*). La maduración de VP7 depende de la formación de puentes disulfuro intramoleculares (Svensson y colab., 1994) y de la presencia de calcio, proponiéndose la existencia de un dominio de unión a calcio en esta proteína, que es conservado entre las diferentes cepas de rotavirus.

La comparación de la secuencia aminoacídica deducida de un gran número de aislados reveló en la proteína VP7 regiones altamente conservadas intercaladas con regiones altamente variables. En total fueron encontradas 9 regiones variables: VR1-VR9 (Green y colab., 1983; Estes, 2001), de las cuales, las regiones VR5, VR7, VR8 y VR9 están correlacionadas con sitios antigénicos, denominados A, B, C y F, respectivamente (Estes, 2001). Así también, se han identificado otros dos sitios antigénicos, ambos definidos por sólo un residuo aminoacídico (sitios D y E) (*Figura 9*). La glicoproteína VP7 ha demostrado ser altamente antigénica, induciendo anticuerpos neutralizantes en el hospedador infectado.

La proteína VP7 contien un marco de lectura de 326 aminoácidos que incluye tres codones de iniciación alternativos en fase. Los dos primeros preceden dos zonas hidrofóbicas que podrían actuar como secuencias señal para dirigir la proteína VP7 hacia el retículo endoplásmico. Se supone que el segundo codón sería el utilizado en forma principal.



Figura 9. Esquema de la estructura de la proteína VP7 (Adaptado de Estes, 2001).

La proteína VP6 es el principal componente estructural de los viriones. Constituye la cápside media, interaccionando simultáneamente con la proteína del *core* VP2 y con las dos proteínas de la cápside externa, VP4 y VP7 (*Figura 6*) (Estes, 2001). Su importancia estructural también está relacionada a la actividad polimerasa da las partículas de doble cubierta (*Figura 5*). Se ha observado que si se elimina la proteína VP6, se pierde esta actividad, aunque se desconoce el motivo de tal fenómeno (Bican y colab., 1982; Sandino y colab., 1986).

VP6 es una proteína hidrofóbica que forma trímeros espontáneamente y es extremadamente estable. Es altamente antigénica e inmunogénica y contiene epitopes muy conservados, por lo que es el principal antígeno utilizado en las pruebas de diagnóstico para la detección de grupo (Estes y colab., 1987; Estes, 2001).

Análisis realizados con variantes virales y proteínas quimeras han permitido conocer algunos dominios de esta proteína (*Figura 10*). El dominio de trimerización se encuentra entre los aminoácidos 246 y 314, y el domino de ensamblaje, necesario para la formación de partículas de doble cápside, está ubicado entre los residuos 353 y 397 (Tosser y colab., 1992; Affranchino y colab., 1997). La prolina 308 está implicada en la estabilización del trímero (Shen y colab., 1994). La región amino-terminal es crucial para el ensamblaje del virus y estaría implicada en el transporte celular de la proteína VP6 hacia las inclusiones viroplasmáticas (Mansell y colab., 1994).



Figura 10. Esquema de la estructura de la proteína VP6 (Estes, 2001). Se indican las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas, los dominios de trimerización y ensamblaje, y la prolina implicada en la estabilización del trímero.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

VP6

NSP4

Es una glicoproteína no estructural que reside exclusivamente en el retículo endoplasmático celular durante el ciclo replicativo del virus y cumple un rol importante durante la morfogénesis viral actuando como un receptor intracelular. Además, en base a experimentos realizados en ratones lactantes, se ha propuesto que la proteína NSP4 sería un importante factor de virulencia, funcionando como una enterotoxina. Se postula que al ser liberada al lumen intestinal esta proteína se uniría a un receptor en el enterocito, activando una vía de señalización dependiente de calcio, lo cual induciría la secreción de cloruros y por lo tanto una diarrea de tipo secretoria (Dong y colab., 1997).

El análisis de secuencias de la proteína NSP4 ha identificado 6 grupos genéticos (denominados con letras de la A a la F) (Ciarlet y colab., 2000; Mori y colab., 2002; Matthijnssens y colab., 2008), presentando la mayor diversidad en el dominio citoplasmático que interactúa con las proteína VP6 durante la morfogénesis.

Proteínas VP4 y VP7: Base de la clasificación serológica y genómica

Los rotavirus grupo A comprenden un gran número de serotipos definidos mediante ensayos de neutralización y divergencia nucleotídica (Hoshino y Kapikian, 1996). El criterio serológico para establecer un nuevo serotipo es demostrar una diferencia de al menos 20 veces en el título de anticuerpos neutralizantes entre una cepa de referencia de un serotipo establecido frente al antisuero homólogo y la nueva especificidad putativa frente al mismo antisuero (Iqbal y Shaw, 1997).

Debido a que la caracterización serológica requiere de colecciones virales y reactivos inmunológicos que no se encuentran disponibles en todos los laboratorios, durante los últimos años la biología molecular ha cobrado especial importancia para establecer genotipos de rotavirus (Iturriza-Gomara y colab., 1999). Así, en la actualidad el criterio de clasificación serológica de rotavirus ha sido reemplazado por el sistema de clasificación genómica. Este sistema establece como criterio de diferenciación de genotipos una divergencia nucleotídica mayor al 9-10% en la proteína VP7 y mayor al 11% en la proteína VP4 (Ciarlet y Estes, 2002b; Gorziglia y colab., 1990). Bajo estos criterios, ya sean serológicos y/o genómicos, se estableció un sistema binario de clasificación de rotavirus para designar los serotipos/genotipos de ambas proteínas. El serotipo/genotipo mediado por VP7 se conoce como G, dado que VP7 es una glicoproteína, mientras que el serotipo/genotipo mediado por VP4 es designado como P, por la sensibilidad de la proteína VP4 a <u>p</u>roteasas.

En el caso de la proteína VP7 se ha establecido una correlación entre los serotipos y los genotipos. La clasificación en base a la proteína VP4 es más compleja, ya que los ensayos de neutralización y secuenciamiento génico no siempre concuerdan, lo cual lleva a una nomenclatura dual de serotipo/genotipo P (Estes, 2001). Los serotipos P son designados por

letras y números, mientras que los genotipos P son designados con números entre corchetes, cuya numeración no está correlacionada con la de los serotipos. Por ejemplo, el genotipo P[8] corresponde al serotipo P1A y el genotipo P[6] a los serotipos P2A y P2B. Hasta el momento se han descripto 23 genotipos G y 32 genotipos P en humanos y/o animales (Matthijnssens y colab., 2008; Trojnar y colab., 2009; Ursu y colab., 2009; Schumann y colab., 2009; Collins y colab., 2010). Del total de genotipos, 11 G y P tipos infectan humanos, respectivamente.

Los segmentos génicos que codifican para las proteínas VP7 y VP4 pueden ser segregados independientemente, dando una gran variabilidad de combinaciones de G/P tipos. Sin embargo, más del 90% de las infecciones en humanos en el mundo son causadas por los genotipos G1-G4 y G9, en combinación con P1A[8] y P1B[4] (Dennehy, 2008), si bien la prevalencia y distribución de los mismos varía en el tiempo y en cada región.

Ciclo replicativo

La mayoría de los estudios del ciclo biológico de los rotavirus se han llevado a cabo utilizando cultivos de células de riñón de mono y células epiteliales polarizadas humanas.

La entrada del virus a la célula es un proceso que involucra varios pasos y cuya complejidad ha impedido su entera dilucidación hasta el momento. Sólo las partículas virales completas tiene la capacidad de unirse a las células susceptibles, que son los enterocitos maduros del intestino delgado. Esta unión se daría a través de la proteína VP4, y algunos autores han postulado que la proteína VP7 también tendría la capacidad de mediar en la adhesión celular (Sabara y colab., 1985; Fukuhara y colab., 1988; Crawford y colab., 1994; Zarate y colab., 2000). Se desconoce la identidad del receptor celular, postulándose hasta el momento distintos glicoconjugados que estarían inmersos en microdominios de membrana ricos en colesterol y glicoesfingolípidos (Hewish y colab., 2000; Arias y colab., 2002; Ciarlet y colab., 2002c).

Luego de la unión, el virus es internalizado mediante un proceso que es motivo de controversia. El proceso de clivaje de la proteína VP4, dando como productos las fracciones VP5* y VP8*, aumenta la infectividad viral, dado que facilitaría la penetración del virus a la células (Clark y colab., 1981). Se postulan como probables mecanismos de penetración celular: 1a) la endocitosis de los viriones, seguida de su transporte a lisosomas y desnudamiento en los mismos por disminución de la concentración de calcio (Chemello y colab., 2002), y/o 1b) la penetración directa de las partículas virales a través de la membrana celular facilitado por la permeabilización de la membrana celular mediada por la proteína VP4 clivada (*Figura 11-1a y 1b*) (Kajlot y colab., 1988). Cualquiera sea el proceso involucrado, resulta en la liberación al citoplasma de una partícula de doble cápside.

La replicación es enteramente citoplasmática, suministrando el virus toda la maquinaria

enzimática para la replicación y transcripción. Tras la infección, la ARN polimerasa ARN dependiente asociada a las partículas virales de doble cápside es activada, lo cual resulta en la transcripción del genoma y la liberación de los 11 segmentos de ARN mensajero (ARNm) (Figura 11-2). Los ARNm no sólo dirigen la síntesis de proteínas (Figura 11-3), sino que también sirven como moldes para la síntesis de ARN de polaridad negativa para producir ARNdc (Patton y colab., 2004). En el citoplasma de las células infectadas existen inclusiones electrodensas denominadas viroplasmas que funcionan como sitios de empaquetamiento y replicación del genoma. En estos sitios la progenie de genomas virales de ARNdc se asocia a su vez con las proteínas NSP2, NSP5, NSP6, VP1, VP2, VP3 y VP6, generando partículas subvirales de doble cápside (Figura 11-4). Desde los viroplasmas las partículas subvirales brotan hacia el interior del retículo endoplásmico rugoso (RER) adyacente, adquiriendo en este proceso una membrana lipídica transitoria que es modificada con la inserción de las glicoproteínas NSP4 y VP7, residentes en el RER, y la proteína VP4 (Figura 11-5). A medida que las partículas se mueven a través del interior de la cisterna del RER, se pierde la membrana lipídica transitoria (Figura 11-6) y las proteínas virales son reordenadas para que VP4 y VP7 se ensamblen de modo tal que se forme la cápside externa del virión (Figura 11-7). Durante este proceso, la proteína NSP4 es excluida de la partícula viral. Aun se desconocen los mecanismos a través de los cuales ocurre la pérdida de la membrana lipídica transitoria y de la proteína NSP4, como así también el correcto ensamblaje de las proteínas de la cápside externa (López y colab., 2005). Dado que la maduración de los viriones es un proceso dependiente de calcio, sería posible que este interviniera en la estabilización de la estructura nativa o la correcta compartimentalización de la proteína VP7 glicosilada.

Los viriones maduros son finalmente liberados mediante lisis celular (*Figura 11-8a*) (Estes, 2001) o por una vía atípica de transporte vesicular desde el RER hacia el exterior celular (*Figura 11-8b*) (Jourdan y colab., 1997).



Figura 11. Ciclo replicativo de los rotavirus. Los números en rojo representan los pasos del ciclo, los cuales se encuentran descriptos en detalle en el texto (Estes, 2001; Jourdan y colab., 1997).

Tratamiento y medidas de prevención para la gastroenteritis por rotavirus

Tratamiento

No existe un tratamiento específico para la gastroenteritis por rotavirus. Generalmente la infección se resuelve por sí misma en un período de 3 a 8 días.

Una medida importante de soporte durante el periodo de diarrea severa por rotavirus es la reposición de líquidos y electrolitos perdidos para evitar la deshidratación del paciente. Con este fin, desde 1976 la Organización Mundial de la Salud recomienda la utilización de sales de rehidratación oral (SRO), cuya formulación contiene 3.5 g de cloruro de sodio, 2.5 g de bicarbonato de sodio, 1.5 g de cloruro de potasio y 20 g de glucosa, que deben ser disueltos en 1 lt de agua (OMS, 1976). La terapia de rehidratación oral ha mostrado ser simple, práctica, poco costosa, muy efectiva y segura, siendo aplicada en la actualidad en países en desarrollo y desarrollados.

Medidas preventivas

La prevención de la enfermedad diarreica por rotavirus está estrechamente ligada a la mejora de las condiciones sanitarias del medio y socioeconómicas de la población, como así también a la realización de campañas sistemáticas de educación sanitaria. La población debe recibir información en cuanto a la urgencia de administrar al paciente sales de rehidratación oral para evitar la deshidratación, y el uso de desinfectantes efectivos, tales como el hipoclorito de sodio, para interrumpir la cadena de transmisión del virus. Sin embargo, estas medidas no serían suficientes para limitar significativamente la circulación del virus en la naturaleza.

La documentación de la historia natural de la infección por RV-A mostró que la primo infección natural protege contra la severidad de las infecciones subsecuentes y genera una respuesta inmune local y sistémica tanto homotípica como heterotípica. Por lo tanto, las vacunas anti-rotavirus serían una herramienta idónea para controlar la severidad de la diarrea causada por estos virus.

Vacunas aprobadas para uso humano

Durante las últimas tres décadas, el desarrollo de una vacuna segura y efectiva contra los rotavirus ha sido considerado una prioridad para la Salud Pública. Las estrategias de vacunación pretenden imitar a la inducción de la inmunidad natural, produciendo una infección asintomática o clínicamente leve que confiera inmunidad y proteja de la enfermedad moderada/severa. Sumado a esto, la diversidad de genotipos de rotavirus que circulan en diferentes comunidades sugiere que las fórmulas vacunales deben proveer una protección heterotípica para que sean efectivas en diferentes regiones geográficas. Desde los años 1980s se ha trabajado ininterrumpidamente para la obtención de una vacuna anti-rotavirus. Este desarrollo de vacuna, desde sus inicios al presente, se diseñó más sobre la base empírica de la observación de la infección natural que sobre resultados certeros de inmunogenicidad. Esto se debe a que se desconoce el aporte de las proteínas VP4 y VP7 a la inducción de la inmunidad protectora. Como consecuencia, se abordaron dos estrategias de desarrollo de vacunas, una monovalente y otra multivalente.

Las vacunas monovalentes fueron la primera estrategia que se desarrolló. Se basan en la hipótesis de que, si bien existen múltiples genotipos circulantes, una vacuna conteniendo una única cepa atenuada de rotavirus podría provocar inmunidad cruzada contra los demás genotipos circulantes. Esta fue la base de la vacuna Rotarix® desarrollada por GlaxoSmithKline (Rixensart, Bélgica), que se encuentra disponible en el mercado argentino desde Marzo de 2006. Consiste en una única cepa de rotavirus humano (cepa 89-12) de serotipo G1P1A[8], que corresponden a las variantes VP7 y VP4 de mayor frecuencia de circulación en el mundo (*Figura 12*). Esta cepa viral fue aislada de un niño con gastroenteritis por rotavirus (Bernstein y colab., 1998) y posteriormente fue atenuada por múltiples pasajes en cultivo celular. La cepa obtenida se denominó RIX4414. Los estudios de seguridad y eficacia de esta vacuna fueron llevados a cabo en Finlandia y varios países de América Latina y han mostrado que es altamente efectiva para disminuir la severidad de las diarreas por rotavirus (Ruiz- Palacios y colab., 2006) (*Tabla 2*).

Otra vacuna monovalente es la LLR, basada en la cepa ovina Lanzyhou Lamb Rotavirus de genotipo G10P[12]. Esta vacuna ha sido desarrollada en el Instituo Lanzhou, de China, y es utilizada exclusivamente en su país de origen (Mohan y colab., 2006).



Figura 12. Esquema de la cepa vacuna monovalente Rotarix[®] de genotipo G1P[8].

Las **vacunas multivalentes** comenzaron a desarrollarse durante la década de los '90s. Consisten en la utilización de cepas animales, naturalmente atenuadas para los humanos (concepto Jenneriano) y se basan en la inducción de inmunidad serotipo-específica para generar un alto nivel de protección contra varios genotipos. Así las vacunas multivalentes contienen varias cepas de rotavirus de diferentes genotipos. En base a este principio se desarrolló la primera vacuna contra rotavirus en el mundo, RotaShield® (Wyeth Laboratories, Marietta, Pennsylvania). Se trataba de una vacuna tetravalente de genotipos G1-G4, elaborada mediante la recombinación de cepas simianas y humanas de rotavirus (*Figura 13*). RotaShield® fue licenciada e incorporada en el calendario de vacunación de EEUU en Agosto de 1998. Sin embargo, un año después fue suspendida y retirada del mercado debido a reportes de invaginaciones intestinales en los niños vacunados (Murphy y colab., 2003).



RRV MMU18006 (VP7 Genotipo G3)



HRV "D" (VP7 Genotipo G1)



Х

HRV "DS-1" (VP7 Genotipo G2)





D x RRV (VP7 Genotipo G1)



DS-1 x RRV (VP7 Genotipo G2)



RRV (VP7 Genotipo G3)



HRV "ST-3" (VP7 Genotipo G4)

Х

ST-3 x RRV (VP7 Genotipo G4)

Figura 13. Diagrama de flujo de la producción de la vacuna tetravalente RotaShield[®], reasociante de rotavirus humano (HRV) x rotavirus de mono rhesus (RRV), con especificidad para los genotipos G1, G2, G3 y G4. El genotipo G3, de origen simiano, fue dejado sin alterar en la vacuna (Kapikian, 1996).

Estudios posteriores reportaron que las invaginaciones ocurrían debido a la alta tasa de replicación de la cepa simiana utilizada, por lo cual se renovaron los intereses por un nuevo desarrollo de vacunas. Así, siguiendo la misma estrategia que RotaShield®, Merck (NJ, EEUU) desarrolló la vacuna Rotateq®. En este caso, el origen no es simiano, sino que se trata de una vacuna de origen bovino de genotipos diferentes a los humanos, los que se han recombinado con cinco virus humanos de genotipos G1-G4 y P[8] (*Figura 14*). Rotateq® se encuentra disponible en el mercado argentino desde Noviembre de 2006. Estudios de seguridad y eficacia han sido llevados a cabo principalmente en países desarrollados, tales como EEUU y Finlandia, mostrando que es altamente efectiva, principalmente en la protección contra la gastroenteritis severa por rotavirus (Matson, 2006; Vesikari y colab., 2006) (*Tabla 2*).



Figura 14. Esquema de la cepa vacunal pentavalente Rotateq[®], de genotipos G1, G2, G3, G4 y P[8], obtenida por recombinación de cepas bovinas y humanas.

| Características | Rotarix [®] | Rotateq [®] |
|------------------------------|------------------------|----------------------|
| Tipo de vacuna | Monovalente | Pentavalente |
| Genotipos humanos incluidos | G1P[8] | G1, G2, G3, G4, P[8] |
| Formulación | Monodosis, liofilizada | Monodosis, líquida |
| Administración | Oral | Oral |
| Número de dosis | Dos | Tres |
| Edad de administración | 2 y 4 meses | 2, 4 y 6 meses |
| Eficacia*: | | |
| - Protección contra | 85% (IC 95%, 72-92) | 98% (IC 95%, 88-100) |
| gastroenteritis severa por | | |
| RV-A | | |
| - Contra hospitalización por | 85% (IC 95%, 70-94) | 95% (IC 95%, 91-97) |
| gastroenteritis por RV-A | | |
| Asociación con invaginación | No | No |
| intestinal | | |

*Los datos no son comparables. Se utilizaron diferentes métodos para evaluar el grado de severidad.

 Tabla 2. Características de las vacunas contra rotavirus disponibles en el mercado argentino.

Planteo del problema

La introducción de una vacuna en una comunidad implica modificar las fuerzas naturales que rigen la dinámica de circulación del virus en la naturaleza. Estas modificaciones siempre tienen características locales determinadas por escenarios epidemiológicos particulares, donde se combinan la diversidad de cepas circulantes y las condiciones socio-culturales de la población. Por esta razón, la introducción de estas vacunas deberá acompañarse de sistemas de vigilancia tanto para monitorear su seguridad como su impacto en la disminución de la enfermedad y en la dinámica de circulación de genotipos. Este requisito permitirá responder en forma oportuna a cualquier evento no esperado como también a cambios epidemiológicos hoy no vislumbrados, que pudieran requerir a futuro de modificaciones de las vacunas o de los esquemas de vacunación.

Es entonces de suma importancia conocer y comprender la dinámica natural de circulación de genotipos de rotavirus en la comunidad, en ausencia de una presión inmunológica generada por la introducción de la vacuna. Esto permite definir los genotipos prevalentes e inusuales en el área, la periodicidad de sustitución de un genotipo por otro, la emergencia de cepas y la identidad nucleotídica y antigénica intragenotípica que circulan en una misma zona durante períodos prolongados de tiempo. La detección de cepas emergentes de rotavirus grupo A o de genotipos pre- existentes que como parte de un proceso de evolución natural modifiquen su antigenicidad es la información necesaria para la elección y evaluación de las fórmulas vacunales para cada región geográfica en particular. Asimismo, con el fin de comprender y eventualmente predecir la continuidad y/o sustitución de uno o varios genotipos por otros sería necesario desarrollar estudios de competencia genotípica *in vitro*, que reproduzcan la dinámica natural de circulación de genotipos en una comunidad. Estos datos permitirían explicar la predominancia de ciertos genotipos y las condiciones necesarias para la emergencia de otros.

En la actualidad, la vigilancia de RV-A está basada en el estudio de cepas virales provenientes de casos clínicos que requieren atención médica. Esto acota la vigilancia clínica a los casos de diarrea severa, dejando de lado los que no concurren a la atención médica y los asintomáticos. A esto hay que sumar que la vigilancia clínica, en general, se realiza en uno o unos pocos centros asistenciales, restringiendo el análisis a los individuos que concurren a tales centros. Por lo tanto, es válido plantear el interrogante sobre la representatividad de esta vigilancia. La respuesta podría encontrarse en estudios comparativos entre una vigilancia clínica y una ambiental, definiendo por vigilancia ambiental a la que se podría realizar a partir de muestras cloacales, las que representan la excreción del virus por un alto porcentaje de la población (60% en la Ciudad de Córdoba Capital) y reúne a los excretores clínicos y asintomáticos. Esta opción ofrecería una herramienta muy valiosa para la vigilancia de RV-A, reflejando la circulación poblacional del virus en la naturaleza.

Con la finalidad de responder a los planteos descriptos, el presente trabajo de tesis propone los objetivos de trabajo que se detallan a continuación.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar a través de un estudio sostenido en el tiempo la epidemiología molecular y filogenia intragenotípica de cepas de rotavirus humano grupo A circulantes en Córdoba, Argentina, durante el período 1979-2006.

Objetivos particulares

- Caracterizar el perfil de circulación de genotipos G y P de rotavirus grupo A entre los años 1979-2006 en el área de Córdoba Capital.
- Definir y explicar las prevalencias y continuidad de circulación en la comunidad de los diferentes genotipos G de rotavirus grupo A.
- Identificar genotipos G y P convencionales e inusuales.
- Analizar la identidad genómica y proteica entre cepas homotípicas G y P a través de la construcción de árboles filogenéticos para cada genotipo aislado.
- Comparar el perfil genotípico de rotavirus grupo A resultante de la vigilancia clínica y ambiental.

Materiales y métodos

Materiales

A) Muestras de materia fecal recolectadas durante el período 1979-2003

Se colectaron un total de 2047 muestras de materia fecal de niños menores de 3 años de edad con un cuadro de gastroenteritis aguda que requirieron de asistencia médica en distintos hospitales públicos de la ciudad de Córdoba, Argentina: Hospital Infantil (dependiente de la Municipalidad de la ciudad de Córdoba) y Hospitales Misericordia, de Niños y Pediátrico (dependientes del Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba). Los requisitos para ser admitidos en el protocolo fueron los siguientes:

- No tener más de 5 días de evolución del episodio de diarrea.
- No provenir de otro centro hospitalario.
- No tener tratamiento con antibióticos.
- Completar una ficha clínica-epidemiológica.

Las muestras fueron obtenidas dentro de las primeras 24 hs del ingreso hospitalario (ambulatorio y/o internación). Se obtuvo el consentimiento informado voluntario de los padres o tutores de los niños, de acuerdo a los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki y los requerimientos adicionales de la autoridad local y nacional (Normativa Nacional 5330/7, Administración Nacional de Alimentos, Medicina y Tecnología). Las muestras fueron conservadas a 4ºC durante su traslado al laboratorio y posteriormente a -20ºC hasta su procesamiento.

B) Muestras de materia fecal recolectadas en el año 2006

Se colectaron un total de 70 muestras de materia fecal de niños menores de 3 años de edad con un cuadro de gastroenteritis aguda, según demanda espontánea en el servicio de pediatría del Centro Médico Hospital Privado de la ciudad de Córdoba, Argentina. Las muestras fueron obtenidas dentro de las primeras 24 hs de hospitalización o al momento de la consulta médica. Se obtuvo el consentimiento informado voluntario de los padres o tutores de los niños según las normas de bioética vigentes. Las muestras fueron conservadas a 4ºC hasta su traslado al laboratorio y posteriormente a -20ºC hasta su procesamiento.

C) Muestras de aguas cloacales recolectadas en el año 2006

De enero a diciembre de 2006 se colectaron semanalmente 1.5 L de agua residual cruda a partir del conducto de la red central que ingresa a la planta depuradora Bajo Grande, ubicada en Chacra de La Merced, de la ciudad de Córdoba. Las muestras fueron colectadas entre las 9 y 11 am para minimizar los efectos de variaciones diurnas y fueron trasladadas al Instituto de Virología dentro de las 12 hs a 4-8°C para posterior procesamiento dentro de las 24 hs post-recepción. El sistema de cloacas de la ciudad tiene una cobertura aproximada del 61% de la población de Córdoba.

Métodos

A) Detección de muestras rotavirus positivas

La totalidad de las muestras fecales recolectadas fueron ensayadas por enzimoinmunoensayo (ELISA) y/o por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) para la detección de rotavirus grupo A.

A.1 Enzimoinmunoensayo (ELISA)

Se utilizó el equipo comercial ELISA PATHFINDERTM ROTAVIRUS (Bio-Rad, Francia), en el que la detección viral está mediada por anticuerpos monoclonales dirigidos al antígeno de grupo (VP6) de los RV-A humanos. El ensayo fue llevado a cabo siguiendo las instrucciones del

fabricante.

A.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y revelado por tinción argéntica (PAGE/SS)

A.2.1 Extracción de ácidos nucleicos

Se prepararó una suspensión de materia fecal al 10% en tampón Tris-HCI 0.02M (pH 7.2). La suspensión fue clarificada por centrifugación a 8000 rpm durante 15 min y utilizada para la extracción del ARN viral mediante el método de fenol-cloroformo, seguido de precipitación alcohólica de acuerdo al procedimiento estándar de Perry y colab. (1972). Brevemente, en un tubo eppendorff se colocaron 200 µl del sobrenadante de la suspensión de materia fecal clarificada, más igual volumen de tampón de extracción (500 mM LiCl, 10 mM EDTA y 1% SDS) y 400 µl de la mezcla de fenol- cloroformo en proporción 1:1. Se homogeneizó y se incubó a 56°C durante 10 min. Se homogeneizó nuevamente y se centrifugó a 16000xg durante 30 min a 4°C. A continuación se extrajo la fase acuosa y se agregaron 1000 µl de etanol puro, se mezcló por inversión y se dejó precipitar el ARN a 4°C durante al menos 12 hs. Cumplido el tiempo, se centrifugó 10 min a 16000xg y el sedimento obtenido se utilizó para su posterior análisis por corrida electroforética en geles de poliacrilamida para detección de genoma de rotavirus y/o por reacción de RT-PCR para la amplificación de segmentos génicos específicos de rotavirus grupo A.

A.2.2 Corrida electroforética en matriz de poliacrilamida y revelado del genoma

viral

Los precipitados de ARN viral obtenidos en el punto A.2.1 fueron diluidos en 15µl de buffer Pyndhia (0.02M Tris-HCI pH 7.4, 0.3M NaCl, 0.01M MgCl2, 0.1% SDS, 5mM EDTA, 4% Sacarosa, 0.04% Azul de bromofenol) y sembrados en un gel de resolución de poliacrilamida al 10% en un sistema de buffer discontinuo siguiendo el procedimiento descripto por Laemmli (1970). La corrida electroforética se realizó utilizando buffer de corrida (0.3% Tris, 1.44% Glicina, 0.1% SDS) durante 3 hs a 60 mA y finalmente el gel fue coloreado mediante tinción argéntica siguiendo el procedimiento descripto por Herring y colab. (1982) para el revelado del genoma de rotavirus. Se consideró positiva la muestra cuando se observó el patrón electroforético característico de rotavirus grupo A, esto es, los 11 segmentos génicos distribuidos en 4 grupos, conteniendo cada uno 4, 2, 3 y 2 segmentos, respectivamente.

B) Genotipificación de muestras rotavirus positivas

B.1 Reacción de RT-PCR para la amplificación del gen de la proteína VP7

A partir de las muestras fecales ELISA y/o PAGE/SS rotavirus positivas, se realizó una suspensión de la materia fecal al 10% en buffer Tris-HCl 0.02M, pH 7.2, y a partir de ésta se realizó la extracción del ARN viral siguiendo el procedimiento antes descripto (Método A.2.1). Los

precipitados de ARN viral obtenidos fueron diluidos en 20µl de agua estéril y 3µl se emplearon como molde para producir cDNA del gen VP7 siguiendo el procedimiento descripto por Gouvea y colab. (1990). Brevemente, el ARN viral se mezcló con el par de primers Beg9 y End9 (0.5uM cada uno; Tabla 3) resultando en un volumen final de 5µl. La mezcla fue calentada durante 5 min a 95°C y se enfrió en hielo durante 2-5 min. Luego se agregó a los tubos (conteniendo el ARN desnaturalizado y los primers), 5 µl de la mezcla de reacción para la transcripción reversa, de manera que las concentraciones finales fueran las siguientes: 1mM de cada dNTP, 6% DMSO, 3U de la transcriptasa reversa AMV (Invitrogen, California, EEUU), 2mM DTT, y 1X buffer de la enzima. Se realizó la retrotranscripción durante 2 hs a 45°C y se inactivó la enzima durante 15 min a 85°C. Posteriormente, 1µl de cDNA fue agregado a 9 µl de una pre-mezcla de reacción para PCR, de manera que las concentraciones finales fueran las siguientes: 0.25µM de cada primer (Beg9, End9), 1.5 mM MgCl2, 0.1mM dNTPs, 0.5U Tag ADN polimerasa (Invitrogen, California, EEUU) y 1X buffer de la enzima, obteniendo un volumen final de reacción de 10 µl. La solución obtenida fue sometida al siguiente perfil de ciclado: 1 min a 94ºC, 30 ciclos de desnaturalización a 92°C, 10 seg; hibridación a 45°C, 15 seg; y extensión a 72°C, 1 min; y finalmente una extensión final a 72°C, 1 min (Gouvea y colab., 1990). El tamaño del producto de reacción que se espera obtener es de 1062 pb. Se utilizó como control positivo la cepa de referencia de rotavirus grupo A Wa, cedida gentilmente por el Centro de Enfermedades Infecciosas (CDC, EEUU).

| Primer | Secuencia | Correspondencia con |
|-------------|---------------------------------------|---------------------|
| (Polaridad) | (5'-3') | nucleolidos de VP7 |
| Beg9 (+) | GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G | 1-28 |
| End9 (-) | GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG | 1062-1036 |

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la detección del gen de la VP7 de RV-A. Los primers Beg9 y End9 fueron diseñados por Gouvea y colab. (1990)
B.2 Reacción de heminested-PCR para la amplificación de regiones genotipo G variables del gen de la proteína VP7

Los productos de la primera reacción de PCR para el gen VP7 fueron sometidos a una segunda ronda de amplificación con mezclas de primers internos específicos para secuencias de genotipos G de humanos (Gouvea y colab., 1990; 1994; Griffin y colab., 2002).

Para la amplificación de secuencias de los genotipos G de mayor prevalencia a nivel mundial se realizaron dos mezclas de reacción conteniendo los siguientes primers tipo-específicos: A) G1 (aBT1), G2 (aCT2) y G3 (aET3); y B) G4 (aDT4) y G9 (aFT9); junto con el primer genérico End9 (*Tabla 4*). Estas combinaciones de primers amplifican regiones variables del gen de la VP7. La mezcla de reacción consistió en 0.4µl de molde (VP7), 0.25µM de cada primer tipo-específico, 0.5µM del primer End9, 3mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.5U Taq ADN polimerasa (Invitrogen, California, EEUU) y el buffer provisto por el fabricante, en un volumen final de 10µl. Las condiciones para la multiplex-PCR fueron las mismas que las descriptas para la primera ronda de amplificación. Los tamaños de los productos de reacción que se esperan obtener son los siguientes: G1, 749 pb; G2, 652 pb; G3, 374 pb; G4, 583 pb; y G9, 306 pb.

Para la búsqueda de genotipos de baja frecuencia de circulación en humanos se realizaron tres reacciones independientes de PCR con las siguientes mezclas de primers: A) G8 (aAT8) y End9 (concentración final 0.25µM cada uno); B) G5 (FT5), G11 (BT11) y Beg9 (concentración final 0.25µM primers tipo-específicos y 0.5µM primer genérico); y C) G12+ (Jrg226) y G12- (Jrg227) (concentración final 0.25µM cada uno) (*Tabla 4*). La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descriptas en el Método B.1. Los tamaños de los productos de reacción que se esperan obtener son los siguientes: G8, 885 pb; G5, 780 pb; G11, 337 pb; y G12, 171 pb.

Las muestras de materia fecal caracterizadas como infecciones G tipo mixtas mediante la reacción de multiplex-PCR fueron re-testeadas para cada genotipo involucrado en la coinfección mediante reacciones individuales de PCR utilizando el primer genérico y el primer tipo-específico en concentraciones finales de 0.25µM. La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que las descriptas en el Método B.1.

| Primer (Polaridad) | Secuencia (5'-3') | Nucleótidos | | Genotipo | Tamaño fragment | del :o |
|-----------------------|--------------------------------|-------------|---------|----------|--------------------|-----------|
| aBT1 (+) End9 | CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG | GG | 314-335 | G1 | 749pb c | on |
| aCT2 (+) | CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC | TGT G | 411-435 | G2 | 652pb | con |
| End9 aET3 (- | +) CGT TTG AAG AAG TTG CAA CA | G | 689-709 | G3 | 374pb | con |
| End9 aDT4 (· | +) CGT TTC TGG TGA GGA GTT G | | 480-498 | G4 | 583pb | con |
| End9 aFT9 (- | -) CTA GAT GTA ACT ACA ACT AC | | 757-776 | G9 | 306pb | con |
| End9 aAT8 (- | •) GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCC | 3 | 178-198 | G8 | 885pb | con |
| End9 | | | | | | |
| FT5 (-) Beg9 | CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC | | 779-760 | G5 | 780pb | con |
| BT11 (-) Beg 9 | GTC ATC AGC AAT CTG AGT TG | С | 336-316 | G11 | 337pb | con |
| Jrg226 (+) Jrg227 | TCG TCA TGC TGC CAT TTA | | 173-190 | G12 | 171pb | con |
| Jrg227 (-) Jrg226 | GTC CAG TCG GGA TCA GTT | | 327-344 | G12 | 171pb | con |

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genotipos G de RV-A. Los primers aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aFT9 y aAT8 fueron diseñados por Gouvea y colab. (1990); los primers FT5 y BT11 por Gouvea y colab. (1994) y los primers Jrg226 y Jrg227 por Griffin y colab. (2002).

B.3 Reacción de RT-PCR para la amplificación del gen de la proteína VP4

Los precipitados de ARN viral obtenidos fueron diluidos en 20µl de agua estéril y 3µl se emplearon como molde para producir cDNA del gen VP4 siguiendo el procedimiento descripto por Gentsch y colab. (1992). Brevemente, el ARN viral se mezcló con el par de primers Con2 y Con3 (0.5µM cada uno; *Tabla 5*) resultando en un volumen final de 5µl. La mezcla fue calentada durante 5 min a 95°C y se enfrió en hielo durante 2-5 min. Luego se agregó a los tubos (conteniendo el ARN desnaturalizado y los primers) 5µl de la mezcla de reacción para la transcripción reversa de manera que las concentraciones finales fueran: 0.5mM de cada dNTP, 5% DMSO, 3U de la transcriptasa reversa AMV (Invitrogen, California, EEUU), 2mM DTT, y 1X buffer de la enzima. Se realizó la retrotranscripción durante 2 hs a 45°C y se inactivó la enzima durante 15 min a 85°C. Posteriormente, 1µl de cDNA fue agregado a 9 µl de una pre-mezcla de reacción para PCR, de manera que las concentraciones finales fueran las siguientes: 0.5µM de cada primer (Con2, Con3), 1.5 mM MgCl₂, 0.1mM dNTPs, 4% DMSO, 1U Taq ADN polimerasa

(Invitrogen, California, EEUU) y 1X buffer de la enzima, obteniendo un volumen final de reacción de 10 μl. La solución obtenida fue sometida al siguiente perfil de ciclado: 28 ciclos de desnaturalización a 94°C, 1 min; hibridación a 42°C, 2 min; y extensión a 72°C, 2 min; y finalmente una extensión final a 72°C, 5 min (Gentsch y colab., 1992; O'Mahony y colab., 1999). El tamaño del producto de reacción que se espera obtener es de 876 pb. Se utilizó como control positivo la cepa de referencia Wa.

| Primer (Polaridad) | Secuencia (5'-3') | Nucleótidos |
|-----------------------|-------------------------------|-------------|
| Con3 (+) | TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A | 11-32 |
| Con2 (-) | ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC | 868-887 |

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la detección parcial del gen de la VP4 de RV-A. Los primers Con3 y Con2 fueron diseñados por Gentsch y colab. (1992).

B.4 Reacción de heminested-PCR para la amplificación de regiones genotipo P variables del gen de la proteína VP4

Los productos de la primera reacción de PCR para el gen VP4 fueron sometidos a una segunda ronda de amplificación con el primer genérico Con3 y una mezcla de primers internos específicos para secuencias de los genotipos P humanos, P[8], P[4], P[6], P[9] y P[10] (Gentsch y colab., 1992; Iturriza-Gomara y colab., 2000). La mezcla de reacción consistió en 1µl de molde (VP4), 0.25µM de cada primer tipo-específico (*Tabla 6*), 0.5µM del primer Con3, 1.5mM MgCl₂, 0.1mM dNTPs, 4% DMSO, 1U Taq ADN polimerasa (Invitrogen, California, EEUU) y el buffer provisto por el fabricante, en un volumen final de 10µl. El perfil de ciclado fue: 30 ciclos de desnaturalización a 94°C, 1 min; hibridación a 50°C, 2 min; y extensión a 72°C, 2 min; y finalmente una extensión final a 72°C, 5 min (Gentsch y colab., 1992; O'Mahony y colab., 1999). Los tamaños de los productos de reacción que se esperan obtener son los siguientes: P[4], 483 pb; P[6], 267; P[8], 345 pb; P[9], 391 pb; y P[10], 583 pb.

| Primer (Polaridad) | Secuencia (5'-3') | Nucleótidos | Genotipo | Tamaño del fragmento |
|-----------------------|-----------------------------|-------------|----------|-------------------------|
| 1T-1 (-) | TCT ACT TGG ATA ACG TGC | 339-356 | P[8] | 345pb con Con3 |
| 2T-1 (-) | CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC | 474-494 | P[4] | 483pb con Con3 |
| 3T-1 (-) | TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA | 259-278 | P[6] | 267pb con Con3 |
| 4T-1 (-) | TGA GAC ATG CAA TTG GAC | 385-402 | P[9] | 391pb con Con3 |
| 5T-1 (-) | ATC ATA GTT AGT AGT CGG | 575-594 | P[10] | 583pb con Con3 |
| 1T-1D (-) | TCT ACT GGY TTY ACN TG | 340-356 | P[8] | 345pb con Con3 |
| | | | | |

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genotipos P de RV-A. Los primers 1T-1 a 5T-1 fueron diseñados por Gentsch y colab. (1992) y el primer 1T-1D por Iturriza-Gomara y colab., 2000.

C) Revelado de los productos de amplificación por PAGE/SS y por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (AGE/EB)

Cinco µl de los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y revelados por tinción con sales de plata de acuerdo al procedimiento estándar previamente descripto (Método A.2.2). Además, algunos productos de PCR fueron sometidos en paralelo a electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer de corrida TBE (0.09 M Tris-borato, 0.002 M EDTA), durante 2 hs a 100 V, visualizando los productos en transiluminador de UV luego de la tinción con bromuro de etidio. En todos los casos los amplicones fueron identificados por tamaño por comparación con un patrón de ADN en el rango de 100 a 1000 pb (PB-L Productos BioLogicos, Buenos Aires, Argentina).

D) Competencia replicativa de G tipos en el curso de coinfecciones por rotavirus

D.1 Muestras seleccionadas para análisis de competencia de G tipos virales

Se seleccionaron muestras de materia fecal obtenidas de niños coinfectados naturalmente con dos cepas de RV-A de distintos genotipos G. Debido a la naturaleza de coinfección de las muestras, los inóculos correspondientes a cada G tipo no pudieron ser cuantificados. Por lo tanto, el criterio de inclusión de muestras fue que las mismas presentaran cantidades equivalentes de productos de PCR para cada genotipo involucrado en la coinfección. Se ensayaron los cuatro tipos de coinfecciones más prevalentes en la naturaleza: (A) G1 y G4; (B) G1 y G2; (C) G2 y G4; y (D) G1 y G9. Se analizaron

individualmente cuatro muestras de cada tipo de coinfección, contabilizando un total de 16 muestras. Las muestras seleccionadas para este estudio fueron clarificadas, tratadas con cloroformo, antibióticos (penicilina/streptomicina) y fungizona. Una alícuota al 10% de la suspension fecal fue pretratada con un volumen igual de tripsina (Difco 1:250, 20µg/ml) e incubada a 37°C por 30 min.

D.2 Crecimiento y cultivo de la línea celular continua de adenocarcinoma de colon (CaCo-2)

Se obtuvieron en placas estériles de 24 cavidades, de fondo plano, monocapas confluentes de células CaCo-2 en medio esencial mínimo Eagle (E-MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina, amonoácidos no esenciales y piruvato de sodio, a 37°C en una atmósfera de 5% CO2. Previo a la infección viral, las monocapas confluentes de células CaCo-2 se lavaron dos veces e incubaron durante toda la noche en E-MEM libre de suero.

D.3 Infección de monocapas celulares de CaCo-2 con inóculos virales G tipo mixtos. Cosecha del producto de replicación viral

Un total de 100µl de cada una de las 16 suspensiones de material fecal preactivadas fue inoculado por sextuplicado en placas de 24-wells con monocapas confluentes de células CaCo-2 (O'Neill y colab., 1996). De este modo, se inocularon en total cuatro placas de 24-wells, cada una con un tipo de coinfección determinado (*Figura 15*). Luego de 60 min de absorción a 37°C con agitación, los extractos fueron removidos. Los cultivos fueron mantenidos en E-MEM, libre de SFB, supplementado con L-glutamina, amonoácidos no esenciales, piruvato de sodio y tripsina (5µg/ml); e incubados a 37°C con 5% CO2 (Cumino y colab., 1998). Se chequeó diariamente la presencia de efecto citopático (ECP) en los cultivos infectados, y en intervalos de 5-7 días se realizaron tres pasajes celulares consecutivos a partir de los sobrenadantes infectados, independientemente de la presencia o ausencia de ECP. Luego de cada intervalo de 5-7 días post-infección, los cultivos fueron cosechados y congelados-descongelados tres veces. De este modo, de cada muestra (n=16) ensayada por sextuplicado se obtuvo el producto del primer, segundo y tercer ciclo replicativo.



Figura 15. Placas de 24-wells infectadas con muestras de RV-A de naturaleza G tipo mixta: A) G1+G4; B) G1+G2; C) G2+G4; D) G1+G9. Cada muestra fue inoculada por sextuplicado.

D.4 Caracterización de G tipos en los productos de replicación viral

Los sobrenadantes cosechados de las muestras inoculadas por sextuplicado fueron analizados de manera independiente, para determinar la reproducibilidad de cada set replicativo del virus. Se realizó la extracción del ARN viral de los sobrenadantes celulares mediante el método de fenol-cloroformo, seguido de precipitación alcohólica de acuerdo a los procedimientos estándar previamente descripto en el Método A.2.1 (Perry y colab., 1972). A partir de los ARN extraídos se realizó la amplificación del gen de la VP7 mediante RT-PCR y la caracterización de genotipos G con primers individuales siguiendo los procedimientos descriptos previamente en los Métodos B1 y B2. Los productos amplificados fueron revelados por PAGE/SS, como se describiera previamente en el Método A.2.2.

D.5 Criterio de expresión de resultados

Se calculó la frecuencia de detección de G tipos como el cociente entre el número total de wells con resultado positivo en la PCR con primers individuales (G tipo específicos) y el número total de wells inoculados, para cada muestra y pasaje de cultivo celular.

E) Vigilancia ambiental de circulación de G tipos de rotavirus grupo A

E.1 Método de concentración de muestras cloacales

La metodología empleada se basa en el proceso de centrifugación y precipitación con solventes orgánicos (polietilenglicol -PEG- 6000) recomendado por la WHO (OMS, 2003). Las muestras fueron concentradas en un factor 100X. Brevemente, las aguas cloacales fueron clarificadas por centrifugación a 4000 rpm por 20 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron conservados a 4°C para su posterior uso y los precipitados fueron eluidos con una solución de extracto de carne 3% y NaNO3 2M (pH 5.5) en una proporción 3:1 respecto al peso del precipitado obtenido. Se eluyeron las muestras durante 1 h a 4ºC con agitación continua a 180 rpm. Luego del tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 8300 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes obtenidos fueron mezclados con el primer sobrenadante obtenido en el paso de clarificación y los virus presentes en la mezcla se precipitaron mediante el agregado de PEG 10% (peso/volumen) y NaCl 2% (peso/volumen), incubando las muestras a 4ºC durante al menos 2 hs con agitación suave (120 rpm). Luego de la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 8300 rpm durante 25 min a 4ºC. Los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en buffer PBS pH 7.2 (1/100 volumen/volumen). Se ajustó el pH a 8 y se eluyó durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 8300 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes resultantes (concentrados 100X) se almacenaron a -80°C.

E.2 Método de extracción de ácidos nucleicos, reacción de RT-PCR y heminested-PCR para la detección de G tipos y revelado de los amplicones obtenidos

Se realizó la extracción del ARN viral de los concentrados de virus en aguas residuales mediante el método de fenol-cloroformo, seguido de precipitación alcohólica de acuerdo al procedimiento estándar previamente descripto en el Método A.2.1 (Perry y colab., 1972). A partir de los ARN extraídos se realizó la amplificación del gen de la VP7 y la caracterización de genotipos G siguiendo los procedimientos descriptos previamente (Métodos B1 y B2). Los productos amplificados fueron revelados por PAGE/SS siguiendo el procedimiento descripto en el punto A.2.2.

F) Análisis estadístico

F.1 Test Chi cuadrado y Test Fisher

Para las comparaciones de frecuencias de detección de G tipos entre grupos etarios y géneros se realizó un análisis univariado a través de pruebas de Chi cuadrado, o la prueba exacta de Fisher en el caso de variables discretas. Los resultados de P<0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

F.2 Test Z

Se aplicó el test Z para comparación de proporciones (Zar, 1996) para comparar las frecuencias de detección de genotipos G de RV-A identificados en especímenes clínicos y cloacales.

G) Análisis filogenético

G.1 Secuenciamiento de los productos genómicos obtenidos por PCR

Los amplicones completos de los genes codificantes para VP7-genotipo G1 (1062 pb) y VP4-genotipo P[8] (876 pb), y los correspondientes al producto de tipificación de G9 (306 pb) fueron purificados y secuenciados en el laboratorio de servicios Macrogen de Corea (www.macrogen.com) utilizando un equipo Applied Biosystems modelo 377 y el método de terminación de cadena por dideoxinucleótido y el kit Prism Ready Brig Dye Terminador Cycle Sequencing (Macrogen, Seoul, Corea). Para el secuenciamiento se utilizaron los primers Beg9/End9 (VP7), Con2/Con3 (VP4) y aFT9/End9 (G9). Cada producto de amplificación fue secuenciado por duplicado y en ambos sentidos, de tal forma que cada secuencia nucleotídica asignada corresponde al consenso de cuatro alineamientos de secuencia.

G.2 Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

Se realizó la edición, alineación y comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas obtenidas utilizando el programa Bio Edit Sequence Alignment Editor, versión 7.0.5.2. Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con las secuencias de cepas patrones publicadas en el GenBank, utilizando el programa BLAST. Se realizó el alineamiento múltiple de secuencias con el programa Clustal X. Las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas fueron calculadas utilizando el software MEGA 4.0, aplicando como modelo de sustitución nucleotídica el método Kimura-2-parámetros. La significancia estadística de las filogenias inferidas se estimó usando el método Neighbor-Joining con un bootstrap de 1000 pseudorepeticiones.

G.3 Números de acceso de secuencias nucleotídicas de cepas de referencia de rotavirus grupo A incorporadas en el análisis filogenético

VP7-G1: Wa (K02033); D/JP (AB118022); KU (D16343); K2 (D16323); 88H249 (AB081795); VN-281 (DQ508167); Thai-1604 (DQ512981); G192B (AF043678); HOU8697 (U88717); AU81 (M64666); AU007 (AB081799); JP421 (D16326); JP471 (D16328); Mvd9812 (AF480289); WI79-9 (GU565057); RIX4414 (variante C605T de Wa).

VP7-G9: R44 (AF438227); R143 (AF274969); INL1 (AJ250277); BD524 (AJ250543); Mc345 (D38055); K-1 (AB045374); 97'SZ37 (AF260959); AMO67 (AJ491179); 116E (L14072); AU32 (AB045372); WI61 (AB180969); F45 (AB180970).

VP4-P[8]: Wa (L34161); MMC71 (EU979382); MMC38 (EU979379); 95-91 (AB008291); YO (AB008279); Hochi (AB008295); VA70 (AJ540229); KU (AB222784); Dhaka25-02 (DQ146652); WI79-4 (GU565044).

G.4 Análisis de la predicción de la estructura secundaria de proteínas

Se utilizó el servidor de predicción de estructura proteica PSIPRED v3.0 (Bryson y colab., 2005) a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas VP4 y VP7 pertenecientes a distintos linajes.

Resultados

Perfil genotípico y dinámica natural de circulación de rotavirus grupo a en Córdoba, Argentina. Período 1979-2003

Durante el período 1979-2003 un total de 2047 muestras de materia fecal fueron colectadas de niños menores de 3 años de edad que requirieron de atención médica por un cuadro de gastroenteritis aguda en la Ciudad de Córdoba. Del total de muestras, 519 (25.3%) resultaron rotavirus positivas por ELISA y/o PAGE/SS. Este total de muestras fue procesado por RT-PCR para analizar los genotipos P y G tipos. Las muestras RV-A positivas que no pudieron ser amplificadas para los genes VP4 y/o VP7 fueron re- testeadas para la detección de genoma viral por PAGE/SS. De las muestras re-testeadas un 23% resultaron RV-A positivas, indicando la presencia de inhibidores de las enzimas de la RT-PCR en estas muestras.

Perfil genotípico de la proteína VP4

Del total de muestras rotavirus positivas (n=519), 323 (62.2%) amplificaron el gen de la proteína VP4 mediante RT-PCR y por lo tanto resultaron aptas para el posterior análisis molecular de P tipos de rotavirus, utilizando primers para la detección de los genotipos P[4], P[6], P[8], P[9] y P[10]. De las 323 muestras VP4 positivas, fue posible caracterizar el genotipo P en 306 (94.7%). Los resultados de este análisis se presentan en la *Tabla 7*.

| | Muestras | Infecciones | Simples | Infecciones Mixtas | | |
|------|-------------|-----------------------|----------|--------------------|--------|--|
| Año | tipificadas | | Total | | Total | |
| | | Tipo (n) | n (%) | Tipo (n) | n (%) | |
| 1979 | 16 | P[4] (1) P[8] (15) | 16 (100) | - | 0 (0) | |
| 1980 | 7 | P[8] (6) | 6 (85) | P[4]+P[8] (1) | 1 (15) | |
| 1981 | 7 | P[4] (5) P[8] (1) | 6 (85) | P[4]+P[8] (1) | 1 (15) | |
| 1982 | 3 | P[8] (3) | 3 (100) | - | 0 (0) | |
| 1984 | 10 | P[4] (1) P[8] (8) | 9 (90) | P[6]+P[8] (1) | 1 (10) | |
| 1985 | 9 | P[8] (9) | 9 (100) | - | 0 (0) | |
| 1986 | 12 | P[8] (10) | 10 (83) | P[4]+P[8] (2) | 2 (17) | |
| 1987 | 5 | P[4] (1) P[8] (3) | 4 (80) | P[4]+P[8] (1) | 1 (20) | |
| 1988 | 3 | P[8] (3) | 3 (100) | - | 0 (0) | |

| 1989 | 10 | P[8] (10) | 10 (100) | - | 0 (0) |
|-------|-----|-----------------------------------------------|------------|---------------------------------|-----------|
| 1992 | 1 | P[8] (1) | 1 (100) | - | 0 (0) |
| 1995 | 3 | P[8] (3) | 3 (100) | - | 0 (0) |
| 1996 | 9 | P[4] (2) P[8] (5) | 7 (78) | P[4]+P[8] (2) | 2 (22) |
| 1997 | 69 | P[4] (19) P[8] (38) | 57 (83) | P[4]+P[8] (11) P[6]+P[8] (1) | 12 (17) |
| 1998 | 65 | P[4] (2) P[6] (6) P[8] (47) P[9] (3) | 58 (89) | P[4]+P[8] (7) | 7 (11) |
| 1999 | 6 | P[8] (5) | 5 (83) | P[4]+P[8] (1) | 1 (17) |
| 2000 | 24 | P[4] (3) P[8] (18) P[9] (1) | 22 (92) | P[4]+P[8] (2) | 2 (8) |
| 2001 | 19 | P[4] (3) P[6] (1) P[8] (14) P[9] (1) | 19 (100) | - | 0 (0) |
| 2002 | 19 | P[4] (4) P[6] (1) P[8] (13) | 18 (95) | P[4]+P[8] (1) | 1 (5) |
| 2003 | 9 | P[4] (3) P[8] (3) | 6 (67) | P[4]+P[8] (2) P[6]+P[8] (1) | 3 (33) |
| TOTAL | 306 | - | 272 (88.9) | - | 34 (11.1) |

Tabla 7. Genotipos P de RV-A circulantes en la Ciudad de Córdoba, Argentina, durante elperíodo 1979-2003.

De las 34 muestras P tipo mixtas identificadas durante el período de 25 años estudiado, 31 (91.2%) correspondieron a coinfecciones con los P tipos de mayor prevalencia, esto es P[4]+P[8] y 3 muestras (8.8%) a coinfecciones P[6]+P[8]. Con el fin de examinar la distribución proporcional de P tipos de RV-A, las infecciones mixtas fueron consideradas como P tipos independientes (cada P tipo fue contabilizado de manera individual), por lo cual el número total de P tipos identificados fue 340.

El análisis global de distribución proporcional de los 340 P tipos de RV-A identificados durante el período estudiado mostró la mayor frecuencia de circulación del genotipo P[8] (73.2%), seguido en importancia por el genotipo P[4] (22.1%). Los genotipos P[6] y P[9] fueron detectados en baja frecuencia (3.2% y 1.5%, respectivamente) y no hubo detección del genotipo P[10] durante el período de 25 años estudiado (*Figura 16*).



Figura 16. Distribución proporcional de genotipos P de RV-A en Córdoba, Argentina, durante el período 1979 y 2003.

La distribución temporal de los genotipos P de RV-A describió la continuidad de circulación de P[8]. El genotipo P[4] circuló de manera fluctuante, alternando ciclos de detección y no detección. Los genotipos P[6] y P[9] fueron detectados esporádicamente y en bajos niveles de frecuencia (*Figura 17*).



Figura 17. Circulación temporal de genotipos P de RV-A en Córdoba, Argentina, durante el período 1979-2003.

Distribución de genotipos P de rotavirus por edad y género

La distribución de los genotipos P de RV-A fue independiente de la edad (1 a 36 meses), ya que cada genotipo estuvo representado de manera similar en cada grupo etáreo (*P*>0.05) (*Figura 18*).



Figura 18. Distribución de genotipos P de RV-A según grupo etáreo durante el período 1979-2003. Córdoba, Argentina.

No se observaron diferencias significativas en la distribución de genotipos P de rotavirus entre pacientes femeninos y masculinos (*P*>0.05) (*Figura 19*).





Perfil genotípico de la proteína VP7

Del total de muestras RV-A positivas (n=519), fue posible analizar por RT-PCR el genotipo G en 385 (74.2%). En la *Tabla 8* se muestran los genotipos G de rotavirus que circularon en la Ciudad de Córdoba durante el período 1979-2003.

| | Muestras | Infecciones | s Simples | Infecciones Mixtas | | | | |
|------|-------------|--------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------|--|--|
| Año | tipificadas | Tipo (n) | Total n (%) | Doble Tipo (n) | Triple Tipo (n) | Total n (%) | | |
| 1979 | 24 | G1 (10) G3 (1) | 11 (46) | G1+G4 (13) | - | 13 (54) | | |
| 1980 | 9 | G1 (5) | 5 (55) | G1+G2 (1) G1+G4 (1) G1+G9 (1) G4+G9 (1) | - | 4 (45) | | |
| 1981 | 7 | - | 0 (0) | G1+G2 (3) G1+G9 (1) G2+G4 (1) | G1+G2+G4 (2) | 7 (100) | | |
| 1982 | 3 | G1 (1) G9 (1) | 2 (67) | - | G1+G4+G9 (1) | 1 (33) | | |
| 1984 | 13 | G1 (6) G2 (1) G3 (1) G4 (2) | 10 (77) | G1+G2 (1) G1+G3 (1) | G1+G4+G9 (1) | 3 (23) | | |
| 1985 | 9 | G1 (2) G4 (1) | 3 (33) | G1+G4 (4) | G1+G2+G4 (1) G1+G3+G4 (1) | 6 (67) | | |
| 1986 | 12 | G1 (6) | 6 (50) | G1+G4 (2) | G1+G2+G4 (2) G1+G3+G4 (1) G1+G4+G9 (1) | 6 (50) | | |
| 1987 | 6 | G1 (2) G2 (1) G4 (1) | 4 (67) | G1+G2 (1) | G1+G2+G4 (1) | 2 (33) | | |
| 1988 | 3 | G1 (1) | 1 (33) | G1+G2 (1) | G1+G4+G9 (1) | 2 (67) | | |
| 1989 | 13 | G1 (8) G4 (3) | 11 (85) | G1+G3 (1) G1+G4 (1) | - | 2 (15) | | |
| 1992 | 1 | - | 0 (0) | G1+G4 (1) | - | 1 (100) | | |

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

| 1995 | 3 | G1 (2) G4 (1) | 3 (100) | - | - | 0 (0) |
|-------|-----|-----------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1996 | 9 | G1 (4) G2 (3) | 7 (78) | G1+G4 (2) | - | 2 (22) |
| 1997 | 86 | G1 (27) G2 (4) G4 (9) | 40 (46) | G1+G2 (8) G1+G3 (2) G1+G4 (20) G1+G9 (2) G2+G4 (3) G3+G4 (1) | G1+G2+G3 (2) G1+G2+G4 (4) G1+G2+G9 (1) G1+G3+G9 (1) G1+G4+G9 (1) G2+G3+G4 (1) | 46 (54) |
| 1998 | 95 | G1 (46) G3 (1) G4 (4) | 51 (54) | G1+G2 (2) G1+G4 (32) G1+G9 (1) G3+G9 (1) | G1+G2+G4 (2) G1+G3+G4 (3) G1+G4+G9 (3) | 44 (46) |
| 1999 | 5 | G1 (2) | 2 (40) | G1+G4 (2) G3+G4 (1) | - | 3 (60) |
| 2000 | 30 | G1 (19) G2 (2) G4 (2) | 23 (77) | G1+G2 (3) G1+G4 (2) G3+G4 (1) G3+G9 (1) | - | 7 (23) |
| 2001 | 28 | G1 (5) G3 (1) G4 (5) | 11 (39) | G1+G4 (11) | G1+G2+G3 (1) G1+G2+G4 (2) G1+G3+G9 (1) G1+G4+G9 (2) | 17 (61) |
| 2002 | 18 | G1 (12) G2 (1) | 13 (72) | G1+G4 (3) G3+G9 (1) | G1+G2+G3 (1) | 5 (28) |
| 2003 | 11 | G1 (4) G2 (4) G9 (2) | 10 (91) | G2+G4 (1) | - | 1 (9) |
| TOTAL | 385 | - | 213 (55.3) | 135 (35.1) | 37 (9.6) | 172 (44.7) |

Tabla 8. Genotipos G de RV-A circulantes en la Ciudad de Córdoba, Argentina,durante el período 1979-2003.

Inesperadamente se identificó un alto índice de infecciones G tipo mixtas (44.7%) en muestras obtenidas dentro de las 24hs de la atención del paciente (*Tabla 8*). Las mismas estuvieron integradas tanto por genotipos comunes como por comunes e inusuales. El

78.5% de los casos G tipo mixtos fueron co-infecciones con dos genotipos de rotavirus, y el 21.5% correspondió a co-infecciones con 3 genotipos. Con el fin de examinar la distribución proporcional de genotipos G de RV-A, las infecciones mixtas fueron consideradas como G tipos independientes (cada genotipo fue contabilizado de manera individual), por lo cual el número total de genotipos identificados fue 594. El análisis global de distribución proporcional de los 594 G tipos identificados en el período estudiado determinó que el tipo G1 fue el más prevalente, siendo responsable del 54.0% de las infecciones por RV-A. El genotipo G4 fue el segundo en frecuencia, siendo responsable del 27.1% de las infecciones, y los tipos G2 y G3 fueron detectados en el 10.3% y 4.4% de las infecciones, respectivamente. El genotipo G9, emergente a nivel mundial desde los años 1990s, fue identificado en una frecuencia global del 4.2% (*Figura 20*).



Figura 20. Distribución proporcional de genotipos G de rotavirus circulantes en Córdoba, Argentina, durante el período 1979-2003.

La distribución temporal de RV-A permitió observar la circulación continua en la Ciudad de Córdoba de los genotipos G1 y G4. El genotipo G1 fue el dominante a lo largo de los 25 años de estudio, seguido por G4. El genotipo G2 mostró un perfil de circulación fluctuante. Los genotipos G3 y G9 fueron infrecuentes desde el año 1979 y 1980, respectivamente, detectándose casos esporádicos en distintos años. La identificación del genotipo G9 desde el año 1980 constituye el registro de más larga data de circulación de este genotipo a nivel mundial (*Figura 21*).



Figura 21. Circulación temporal de genotipos G de RV-A en Córdoba, Argentina, durante el período 1979-2003.

Distribución de genotipos G de rotavirus por edad y género

La mayor frecuencia de infecciones por RV-A fue en niños menores de 18 meses de edad (98.6%). La distribución de los genotipos G de RV-A fue independiente de la edad (1 a 36 meses), ya que cada genotipo estuvo representado de manera similar en cada grupo etareo (*P*>0.05) (*Figura 22*).



Figura 22. Distribución de genotipos G de RV-A según grupo etáreo durante el período 1979-2003. Córdoba, Argentina.

Tampoco se observaron diferencias significativas en la distribución de genotipos G de rotavirus entre pacientes femeninos (n=236) y masculinos (n=265) (P>0.05) (*Figura 23*).



Figura 23. Distribución de genotipos G de RV-A según género durante el período 1979-2003. Córdoba, Argentina.

G tipos de circulación inusual en humanos

Del total de muestras rotavirus VP7 positivas (n=365) durante el período 1979-2003, el 0.9% (n=3) mostró presencia de los genotipos inusuales G5 y/o G8. No se detectó circulación durante este período de los genotipos G11 y G12.

El genotipo G5 fue detectado en una muestra colectada en el año 1988 en co-infección con el genotipo G1. Se observó también la circulación del genotipo inusual G8 durante los años 1997 y 1998. La muestra G8 colectada en el año 1997 fue identificada en coinfección con los genotipos G1+G9, mientras que la muestra G8 colectada en el año 1998 correspondió a una infección simple. Con la detección de la infección mixta G1+G5, el número de infecciones G tipo mixtas ascendió de 172 (44.7%) (*Tabla 8*), a 173 (44.8%).

Análisis de infecciones G tipo mixtas

De las 173 muestras G tipo mixtas detectadas durante el período de 25 años estudiado, 94 (54.3%) correspondieron a co-infecciones con los genotipos de mayor prevalencia, esto es G1+G4, y en la mayoría de los casos ambos amplicones fueron revelados como bandas fuertes. Con el fin de confirmar estos resultados, las 94 muestras G1+G4 fueron re analizadas mediante reacciones individuales de PCR utilizando primers específicos para G1 en una reacción y para G4 en otra, confirmándose todas las muestras como co- infecciones G1+G4. Las restantes 79 (45.7%) muestras G tipo mixtas, compuestas por distintas combinaciones de G tipos, fueron reveladas generalmente como dos bandas de diferente intensidad: una banda fuerte y otra débil. Para confirmar estos resultados, las muestras fueron re-testeadas en reacciones individuales de PCR utilizando primers específicos para cada genotipo involucrado en la coinfección. Del total de muestras, 11 no pudieron ser confirmadas como infecciones mixtas y 13 co-infecciones con tres genotipos diferentes fueron reveladas como infecciones dobles.

Con el fin de verificar la especificidad de los amplicones obtenidos, un total de 30 muestras con G tipos en coinfección fueron secuenciadas con los primers End9 y genotipoespecífico. Sólo una muestra no fue confirmada como G tipo mixta.

De este modo, el número total de infecciones G tipo mixtas disminuyó de 173 (44.8%) a 161 (41.7%). De las muestras G tipo mixtas, 140 correspondieron a infecciones dobles y 21 a infecciones triples, siendo las co-infecciones más frecuentes G1+G4 (n=104, 64.6%), G1+G2 (n=20, 12.4%), G2+G4 (n=5, 3.1%) y G1+G9 (n=4, 2.5%).

La distribución proporcional de genotipos G durante el período 1979-2003 luego del análisis pormenorizado de los genotipos involucrados en las infecciones mixtas y la inclusión al análisis de genotipos inusuales se representa en la *Figura 24*. Si bien se observan pequeñas diferencias porcentuales en la distribución proporcional de G tipos respecto a lo documentado en la *Figura 20*, estas resultaron no significativas (G1 54.0% vs. 56.3%; G2 10.3% vs. 9.9%; G3 4.4% vs. 2.1%; G4 27.1% vs. 28.5%; G9 4.2% vs. 2.6%). Por esta razón no se repitió el análisis de distribución temporal, por grupo etario y género de G tipos.





Distribución de genotipos G entre infecciones simples y mixtas

La distribución de genotipos G de RV-A en infecciones simples y mixtas se presenta en la *Tabla 9*. Los genotipos G2, G3, G4 y G9 se encontraron más frecuentemente asociados a infecciones mixtas que a infecciones simples (P<0.05), mientras que el genotipo G1 fue detectado en frecuencias similares en infecciones simples y mixtas (P>0.05). No pudo realizarse el análisis estadístico de asociación en infecciones simples o mixtas de los genotipos inusuales G5 y G8 debido al bajo número de muestras obtenidas.

| Genotipo | Total | Infección Simple n (%) | Infección Mixta n (%) |
|----------|-------|---------------------------|--------------------------|
| G1 | 320 | 170 (53.1) | 150 (46.9) |
| G2 | 56 | 16 (28.6) | 40 (71.4) |
| G3 | 12 | 5 (41.7) | 7 (58.3) |
| G4 | 162 | 30 (18.5) | 132 (81.5) |
| G5 | 1 | 0 (0.0) | 1 (100) |
| G8 | 2 | 1 (50.0) | 1 (50.0) |
| G9 | 15 | 3 (20.0) | 12 (80.0) |
| Total | 568 | 225 (39.7) | 343 (60.3) |

 Tabla 9. Distribución de genotipos G de RV-A según su presencia en infecciones simples o mixtas.

Infecciones G tipo mixtas en pacientes hospitalizados y ambulatorios

El número de pacientes ambulatorios infectados con más de una cepa de rotavirus fue levemente menor que el número de pacientes que requirieron hospitalización (40% vs. 48%), pero esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (*P*>0.05).

Comparación de dos sistemas de revelado y tinción para la detección de amplicones de rotavirus

Durante el desarrollo de este trabajo se detectó un porcentaje de infecciones G tipo mixtas que resultó significativamente más alto que lo reportado por la mayoría de los autores que trabajan en el tema en otras áreas geográficas, e inclusive en nuestro país. El análisis de lo realizado por otros autores respecto a lo realizado en este trabajo condujo a que el punto disimil fue la metodología utilizada para revelar los amplicones obtenidos en la RT-PCR. Así, mientras la mayoría de los autores utiliza para la detección de amplicones una matriz de agarosa con revelado por bromuro de etidio, en el presente trabajo se utilizó una matriz de poliacrilamida con revelado por tinción argéntica. Con el fin de analizar la influencia metodológica en la detección de infecciones mixtas, 40 muestras G tipo mixtas confirmadas por PCR con primers individuales y/o secuenciamiento génico fueron analizadas en paralelo revelando los amplicones mediante PAGE/SS y el método estándar AGE/EB. Del total de muestras testeadas, sólo el 75% (n=30) fueron confirmadas como infecciones G tipo mixtas

por la técnica estándar (AGE/EB). La pérdida de detección por AGE/EB fue más acentuada para los genotipos revelados como bandas tenues por PAGE/SS (*Tabla 10*).

| Genotino | Nº de genotipos | Nº de genotipos detectados por | | | | | | |
|----------|-----------------|--------------------------------|------------------|--|--|--|--|--|
| Genotipo | PAGE/SS | AGE/EB | por AGE/EB, n(%) | | | | | |
| G1 | 31 | 27 | 4 (12.9) | | | | | |
| G2 | 14 | 7 | 7 (50.0) | | | | | |
| G3 | 5 | 3 | 2 (40.0) | | | | | |
| G4 | 35 | 33 | 2 (5.7) | | | | | |
| G9 | 9 | 6 | 3 (33.3) | | | | | |
| Total | 95 | 76 | 19 (20.0) | | | | | |

Tabla 10. Detección de genotipos G de RV-A en infecciones mixtas mediante revelado de los amplicones de PCR por PAGE/SS y AGE/EB.

Competencia replicativa de genotipos G

Con el objeto de explicar la dinámica de circulación de genotipos de RV-A en la naturaleza, se utilizó un sistema in vitro que se ensayó inoculando cultivos de células CaCo-2 con muestras de materia fecal que presentaban los tipos de coinfecciones más frecuentemente determinadas en la población, esto es G1+G4, G1+G2, G2+G4 y G1+G9. Por cada coinfección se analizaron 4 muestras obtenidas de diferentes pacientes (G1+G4; A1-A4; G1+G2: B1-B4; G2+G4: C1-C4; G1+G9: D1-D4). En el sistema in vitro se montó una cadena de transmisión de infecciones G tipo mixtas mediante la realización de tres pasajes celulares ciegos y consecutivos. El producto del gen VP7 producido luego de la competencia de genotipos virales se analizó por RT-PCR- heminested PCR en los sobrenadantes de los cultivos infectados, visualizando los G tipos mediante PAGE/SS. La frecuencia de detección de cada G tipo fue calculada como el cociente entre el número total de pocillos que resultaron positivos en la reacción de PCR específica para cada G tipo y el número total de pocillos inoculados, para cada pasaje celular. La *Tabla 11* muestra la frecuencia de detección de cada genotipo por muestra analizada por sextuplicado, en el 1º, 2º y 3º pasaje celular.

| Coinfecciones | | | Mu | | | | | | | |
|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------|-----------|
| G1+G4 | A1 | | A2 | | A3 | | A4 | | Total (%) | |
| Pasaje celular | G1 | G4 | G1 | G4 | G1 | G4 | G1 | G4 | G1 | G4 |
| 1 | 5 | 5 | 6 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | 22 (91.7) | 22 (91.7) |
| 2 | 5 | 5 | 6 | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 22 (91.7) | 21 (87.5) |
| 3 | 5 | 5 | 6 | 4 | 5 | 5 | 6 | 6 | 22 (91.7) | 20 (83.3) |

| Coinfecciones | | | Mue | | | | | | | |
|----------------|----|----|-----|----|----|----|----|----|-----------|-----------|
| G1+G2 | B1 | | B2 | | B3 | | B4 | | Total (%) | |
| Pasaje celular | G1 | G2 | G1 | G2 | G1 | G2 | G1 | G2 | G1 | G2 |
| 1 | 6 | 4 | 6 | 6 | 6 | 3 | 6 | 4 | 24 (100) | 17 (70.8) |
| 2 | 6 | 3 | 6 | 5 | 6 | 3 | 6 | 4 | 24 (100) | 15 (62.5) |
| 3 | 6 | 2 | 6 | 5 | 6 | 3 | 6 | 3 | 24 (100) | 13 (54.2) |

| Coinfecciones | | | Mu | | | | | | | |
|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------|-----------|
| G2+G4 | C1 | | C2 | | C3 | | C4 | | Total (%) | |
| Pasaje celular | G2 | G4 | G2 | G4 | G2 | G4 | G2 | G4 | G2 | G4 |
| 1 | 4 | 5 | 4 | 5 | 6 | 2 | 5 | 6 | 19 (79.2) | 18 (75.0) |
| 2 | 4 | 5 | 4 | 4 | 6 | 2 | 5 | 5 | 19 (79.2) | 16 (66.7) |
| 3 | 4 | 3 | 4 | 2 | 6 | 1 | 5 | 3 | 19 (79.2) | 9 (37.5) |

| Coinfecciones | Muestras analizadas | | | | | | | | | |
|----------------|---------------------|----|----|----|----|----|----|----|-----------|-----------|
| G1+G9 | D1 | | D2 | | D3 | | D4 | | Total (%) | |
| Pasaje celular | G1 | G9 | G1 | G9 | G1 | G9 | G1 | G9 | G1 | G9 |
| 1 | 6 | 2 | 6 | 3 | 6 | 2 | 6 | 4 | 24 (100) | 11 (45.8) |
| 2 | 6 | 1 | 6 | 3 | 6 | 2 | 5 | 3 | 23 (95.8) | 9 (37.5) |
| 3 | 6 | 0 | 6 | 2 | 6 | 2 | 5 | 3 | 23 (95.8) | 7 (29.2) |

Tabla 11. Detección de genotipos G de RV-A durante coinfecciones en células CaCo-2. Los sobrenadantes de los cultivos celulares correspondientes al 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} pasaje fueron analizados por PCR para detección de G tipos. Se indica la frecuencia promedio de detección de G tipos en los 6 pocillos inoculados con la misma muestra para cada G tipo, número de pasaje celular y muestra analizada.

La tasa de detección del genotipo G1 en las coinfecciones G1+G2 y G1+G9 fue mayor que las tasas de detección de los genotipos G2 y G9 (*Figura 25*). En el tercer pasaje de estas coinfecciones, la mayoría de los virus detectados pertenecieron al genotipo G1 (100% G1 vs. 54.2% G2; 95.8% G1 vs. 29.2% G9). Por el contrario, el genotipo G4 co- amplificó eficientemente con el genotipo G1 en cada pasaje celular, a tasas de detección superiores al 80% (*Tabla 11* y *Figura 25*). En las coinfecciones con los genotipos G2 y G4 se observó que el tipo G2 amplificó levemente más que el tipo G4 en los primeros dos pasajes celulares, siendo esta diferencia aún más marcada en el tercer pasaje celular (79.2% G2 vs. 37.5% G4).



Figura 25. Selección in vitro de G tipos de RV-A luego de coinfecciones en células CaCo-2. Cada punto representa la frecuencia promedio de detección de G tipo de las 4 muestras ensayadas por sextuplicado, en un determinado nivel de pasaje celular (valor medio para un tipo de coinfección resultante de 24 determinaciones). Nota: El pasaje 0 corresponde a la tasa de detección de G tipo en el inóculo original (muestra de materia fecal).

Discusión

El análisis molecular de las proteínas VP4 y VP7 de RV-A reveló que más del 95% de las infecciones por RV-A ocurridas en Córdoba, Argentina, durante el período 1979-2003 correspondieron a los genotipos de mayor prevalencia a nivel mundial, esto es, P[8], P[4] y G1-G4 (Gentsch y colab., 2005; Santos y Hoshino, 2005).

Los primeros reportes de caracterización de genotipos P de RV-A a nivel mundial describieron la presencia de los tipos P[8] y P[4] en muestras de niños con diarrea. Desde entonces estos genotipos son detectados como los tipos más prevalentes que infectan humanos (Desselberger y colab., 2001). En Córdoba, el análisis de los genotipos P también reveló la circulación de estos dos P tipos como dominantes, con una marcada frecuencia de circulación de P[8] (73.2%) a lo largo del tiempo y la circulación fluctuante del tipo P[4] (22.1%).

El genotipo P[6] es inusualmente detectado a nivel mundial en humanos pero su detección es frecuente en porcinos (Desselberger y colab., 2001). Muy esporádicamente, este genotipo fue recuperado a partir de neonatos asintomáticamente infectados en guarderías de hospitales en Australia, Suecia, Venezuela e Inglaterra (Hoshino y colab., 1985; Flores y colab., 1986; Gorziglia y colab., 1986, 1988; Steele y colab., 1992). En Córdoba, se vio el mismo patrón que el observado a nivel mundial, ya que fue detectado esporádicamente y en baja frecuencia de circulación (3.2%). Otros dos genotipos de VP4 han sido raramente descriptos a nivel mundial en niños con gastroenteritis. Uno de ellos, P[9], identificado por primera vez en Japón en el año 1977 es frecuentemente detectado en felinos pero sólo inusualmente en niños (Desselberger y colab., 2001; Qian y Green, 1991). La circulación de este genotipo en Córdoba estuvo acotada a los años 1998, 2000 y 2001 en una tasa global de circulación de 1.5% a lo largo del período de 25 años. El otro genotipo inusual, P[10], fue recuperado a partir de muestras de niños con diarrea en Indonesia (Taniguchi y colab., 1989) y no se observó la circulación de este genotipo durante el estudio realizado en Córdoba. Por lo tanto, el patrón de circulación de P tipos en Córdoba es comparable al descripto a nivel mundial, detectando al P[8] como el dominante, seguido de P[4] y la circulación inusual de P[6] y P[9].

Por otra parte, el estudio de los G tipos mostró que G1 fue el más prevalente en la Ciudad de Córdoba durante el período analizado, con una frecuencia media de detección del 56.3%. En concordancia, numerosos estudios han demostrado que durante las últimas décadas este genotipo ha sido el de mayor distribución y dominancia en diversos países del mundo, cubriendo todos los continentes (Santos y Hoshino, 2005). El segundo G tipo más frecuentemente detectado en Córdoba durante el período de 25 años fue G4, con una frecuencia media de detección del 28.5%, el cual ha incrementodo su prevalencia a nivel mundial durante la década pasada, mostrando un patrón general de circulación frecuente

pero no continua (Gentsch y colab., 1996). La particularidad del perfil de circulación de G4 en Córdoba consiste en la detección continua de este genotipo durante todo el período estudiado, pero en frecuencias fluctuantes de detección que abarcan entre el 8.3% y 50%. Otro de los genotipos detectados en el estudio fue G2, con una frecuencia media de detección del 9.9%, el cual presentó fluctuaciones en su circulación, alternando ciclos de detección seguidos por períodos de no detección. Estudios llevados a cabo en Buenos Aires, Argentina, Sudáfrica, Ecuador e Inglaterra mostraron también el perfil cíclico de circulación del genotipo G2 (Esteban y colab., 2010; Page y Steele, 2004; Hasing y colab., 2009; Iturriza-Gomara y colab., 2000a). Es de destacar que el presente trabajo es el que abarca el mayor período de estudio, permitiendo así analizar con mayor detalle el perfil cíclico del genotipo G2 a lo largo del tiempo. En los períodos en los que circuló G2 fue identificado en frecuencias que variaron entre el 3 y 42%. Durante el estudio de 25 años realizado en Córdoba se observó también la circulación esporádica y en bajas frecuencia de detección del genotipo G3 (2.1%). Las cepas de RV-A de genotipo G3 representan el tipo para el cual ha sido descripto el mayor rango de hospedadores, siendo comúnmente detectado en humanos, como así también en diferentes especies animales, tales como gatos, perros, monos, conejos, ratones, caballos, aves, cerdos, vacas y corderos (Gentsch y colab., 1996, 2005; Khamrin y colab., 2006a; Lee y colab., 2003; Martella y colab., 2001, 2003; McNeal y colab., 2005). A nivel global durante los años 1990s la detección de este genotipo ha sido infrecuente, reportando su re-emergencia durante años recientes (Arista y colab., 1990, 1997, 2003; Caprioli y colab., 1996; De Grazia y colab., 2007; Kebaabetswe y colab., 2005; Lai y colab., 2005; Reidy y colab., 2005; Sanchez- Fauquier y colab., 2006). Sin embargo, durante la vigilancia de genotipos en Córdoba no fue posible detectar la emergencia o incremento en la circulación de este genotipo a lo largo del tiempo. Esto podría deberse a que el período estudiado incluyó hasta el año 2003, fecha previa a los reportes de emergencia de este G tipo. Otro genotipo detectado en Córdoba fue el tipo G9, en una frecuencia global del 2.6%. Este genotipo fue identificado por primera vez en el año 1983 en Estados Unidos y durante los años 1985 y 1986 en Japón, India, Yugoslavia y Tailandia (Clark y colab., 1987; Nakagomi y colab., 1988, 1990; Urasawa y colab., 1992; Zizdic y colab., 1992; Das y colab., 1993), pero desde entonces y hasta principios de los años 1990s su circulación a nivel global fue infrecuente. Recién a mediados de los años 1990s hubo un incremento notable en la detección de cepas G9 causantes de gastroenteritis y este genotipo ha emergido desde entonces como uno de los más prevalentes a nivel mundial (Ramachandran y colab., 1996; Unicomb y colab., 1999; Griffin y colab., 2000; Widdowson y colab., 2000; Cunliffe y colab., 2001). En la ciudad de Córdoba la circulación del genotipo G9 fue detectada desde el año 1980, pero sin lograr establecer durante los 25 años de estudio una tasa de circulación significativa respecto a los otros genotipos. Esto sugiere que en un escenario epidemiológico en el que predomina la circulación de G1 y G4, el genotipo G9 no encuentra las condiciones

apropiadas para aumentar su frecuencia de circulación.

Durante la última década se ha observado un incremento en la variedad de genotipos circulantes en el mundo, esto se debe en gran medida a la introducción y amplia utilización de métodos de tipificación de cepas basados en la biología molecular en reemplazo de la tipificación serológica. Como resultado de esto, han emergido como patógenos de importancia regional cepas porcinas tipo G5 y bovinas tipo G8 en Brasil y África, respecticametne (Macedo y colab., 2005; Leite y colab., 2008; Mast y colab., 2010; Bányai y colab., 2009a; Matthijnssens y colab., 2006). En la Ciudad de Córdoba estos genotipos fueron detectados en muy bajos niveles de circulación, G5 sólo en una muestra obtenida en el año 1988 y el tipo G8 en dos muestras, colectadas en los años 1997 y 1998, respectivamente. Se desconocen los motivos que circunscriben la circulación de los genotipos G5 y G8 a determinadas áreas geográficas. El genotipo G11 fue aislado por primera vez en cerdos en varias regiones de México en el año 1983 (Ruiz y colab., 1988) y fue identificado subsecuentemente en Venezuela y Estados Unidos en frecuencias variables de detección (Ciarlet y colab., 1994; Rosen y colab., 1994). Sin embargo, este genotipo no fue identificado en humanos hasta el año 2005 en Bangladesh y desde entonces es detectado esporádicamente en diferentes partes del mundo (Rahman y colab., 2005a; Hong y colab., 2007; Bányai y colab., 2009b). Tanto es así, que su ausencia de circulación en Córdoba fue un evento esperado. Por otra parte, el genotipo G12 fue descripto por primera vez en 1990 a partir de muestras de niños con gastroenteritis en Filipinas (Taniguchi y colab., 1990). Desde entonces no fue nuevamente detectado hasta el año 2002, cuando emergió en Estados Unidos y Tailandia, y poco tiempo después en India, Japón y Argentina (Griffin y colab., 2002; Pongsuwanna y colab., 2002; Das y colab., 2003; Shinozaki y colab., 2004; Castello y colab., 2006). Debido a su emergencia en la ciudad de Buenos Aires, Argentina, era de interés detectar la circulación de este genotipo también en Córdoba y así poder realizar análisis filogenéticos entre las cepas circulantes; sin embargo, no fue posible identificar la presencia de G12 en nuestra ciudad.

A pesar de que los genes codificantes para las proteínas VP7 y VP4 segregan independientemente (Hoshino y colab., 1985), y que en el curso de infecciones mixtas son teóricamente posibles numerosas combinaciones de G y P tipos, comúnmente son identificadas las combinaciones G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8] en todo el mundo (Gentsch y colab., 2005; Santos y Hoshino, 2005; Gurgel y colab., 2008). Si bien la vigilancia de genotipos de RV-A en Córdoba no permitió la asociación directa de G y P tipos debido al elevado número de infecciones mixtas, la circulación dominante del genotipo P[8] (73.2%) a lo largo del tiempo se correlaciona con la alta frecuencia de detección de los genotipos G1, G3 y G4, cuya incidencia global fue del 86.9%, generando al igual que lo descripto a nivel mundial las combinaciones G1P[8], G3P[8] y G4P[8].

La distribución de genotipos G de RV-A mostró variaciones temporales, descriptas también en otras partes del mundo (Koshimura y colab., 2000; Iturriza-Gomara y colab., 2000a; Santos y Hoshino, 2005). Esto sugeriría que las variaciones de dominancia de ciertos genotipos, así como las fluctuaciones en la frecuencia de circulación de G tipos corresponderían al patrón natural de circulación de RV-A, instalado este patrón en comunidades donde todos los años se le ofrece al virus una cohorte susceptible que corresponde a los niños nacidos en ese año. Esta situación se vería alterada en poblaciones vacunadas en las que el virus ya no encuentra individuos susceptibles, y entonces potencialmente podrían emerger en frecuencia de circulación G tipos que encuentren menores barreras inmunológicas en la población. Este hecho estaría documentado en trabajos recientemente publicados en los que la vacunación en Brasil y Australia con la cepa vacunal G1P[8] generó la emergencia del genotipo G2P[4] (Gurgel y colab., 2007; Carvalho-Costa y colab., 2009; Kirkwood y colab., 2009). Por otra parte, a diferencia de los G tipos, para los P tipos no se observó una vaciación temporal. Esto se explica por la asociación natural de los G y P tipos. Dado que los G- tipos G1 y G4 fueron los dominantes durante el período estudiado, era de esperar, tal como fue identificado, que el P[8] fuera el prevalente durante los 25 años estudiados en Córdoba.

El análisis de la distribución de genotipos P y G de rotavirus no mostró diferencias significativas según grupo etáreo analizado y género. Este resultado difiere de lo reportado por Bok y colab. (2001) en Argentina durante el período 1996-1998, quienes encontraron una diferencia significativa en la distribución etarea de los genotipos G2 y G4. El estudio reveló que las cepas G2 (70.5%) afectan a niños menores de un año de edad en mayor proporción que las cepas G4 (57.0%; *P*=0.03). Estos resultados contrastan con los reportados en Japón por Kitahorio y colab. (2003) e Inoue y colab. (2003), quienes encuentran una mayor incidencia del genotipo G2P[4] en niños en edad escolar respecto a niños en edad preescolar. Resultados similares fueron publicados por Lo y colab. (2005), quienes observan una prevalencia mayor del genotipo G2 en niños mayores de 5 años de edad, mientras que el genotipo G1 muestra una mayor incidencia en menores de 5 años. Una distribución disímil de G tipos según grupo etáreo también fue reportado para la emergencia de cepas G9P[6] y G3P[6] en un hospital de Londres durante el año 1996, donde estos genotipos estuvieron principalmente asociados a infecciones en niños mayores a 3 años de edad (Cubitt y colab., 2000).

Otra característica del patrón de circulación de rotavirus en Córdoba fue la alta tasa de infecciones G tipo mixtas detectada durante el período de 25 años estudiado (41.5%), la cual contrasta con los porcentajes usualmente encontrados en poblaciones latinoamericanas y de otros países (Coluchi y colab., 2002; Gault y colab., 1999; Timenetsky y colab., 1994; Jain y colab., 2001; Abdel-Haq y colab., 2003). Debe señalarse que en el presente trabajo las infecciones G tipo mixtas fueron detectadas durante diferentes años y en muestreos

realizados en distintos centros de atención médica. En este sentido, la alta frecuencia de infecciones por RV-A G tipo mixtas sería parte del patrón epidemiológico de RV-A en Córdoba. En este escenario epidemiológico, G1 y G4 fueron los genotipos detectados en mayor frecuencia en las co-infecciones. Esto se ve reflejado en el patrón general de circulación local de RV-A, el cual involucra casi la mitad de las infecciones como G tipo mixtas, siendo el 64.6% de éstas coinfecciones G1+G4.

En cuanto a la distribución de los genotipos en infecciones simples o mixtas, se observó que los tipos G2, G3, G4 y G9 se encontraron más frecuentemente asociados a infecciones mixtas que a infecciones simples (P<0.05), mientras que el genotipo G1 fue detectado en frecuencias similares en ambos tipos de infecciones (P>0.05). La asociación indistinta de G1 en infecciones simples y mixtas podría deberse a su alta frecuencia de circulación, mientras que los genotipos G2, G3, G4 y G9 coinfectarían en alta proporción con el tipo G1.

La alta tasa de detección de infecciones mixtas podría deberse a modificaciones metodológicas realizadas durante el desarrollo del presente proyecto. En nuestra experiencia, el uso de la mezcla estándar de primers y el revelado de productos de PCR por AGE/EB genera resultados confusos y difíciles de interpretar cuando las bandas obtenidas son demasiado tenues (lo que dificulta visualizar amplicones) o muy fuertes (lo que genera superposición de bandas). Por lo tanto, se decidió utilizar PAGE/SS para analizar los productos de PCR con el fin de obtener una mayor sensibilidad y resultados más claros. Además, se separó la mezcla del pool de primers en dos reacciones independientes de PCR (G1, G2, G3 por un lado, y G4, G9 por otro). Esto permitió evitar la interpretación confusa de los resultados correspondientes a amplicones de pesos moleculares relativamente similares: G2 y G4 (652 pb y 583 pb, respectivamente) y G3 y G9 (374 pb y 306 pb, respectivamente). En la comparación de metodologías se observó que la utilización del método de revelado PAGE/SS permite detectar un mayor número de genotipos que el método AGE/EB. Más aún, productos de PCR (confirmados como específicos por secuenciamiento) fueron visualizados como bandas tenues por PAGE/SS y perdidos en la detección por AGE/EB. En base a estas observaciones, podría sugerirse que la alta tasa de detección de infecciones mixtas en este estudio sería atribuible a la atención especial dedicada al análisis de las bandas tenues detectadas por PAGE/SS, a las modificaciones aplicadas al método estándar de tipificación por múltiplex-PCR (separación de pool de primers), y al sistema de revelado utilizado. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugerirían que los genotipos de rotavirus involucrados en las infecciones mixtas podrían estar presentes en distintas proporciones. Esto generaría una competencia, resultando en menor cantidad de amplicones del genotipo en menor concentración, y por lo tanto su detección como una banda tenue cuando es revelado por PAGE/SS. Respecto al aumento de eficiencia de detección de infecciones mixtas a través de la utilización de reacciones de PCR con separación de primers, los resultados obtenidos concuerdan con estudios realizados en Guinea-Bissau (Fischer y colab.,

2003; Nielsen y colab., 2005) donde se reportó un aumento en la detección de infecciones mixtas cuando el método estándar de tipificación fue reemplazado por reacciones de PCR con primers individuales. Esto indicaría que la dimerización de primers y/o la competencia de éstos durante la multiplex-PCR podría ser otro factor relacionado a la disminución en la detección de infecciones mixtas. De lo expuesto surge la necesidad de sensibilizar la metodología de detección de G tipos, a los fines de evitar la subestimación de los genotipos presentes en menor abundancia.

Múltiples grupos de trabajo en distintos lugares del mundo se han abocado al estudio del perfil de circulación de RV-A en la población. Sin embargo, no hay estudios realizados que expliquen los factores que determinan la frecuencia relativa de los genotipos G y su reemplazo a lo largo del tiempo. El estudio in vitro de co- amplificación de genotipos G de RV-A permitió analizar el comportamiento de las variantes de VP7 en la naturaleza. La coamplificación eficiente de G1 y G4 podría explicar la circulación endémica de ambos genotipos y la alta frecuencia de coinfecciones G1+G4 observadas en Córdoba. La dominancia replicativa del genotipo G1 respecto a cepas de RV-A de especificidad diferente (G2 y G9) podría explicar, en parte, su alta frecuencia de detección local. Además, la mayor eficacia replicativa de G1 podría determinar las fluctuaciones en las tasas de detección de G2 y las bajas y esporádicas tasas de detección del genotipo G9. Las diferencias replicativas podrían ser también parte de la explicación del largo tiempo que transcurre entre la detección de cepas G9 aisladas esporádicamente y su conversión en un genotipo dominante en algunas áreas del mundo (Santos y colab., 2005; Serravalle y colab., 2007; Sánchez-Fauquier y colab., 2006; Khamrin y colab., 2006b). Es posible que la disminución en la circulación del genotipo G1 le otorgara un espacio replicativo al genotipo G9 y por lo tanto se produjera la emergencia de éste (Sánchez-Fauquier y colab., 2004; Parra y colab., 2005; Santos y colab., 2005).

Luego de las coinfecciones con RV-A de los cultivos celulares se observó una selección no aleatoria del segmento VP7 en la progenie viral. Las posibles causas de la selección del segmento luego de la coinfección podrían ser: (A) los segmentos de ARN de diferentes G tipos son producidos en cantidades diferentes; (B) los segmentos génicos G tipo específicos son ensamblados en las partículas con cinéticas diferentes; (C) partículas con ciertos segmentos se replican más eficientemente; y/o (D) partículas con ciertos segmentos son más estables (Ni y Kemp, 1992; Ward y colab., 1988; Ward y Knowlton, 1989; Kobayachi y colab., 1994, 1995, 1996a, 1996b; Okada y colab., 1998; Xu y Woode, 1994). Estudios reportados por Xu y Woode (1994) demuestran que cepas de RV-A con distinta especificidad de G tipos podría tener diferencias replicativas, posiblemente mediante la modificación en la eficiencia de la función de adhesión celular de la proteína VP4. La influencia de VP7 sobre las propiedades de VP4 podría ser el resultado de cambios conformacionales en un dominio específico de la proteína. Las combinaciones menos adecuadas de las proteínas VP7 y VP4

(o las interacciones no covalentes de las proteínas derivadas de virus progenitores divergentes) podrían ser inestables y dar como resultado que la circulación del virus en la naturaleza sea en las combinaciones más eficientes, como parecieran ser G1P[8] por la abundacia de su circulación. En el presente estudio no se analizó la proteína VP4 debido a la imposibilidad de asociar un genotipo P a un genotipo G en particular, como consecuencia de la naturaleza mixta de G tipos de las muestras ensayadas. Cabe resaltar las limitaciones del estudio in vitro para representar la situación real de la selección del gen de VP7 in vivo. Algunas de estas limitaciones son: (A) las células blanco y las condiciones de infección natural son diferentes a las ensayadas in vitro; (B) la estabilidad ambiental de las partículas de diferentes genotipos podría variar; (C) la respuesta inmune innata o celular intrínseca del hospedador podría ser distinta para diferentes cepas; y (D) la presión selectiva del sistema inmune adaptativo podría limitar la circulación de ciertos genotipos G en individuos previamente expuestos. Respecto a este último punto, cabe resaltar que la mayoría de los niños mayores de tres años de edad han sido naturalmente infectados por cepas de RV-A circulantes en la comunidad. De este modo, ante la re-exposición al virus el sistema inmune sería capaz de controlar la infección, resultando en infecciones asintomáticas o cuadros clínicos leves. Sin embargo, cada año los recién nacidos constituyen una nueva cohorte de individuos susceptibles a la enfermedad por RV-A. En este sentido, los sistemas in vitro de cultivo celular se asemejarían a la cohorte de recién nacidos, quienes cumplirían un papel importante en el mantenimiento de la circulación de RV-A en la naturaleza. Otro factor, como la multiplicidad relativa de infección de las cepas co-infectantes podría alterar las ventajas selectivas de ciertos segmentos in vitro y podría tener un efecto dramático en la selección in vivo de virus (Ward y colab., 1988).

Otraa limitación del estudio realizado fue la imposibilidad de cuantificar los inóculos iniciales. Esto se debió a que las muestras G tipo mixtas se obtuvieron directamente de individuos infectados. A pesar de esto, las 4 muestras de cada tipo de coinfección fueron analizadas en paralelo por sextuplicado, mostrando reproducibilidad de resultados. El método utilizado por lo tanto, podría ser un primer acercamiento para entender el perfil de circulación de los rotavirus en el ambiente.

El presente estudio permitió caracterizar el perfil genotípico y la dinámica natural de circulación de RV-A en Córdoba, Argentina, durante los años 1979-2003. El patrón de circulación de genotipos mostró a G1 y P[8] como dominantes a lo largo del tiempo, seguidos por los genotipos G4 y P[4]. La detección del tipo G2 presentó fluctuaciones en su frecuencia de circulación. El genotipo G3 circuló en Córdoba en forma esporádica y en frecuencias comparables al genotipo G9, el cual fue detectado en Córdoba desde el año 1980. Se detectó también la presencia de los genotipos inusuales G5, G8, P[6] y P[9] pero en niveles de circulación no significativos. El perfil de circulación de genotipos estuvo también conformado por una elevada proporción de infecciones G tipo mixtas. La continuidad de

circulación y dominancia del genotipo G1 respecto a los demás genotipos a lo largo de un período de 25 años se podría explicar al menos en parte, por la capacidad replicativa significativamente mayor de este genotipo respecto a los otros. Esto generaría una abundancia de G1 en la naturaleza que le permitiría ser el principal responsable tanto de infecciones simples como de infecciones G tipo mixtas. Este resultado es importante para evaluar las consecuencias que pudiera tener la introducción masiva de la vacuna monovalente G1P[8], la cual generaría una presión inmunológica sobre los G y P tipos dominantes y así, modificar la dinámica natural de circulación de RV-A.

Análisis comparativo entre vigilancia clínica y ambiental para la detección de G tipos de rotavirus que circulan en Córdoba

Identificación de G tipos mediante vigilancia clínica. Año 2006

Durante el año 2006 un total de 70 muestras de materia fecal fueron colectadas de niños menores de 3 años de edad que requirieron de atención médica en un único centro asistencial de la Ciudad de Córdoba por un cuadro de gastroenteritis aguda. Del total de muestras, 50 (71.4%) resultaron positivas para la infección por RV-A por ELISA y/o PAGE/SS, y fueron posteriormente ensayadas por RT-PCR para el análisis de los genotipos G. El 32% (n=16) de las muestras correspondieron a coinfecciones, totalizando 70 G tipos detectados. Se observó una frecuencia significativamente mayor de infecciones causadas por los genotipos G1 (27.1%), G4 (22.9%) y G3 (25.7%), respecto a los tipos G2 (10.0%) y G9 (14.3%). No se detectó circulación de los genotipos inusuales G5, G8, G11 y G12 durante el año 2006 (*Figura 26A*).

Identificación de G tipos mediante vigilancia ambiental. Año 2006

La totalidad de las muestras de aguas cloacales colectadas durante el año 2006 (n=52) resultaron positivas para RV-A mediante RT-PCR seguida de heminested PCR para genotipos G. Más de un tipo G fue detectado en el 67.3% (n=35) de las muestras, contabilizando un total de 115 G tipos. El genotipo G1 fue revelado como el más prevalente (28.7%), seguido por el genotipo G3 (20.9%). Los genotipos G2, G4 y G9 fueron detectados en frecuencias similares de circulación (G2 15.7%, G4 18.3% y G9 15.7%). El genotipo G8 sólo fue hallado en una muestra cloacal (0.9%) y no se observó circulación de los genotipos G5, G11 y G12 (*Figura 26B*).



Figura 26. Distribución proporcional comparativa de genotipos G de rotavirus detectados en muestras (A) clínicas y (B) cloacales, obtenidas durante el año 2006.

Perfil estacional de G tipos de RV-A identificados por vigilancia clínica y ambiental

De las 50 muestras clínicas RV-A positivas colectadas en el año 2006, 3 fueron obtenidas durante las estaciones cálidas del año (verano y primavera) y 47 durante las estaciones frías (otoño e invierno). Por otra parte, de las 52 muestras de aguas cloacales colectadas durante el mismo período, 26 fueron obtenidas durante las estaciones cálidas y 26 durante las estaciones frías. Debido al bajo número de muestras clínicas RV-A positivas obtenidas durante los meses cálidos, se realizó la comparación de genotipos detectados por ambos sistemas de vigilancia sólo en muestras obtenidas durante el período frío. Durante este período, ambos sistemas de vigilancia detectaron a los genotipos G1 y G3 como los más prevalentes, seguidos por el genotipo G4. Los genotipos G2 y G9 también fueron revelados en tasas de circulación comparables por ambos sistemas de monitoreo. El genotipo inusual G8 sólo fue detectado mediante el monitoreo de cloacas, sin observarse su presencia mediante el muestreo clínico (*Figura 27*). Los resultados obtenidos indican que no hay diferencia estadísticamente significativa (*P*>0.05) entre el análisis de distribución de genotipos G de RV-A a partir de muestras clínicas y cloacales. Debido al bajo número de muestras G8 positivas, no fue posible incluir a este genotipo en el análisis estadístico.



Figura 27. Distribución proporcional de genotipos G de rotavirus detectados en muestras clínicas (n=66) y cloacales (n=64) durante las estaciones frías del año 2006.

La detección de RV-A en muestras ambientales durante todo el período estudiado (meses fríos y meses cálidos) permitió el análisis comparativo de los genotipos de acuerdo al período estacional en el que las muestras fueron colectadas (*Figura 28*). Los resultados muestran que no hay diferencia estadísticamente significativa (*P*>0.05) entre la distribución proporcional de genotipos G1-G4 y G9 de RV-A identificados en muestras cloacales colectadas durante los meses fríos y cálidos del año. El genotipo inusual G8 sólo fue detectado en una muestra correspondiente al período frío, mientras que no se observó detección del mismo durante el período cálido.



Figura 28. Distribución proporcional de genotipos G de rotavirus detectados en muestras cloacales durante los períodos frío (n=64) y cálido (n=55) del año 2006.
Discusión

Numerosos estudios han reportado el perfil de circulación de genotipos de RV-A en diferentes regiones del mundo, basándose en el análisis de materia fecal de pacientes sintomáticos (Matthijnssens y col., 2008; Annarita y col., 2010; Mukherjee y col., 2010). Este tipo de muestreo requiere la intervención médico-hospitalaria e incluye sólo pacientes con sintomatología lo suficientemente severa como para demandar atención médica. En este sentido, los sistemas de vigilancia ambiental, en particular el monitoreo de aguas cloacales, podría resolver las limitaciones de la vigilancia basada en individuos enfermos, permitiendo acceder a una muestra poblacional de excreción de virus en la que están incluidos individuos sintomáticos de distintas categorías clínicas y asintomáticos. Cabe señalar que la planta de tratamiento de efluentes cloacales de la ciudad de Córdoba sirve a aproximadamente el 61% de la población local. Por lo tanto, es razonable asumir que el análisis de genotipos en las cloacas reflejaría la diversidad local de RV-A. De este modo, la vigilancia ambiental resulta ideal para la caracterización de cepas de RV-A que circulan en una región en un período determinado.

Lo original del trabajo realizado respecto a otros estudios que analizan la presencia de RV-A en aguas cloacales (Villena y col., 2003a; Ferreira y col., 2009; Kamel y col., 2010) consiste en que éste se centra en la evaluación comparativa de los sistemas de vigilancia de rotavirus clínica y ambiental, observando una correlación entre los resultados obtenidos por los mismos. Ambos sistemas revelaron en la ciudad de Córdoba a los genotipos G1 y G3 como los dominantes, seguidos por los tipos G4 y G9. Cabe destacar que si bien G1 fue identificado con una frecuencia significativa, ésta fue menor a la identificada durante los 25 años de estudio previamente detallados (período 1979-2003: media de frecuencia 56.2%, rango 33.3-66.7%; año 2006: vigilancia clínica 28.8%, vigilancia ambiental 26.6%). Los genotipos G3 y G9 fueron detectados en altas tasas de circulación por ambos sistemas de monitoreo, observándose un incremento significativo de estos genotipos respecto al período de 25 años antes estudiado (período 1979-2003: G3 media de frecuencia 2.1%, rango 0-6.3%; G9 media de frecuencia 0.6%, rango 0-40%; año 2006: G3 media de frecuencia 23.8%, G9 15.4%). El incremento significativo en la detección del tipo G9 no es sorprendente si se considera la emergencia global durante la última década de este genotipo (Santos y Hoshino, 2005; van Zyl y col., 2006; Parez, 2008). Resultados similares en la modificación del patrón de prevalencia de genotipos de RV-A fueron reportados en otros países limítrofes de la Argentina, observándose una disminución en la circulación del genotipo G1 y el concomitante incremento en la frecuencia de los genotipos G3 y/o G9 (Martini y col., 2008; Martínez y col; 2010). Por otra parte, ambos sistemas de vigilancia detectaron la presencia del tipo G2 en tasas de circulación similares a las obtenidas durante los 25 años de estudio (período 19792003: media de frecuencia 9.9%, rango 0-41.7%; año 2006: media de frecuencia 10.0%). El genotipo inusual G8 fue sólo detectado en una muestra cloacal pero no en muestras clínicas. La ausencia de detección de este genotipo mediante la vigilancia clínica podría deberse a que el muestreo clínico abarcó un número significativamente menor de individuos excretores del virus respecto al muestreo ambiental. Es de destacar que el sistema de monitoreo ambiental de rotavirus no detectó circulación de los genotipos inusuales G5, G11 y G12 durante el año estudiado. Esto sugeriría que los G tipos inusuales no tendrían una participación etiológica importante en la diarrea por RV-A en Córdoba. Los resultados obtenidos indican que el análisis del agua residual urbana (representando un muestreo poblacional) y una vigilancia clínica acotada (que sólo representa una pequeña parte de la punta visible del iceberg de infección por rotavirus) son fuentes alternativas y comparables para el estudio de la distribución de G tipos que circulan en una comunidad. La pequeña punta visible del iceberg en el muestreo clínico hace referencia a que las muestras fecales fueron colectadas de un único centro asistencial y de pacientes en el rango clínico de sintomatología severa. Sin embargo, el muestreo clínico acotado refleja la circulación de G tipos poblacional, sugiriendo que la circulación de genotipos de rotavirus en la población sintomática y asintomática sería comparable.

Es también importante puntualizar las limitaciones del muestreo ambiental. Por un lado, pueden existir fluctuaciones diarias en la diversidad de G tipos en las aguas cloacales (Hejkal y col., 1984), por lo que sería posible que la detección de G tipos de RV-A varíe si las muestras fueran obtenidas en diferentes momentos del día. Para minimizar estas fluctuaciones, en el presente estudio las muestras cloacales fueron siempre colectadas en el mismo horario, entre las 9 y 11 am, lo cual correspondería a la máxima tasa de excreción fecal de la población (basado en comunicación personal con el responsable de la planta de tratamiento de efluentes cloacales de la ciudad de Córdoba, en base a resultados del análisis de coliformes fecales y totales). Otra limitación del muestreo ambiental reside en las variaciones temporales del volumen de líquido residual que recibe el sistema de cloacas, especialmente durante las estaciones secas y húmedas. Estas fluctuaciones en el caudal del afluente cloacal se deben principalmente al agua de lluvia que escurre por las alcantarillas y desemboca finalmente en la planta de depuración. Esta variable podría influir en los resultados del análisis de virus, sin embargo se detectó RV-A en todas las muestras colectadas a lo largo del período estudiado.

Estudios clínico-epidemiológicos de RV-A indican la presencia de un patrón estacional característico, con un incremento significativo en la incidencia de diarreas por RV-A durante los meses fríos (Ansari y col., 1991; Koopmans y Brown, 1999). Esto se vio reflejado en el presente estudio por la demanda significativamente mayor de atención médica por diarrea por RV-A durante el período frío del año. Este patrón no fue observado mediante la vigilancia

ambiental, donde RV-A fue detectado en todas las muestras analizadas a lo largo del año, mostrando una distribución de genotipos G similar durante los dos períodos estacionales. Por lo tanto, la vigilancia ambiental destaca la circulación continua de RV-A durante todo el año. Estos resultados contrastan con la información reportada por Mehnert y Stewien (1993) y Hejkal y col. (1984), quienes detectaron variaciones estacionales cualitativas en la circulación de RV- A en Brasil y EEUU, respectivamente. Por el contrario, los resultados obtenidos en Córdoba concuerdan con estudios realizados en Barcelona y El Cairo (Bosch y col., 1988; Villena y col., 2003a) en los que se detectó la circulación continua de RV-A a lo largo del año. A su vez, un trabajo realizado también en Barcelona reveló la ausencia de un patrón estacional cualitativo de RV-A en el agua residual de dicha ciudad, pero una marcada variación restacional en la concentración viral (Villena y col., 2003b). Cabe resaltar, que el estudio realizado en Córdoba es cualitativo, por lo que un análisis cuantitativo sería útil para interpretar la discrepancia entre la ausencia de variación estacional en el ambiente y el pico de incidencia de diarreas por RV-A durante los meses fríos.

Es de destacar que unos pocos estudios han comparado la detección de genotipos de RV-A mediante los sistemas de vigilancia clínica y ambiental. Un trabajo reciente realizado en El Cairo estableció una correlación entre los genotipos de RV-A y la presencia concomitante del virus en el ambiente (Kamel y col., 2009). Del mismo modo, un estudio epidemiológico de virus entéricos en Francia mostró alta homología nucleotídica entre los genotipos de RV-A detectados en muestras ambientales y los identificados en muestras clínicas (Arraj y col., 2008). Otros estudios comparativos de monitoreos clínicos y ambientales basados en la vigilancia de enterovirus han demostrados también tasas similares en la detección viral (Sellwood y col., 1981; Payment y col., 1993; Sedmak y col., 2003). El presente trabajo es el primero en las Américas que analiza la epidemiología ambiental de RV-A y su correlación genotípica con las cepas virales aisladas de pacientes con diarrea.

La vigilancia ambiental a partir de aguas cloacales mostró ser satisfactoria para el monitoreo de circulación de RV-A. Es así que la detección de virus por técnicas de biología molecular en aguas residuales sería una fuente alternativa al muestreo clínico para describir y caracterizar las variantes genotípicas de RV-A en la naturaleza, como así también para detectar la emergencia de nuevas cepas.

Análisis filogenético de genotipos: inferencias evolutivas de rotavirus grupo A

Filogenia del genotipo G1

Dado que el genotipo G1 fue el más prevalente en la ciudad de Córdoba a lo largo de los 28 años de estudio (1979-2006), resulta de interés investigar el patrón de evolución genética y antigénica de este genotipo. La información obtenida permitirá profundizar los conocimientos respecto a los mecanismos naturales de distribución y selección de cepas de RV-A en la naturaleza.

Con este objeto, se secuenció la región codificante del gen VP7 de 16 cepas de genotipo G1, colectadas durante el período 1980-2006. Las muestras G1 seleccionadas correspondieron a infecciones simples, de manera de poder analizar el gen completo de la VP7.

Las cepas G1 aisladas en Córdoba mostraron una alta identidad en sus secuencias nucleotídica (rango: 93.4% - 100%) (*Tabla 12*). Esta identidad fue más acentuada entre cepas aisladas en una misma década. Así, la identidad nucleotídica entre cepas aisladas en la década del '80 fue >97.0%, en la década del '90, >95.8%, y en la década del '00,>98.3%. El porcentaje de identidad nucleotídica entre las cepas aisladas en Córdoba y las cepas vacunales (RIX4414 y WI79-9), estuvo en un rango entre el 92.2% y el 94.9%. La similitud nucleotídica entre las cepas aisladas en Córdoba por décadas respecto a las cepas vacunales fue >93.0% en la década 1980, >92.5% en la década 1990, y >92.2% en la década 2000.

El análisis filogenético reveló que todas las cepas G1 de los años 1980s agruparon dentro del linaje IV, las aisladas en los años 1990s agruparon en los linajes I y II, y entre los años 2000 y 2006 las cepas agruparon sólo en el linaje I. Ninguna de las cepas aisladas en Córdoba correspondió al linaje III, el cual reúne las cepas vacunales (*Figura 29*).

| | | | Años 19 | 80s | | | Ai | ños 1990 |)s | | | Aŕ | ios 2000 | S | | | Vacu | nales |
|-----------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Secuencia | ARGA11 | ARGA20 | ARG171 | ARG185 | ARG747 | ARG748 | ARG1293 | ARG1345 | ARG1347 | ARG1349 | ARG1368 | ARG1427 | ARG1432 | ARG1433 | ARG1437 | ARG1442 | RIX4144 | WI79-9 |
| ARGA11 | ID | 0,996 | 0,992 | 0,994 | 0,977 | 0,976 | 0,941 | 0,954 | 0,94 | 0,94 | 0,937 | 0,942 | 0,943 | 0,939 | 0,94 | 0,94 | 0,94 | 0,937 |
| ARGA20 | 0,996 | ID | 0,988 | 0,992 | 0,975 | 0,974 | 0,943 | 0,954 | 0,942 | 0,942 | 0,939 | 0,944 | 0,945 | 0,941 | 0,942 | 0,942 | 0,938 | 0,935 |
| ARG171 | 0,992 | 0,988 | ID | 0,989 | 0,971 | 0,97 | 0,935 | 0,949 | 0,935 | 0,935 | 0,934 | 0,936 | 0,937 | 0,934 | 0,935 | 0,935 | 0,933 | 0,93 |
| ARG185 | 0,994 | 0,992 | 0,989 | ID | 0,975 | 0,976 | 0,937 | 0,952 | 0,936 | 0,936 | 0,935 | 0,938 | 0,939 | 0,935 | 0,936 | 0,936 | 0,936 | 0,934 |
| ARG747 | 0,977 | 0,975 | 0,971 | 0,975 | ID | 0,999 | 0,95 | 0,966 | 0,949 | 0,951 | 0,946 | 0,951 | 0,951 | 0,948 | 0,949 | 0,949 | 0,949 | 0,946 |
| ARG748 | 0,976 | 0,974 | 0,97 | 0,976 | 0,999 | ID | 0,949 | 0,965 | 0,948 | 0,95 | 0,946 | 0,95 | 0,951 | 0,947 | 0,948 | 0,948 | 0,948 | 0,945 |
| ARG1293 | 0,941 | 0,943 | 0,935 | 0,937 | 0,95 | 0,949 | ID | 0,959 | 0,999 | 0,999 | 0,986 | 0,997 | 0,998 | 0,994 | 0,995 | 0,995 | 0,931 | 0,926 |
| ARG1345 | 0,954 | 0,954 | 0,949 | 0,952 | 0,966 | 0,965 | 0,959 | ID | 0,958 | 0,96 | 0,955 | 0,958 | 0,959 | 0,955 | 0,956 | 0,956 | 0,938 | 0,935 |
| ARG1347 | 0,94 | 0,942 | 0,935 | 0,936 | 0,949 | 0,948 | 0,999 | 0,958 | ID | 0,998 | 0,985 | 0,996 | 0,997 | 0,993 | 0,994 | 0,994 | 0,93 | 0,925 |
| ARG1349 | 0,94 | 0,942 | 0,935 | 0,936 | 0,951 | 0,95 | 0,999 | 0,96 | 0,998 | ID | 0,985 | 0,996 | 0,997 | 0,993 | 0,994 | 0,994 | 0,932 | 0,927 |
| ARG1368 | 0,937 | 0,939 | 0,934 | 0,935 | 0,946 | 0,946 | 0,986 | 0,955 | 0,985 | 0,985 | ID | 0,985 | 0,986 | 0,983 | 0,983 | 0,983 | 0,927 | 0,922 |
| ARG1427 | 0,942 | 0,944 | 0,936 | 0,938 | 0,951 | 0,95 | 0,997 | 0,958 | 0,996 | 0,996 | 0,985 | ID | 0,999 | 0,995 | 0,996 | 0,996 | 0,932 | 0,927 |
| ARG1432 | 0,943 | 0,945 | 0,937 | 0,939 | 0,951 | 0,951 | 0,998 | 0,959 | 0,997 | 0,997 | 0,986 | 0,999 | ID | 0,996 | 0,997 | 0,997 | 0,933 | 0,928 |
| ARG1433 | 0,939 | 0,941 | 0,934 | 0,935 | 0,948 | 0,947 | 0,994 | 0,955 | 0,993 | 0,993 | 0,983 | 0,995 | 0,996 | ID | 0,993 | 0,993 | 0,929 | 0,924 |
| ARG1437 | 0,94 | 0,942 | 0,935 | 0,936 | 0,949 | 0,948 | 0,995 | 0,956 | 0,994 | 0,994 | 0,983 | 0,996 | 0,997 | 0,993 | ID | 1 | 0,93 | 0,925 |
| ARG1442 | 0,94 | 0,942 | 0,935 | 0,936 | 0,949 | 0,948 | 0,995 | 0,956 | 0,994 | 0,994 | 0,983 | 0,996 | 0,997 | 0,993 | 1 | ID | 0,93 | 0,925 |
| RIX4144 | 0,94 | 0,938 | 0,933 | 0,936 | 0,949 | 0,948 | 0,931 | 0,938 | 0,93 | 0,932 | 0,927 | 0,932 | 0,933 | 0,929 | 0,93 | 0,93 | ID | 0,991 |
| WI79-9 | 0,937 | 0,935 | 0,93 | 0,934 | 0,946 | 0,945 | 0,926 | 0,935 | 0,925 | 0,927 | 0,922 | 0,927 | 0,928 | 0,924 | 0,925 | 0,925 | 0,991 | ID |

 Tabla 12. Porcentajes de similitud nucleotídica entre cepas G1 de RV-A detectadas en Córdoba, Argentina, durante el período 1980-2006

 (designadas ARG + número) y cepas G1 vacunales. La cepa RIX4414 corresponde a la vacuna monovalente Rotarix[®] (van Doorn y colab.,

2009) y la cepa WI79-9 a la vacuna pentavalente Rotateq $^{\mathbb{R}}$ (Clark y colab., 2004a).



Figura 29. Árbol filogenético mostrando los cuatro linajes descriptos en el mundo para el genotipo G1 de RV-A. El árbol fue construido por el método de Neighbor-Joining usando Kimura 2-parámetros como modelo de sustitución, los valores de boostrap inferiores a 75% no se muestran. Las cepas detectadas en Córdoba se indican con círculos en verde (años 1980s), rojo (años 1990s) y azul (años 2000). La cepa RIX4414 corresponde a la vacuna Rotarix[®] y la cepa WI79-9 a la vacuna Rotateq[®]. La barra indica la distancia que representa 1% de divergencia.

Con el fin de evaluar si las diferencias nucleotídicas entre las cepas de Córdoba y entre éstas y las cepas G1 de las vacunas licenciadas corresponden a mutaciones no silentes, se realizó la comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas del gen codificante para la VP7.

El alineamiento de las cepas G1 circulantes en Córdoba entre los años 1980 y 2006 mostró una identidad aminoacídica entre ellas y con las cepas vacunales >93.2% (*Tabla 13*). En base a las secuencias aminoacídicas de VP7 se construyó un árbol filogenético que resultó en una distribución de linajes comparable a la obtenida mediante el análisis nucleotídico de las cepas (gráfico no presentado).

Se observó una alta conservación de secuencia aminoacídica entre cepas del mismo linaje y mutaciones puntuales respecto a cepas de otros linajes. Las sustituciones aminoacídicas entre cepas de distintos linajes fueron reveladas no sólo en regiones variables sino también en regiones conservadas de la VP7. Se observaron algunas mutaciones propias de un determinado linaje y otras mutaciones que no pudieron asociarse a linajes ni décadas de circulación de cepas. El análisis detallado de las sustituciones aminoacídicas indicó que todas las cepas de linaje I (cepas que circularon en los años '90s y '00s) presentaron cambios dentro de las regiones variables (VR) respecto a todas las cepas de linaje IV que circularon en Córdoba durante la década de los '80 en las siguientes posiciones aminoacídicas: VR3, 37 (Ser→Phe), 41 (Thr→Ser), 49 (Arg→Lys); VR4, 66 (Ile→Val), 75 (IIe→VaI); VR6, 123 (Ser→Asn); y VR8, 217 (Met→Thr). Además, todas las cepas de linaje I presentaron mutaciones puntuales respecto a algunas de las cepas de linaje IV en las siguientes posiciones aminoacídicas: VR1, 16 (Val o Asp \rightarrow IIe); VR4, 68 (Thr o Ala \rightarrow Ser); y VR5, 96 (Val→Gly). Asimismo, se observaron mutaciones que no fueron características de todas las cepas de linaje I: VR5, 94 (Ser→Asn); y VR8, 212 (Val→Ile), 219 (Ala→Thr). De todas las mutaciones detalladas, las correspondientes a los residuos aminoacídicos 94, 96, 212, 217 y 219 están ubicadas en regiones identificadas como altamente antigénicas en la proteína VP7. La cepa de linaje II (década del '90) en su secuencia aminoacídica se asemejó más a las cepas de linaje IV que a las de linaje I. Así, mostró 9 sustituciones en regiones variables respecto al linaje I y 7 respecto al linaje IV. Las sustituciones reveladas respecto a todas las cepas del linaje IV fueron en las siguientes posiciones aminoacídicas: VR3, 41 (Thr \rightarrow Ser); VR4, 66 (Ile \rightarrow Val); y VR8, 217 (Met \rightarrow Ile). Respecto a algunas cepas de linaje IV se observaron también las mutaciones puntuales: VR1, 16 (Val o Asp→lle); VR4, 68 (Thr o Ala \rightarrow Ser); VR5, 94 (Ser \rightarrow Asn), 96 (Val \rightarrow Gly); y 291 (Arg \rightarrow Lys). Las cepas vacunales (cepas de los años 1970s), revelaron las siguientes mutaciones respecto a todas las cepas de Córdoba en las siguientes regiones variables identificadas como importantes desde el punto de vista antigénico: VR5-región antigénica A, 97 (Glu→Asp), VR7-región antigénica B, 141 (Leu→Phe, sólo la cepa vacunal WI79-9), 147 (Asn→Ser); y VR8-región antigénica C, 218 (Val→IIe). Respecto a algunas cepas de Córdoba, las cepas vacunales mostraron cambios en la región antigénica A, 94 (Ser \rightarrow Asn), 96 (Val \rightarrow Gly); región antigénica C, 212 (Ile \rightarrow Val), 217 (Ile o Thr \rightarrow Met); y región antigénica D, 291 (Arg \rightarrow Lys) (*Figura 30*).

| | | | Lina | je IV | | | Linaje I | l | | | | Linaje I | | | | | Vacu | inales |
|------------------|-------------|-------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| Secuencia | ARGA11 | ARGA20 | ARG171 | ARG185 | ARG747 | ARG748 | ARG1345 | II ARG1293 | ARG1347 | ARG1349 | ARG1368 | ARG1427 | ARG1432 | ARG1433 | ARG1437 | ARG1442 | RIX4414 | WI79-9 |
| ARGA11 ARGA20 | ID 0,996 | 0,996 ID | 0,987 0,984 | 0,987 0,99 | 0,978 0,981 | 0,975 0,978 | 0,972 0,975 | 0,96 0,963 | 0,957 0,96 | 0,957 0,96 | 0,95 0,953 | 0,96 0,963 | 0,963 0,966 | 0,96 0,963 | 0,96 0,963 | 0,96 0,963 | 0,953 0,957 | 0,95 0,953 |
| ARG171 | 0,987 | 0,984 | ID | 0,978 | 0,969 | 0,966 | 0,963 | 0,95 | 0,947 | 0,947 | 0,947 | 0,95 | 0,953 | 0,95 | 0,95 | 0,95 | 0,944 | 0,941 |
| ARG185 | 0,987 | 0,99 | 0,978 | ID | 0,972 | 0,975 | 0,966 | 0,953 | 0,95 | 0,95 | 0,944 | 0,953 | 0,957 | 0,953 | 0,953 | 0,953 | 0,947 | 0,944 |
| ARG747 | 0,978 | 0,981 | 0,969 | 0,972 | ID | 0,996 | 0,981 | 0,953 | 0,95 | 0,957 | 0,944 | 0,953 | 0,957 | 0,953 | 0,953 | 0,953 | 0,963 | 0,96 |
| ARG748 | 0,975 | 0,978 | 0,966 | 0,975 | 0,996 | ID | 0,978 | 0,95 | 0,947 | 0,953 | 0,941 | 0,95 | 0,953 | 0,95 | 0,95 | 0,95 | 0,96 | 0,957 |
| ARG1345 | 0,972 | 0,975 | 0,963 | 0,966 | 0,981 | 0,978 | ID | 0,96 | 0,957 | 0,963 | 0,95 | 0,96 | 0,963 | 0,96 | 0,96 | 0,96 | 0,953 | 0,95 |
| ARG1293 | 0,96 | 0,963 | 0,95 | 0,953 | 0,953 | 0,95 | 0,96 | ID | 0,996 | 0,996 | 0,984 | 0,993 | 0,996 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,95 | 0,941 |
| ARG1347 | 0,957 | 0,96 | 0,947 | 0,95 | 0,95 | 0,947 | 0,957 | 0,996 | ID | 0,993 | 0,981 | 0,99 | 0,993 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,947 | 0,938 |
| ARG1349 | 0,957 | 0,96 | 0,947 | 0,95 | 0,957 | 0,953 | 0,963 | 0,996 | 0,993 | ID | 0,981 | 0,99 | 0,993 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,953 | 0,944 |
| ARG1368 | 0,95 | 0,953 | 0,947 | 0,944 | 0,944 | 0,941 | 0,95 | 0,984 | 0,981 | 0,981 | ID | 0,984 | 0,987 | 0,984 | 0,984 | 0,984 | 0,941 | 0,932 |
| ARG1427 | 0,96 | 0,963 | 0,95 | 0,953 | 0,953 | 0,95 | 0,96 | 0,993 | 0,99 | 0,99 | 0,984 | ID | 0,996 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,95 | 0,941 |
| ARG1432 | 0,963 | 0,966 | 0,953 | 0,957 | 0,957 | 0,953 | 0,963 | 0,996 | 0,993 | 0,993 | 0,987 | 0,996 | ID | 0,996 | 0,996 | 0,996 | 0,953 | 0,944 |
| ARG1433 | 0,96 | 0,963 | 0,95 | 0,953 | 0,953 | 0,95 | 0,96 | 0,993 | 0,99 | 0,99 | 0,984 | 0,993 | 0,996 | ID | 0,993 | 0,993 | 0,95 | 0,941 |
| ARG1437 | 0,96 | 0,963 | 0,95 | 0,953 | 0,953 | 0,95 | 0,96 | 0,993 | 0,99 | 0,99 | 0,984 | 0,993 | 0,996 | 0,993 | ID | 1 | 0,95 | 0,941 |
| ARG1442 | 0,96 | 0,963 | 0,95 | 0,953 | 0,953 | 0,95 | 0,96 | 0,993 | 0,99 | 0,99 | 0,984 | 0,993 | 0,996 | 0,993 | 1 | ID | 0,95 | 0,941 |
| RIX4414 | 0,953 | 0,957 | 0,944 | 0,947 | 0,963 | 0,96 | 0,953 | 0,95 | 0,947 | 0,953 | 0,941 | 0,95 | 0,953 | 0,95 | 0,95 | 0,95 | ID | 0,984 |
| WI79-9 | 0,95 | 0,953 | 0,941 | 0,944 | 0,96 | 0,957 | 0,95 | 0,941 | 0,938 | 0,944 | 0,932 | 0,941 | 0,944 | 0,941 | 0,941 | 0,941 | 0,984 | ID |

Tabla 13. Porcentajes de similitud aminoacídica entre cepas de RV-A de genotipo G1 detectadas en Córdoba, Argentina entre los años 1980-

2006 y cepas G1 vacunales.



(Continúa)





Figura 30. Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de la VP7 de las cepas G1 circulantes en Córdoba entre los años 1980-2006 y las cepas vacunales RIX4414 y WI79-9. Los residuos aminoacídicos conservados se representan con puntos. Los linajes correspondientes para cada muestra se indican con recuadros de color (verde: linaje IV, rojo: linaje II, azul: linaje I, celeste: linaje III, cepas vacunales). Se indican las regiones variables de la proteína VP7 con las iniciales *VR*, y las regiones antigénicas A-F en letras entre paréntesis.

Con el fin de evaluar si las sustituciones aminoacídicas observadas en los sitios antigénicos de diferentes cepas afectan la estructura de la proteína VP7, se realizó la predicción de la estructura secundaria de la VP7 de las cepas G1 que circularon en Córdoba, como así también de las cepas vacunales. Dicho estudio reveló que las mutaciones en las siguientes regiones antigénicas y posiciones de aminoácidos: región antigénica A, 94 (Ser→Asn), 96 (Val→Gly); región antigénica B, 141 (Leu→Phe), 147 (Ser→Asn); región antigénica C, 212 (Val→IIe), 217 (Met→IIe→Thr), 218 (Val→IIe), 219 (Ala→Thr); y región antigénica D, 291 (Arg→Lys), no modificaron la estructura secundaria de la proteína. La sustitución aminoacídica 97 (Glu→Asp) en cepas vacunales respecto a las de circulación local, ubicada en la región antigénica A, resultó en una modificación estructural que altera la longitud de la hélice α presente en esa región proteica (*Figura 31*).



Figura 31. Representación esquemática de las estructura secundaria predicha para las cepas G1 circulantes en Córdoba y las cepas G1 vacunales. Con un recuadro en rojo se indica el residuo aminoacídico 97 implicado en la mutación Glu→Asp que resulta en una modificación de la estructura secundaria de la VP7.

Sobre un diagrama en cinta del monómero de la proteína VP7 (*Figura 32B*) se localizaron los residuos aminoacídicos que mostraron sustituciones entre las variantes de G1 que circularon en Córdoba, y entre éstas y las cepas vacunales. La ubicación de los residuos en la estructura tridimensional de la proteína VP7 facilita la visión de la exposición de los seis sitios con diferencias aminoacídicas entre cepas (*Figura 32B*). En la *Figura 32A* se indica la ubicación de las proteínas VP7 y VP4 en la estructura del virión y en diagrama en cinta ampliado, el trímero de la proteína VP7 y la asociación estructural VP7-VP4.



Figura 32. Estructura de la proteína VP7 de RV-A. (A) Representación esquemática del virión completo, resaltando en el recuadro ampliado un diagrama en cinta de un trímero de la proteína VP7. (B) Estructura tridimensional en cinta de un monómero de VP7, indicando la ubicación de los residuos aminoacídicos expuestos en los que se observaron mutaciones.

Filogenia del genotipo G9

El genotipo G9 atrae especial atención dado que tiene una historia natural de circulación emergente en humanos. En Córdoba, este genotipo fue identificado desde el año 1980 en bajos niveles de circulación, incrementándose su detección desde el año 2000 (ver resultados *Perfil genotípico y dinámica natural de circulación de rotavirus grupo A en Córdoba, Argentina. Período 1979-2003*). Por este motivo, resultó de interés analizar las relaciones evolutivas entre las cepas G9 de Córdoba y compararlas con las cepas G9 aisladas en distintos países.

Para esto se secuenció parcialmente la región codificante del gen VP7 de 19 cepas de RV-A del genotipo G9, aisladas en Córdoba entre los años 1980-2006. Debido a que la mayor parte de las muestras (>80%) correspondieron a coinfecciones con otros G tipos, se secuenció sólo la región correspondiente al producto de amplificación específico del genotipo G9 (heminested-PCR con el par de primers G9 y End9, nucleótidos 756 a 1062).

Las secuencias obtenidas mostraron una alta identidad nucleotídica entre ellas (rango: 98.3% - 100%) (*Tabla 14*). Todas las cepas G9 de Córdoba, que circularon durante el período 1980-2006, agruparon dentro del linaje III, mostrando un alto porcentaje de similitud nucleotídica con cepas aisladas en distintas partes del mundo (>94%). Ninguna de las cepas G9 identificadas en Córdoba en los años 1980s agrupó en los clusters que definen los linajes I y II de cepas G9 aisladas en el mundo durante la misma década (*Figura 33*).

| | | Años | 1980s | | | | Años | 1990s | | | | | | А | ños 2000 | S | | | |
|-----------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|--------|--------|
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Secuencia | ARG184 | ARG029 | ARG545 | ARG045 | ARG1277 | ARG001 | ARG014 | ARG004 | ARG007 | ARG009 | ARG023 | ARG026 | ARG052 | ARG070 | ARG1674 | ARG064 | ARG066 | ARG068 | ARG080 |
| ARG184 | ID | 1 | 0,99 | 1 | 0,993 | 1 | 0,993 | 1 | 0,996 | 0,993 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,993 | 0,996 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| ARG029 | 1 | ID | 0,99 | 1 | 0,993 | 1 | 0,993 | 1 | 0,996 | 0,993 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,993 | 0,996 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| ARG545 | 0,99 | 0,99 | ID | 0,99 | 0,996 | 0,99 | 0,996 | 0,99 | 0,986 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,996 | 0,993 | 0,98 | 1 | 1 |
| ARG045 | 1 | 1 | 0,99 | ID | 0,993 | 1 | 0,993 | 1 | 0,996 | 0,993 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,993 | 0,996 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| ARG1277 | 0,993 | 0,993 | 0,996 | 0,993 | ID | 0,993 | 1 | 0,993 | 0,99 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 1 | 0,996 | 0,983 | 0,996 | 0,996 |
| ARG001 | 1 | 1 | 0,99 | 1 | 0,993 | ID | 0,993 | 1 | 0,996 | 0,993 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,993 | 0,996 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| ARG014 | 0,993 | 0,993 | 0,996 | 0,993 | 1 | 0,993 | ID | 0,993 | 0,99 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 1 | 0,996 | 0,983 | 0,996 | 0,996 |
| ARG004 | 1 | 1 | 0,99 | 1 | 0,993 | 1 | 0,993 | ID | 0,996 | 0,993 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,993 | 0,996 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| ARG007 | 0,996 | 0,996 | 0,986 | 0,996 | 0,99 | 0,996 | 0,99 | 0,996 | ID | 0,996 | 0,996 | 0,996 | 0,996 | 0,996 | 0,99 | 0,993 | 0,993 | 0,986 | 0,986 |
| ARG009 | 0,993 | 0,993 | 0,99 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,996 | ID | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,996 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| ARG023 | 1 | 1 | 0,99 | 1 | 0,993 | 1 | 0,993 | 1 | 0,996 | 0,993 | ID | 1 | 1 | 1 | 0,993 | 0,996 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| ARG026 | 1 | 1 | 0,99 | 1 | 0,993 | 1 | 0,993 | 1 | 0,996 | 0,993 | 1 | ID | 1 | 1 | 0,993 | 0,996 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| ARG052 | 1 | 1 | 0,99 | 1 | 0,993 | 1 | 0,993 | 1 | 0,996 | 0,993 | 1 | 1 | ID | 1 | 0,993 | 0,996 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| ARG070 | 1 | 1 | 0,99 | 1 | 0,993 | 1 | 0,993 | 1 | 0,996 | 0,993 | 1 | 1 | 1 | ID | 0,993 | 0,996 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| ARG1674 | 0,993 | 0,993 | 0,996 | 0,993 | 1 | 0,993 | 1 | 0,993 | 0,99 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | 0,993 | ID | 0,996 | 0,983 | 0,996 | 0,996 |
| ARG064 | 0,996 | 0,996 | 0,993 | 0,996 | 0,996 | 0,996 | 0,996 | 0,996 | 0,993 | 0,996 | 0,996 | 0,996 | 0,996 | 0,996 | 0,996 | ID | 0,986 | 0,993 | 0,993 |
| ARG066 | 0,99 | 0,99 | 0,98 | 0,99 | 0,983 | 0,99 | 0,983 | 0,99 | 0,993 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,983 | 0,986 | ID | 0,98 | 0,98 |
| ARG068 | 0,99 | 0,99 | 1 | 0,99 | 0,996 | 0,99 | 0,996 | 0,99 | 0,986 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,996 | 0,993 | 0,98 | ID | 1 |
| ARG080 | 0,99 | 0,99 | 1 | 0,99 | 0,996 | 0,99 | 0,996 | 0,99 | 0,986 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,996 | 0,993 | 0,98 | 1 | ID |

 Tabla 14.
 Porcentajes de similitud nucleotídica de cepas G9 de RV-A detectadas en Córdoba, Argentina, durante el período 1980-2006.



Figura 33. Árbol filogenético mostrando los seis linajes descriptos a nivel mundial para el genotipo G9 de RV-A. El árbol fue construido por el método de Neighbor-Joining usando Kimura 2-parámetros como modelo de sustitución, los valores de boostrap inferiores a 75% no se muestran. Los rotavirus detectados en Córdoba se indican con círculos en verde (años 1980s), rojo (años 1990s) y azul (años 2000). La barra indica la distancia que representa 1% de divergencia.

Con el objeto de analizar si las diferencias nucleotídicas entre las cepas de circulación local se traducirían en cambios aminoacídicos, se realizó la comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas de la región parcial del gen de la VP7 que codifica para el genotipo G9. El alineamiento de las cepas G9 circulantes en Córdoba entre los años 1980 y 2006 mostró una identidad aminoacídica >96.6, y >92.2% respecto a las cepas de linaje III del mundo (*Tabla 15*). En base a las secuencias aminoacídicas de VP7 se construyó un árbol filogenético que resultó en una distribución de linajes comparable a la obtenida mediante el análisis nucleotídico de las cepas.

Se observó una alta conservación de secuencia aminoacídica entre las cepas de circulación local y sólo algunas de ellas presentaron sustituciones aminoacídicas puntuales en regiones antigénicas (*Figura 34*). Así, las cepas aisladas en Córdoba ARG545 (año 1984), ARG068 y ARG080 (año 2006) revelaron la sustitución aminoacídica 242-Thr \rightarrow Asn, correspondiente a la región antigénica F. La sustitución antes mencionada fue también observada en la mayoría de las cepas G9 de linaje III que circularon en otros países del mundo. Particularmente, una cepa aislada en India mostró en esta posición aminoacídica el reemplazo de Thr \rightarrow Gly. No se observaron modificaciones en la región antigénica D (residuo 291).

| | | | | | | | | | Lina | aje III - C | Córdoba | | | | | | | | | | Linaj | e III - Mu | indo | |
|-----------|--------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|-------------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|------------|-------|-------|
| | | | ARG545 ARG045 ARG1277 ARG014 ARG004 ARG007 ARG009 ARG023 ARG026 ARG052 ARG070 ARG1674 ARG064 ARG066 0,988 1 1 1 1 0,988 1 1 1 1 0,977 0,988 1 1 1 1 0,988 1 1 1 1 0,977 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Secuencia | ARG184 | ARG029 | ARG545 | ARG045 | ARG1277 | ARG001 | ARG014 | ARG004 | ARG007 | ARG009 | ARG023 | ARG026 | ARG052 | ARG070 | ARG1674 | ARG064 | ARG066 | ARG068 | ARG080 | INL1 | BD524 | R44 | R143 | Mc345 |
| ARG184 | ID | 1 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG029 | 1 | ID | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG545 | 0,988 | 0,988 | ID | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,966 | 1 | 1 | 0,944 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 |
| ARG045 | 1 | 1 | 0,988 | ID | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG1277 | 1 | 1 | 0,988 | 1 | ID | 1 | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG001 | 1 | 1 | 0,988 | 1 | 1 | ID | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG014 | 1 | 1 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | ID | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG004 | 1 | 1 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | ID | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG007 | 0,988 | 0,988 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | ID | 1 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,977 | 0,977 | 0,933 | 0,966 | 0,966 | 0,977 | 0,977 |
| ARG009 | 0,988 | 0,988 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 1 | ID | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,977 | 0,977 | 0,933 | 0,966 | 0,966 | 0,977 | 0,977 |
| ARG023 | 1 | 1 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | ID | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG026 | 1 | 1 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | ID | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG052 | 1 | 1 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | ID | 1 | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG070 | 1 | 1 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | ID | 1 | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG1674 | 1 | 1 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | ID | 1 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG064 | 1 | 1 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | ID | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,944 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| ARG066 | 0,977 | 0,977 | 0,966 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | ID | 0,966 | 0,966 | 0,922 | 0,955 | 0,955 | 0,966 | 0,966 |
| ARG068 | 0,988 | 0,988 | 1 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,966 | ID | 1 | 0,944 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 |
| ARG080 | 0,988 | 0,988 | 1 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,966 | 1 | ID | 0,944 | 0,988 | 0,988 | 1 | 1 |
| INL1 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,933 | 0,933 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,922 | 0,944 | 0,944 | ID | 0,933 | 0,933 | 0,944 | 0,944 |
| BD524 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,966 | 0,966 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,955 | 0,988 | 0,988 | 0,933 | ID | 0,977 | 0,988 | 0,988 |
| R44 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,966 | 0,966 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,977 | 0,955 | 0,988 | 0,988 | 0,933 | 0,977 | ID | 0,988 | 0,988 |
| R143 | 0,988 | 0,988 | 1 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,966 | 1 | 1 | 0,944 | 0,988 | 0,988 | ID | 1 |
| Mc345 | 0,988 | 0,988 | 1 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,977 | 0,977 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,988 | 0,966 | 1 | 1 | 0,944 | 0,988 | 0,988 | 1 | ID |

 Tabla 15. Porcentajes de similitud aminoacídica entre cepas de RV-A de genotipo G9 detectadas en Córdoba, Argentina entre los años 1980

 2006 y cepas G9 de linaje III aisladas en distintos lugares del mundo.

| | Región antigénica F | | | | | Región antigénica D ∏ | | | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|------------|-------------------|
| ARG194 | | | NVALIOVEES | | | | VIVVDVINOL | VOVMSKRSRS | |
| ADC030 | Levinieri | NIGHNEOFNE | | UVED IT ADET | TAPSTENIIN | A DESIGNATION A. | I I Y Y D I I N X I | YUYHONNONO | LIISAATTIKY |
| ADCE 45 | ы. | | | •••• | | | • • • • • • • • • • • | | |
| AR0345 ADCO45 | • • • • • N • • • • • | | | | | | | | |
| AKOU40 | | | | | | | | | |
| ARG1277 | ••••• | | | •••• | ••••• | | •••• | | |
| ARG001 | | | | •••• | | | • • • • • • • • • • | | |
| ARG014 | | | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | • • • • • • • • • • • • • • • • • • • • | | |
| ARG004 | | | | • • • • • • • • • • • | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | |
| ARG007 | | | | • • • • • • • • • • | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | |
| ARG009 | | | | | | | | | |
| ARG023 | | | | | | | | | |
| ARG026 | | | | | | | | | |
| ARG052 | | | | | | | | | |
| ARG070 | | | | | | | | | |
| ARG1674 | | | | | | | | | |
| AR6064 | | | | | | | | | |
| ARGOSS | | | | | 6 | | | | |
| AR0000 | м | | | | ••••• | | | | |
| ADC000 | N M | | | •••• | | | | | |
| ANGUOU INI 4 | Maria and Maria and Anna and A | | | | | | | | |
| INL1 | • • • • • • • • • • • • • | · · · · · · · · · · · · | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | •••• | | 1 | •••• | ••••• | |
| BU524 | N | | | •••• | · v · · · · · · · | | •••• | | |
| R44 | | • • • • • • • • • • | | •••• | | | • • • • • • • • • • • • • • • • • • • | | |
| R143 | N . . | | | • • • • • • • • • • • | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | |
| Mc345 | N | | | • • • • • • • • • • • | · · · · · · · · · · · · | | • • • • • • • • • • • | | • • • • • • • • • |

Figura 34. Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de la región parcial de la VP7 correspondiente a cepas G9 circulantes en Córdoba entre los años 1980-2006 y cepas de linaje III de distintos lugares del mundo. Los residuos aminoacídicos conservados se representan con puntos.

Con el fin de evaluar si la sustitución aminoacídica observada en el sitio antigénico F afecta la estructura de la proteína VP7 se realizó la predicción de la estructura secundaria de la VP7 de las cepas G9 que circularon en Córdoba y otras regiones del mundo. Dicho estudio reveló que la mutación 242-Thr→Asn/Lys no modificó la estructura secundaria de la proteína G9-VP7 (*Figura 35*).



Figura 35. Representación esquemática de las estructuras secundarias predichas para las cepas G9 circulantes en Córdoba y las cepas G9 de distintos lugares del mundo. Con un recuadro en rojo se indica el residuo aminoacídico implicado en la mutación 242- Thr→Asn/Lys ubicada en la región antigénica F.

Filogenia del genotipo P[8]

El genotipo P[8] es el más prevalente a nivel mundial y a nivel local (ver resultados *Perfil genotípico y dinámica natural de circulación de rotavirus grupo A en Córdoba, Argentina. Período 1979-2003*). Debido a que las vacunas contra rotavirus disponibles en el mercado incluyen en su formulación a este genotipo, es de especial interés el análisis evolutivo del mismo en la ciudad de Córdoba.

Con este fin, se secuenció el fragmento VP8* y una pequeña porción del fragmento VP5* del gen de la VP4 de 7 cepas de RV-A del genotipo P[8], colectadas durante el período 1984-2003. Las muestras P[8] seleccionadas correspondieron a infecciones P tipo simples, de manera de poder analizar el gen completo de la VP4.

Las cepas P[8] aisladas en Córdoba mostraron una alta identidad en sus secuencias nucleotídicas (rango: 90.8% - 98.9%) (*Tabla 15*).

| | [| Años 1980s | | Año | s 1990s | Años | s 2000s | Vacunal |
|-----------|--------|------------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|
| Secuencia | ARG123 | ARG616 | ARG1280 | ARG433 | ARG1474 | ARG811 | ARG1617 | WI79-4 |
| ARG123 | ID | 0,989 | 0,978 | 0,919 | 0,915 | 0,916 | 0,931 | 0,914 |
| ARG616 | 0,989 | ID | 0,979 | 0,911 | 0,91 | 0,913 | 0,928 | 0,911 |
| ARG1280 | 0,978 | 0,979 | ID | 0,908 | 0,91 | 0,908 | 0,923 | 0,908 |
| ARG433 | 0,919 | 0,911 | 0,908 | ID | 0,985 | 0,973 | 0,966 | 0,97 |
| ARG1474 | 0,915 | 0,91 | 0,91 | 0,985 | ID | 0,972 | 0,965 | 0,969 |
| ARG811 | 0,916 | 0,913 | 0,908 | 0,973 | 0,972 | ID | 0,977 | 0,971 |
| ARG1617 | 0,931 | 0,928 | 0,923 | 0,966 | 0,965 | 0,977 | ID | 0,964 |
| WI79-4 | 0,914 | 0,911 | 0,908 | 0,97 | 0,969 | 0,971 | 0,964 | ID |

Tabla 15. Porcentajes de similitud nucleotídica entre cepas P[8] de RV-A detectadas en

Córdoba, Argentina, y la cepa WI79-4 incluida en la vacuna Rotateq $^{\textcircled{R}}$.

La identidad nucleotídica entre cepas P[8] aisladas en la década del `80 fue >97.8%; en la década del '90, 98.5%; y en la década del '00, 97.7%. El valor medio de identidad nucleotídica entre las cepas aisladas en Córdoba y la cepa vacunal WI79-4 fue del 94.4%. El análisis filogenético reveló que todas las cepas P[8] locales de los años 1980s agruparon dentro del linaje I y las aisladas en las décadas de los 1990s y 2000s agruparon en el linaje II (*Figura 36*).



Figura 36. Árbol filogenético mostrando los cuatro linajes descriptos a nivel mundial para el genotipo P[8] de RV-A. El árbol fue construido por el método de Neighbor- Joining usando Kimura 2-parámetros como modelo de sustitución, los valores de boostrap inferiores a 75% no se muestran. Los rotavirus detectados en Córdoba se indican con círculos en verde (años 1980s), rojo (años 1990s) y azul (años 2000). La cepa WI79-4 corresponde a la vacuna Rotateq[®]. La barra indica la distancia que representa 1% de divergencia.

Con el fin de evaluar si las diferencias nucleotídicas entre las cepas de Córdoba y entre éstas y la cepa P[8] vacunal corresponden a mutaciones no silentes, se realizó la comparación de las secuencias aminoacídicas parciales de la VP4.

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las cepas P[8] circulantes en Córdoba entre los años 1984 y 2003 mostró una identidad entre ellas y con la cepa vacunal >92.4% (*Tabla 16*). En base a las secuencias aminoacídicas de VP4 se construyó un árbol filogenético que resultó en una distribución de linajes comparable a la obtenida mediante el análisis nucleotídico de las cepas (gráfico no presentado).

| | | Linaje I | | | Lina | aje II | | Vacunal |
|-----------|--------|----------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|
| Secuencia | ARG123 | ARG616 | ARG1280 | ARG433 | ARG1474 | ARG811 | ARG1617 | WI79-4 |
| ARG123 | ID | 0,986 | 0,982 | 0,941 | 0,941 | 0,931 | 0,931 | 0,931 |
| ARG616 | 0,986 | ID | 0,976 | 0,928 | 0,928 | 0,924 | 0,924 | 0,924 |
| ARG1280 | 0,982 | 0,976 | ID | 0,938 | 0,938 | 0,928 | 0,928 | 0,928 |
| ARG433 | 0,941 | 0,928 | 0,938 | ID | 0,993 | 0,979 | 0,976 | 0,972 |
| ARG1474 | 0,941 | 0,928 | 0,938 | 0,993 | ID | 0,979 | 0,976 | 0,972 |
| ARG811 | 0,931 | 0,924 | 0,928 | 0,979 | 0,979 | ID | 0,976 | 0,972 |
| ARG1617 | 0,931 | 0,924 | 0,928 | 0,976 | 0,976 | 0,976 | ID | 0,962 |
| WI79-4 | 0,931 | 0,924 | 0,928 | 0,972 | 0,972 | 0,972 | 0,962 | ID |

 Tabla 16. Porcentajes de similitud aminoacídica entre cepas de RV-A de genotipo P[8] detectadas en Córdoba, Argentina entre los años 1984-2003 y

la cepa P[8] de la vacuna pentavalente Rotateq^(R) (WI79-4).

Se observó una alta conservación de secuencia aminoacídica entre cepas del mismo linaje y mutaciones puntuales respecto a cepas de otros linajes. Se observaron algunas mutaciones propias de un determinado linaje y otras mutaciones que no pudieron asociarse a linajes ni décadas de circulación de cepas. El análisis detallado de las sustituciones aminoacídicas indicó que todas las cepas de linaje II (cepas que circularon en los años '90s y '00s) presentaron sustituciones en las regiones variables respecto a todas las cepas de linaje I que circularon en Córdoba durante la década de los '80 en las siguientes posiciones aminoacídicas: $35 (IIe \rightarrow VaI)$, $108 (IIe \rightarrow VaI)$, $121 (IIe \rightarrow VaI)$, $131 (Ser \rightarrow Arg)$, $135 (Asn \rightarrow Asp)$, $162 (Arg \rightarrow Lys)$, y 189 (Ser $\rightarrow Asn$). También se observaron sustituciones en las regiones variables que fueron características de algunas cepas de estos linajes, pero no de todas, en las siguientes posiciones aminoacídicas: $89 (Asn \rightarrow Ser)$, $120 (Thr \rightarrow Met)$, $125 (Ser \rightarrow Asn)$,

145 (Asn→Ser), 160 (Glu→Ala), 173 (Val→IIe/Met), 176 (Phe→Val), 191 (Ala→Thr) y 283 (Met→Leu). Cabe resaltar que de todas las mutaciones detalladas, la correspondiente a la posición aminoacídica 189 es particularmente importante debido a que influiría en la unión al receptor de ácido siálico. Además, todas las cepas de linaje II presentaron sustituciones respecto a las cepas de linaje I en regiones conservadas, involucrando las siguientes posiciones aminoacídicas: 78 (Asn→Thr), 195 (Asn→Ser), 199 (Thr→IIe), 236 (Phe→Ser) y 255 (Val→IIe). En cuanto a la cepa vacunal WI79-4, ésta reveló las siguientes mutaciones respecto a todas las cepas de Córdoba: 52-Gly→Tyr, 78-Asn/Thr→IIe, 252-Asp→Glu, y 268-Arg→Ser (*Figura 37*).



| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | F | ۲V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---|---|-------|-------|------|------|----|---|-----|----|----|---|----|----|---|----|-----|-----|---|-----|---|----------|-----|-----|-----|-----|-----|---|-------------|----|-----|----|---|-----|-----|----|-----|----|-------|------|------|-----|-----|----|------|-------|-------|----|-----|
| | | | ſ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ٦ |
| | | | | | | - 90 | ni - | | | | | 10 | 0 | | | | | | 110 | | | | | | 12 | 0 | | | | | | 130 | | | | | | 140 | | | | | | 150 | | | | | 1 | 160 |
| | | | | . [| | | | | | 1 - | | | | | | _ | | | _ | | | | <u> </u> | | | | | | | | | | | | . | | | | | | | | | | | | _ | | | 1 |
| | ARG123 | W | L | L Ń S | S N 1 | ΓNĠ | V | ٧Y | E | ŚΤ | NN | S |) | FW | TA | Ŵ | ۷A | I E | Ρ. | Н | V N | P | V D | R Q | ΥĪ | [| I F | G E | Ś | ΚQ | FN | Ý | SI | D | S N | KW | ΚF | L. | EN | A F R | (N S | i Si | Q N | Ē | FY | IN F | R R 1 | E L 1 | ΤS | D |
| | ARG616 | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ARG1280 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | . 1 | Ι. | | | | | | | | | | | | | | | S . | | | | | | | | | |
| | ARG433 | | | | | | | | | | | | | | | | | ۷. | | | | | | | | . 1 | ۷. | | Ν | | | | R | | . D | | | | | | S. | | | | | | ••• | | | |
| | ARG1474 | | | | | | | | • | | | | | | | | | ۷. | | | | | | | | 1 | ۷. | | Ν | | | . 1 | R | | . D | ι. | | | | | S . | | | | | | | | | А |
| " | AR6811 | | | | | S . | | | | | | | | | | | | ۷. | | | | | | | | 1 | ۷. | | N | La recentra | | | R | | . D | γ., | | | | | S . | | | | | | | | | |
| | ARG1617 | | | | | S . | | | | | | | | | | | | ۷. | | | | | | | | 1 | ۷. | | | | | | R | | . D | ς., | | | | | S . | | | | | | | | | |
| ш | WI79-4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ٧. | | Ν | | | | R | | . D | | | | | | S . | | | | | | | | | |





Figura 37. Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de la subunidad VP8* y un fragmento génico de la subunidad VP5* correspondientes a cepas P[8] circulantes en Córdoba entre los años 1984-2003 y la cepa vacunal WI79-4. Los residuos aminoacídicos conservados se representan con puntos. Se indica con las iniciales RV a las regiones aminoacídicas variables.

Con el fin de evaluar si las sustituciones aminoacídicas observadas en las cepas P[8] afectan la estructura de la proteína VP4 se realizó la predicción de la estructura secundaria de esta proteína. Dicho estudio reveló que las mutaciones 78-Asn/Thr→lle, 125 (Ser→Asn), y 176 (Phe→Val), modificaron la estructura secundaria de la proteína (Figura 38). La sustitución 78-Asn/Thr→lle induce el cambio de una hoja β por una estructura en espiral aguas arriba de la posición aminoacídica modificada (Figura 38A); la sustitución 125-Ser→Asn induce la formación de una hoja β de mayor longitud (*Figura 38B*); y la sustitución 176-Phe \rightarrow Val induce la modificación de una hoja β por una estructura en espiral aguas abajo de la posición aminoacídica modificada (Figura 38C).





125-Ser

125-Ser: cepas P[8] linaje I y una cepa linaje II (ARG1617)

125-Asn



125-Asn: mayoría de las cepas P[8] linaje II y cepa vacunal WI79-4





AA:

Pred: estructura secundaria predicha

secuencia blanco

^(helix – H) Iámina β

(strand – E)

espiral

(coil – C)

Sobre un diagrama en cinta de la subunidad VP8* de la proteína VP4 se localizaron los residuos aminoacídicos que mostraron sustituciones entre las variantes de P[8] que circularon en Córdoba, y entre éstas y la cepa vacunal. La ubicación de los residuos en la estructura tridimensional de la proteína VP4 facilita la visión de la exposición de los sitios con diferencias aminoacídicas entre cepas (*Figura 39*).



Figura 39. Estructura de la proteína VP4 de RV-A. (A) Representación esquemática del virión completo de RV-A, resaltando en el recuadro ampliado una representación de la estructura de cristal de la proteína VP4, indicando el fragmento VP8*. (B) Estructura tridimensional en cinta de la subunidad VP8*, indicando la ubicación de los residuos aminoacídicos expuestos en los que se observaron mutaciones.

Discusión

Numerosos estudios han mostrado la existencia de distintos linajes de cepas de rotavirus en base a la caracterización nucleotídica y aminoacídica de las proteínas de la cápside externa, VP7 y VP4 (Jin y colab., 1996; Piec y Palombo, 1998; Diwakarla y Palombo, 1999; Arista y colab., 2006). Debido a la dominancia y persistencia de los tipos G1 y P[8], y a la emergencia en frecuencia de circulación de G9 a nivel local (ver resultados *Perfil genotípico y dinámica natural de circulación de rotavirus grupo A en Córdoba, Argentina. Período 1979-2003*), resultó de interés investigar la heterogeneidad y evolución genética y antigénica de cepas de circulación local a lo largo del tiempo.

Mediante la comparación de la secuencia aminoacídica de la VP7 de distintos serotipos de RV-A humanos y animales se identificaron seis regiones variables (VR) serotipoespecíficas, denominadas VR4-VR9 (Glass y colab., 1985; Green y colab., 1989; Nishikawa y colab., 1989). Las secuencias aminoacídicas en estas regiones son altamente conservadas dentro de un serotipo, pero difieren considerablemente entre serotipos. Las regiones variables VR5, VR7, VR8 y VR9, correspondientes a las regiones antigénicas A (abarcando los residuos aminoacídicos 87-100), B (aminoácidos 141-150), C (aminoácidos 208-224) y F (aminoácidos 235-242), respectivamente, han sido confirmadas como los principales sitios inductores de anticuerpos neutralizantes de RV-A mediante el mapeo de virus mutantes de escape a la neutralización con anticuerpos monoclonales (Coulson y Kirkwood, 1991; Xin y colab., 1993; Kirkwood y colab., 1993). Además, el mapeo de virus resistentes a la neutralización ha permitido identificar otros dos sitios antigénicos, denominadas E y D, en los residuos aminoacídicos 190 y 291, respectivamente (Kirkwood y colab., 1993; Lazdins y colab., 1995). Asímismo, ha sido demostrado que las regiones antigénicas en la proteína VP7, a pesar de encontrarse distantes en la molécula lineal, interaccionan de manera conjunta en la proteína madura. Esto es consecuencia del plegamiento de la proteína VP7 para adquirir su estructura terciaria. Las regiones antigénicas son determinantes en la unión de anticuerpos protectores y en la inducción de respuesta inmune (Dyall-Smith y colab., 1986). De hecho, se ha observado que una única sustitución aminoacídica en la VP7, predominantemente en las regiones antigénicas A, B y C, altera la antigenicidad del virus (Kapikian y colab., 2001).

El estudio de la variabilidad genética y antigénica de genotipos de RV-A es un tema de relevancia actual. Los estudios están orientados al análisis de diversidad de cepas circulantes y a la evaluación antigénica entre cepas circulantes y cepas vacunales. La atención ha sido puesta fundamentalmente en los genotipos contenidos en las formas vacunales (G1 y P[8]) y en el emergente a nivel mundial G9.

Así, estudios filogenéticos del genotipo G1 llevados a cabo en distintas partes del mundo han revelado la existencia de al menos cuatro linajes genéticos (Jin y colab., 1996). A

su vez, el análisis de secuencia de VP7 de mutantes de escape seleccionados con anticuerpos monoclonales serotipo G1-específicos ha aportado información sobre los aminoácidos involucrados en la neutralización del virus (Coulson y Kirkwood, 1991; Xin y colab., 1993).

Teniendo como base la información disponible, se realizó el análisis de heterogeneidad genética y antigénica de cepas de circulación natural de RV-A genotipo G1 en Córdoba.

Las cepas de genotipo G1 que circularon en Córdoba durante el período de 28 años (1979-2006) agruparon dentro de tres linajes (I, II y IV), alternando ciclos de circulación, cocirculación, emergencia, desaparición y/o persistencia de variantes G1 intragenotípicas en el tiempo. Durante los años '80s se observó la circulación de cepas de genotipo G1 correspondientes al linaje IV que persistieron durante toda la década. Las cepas G1 de linaje IV fueron detectadas hasta el año 1989. Sin embargo, se desconoce si el linaje IV extinguió su circulación a fines de la década del '80 o continuó su circulación hasta mediados de la década de los '90s. Esto se debe a que una limitación del presente estudio fue el bajo número de muestras disponibles entre los años 1989 y 1996 (n=4). Cuando se retomó el muestreo ampliado en el año 1996, las cepas de linaje IV ya no fueron encontradas. Los resultados de este trabajo de tesis coinciden con otros reportes de circulación de cepas de linaje IV en el mundo, estando acotada su circulación a los años 1980s y principios de los 1990s, principalmente en Korea, Japón y Egipto (Jin y colab., 1996). En el año 1996 emergieron en Córdoba cepas G1 de linaje I, que se mantuvieron en circulación durante al menos 11 años (al menos hasta el año 2006). El primer registro de detección de cepas de linaje I fue en Italia en el año 1986, donde cepas de este linaje circularon esporádicamente durante un período de 19 años (Arista y colab., 2006). A partir de entonces, cepas G1 de linaje I fueron detectadas como las predominantes en diversos países, tales como Bangladesh, Malawi, Brasil y Japón durante los años 1988-2004, 1997-1999, 2002-2004 y 2005-2006, respectivamente (Ahmed y colab., 2010; Cunliffe y colab., 2001; Araujo y colab., 2007; Phan y colab., 2007a). En el año 1998 se detectó en Córdoba la co-circulación de cepas de linaje I y linaje II. La co-circulación de cepas de estos dos linajes fue también observada en Italia, Japón, India y Korea durante los años 1989-2004, 2005-2006, 2006 y 2007-2009, respectivamente (Arista y colab., 2006; Phan y colab., 2007a; Arora y colab., 2009; Han y colab., 2010). En Córdoba, las cepas de linaje II no persistieron en el tiempo, siendo únicamente halladas en el año 1998. Resultados similares a los observados en Córdoba desde los años 1990s fueron revelados en países limítrofes a Argentina, detectándose la circulación de cepas G1 de linaje I y/o II en Uruguay, Paraguay y Brasil durante el mismo período (Berois y colab., 2003; Parra y colab., 2005; Araujo y colab., 2007). Sin embargo, los resultados de Córdoba contrastan con los reportados en Brasil durante los años 1980s, en donde circularon cepas G1 de linajes III (Araujo y colab., 2007; Jin y colab., 1996). El linaje III de G1 fue también detectado en países asiáticos (Japón, China, Tailandia

y Vietnam) durante los años 2002-2005 y reúne, en general, las cepas de circulación más antigua (años 1970s), dentro de las que se incluyen las variantes vacunales RIX4414 y WI79-9 (Trinh y colab., 2007).

Es de marcado interés llevar el análisis genético y evolutivo de las cepas de circulación natural al marco comparativo con cepas vacunales actualmente disponibles en la región. En este análisis, las cepas G1 cordobesas de circulación más reciente resultaron divergentes a las vacunales tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico en el rango 3.7%-6.8%.

El análisis evolutivo de las cepas G1 circulantes en Córdoba se basó en la comparación de sus secuencias aminoacídicas respecto a la primera cepa G1 aislada en Córdoba. Este criterio se basa en que el análisis evolutivo implica el registro temporal de cambios genéticos en cepas autóctonas respecto a la cepa de registro más antiguo de circulación en la misma área geográfica. Si bien es importante el análisis de sustitución de linajes de cepas que circulan en una región como marcador evolutivo viral, más importante es determinar si esta sustitución se correlaciona con cambios antigénicos en las cepas. Esto podría explicar la persistencia y abundancia de circulación de G tipos de rotavirus a nivel local.

Numerosos estudios se han llevado a cabo con el objeto de identificar regiones o sitios puntuales en la secuencia aminoacídica de VP7 que son determinantes en la respuesta inmune protectora contra la infección.

Respecto a la región antigénica A de la VP7 (aminoácidos 87 a 101), ensayos de antigenicidad con anticuerpos monoclonales demostraron que la presencia de Asn en el residuo aminoacídico 94 está relacionada con la neutralización viral y que, independientemente del serotipo, virus con la sustitución Asn→Ser en esta posición no son neutralizados. La Ser es un aminoácido con cadena lateral más corta que la de Asn. El cambio en el tamaño aminoacídico alteraría suficientemente la conformación de la proteína como para impedir la interacción del anticuerpo monoclonal con la VP7 (Coulson y Kirkwood, 1991; Diwakarla y Palombo, 1999). Además, Diwakarla y Palombo (1999) describieron la posición aminoacídica 94 como esencial para distinguir entre linajes I y II de rotavirus de genotipo G1, resaltando que las cepas de linaje II presentan Asn en esta posición, mientras que las cepas de linaje I presentan Ser. El análisis de cepas G1 de circulación local reveló que aproximadamente el 90% de las cepas de Córdoba de linajes I y II se comportan de este modo, presentando Ser y Asn en la posición aminoacídica 94, respectivamente (sólo una cepa de linaje I presentó Asn en la posición 94). Un estudio reportado por Arista y colab. (2006) en Italia mostró resultados similares a los observados en Córdoba, revelando la sustitución aminoacídica

94-Asn→Ser en sólo algunas cepas de linaje I, mientras que todas las cepas de linaje II presentaron Asn en esta posición. De esta manera, los estudios realizados en Córdoba e Italia mostraron una tendencia a la presencia de Asn o Ser en un determinado linaje, pero este marcador no permitió de manera absoluta discriminar a partir del residuo aminoacídico

94 entre los distintos linajes de G1. Estos resultados sugieren la necesidad del secuenciamiento completo de la VP7 para adscribir una cepa a un linaje. Es de recalcar que este análisis reveló que las cepas locales de circulación más actual (2000-2006) difieren antigénicamente en este residuo aminoácidico con las cepas vacunales, ya que las vacunales en la posición 94 tienen Asn, mientras que la mayoría de las cepas de circulación reciente a nivel local tienen Ser.

Continuando con el análisis de la región antigénica A, el presente estudio reveló que todas las cepas de linaje I y II y el 70% de las cepas de linaje IV de circulación local, presentaron Gly en la posición aminoacídica 96, mientras que las restantes cepas de linaje IV mostraron la sustitución por Val. A su vez, las cepas vacunales mostraron en este sitio Gly. Se desconocen las implicancias antigénicas que pudiera tener esta mutación dentro de la región antigénica A.

Por último, en la región antigénica A, la sustitución de Asp por Glu en la posición aminoacídica 97 es considerada crítica en la preservación de epitopes neutralizantes (Coulson y Kirkwood, 1991; Dyall-Smith y colab., 1986). Todas las cepas de Córdoba presentaron Glu en esta posición, mientras que las cepas vacunales presentaron Asp. A partir de la predicción de la estructura secundaria de la proteína VP7 de cepas G1 que circularon en Córdoba y las vacunales, se observó que la sustitución en la posición aminoacídica 97 (Asp \rightarrow Glu) resultó en una modificación estructural, que alteró la longitud de la hélice α presente en esa región proteica. Los cambios observados podrían llevar a cambios conformacionales en las regiones de epitopes neutralizantes de la proteína, afectando así las propiedades de antigenicidad de la VP7. La sustitución aminoacídica en un epitope crítico neutralizante, junto con la modificación estructural de la proteína, podría tener consecuencias de alteraciones antigénicas catastróficas.

Respecto a la región antigénica B (aminoácidos 141 a 150), las cepas que circularon en Córdoba presentaron sustituciones aminoacídicas respecto a las cepas vacunales. Todas las cepas de Córdoba y la cepa vacunal RIX4414 presentaron Leu en la posición aminoacídica 141, mientras que la cepa vacunal WI79-9 mostró en esta posición Phe. Se desconocen las implicancias de esta sustitución aminoacídica en los escapes a la respuesta inmune. La otra sustitución observada fue en la posición 147, donde la totalidad de las cepas de Córdoba presentaron el residuo aminoacídico Asn y las vacunales Ser. Estudio de antigenicidad han demostrado que el cambio 147-Ser→Asn es crítico en la preservación de epitopes neutralizantes (Coulson y Kirkwood, 1991; Dyall-Smith y colab., 1986).

El mayor número de sustituciones aminoacídicas se observó dentro de la región antigénica C (aminoácidos 208 a 224). Las cepas de Córdoba agrupadas en los linajes II y IV, presentaron Val en la posición 212, mientras que las cepas de linaje I y las vacunales mostraron IIe. Asímismo, en el residuo aminoacídico 218 las cepas cordobesas se diferenciaron de las vacunales por la sustitución Val→IIe. Por último, en la posición 219, las

cepas de linaje I de Córdoba presentaron la sustitución Ala \rightarrow Thr respecto a las demás cepas cordobesas y vacunales. Se desconocen las implicancias que pudieran tener los cambios en las posiciones 212 (Val \rightarrow IIe), 218 (Val \rightarrow IIe) y 219 (Ala \rightarrow Thr) en la región antigénica C. Por otra parte, los aislamientos más recientes de Córdoba (linajes I y II) mostraron una sustitución en el residuo 217 (Thr o IIe) respecto a las cepas de circulación más antigua (217-Met: linaje IV y cepas vacunales). Estudios realizados por Diwakarla y Palombo (1999) demostraron que si bien los cambios observados en el residuo 217 (Met \rightarrow Thr/IIe) no se correlacionan con una alteración en la reactividad frente a anticuerpos monoclonales neutralizantes, podrían ser un marcador evolutivo, diferenciando cepas de circulación de las décadas de los '70/'80, de las cepas de circulación más reciente.

Ensayos con anticuerpos monoclonales han demostrado la selección de variantes resistentes a la neutralización con mutaciones puntuales en el sitio antigénico D (aminoácido 291). El cambio aminoacídico 291-Lys→Arg afectaría una región hidrofóbica (Dyall-Smith y colab., 1986) y altamente conservada que media en la unión de los rotavirus a las células MA104 (Frenchick y colab., 1988). La cepa cordobesa de linaje II, el 30% de las cepas de linaje IV y las vacunales, presentaron Lys en esta posición aminoacídica, mientras que las cepas de linaje I y las restantes de linaje IV mostraron la sustitución 291-Lys→Arg.

La región antigénica F (aminoácidos 235 a 242), la cual es considerada una de las de mayor importancia antigénica, como así también la región antigénica E (aminoácido 190), se mostraron altamente conservadas entre todas las cepas de circulación local y vacunales.

Los resultados del presente trabajo muestran que las cepas de circulación más actual en Córdoba (años 2000-2006) difieren de las cepas vacunales, presentando sustituciones aminoacídicas en sitios que generan mutantes de escape a la neutralización. Se desconoce la implicancia en la respuesta inmune policional de estas divergencias antigénicas puntuales. Sin embargo, en una prueba de eficacia de la vacuna monovalente G1 RRV-S1 realizada en EEUU durante los años 1991-1992, Jin y colab. (1996) determinaron una muy baja eficacia de protección y observaron la presencia de numerosas sustituciones aminoacídicas entre la cepa vacunal y las de circulación natural. Los autores sugieren que la presencia de las mutaciones puntuales podría haber influido en el fracaso de la vacuna debido a cambios antigénicos en las cepas de circulación local.

El análisis filogenético y aminoacídico de cepas G1 sugiere que la circulación temporal de distintos linajes de cepas G1 en Córdoba no estaría ligada a la emergencia de variantes antigénicas en la comunidad. Por lo tanto, si bien los estudios filogenéticos son de gran utilidad, éstos sólo están mostrando relaciones evolutivas de cepas de circulación local. Es entonces necesario profundizar en el estudio de estructura primaria (secuencia aminoacídica) y terciaria de la proteína G1-VP7 para conocer la emergencia de variantes antigénicas de circulación local.

Los estudios de variabilidad antigénica de las cepas G1 son de gran importancia debido a que es un genotipo que circula con alta frecuencia en todo el mundo y que lo contienen ambas fórmulas vacunales. Las divergencias aminoacídicas en regiones antigénicas entre cepas de circulación local y vacunales sugieren que la introducción de la vacuna debería estar acompañada de una vigilancia molecular de cepas de rotavirus aisladas de niños vacunados que cursen diarrea por rotavirus.

Respecto al genotipo G9, cabe destacar que su emergencia en frecuencia de circulación en el mundo ha atraído considerable interés científico en varios aspectos, incluyendo la epidemiología, origen evolutivo y composición genética del virus. El análisis filogenético de cepas G9 de todo el mundo ha revelado la existencia de al menos seis linajes (Phan y colab., 2007b). Los linajes I, II, IV y V fueron encontrados sólo en humanos, mientras que los linajes III y VI han sido hallados tanto en humanos como en porcinos. Los virus G9 de linaje I incluyen cepas detectadas en los años 1980s en EEUU y Japón; los de linaje III han sido detectados sólo en neonatos asintomáticos en India en el año 1986; virus de linaje III incluyen cepas emergentes/reemergentes en los años 1990s, constituyendo el linaje más prevalente alrededor del mundo; cepas de linaje IV han sido detectados en EEUU en los años 1997-1998; y los virus de linaje V sólo han sido detectados en los años 1997-2002 en el mundo.

Debido a que el 80% de las cepas G9 detectadas en Córdoba fueron encontradas en coinfecciones con cepas de otros genotipos, no fue posible secuenciar el producto completo del gen de la VP7 específico del tipo G9. Por este motivo, el análisis de secuencia de las cepas G9 fue realizado en base a una región parcial del gen de la VP7, correspondiente al amplicón específico de este genotipo (306 pb). Esta región de la VP7 sólo involucra las regiones antigénicas F y D, y una extensa región conservada que se mantiene entre las proteínas VP7 de distintos genotipos.

Se ensayaron distintas opciones para obtener un amplicón que involucrara las otras regiones hipervariables de la VP7, incluyendo las regiones antigénicas A, B y C, pero todos estos intentos resultaron infructuosos. Uno de ellos se refirió a amplificar la VP7 completa, pero cuando se secuenció el producto de PCR éste siempre correspondió al otro genotipo que estaba en coinfección con G9 (generalmente el genotipo G1). Un segundo intento fue utilizar los primers Beg9 y aFT9, para complementar la secuencia nucleotídica obtenida con primers G9 tipo específicos, pero se obtuvieron resultados confusos y no reproducibles.

Un estudio realizado por Baggi y Peduzzi (2000) reveló que la amplificación y secuenciación de un fragmento de 189 pb de la VP7 (nucleótidos 51 a 239) fue suficiente para caracterizar los genotipos G de RV-A presentes en una muestra. Más aun, DiStefano y colab. (2005) determinaron que es posible caracterizar cepas de RV-A, e incluso analizar el subgrupo del serotipo, mediante la amplificación de un producto truncado de la

VP7, de 365 pb. Por lo tanto, secuencias parciales de la VP7 también brindan información acerca de variabilidad serotípica e intraserotípica. Teniendo como base esta información se decidió hacer un análisis de representatividad y validez para caracterizar linajes de cepas G9 a partir de los amplicones obtenidos con los primers aFT9 y End9 (nucleótidos 776 a 1062) en el curso de este trabajo. Para esto se realizaron dos ensayos de filogenia. El primero abarcó todo el amplicón (VR9 y región conservada) y el otro, tomando sólo la región conservada. Este análisis se realizó con las cepas reportadas a nivel mundial de los seis linajes de este genotipo. La filogenia que incorporó la región VR9 reprodujo la distribución en clusters utilizando sólo la región conservada (que incluye el sitio antigénico D) no reprodujo la agrupación en clusters antes definida. Este resultado fuertemente sugiere la importancia de la región VR9 para la clasificación en linajes de cepas G9. A partir de este resultado se realizaron los análisis de filogenia con las cepas G9 aisladas en Córdoba.

Los resultados obtenidos indican que todas las cepas G9 de Córdoba identificadas entre los años 1980 y 2006 pertenecen al linaje III, el cual agrupa cepas G9 emergentes/reemergentes que circularon en otras ciudades de Argentina, en países vecinos (Paraguay y Brasil) y en el mundo en general a partir de los años 1990s (Clark y colab., 1987, 2004b; Parra y colab., 2005, 2007; Rahman y colab., 2005b; Santos y Hoshino, 2005; Stupka y colab., 2007, 2009; Volatao y colab., 2006). Las cepas que circularon en la década del '80 en Córdoba fueron filogenéticamente distintas a las reportadas durante el mismo período en otros países del mundo (Oka y colab., 2000; Cao y colab., 2008). Los resultados del presente trabajo indican que en los años '80 circularon en el mundo no sólo los linajes I y II, sino también cepas G9 de linaje III.

Además, se reveló una alta conservación temporal en la secuencia aminoacídica parcial de las cepas G9 que circularon en Córdoba (>98.3% identidad). Durante el período 1980-2006 sólo se observó la sustitución aminoacídica 242-Thr→Asn en la región antigénica F en tres cepas, una aislada en el año 1984 y dos en el año 2006. Esta sustitución también fue observada por Phan y colab. (2007b) en todos los linajes de G9 respecto a cepas de linaje I. Se desconocen las implicancias de la sustitución aminoacídica en este residuo para el reconocimiento de anticuerpos protectores. El sitio antigénico D (aminoácido 291) se preservó a lo largo del tiempo.

El tipo G9 es un genotipo al que recientemente se le prestado gran atención debido al incremento en su frecuencia de circulación a nivel global. A su vez, es un G tipo no incorporado en ninguna de las fórmulas vacunales, por lo tanto el monitoreo de la variabilidad antigénica sería importante para evaluar la protección inmune heterotípica inducida por las vacunas actualmente licenciadas.

Otra proteína de importancia antigénica es la VP4, la cual está involucrada en la adhesión y penetración del virus a la célula. Ha sido demostrado que el clivaje enzimático de la VP4 en los polipéptidos VP8* (N-terminal) y VP5* (C-terminal) resulta en un incremento de la infectividad viral (Espejo y colab., 1981; Estes y colab., 1981). El fragmento VP8* es la hemaglutinina viral, mientras que el fragmento VP5* está involucrado en la permeabilización de membranas (Fiore y colab., 1991; Dowling y colab., 2000). La comparación de la secuencia aminoacídica de la VP4 de rotavirus humanos y animales reveló que el fragmento VP5* es más conservado que el VP8* (Estes y Cohen, 1989). Así, Gorziglia y colab. (1986; 1988) determinaron la presencia de nueve regiones variables en la proteína VP4, tres regiones ubicadas en la subunidad VP8*, en las posiciones aminoacídicas 30-38, 61-64 y 92-192, y 6 regiones variables localizadas en la subunidad VP5*, en las posiciones aminoacídicas 280-283, 335-339, 384-388, 601-607, y 664-700. El fragmento VP8* tiene una amplia región variable tipo- específica, definida entre los aminoácidos 84 y 180, donde se ubican varios epitopes neutralizantes (Larralde y Gorziglia, 1992; Ruggeri y Greenberg, 1991). Hasta el momento, el estudio del fragmento VP8* del genotipo P[8] ha revelado la existencia de cuatro linajes filogenéticos (Araujo y colab., 2007; Cunliffe y colab., 2001; Iturriza- Gomara y colab., 2000b).

Teniendo como base la información disponible, se realizó el análisis de heterogeneidad intragenotípica y antigénica de cepas de circulación natural de RV-A genotipo P[8] en Córdoba. El análisis filogenético de las cepas P[8] agrupó las cepas cordobesas en dos linajes evolutivos diferentes. Las cepas de mayor antigüedad (1984-1989) pertenecieron al linaje I, mientras que las detectadas en los años 1996-2003 agruparon en el linaje II. Resultados similares en el agrupamiento temporal de cepas fueron observados durante un estudio epidemiológico en Palermo, Italia, realizado por Arista y colab. (2006), quienes encontraron que las cepas P[8] más antiguas (1989-1993) agruparon en el linaje I, mientras que las cepas aisladas años después (1995-2003) pertenecieron al linaje III. La distribución temporal de P[8] también fue observada por Araujo y colab. (2007) en Brasil, quienes revelaron que los aislamientos de los años 1986-1990 y 2001 agruparon en el linaje II mientras que las cepas de los años 2002-2004 agruparon en el linaje III. Si bien los estudios citados coinciden en que los linajes se distribuyen temporalmente y que las cepas más antiguas pertenecerían a los linajes I o II, los datos reportados muestran que en un mismo espacio temporal, pero en zonas geográficas diferentes, circulan distintos linajes. Esto sugeriría una co-circulación mundial de cepas P[8] pertenecientes a los linajes I y II. El linaje III reúne cepas que han emergido a nivel global en la última década (Arista y colab., 2006; Ansaldi y colab., 2007; Araujo y colab., 2007). Sin embargo, no se identificaron en Córdoba cepas pertenecientes a este linaje, sino que en los últimos años se detectó la circulación continua de cepas P[8] de linaje II. Cepas de linaje III fueron también detectadas en los últimos años en Korea y Paraguay (Min y colab., 2004; Espínola y colab., 2008). Finalmente,
el linaje IV es un subtipo de baja frecuencia de circulación que agrupa sólo unas pocas cepas de rotavirus aisladas en Malawi (Cunliffe y colab., 2001). La circulación de este linaje no fue identificada en Córdoba.

El análisis genético y evolutivo de las cepas P[8] de circulación natural reveló que las cepas cordobesas de aparición más reciente (cepas de linaje II) resultaron muy similares a la cepa vacunal WI79-4 tanto a nivel nucleotídico (cepa vacunal perteneciente al linaje II) como aminoacídico (identidad >96.2%). El estudio aminoacídico involucró una región parcial de la proteína VP4, que incluye en su secuencia tres regiones variables de la VP8* y una de la VP5*. El análisis de cepas de circulación local mostró una variación de secuencia aminoacídica <7.6% entre los dos linajes de P[8] identificados en Córdoba, y la variación interlinaje fue <2.4%. Entre las mutaciones puntuales observadas, las identificadas en los residuos aminoacídicos 189 y 255 son particularmente importantes. Todas las cepas de linaje I, presentaron Ser en la posición 189, mientras que las cepas de linaje II, cordobesas y vacunal, mostraron Asn. Esta sustitución aminoacídica tendría influencia en la unión del receptor de ácido siálico (Dormitzer y colab., 2002). Además, se observó que todas las cepas de linaje II mostraron la sustitución 255-Val→lle respecto a las de circulación más antigua. El cambio en este residuo aminoacídico alteraría la neutralización del virus (McDonald y colab, 2009). Por otra parte, a partir del alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de la subunidad VP8* de cepas paraguayas y cepas de distintas partes del mundo, Espínola y colab. (2008) sugirieron que el residuo aminoacídico localizado en la posición 195 permitiría diferenciar a las cepas P[8] en los cuatro linajes conocidos: las cepas de linaje I con Asn, cepas de linaje II con Asp, linaje III con Gly, y cepas de linaje IV con Ser. Los resultados obtenidos en Córdoba concuerdan con lo publicado por Espínola y colab. (2008), pudiendo ser diferenciadas las cepas de linajes I y II mediante sólo el análisis del residuo aminoacídico 195. El estudio realizado permite concluir que la distribución de cepas P[8] en distintos linajes coincide con sustituciones aminoacídicas en regiones variables. Sin embargo, si bien se han observado diferencias antigénicas entre los distintos linajes del genotipo P[6] de rotavirus (Hoshino y colab., 2002; Li y Gorziglia, 1993; Nakagomi y colab., 1999), aún se desconoce si los distintos linajes de P[8] diferirían también antigénicamente.

La investigación de la dinámica de evolución de genotipos en Córdoba durante el período 1979-2006 mostró la circulación de distintas variantes genéticas y antigénicas intragenotípicas a lo largo del tiempo para G1 y P[8]. Por el contrario, el tipo G9 mostró una alta homogeneidad intragenotípica.

Durante los últimos años ha tomado importancia, en el diseño e introducción de vacunas en la población, el estudio de la diversidad de cepas circulantes en una determinada área geográfica y el análisis de las fuerzas conductoras de la evolución de los rotavirus. Las fuerzas que rigen la evolución de los RV-A son las mutaciones puntuales, y las

reasociaciones y recombinaciones genómicas entre cepas humanas y/o animales que pudieran ocurrir durante infecciones mixtas, dando origen a las poblaciones genéticas y antigénicas de cepas de rotavirus que circulan temporalmente en una región (Estes, 2001; Cunliffe y colab., 2002). Es entonces de importancia que la introducción de las vacunas sea acompañada por sistemas de vigilancia para monitorear el nivel de correspondencia antigénica entre cepas vacunales y cepas de circulación local, a los fines de evitar una potencial evasión de la respuesta inmune vacunal ante la infección por cepas de circulación local.

Conclusiones

1. El estudio de circulación natural de RV-A realizado sobre un muestreo de materia fecal recolectado durante 28 años (período 1979-2006) reveló en Córdoba, Argentina, una dinámica compleja, caracterizada por cambios temporales en la epidemiología molecular de G tipos de RV-A y un patrón continuo en el tiempo de circulación de P tipos.

2. El presente estudio reveló la historia natural de circulación de RV-A en la naturaleza, como una historia de fuerzas y balances entre genotipos dominantes en circulación, genotipos infrecuentes y/o de circulación cíclica, y genotipos emergentes, en un escenario epidemiológico que facilitaría la ocurrencia de altas tasas de infecciones mixtas. La frecuencia de circulación natural de G tipos de RV-A estaría sujeta, al menos en parte, a la competencia replicativa entre las variantes genotípicas virales que coexisten en una misma área geográfica y en un mismo período.

3. Los genotipos de mayor prevalencia a nivel local, G1 y P[8], revelaron una dinámica temporal de circulación, co-circulación y emergencia de variantes intragenotípicas y antigénicas. La distribución temporal de variantes genéticas G1 y P[8] no se correlacionó con sustituciones aminoacídicas presentes en regiones antigénicas. Por lo tanto, la circulación sostenida y dominante de G1 y P[8] en el tiempo no estaría ligada a la emergencia de variantes antigénicas en la comunidad sino que sería facilitada por la capacidad replicativa significativamente mayor de las cepas G1 y potencialmente P[8] respecto a otros genotipos. Se identificaron diferencias aminoacídicas en regiones antigénicas o variables de cepas G1 y P[8] de circulación natural respecto a las cepas contenidas en las fórmulas vacunales. Se desconoce a nivel de la respuesta inmune policional la implicancia de mutaciones puntuales en regiones inmunogénicas de las proteínas VP7 y VP4.

4. El genotipo G9 se detectó en Córdoba desde el año 1980, siendo su circulación infrecuente hasta el año 2006, año en el que presentó un incremento significativo en su frecuencia de circulación, posiblemente como consecuencia de su mayor participación etiológica en infecciones simples. Este hecho facilitaría su diseminación en la comunidad al no tener que competir replicativamente con otro G tipo. El genotipo G9 mostró la circulación continua de una misma variante genética. Por lo tanto, su emergencia de circulación, al igual que G1 y P[8], no se relacionaría con un proceso de evolución intragenotípica.

5. Durante todo el período estudiado los genotipos G4, G2 y P[4] mostraron un perfil de circulación característico. Así, el genotipo G4 mostró una circulación continua durante los 28

años de estudio, sin llegar a ser nunca el G tipo dominante; y G2 y P[4] revelaron frecuencias de detección cíclicas y acompañadas en el tiempo.

6. El genotipo G3 que circuló durante 25 años en baja frecuencia y esporádicamente, mostró un incremento significativo en su circulación en el año 2006.

7. No se identificó a nivel local la circulación significativa de genotipos infrecuentes a nivel mundial.

8. El estudio comparativo de los sistemas de vigilancia clínica y ambiental reveló una distribución similar de genotipos G de rotavirus con características genéticas y antigénicas comparables. Por lo tanto, la vigilancia ambiental sería una nueva herramienta para el monitoreo de genotipos de RV-A en la población.

La introducción masiva de las vacunas podría alterar la dinámica que rige la evolución natural de rotavirus, acelerando o facilitando por presión inmunológica la emergencia de cepas antigénicamente divergentes a las vacunales. Es entonces de importancia que la introducción de las vacunas sea acompañada por una vigilancia clínica y/o ambiental sostenida en el tiempo a los fines de evaluar su impacto en la dinámica de circulación y diversidad de cepas de RV-A en la comunidad.

Referencias

- Abdel-Haq NM, Thomas RA, Asmar BI, Zacharova V, Lyman WD. 2003. Increased prevalence of G1P[4] genotype among children with rotavirus-associated gastroenteritis in metropolitan Detroit. J Clin Microbiol 41:2680-2682.
- Affranchino JL, Gonzalez SA. 1997. Deletion mapping of functional domains in the rotavirus capsid protein VP6. J Gen Virol 78:1949-1955.
- Ahmed K, Ahmed S, Mitui MT, Rahman A, Kabir L, Hannan A, Nishizono A, Nakagomi O.
 2010. Molecular characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh.
 Virus Genes 40:347-356.
- Anderson EJ, Weber SG. 2004. Rotavirus infection in adults. Lancet Infect Dis 4:91-99.
- Angel J, Franco MA, Greenberg HB. 2007. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. Nat Rev Microbiol 5:529-539.
- Annarita P, Grassi T, Donia D, De Donno A, Idolo A, Alfio C, Alessandri C, Alberto S, Divizia M. 2010. Detection and molecular characterization of human rotaviruses isolated in Italy and Albania. J Med Virol 82(3):510-518.
- Ansaldi F, Pastorino B, Valle L, Durando P, Sticchi L, Tucci P, Biasci P, Lai P, Gasparini R, Icardi G. 2007. Molecular characterization of a new variant of rotavirus P[8]G9 predominant in a sentinel-based survey in central Italy. J Clin Microbiol 45:1011-1015.
- Ansari SA, Springhorpe VS, Sattar SA. 1991. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. Rev Infect Dis 13:448-461.
- Araujo IT, Assis RM, Fialho AM, Mascarenhas JD, Heinemann MB, Leite JP. 2007. Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis. J Med Virol 79:995-1001.
- Arias CF, Isa P, Guerrero CA, Mendez E, Zarate S, López T, Espinosa R, Romero P, López S. 2002. Molecular biology of rotavirus cell entry. Arch Med Res 33:356-361.

- Arista S, Giovannelli L, Pistoia D, Cascio A, Parea M, Gerna G. 1990. Electropherotypes, subgroups and serotypes of human rotavirus strains causing gastroenteritis in infants and young children in Palermo, Italy, from 1985 to 1989. Res Virol 141:435–448.
- Arista S, Vizzi E, Ferraro D, Cascio A, Di Stefano R. 1997. Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhoea. Arch Virol 142:2065–2071.
- Arista S, Vizzi E, Migliore MC, Di Rosa E, Cascio A. 2003. High incidence of G9P [8] rotavirus infections in Italian children during the winter season 1999–2000. Eur J Epidemiol 18:711–714.
- Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Ramirez S, Lo Biundo C, Colomba C, Cascio A, Martella V. 2006. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. J Virol 80:10724–10733.
- Arora R, Chhabra P, Chitambar SD. 2009. Genetic diversity of genotype G1 rotaviruses co-circulating in western India. Virus Res 146:36-40.
- Arraj A, Bohatier J, Aumeran C, Bailly JL, Laveran H, Traeré O. 2008. An epidemiological study of enteric virases in sewage with molecular characterization by RT-PCR and sequence analysis. J Water Health 6:351-358.
- Baggi F, Peduzzi R. 2000. Genotyping of rotaviruses in environmental water and stool samples in Southern Switzerland by nucleotide sequence analysis of 189 base pairs at the 5' end of the VP7 gene. J Clin Microbiol 38:3681-3685.
- Bányai K, Bogdán A, Domonkos G, Kisfali P, Molnár P, Tóth A, Melegh B, Martella V, Gentsch JR, Szucs G. 2009a. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. J Med Virol. 81:362-70.
- Bányai K, Esona MD, Kerin TK, Hull JJ, Mijatovic S, Vásconez N, Torres C, de Filippis AM, Foytich KR, Gentsch JR. 2009b. Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P [6], from Ecuador. Arch Virol 154:1823-1829.
- Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. Bull World Health Organ 70:705-714.

- Bernstein DI, Smith VE, Sherwood JR, Schiff GM, Sander DS, DeFeudis D, Spriggs DR, Ward RL. 1998. Safety and immunogenicity of live attenuated human rotavirus vaccine 89-12. Vaccine 16:381-387.
- Berois M, Libersou S, Russi J, Arbiza J, Cohen J. 2003. Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus isolated in Montevideo-Uruguay from 1996-1999. J Med Virol 71:456-462.
- Bican P, Cohen J, Charpilienne A, Scherrer R. 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. J Virol 43:1113-1117.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet 2:1281-1283.
- Bok K, Castagnaro N, Borsa A, Nates S, Espul C, Fay O, Fabri A, Grinstein S, Miceli I, Matson DO, Gómez JA. 2001. Surveillance for rotavirus in Argentina. J Med Virol 65:190-198.
- Bosch A, Pintó RM, Jofre J. 1988. Non-seasonal ocurrence of rotavirus in Barcelona raw sewage. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B 186:273-277.
- Bryson K, McGuffin LJ, Marsden RL, Ward JJ, Sodhi JS, Jones DT. 2005. Protein structure prediction servers at University College London. Nucleic Acids Res. 33:W36-W38.
- Cao D, Santos N, Jones RW, Tatsumi M, Gentsch JR, Hoshino Y. 2008. The VP7 genes of two G9 rotaviruses isolated in 1980 from diarrheal stool samples collected in Washington, DC, are unique molecularly and serotypically. J Virol 82:4175-4179.
- Caprioli A, Pezzella C, Morelli R, Giammaco A, Arista S, Crotti D, Facchini M, Guglielmetti P, Piersimoni C, Luzzi I. 1996. Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. The Italian Study Group of Gastrointestinal Infections. Pediatr Infect Dis J 15:876–883.
- Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins CM, Bóia MN, Leite JP. 2009. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. Emerg Infect Dis 15:95-97.

- Castello AA, Argüelles MH, Rota RP, Olthoff A, Jiang B, Glass RI, Gentsch JR, Glikmann G. 2006. 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 44:2046-2050.
- Chemello ME, Aristimuño OC, Michelangeli F, Ruiz MC. 2002. Requeriment for vacuolar H⁺-ATPase activity and Ca²⁺gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. J Virol 76:13083-13087.
- Ciarlet M, Hidalgo M, Gorziglia M, Liprandi F. 1994. Characterization of neutralization epitopes on the VP7 surface protein of serotype G11 porcine rotaviruses. J Gen Virol 75:1867-1873.
- Ciarlet M, Liprandi F, Conner ME, Estes MK. 2000. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. Arch Virol 145:371-383.
- Ciarlet M, Ludert JE, Iturriza-Gomara M, Liprandi F, Gray JJ, Desselberg U, Estes MK. 2002a. Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origen. J Virol 76:4087-4095.
- Ciarlet M, Estes MK. 2002b. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. En Bitton G (ed.), Encyclopedia of Environmental Microbiology, pag. 2753–2773. John Wiley and Sons, New York, USA.
- Ciarlet M, Crawford SE, Cheng E, Blutt SE, Rice DA, Bergelson JM, Estes MK. 2002c. VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. J Virol 76:1109-1123.
- Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB, Spendlove RS. 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. J Virol 39:816-822.
- Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, Offit PA. 1987. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. J Clin Microbiol 25:1757-1762.

- Clark HF, Lawley D, Shrager D, Jean-Guillaume D, Offit PA, Whang SY, Eiden JJ, Bennett PS, Kaplan KM, Shaw AR. 2004a. Infant immune response to human rotavirus serotype G1 vaccine candidate reassortant WI79-9: different dose response patterns to virus surface proteins VP7 and VP4. Pediatr Infect Dis J 23:206-211.
- Clark HF, Lawley D, Shrager D, Patacsil JM, Marcello AE, Glass RI, Jain V, Gentsch J. 2004b. Assessment of the epidemic potential of a new strain of rotavirus associated with the novel G9 serotype which caused an outbreak in the United States for the first time in the 1995-1996 season. J Clin Microbiol 42:1434-1438.
- Collins PJ, Martella V, Buonavoglia C, O'Shea H. 2010. Identification of a G2-like porcine rotavirus bearing a novel VP4 type, P[32]. Vet Res 41:73.
- Coluchi N, Munford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M, Weber E, Mármol P, Rácz ML. 2002. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. J Clin Microbiol 40:1709-1714.
- Conner ME, Estes MK, Graham DY. 1988. Rabbit model of rotavirus infection. J Virol 62:1625-1633.
- Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. 1990. Global seasonality of rotavirus infections. Bull World Health Organ 68:171-177.
- Coulson BS, Kirkwood C. 1991. Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype. J Virol 65:5968–5974.
- Crawford SE, Labbé M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK. 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. J Virol 68:5945-5952.
- Cubitt WD, Steele AD, Iturriza M. 2000. Characterisation of rotaviruses from children treated at a London hospital during 1996: emergence of strains G9P2A [6] and G3P2A[6]. J Med Virol 61:150-154.
- Cumino AC, Giordano MO, Martínez LC, Medeot SI, Pavan JV, Yudowsky S, Isa MB, Depetris AR, Nates SV. 1998. Culture amplification in human colon adenocarcinoma cell line (CaCo-2) combined with an ELISA as a supplementary assay for accurate diagnosis of rotavirus. J Virol Methods 76:81-85.

- Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. 2001. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. J Clin Microbiol 39:836-843.
- Cunliffe NA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI, Hart AC. 2002. The expanding diversity of rotaviruses. Lancet 359:640-642.
- Das BK, Gentsch JR, Hoshino Y, Ishida S, Nakagomi O, Bhan MK, Kumar R, Glass RI. 1993. Characterization of the G serotype and genogroup of New Delhi newborn rotavirus strain 116E. Virology 197:99-107.
- Das S, Varghese V, Chaudhury S, Barman P, Mahapatra S, Kojima K, Bhattacharya SK, Krishnan T, Ratho RK, Chhotray GP, Phukan AC, Kobayashi N, Naik TN. 2003. Emergence of novel human group A rotavirus G12 strains in India. J Clin Microbiol 41:2760-2762.
- De Grazia S, Ramirez S, Giammanco GM, Colomba C, Martella V, Lo Biundo C, Mazzola R, Arista S. 2007. Diversity of human rotaviruses detected in Sicily, Italy, over a 5-year period (2001–2005). Arch Virol 152:833–837.
- Dennehy PH. 2008. Rotavirus vaccines: an overview. Clin Microbiol Rev 21:198-208.
- Desselberger U, Iturriza-Gomara M, Gray J. 2001. Rotavirus epidemiology and surveillance. Novartis Found Symp 238:125-147.
- DiStefano DJ, Kraiouchkine N, Mallette L, Maliga M, Kulnis G, Keller PM, Clark HF, Shaw AR. 2005. 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 43:5876-5880.

Diwakarla CS, Palombo EA. 1999. Genetic and antigenic variation of capsid protein

VP7 of serotype G1 human rotavirus isolates. J Gen Virol 80:341–344.

Dong Y, Zeng CQ, Ball JM, Estes MK, Morris AP. 1997. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase

C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. Proc Natl Acad Sci USA 94:3960-3965.

- Dormitzer PR, Sun ZY, Wagner G, Harrison SC. 2002. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. EMBO J 21:885-897.
- Dowling W, Denisova E, LaMonica R, Mackow ER. 2000. Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5* protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain. J Virol 74:6368-6376.
- Dyall-Smith ML, Lazdins I, Tregear GW, Holmes IH. 1986. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. Proc Natl Acad Sci USA 83:3465-3468.
- Espejo RT, Lopez S, Arias C. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. J Virol 37:156-160.
- Espínola EE, Amarilla A, Arbiza J, Parra GI. 2008. Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. Arch Virol 153:1067–1073.
- Esteban LE, Rota RP, Gentsch JR, Jiang B, Esona M, Glass RI, Glikmann G, Castello AA. 2010. 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 82:1083-1093.
- Estes MK, Graham DY, Mason BB. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: Molecular mechanisms. J Virol 39:879-888.
- Estes MK, Crawford SE, Peñaranda ME, Petrie BL, Burns JW, Chan WK, Ericson B, Smith GE, Summers MD. 1987. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. J Virol 61:1488-1494.
- Estes MK, Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. Microbiol Rev 53:410-449.

Estes MK. 2001. Rotaviruses and their replication. En Knipe DM, Howley PM, Griffin

- DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed.), Fields Virology, 4ta ed., vol. 2, pag. 1747-1786. Lippincott-Williams-Wilkins. Philadelphia, Pa.
- Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Victoria M, Vieira CB, Luz S, Shubo T, Leite JP, Miagostovich MP. 2009. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, Gtype and subgroup characterization. Water Sci Technol 60(3):633-642.
- Fiore L, Greenberg HB, Mackow ER. 1991. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. Virology 181:553-563.
- Fischer TK, Page NA, Griffin DD, Eugen-Olsen J, Pedersen AG, Valentiner-Branth P, Mølbak K, Sommerfelt H, Nielsen NM. 2003. Characterization of incompletely typed rotavirus strains from Guinea-Bissau: identification of G8 and G9 types and a high frequency of mixed infections. Virol 311:125-133.
- Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. Lancet 2:61-63.
- Frenchick P, Sabara MI, Ijak MK, Babiuk LA. 1988. Immune responses to synthetic peptide vaccines of veterinary importance. *En* Kurstak B, Marusyk RG, Murphy FA, van Regenmortel MHV (ed.), Applied Virology Research, vol. 1, pag. 141-151. Plenum Publishing Corp. New York, NY.
- Fukuhara N, Yoshie O, Kitaoka S, Konno T. 1988. Role of VP3 in human rotavirus internalization after target cell attachment via VP7. J Virol 62:2209-2218.
- Gault E, Chikhi-Brachet R, Delon S, Schnepf N, Albiges L, Grimprel E, Girardet JP, Begue P, Garbarg-Chenon A. 1999. Distribution of human rotavirus G types circulating in Paris, France, during the 1997-1998 epidemic: high prevalence of type G4. J Clin Microbiol 37:2373-2375.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods PA, Gouvea V, Gorziglia MK, Flores J, Das BK, Bhan MK. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30:1365-1373.
- Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. 1996. Review of G and P typing results from a global collection of

rotavirus strains: implications for vaccine development. J Infect Dis 174:S30–S36.

- Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. 2005. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. J Infect Dis 192:S146-159.
- Glass RI, Keith J, Nakagomi O, Nakagomi T, Askaa J, Kapikian AZ, Chanock RM, Flores J. 1985. Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf diarrhea virus rotavirus: Comparison with homologous genes from four strains of human and animal rotaviruses. Virology 141:292-298.
- Gomez JA, Sordo ME, Gentile A. 2002. Epidemiologic patterns of diarrheal disease in Argentina: estimation of rotavirus disease burden. Pediatr Infect Dis J 21:843-850.
- Gorrell RJ, Bishop RF. 1999. Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children. J Med Virol 57:204-211.
- Gorziglia MK, Hoshino Y, Buckler-White A, Blumentals I, Glass RI, Flroes J, Kapikian AZ, Chanock RM. 1986. Conservation of amino acid sequence of VP8 and cleavage region of 84-KDa outer capsid protein among rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infection. Proc Natl Acad Sci USA 83:7039-7043.
- Gorziglia MK, Green K, Nishikawa K, Taniguchi K, Jones R, Kapikian AZ, Chanock RM. 1988. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. J Virol 62:2978-2984.
- Gorziglia M, Larralde G, Kapikian A, Chanock RM. 1990. Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. Proc Natl Acad Sci USA 87:7155–7159.
- Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J Clin Microbiol 28:276-282.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. 1994. Identification of bovine and porcine group

A rotaviruses by PCR. J Clin Microbiol 32:1338-1340.

- Green KY, Hoshino Y, Ikegami N. 1989. Sequence analysis of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein (VP7) of two new human rotavirus serotypes. Virology 168:429-433.
- Greenberg HB, Valdesuso J, van Wyke K, Midthun K, Walsh M, McAulife V, Wyatt RG, Kalica AR, Flores J, Hoshino Y. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. J Virol 47:267-275.
- Griffin DD, Kirkwood CD, Parashar UD, Woods PA, Bresee JS, Glass RI, Gentsch JR. 2000. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of unusual strains. The National Rotavirus Strain Surveillance System collaborating laboratories. J Clin Microbiol 38:2784-2787.
- Griffin DD, Nakagomi T, Hoshino Y, Nakagomi O, Kirkwood CD, Parashar UD, Glass RI, Gentsch JR, National Rotavirus Surveillance System. 2002. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6],G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. Virology 294:256-269.
- Guerrant R, Van Gilder T, Steiner T. 2001. Practice Guidelines for the management of infectious diarrhea. IDSA Guidelines. Clin Infect Dis 32:331-350.
- Guerrant RI, Kozek M, Lima AA, Lorntz B, Guyatt HL. 2002. Updating the DALYs for diarrhoeal disease. Trends Parasitol 18:191-193. [Erratum, Trands Parasitol 2002; 18:281]
- Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SCF, Barros VCF, Fontes PB, Salustino EF, Nakagomi O, Nakagomi T, Dove W, Cunliffe N, Hart CA. 2007. Predominance of rotavirus G2P[4] in a vaccinated population, Brazil. Emerg Infect Dis 13:1571-1573.
- Gurgel RQ, Cunliffe NA, Nakagomi O, Cuevas LE. 2008. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. J Clin Virol 43:1-8.

Gurgel RG, Bohland AK, Vieira SC, Oliveira DM, Fontes PB, Barros VF, Ramos MF, Dove

W, Nakagomi T, Nakagomi O, Correia JB, Cunliffe N, Cuevas LE. 2009. Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. Gastroenterology 137:1970-1975.

Haffejee IE. 1991. Neonatal rotavirus infection. Rev Infect Dis 13:957-962.

- Han TH, Kim CH, Chung JY, Park SH, Hwang ES. 2010. Genetic characterization of rotavirus in children in South Korea from 2007 to 2009. Arch Virol 155:1663-1673.
- Hasing ME, Trueba G, Baquero MI, Ponce K, Cevallos W, Solberg OD, Eisenberg JN. 2009. Rapid changes in rotaviral genotypes in Ecuador. J Med Virol 81:2109-2113.
- Hejkal TW, Smith EM, Gerba CP. 1984. Seasonal occurrence of rotavirus in sewage. Appl Environ Microbiol 47:588–590.
- Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid silver-stain polyacrilamide gels. J Clin Microbiol 16:473-477.
- Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS. 2000. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. J Virol 74:228-236.
- Hong SK, Lee SG, Lee SA, Kang JH, Lee JH, Kim JH, Kim DS, Kim HM, Jang YT, Ma SH, Kim SY, Paik SY. 2007. Characterization of a G11,P[4] strain of human rotavirus isolated in South Korea. J Clin Microbiol 45:3759-3761.
- Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RM. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. Proc Natl Acad Sci USA 82:8701–8704.
- Hoshino Y, Kapikian AZ. 1996. Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. Arch Virol 12:99-111.
- Hoshino Y, Jones RW, Kapikian AZ. 2002. Characterization of neutralization specificities of outer capsid spike protein VP4 of selected murine, lapine, and human rotavirus strains. Virology 299:64-71.

Inoue Y, Kitahori Y, Adachi O, Imai S. 2003. P genotypic identification of human

group A rotaviruses. Jpn J Infect Dis 56:179-80.

Iqbal N, Shaw RD. 1997. En Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (ed), Clinical

Virology, pag. 765. Churchill Livingstone Inc, NY.

- Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW, Desselberger U, Gray JJ. 1999. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. J Virol Methods 78:93-103.
- Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW, Ramsay M, Desselberger U, Gray JJ. 2000a. Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998. J Clin Microbiol 38:4394-4401.
- Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW, Desselberger U, Gray JJ. 2000b. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription- PCR genotyping. J Clin Microbiol 38:898-901.
- Iturriza-Gomara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. 2002. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. J Virol 76:6596-6601.
- Jain V, Das BK, Bhan MK, Glass RI, Gentsch JR, Indian Strain Surveillance Collaborating Laboratories. 2001. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. J Clin Microbiol 39:3524-3529.
- Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. Virus Res 101:67-81.
- Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. 2002. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. Clin Infect Dis 34:1351-1361.
- Jin Q, Ward RL, Knowlton DR, Gabbay YB, Linhares AC, Rappaport R, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. 1996. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. Arch Virol 141:2057-2076.
- Jourdan N, Maurice M, Delautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. 1997. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through

nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. J Virol 71:8268-8278.

- Kalica AR, Flores J, Greenberg HB. 1983. Identification of the rotavirus gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. Virology 125:194-205.
- Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. J Virol 62:1136-1144.
- Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, Aho S, Pothier P, Belliot G. 2010. Evidence of the cocirculation of enteric viruses in sewage and in the population of Greater Cairo. J Appl Microbiol 108:1620-1629.
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J Virol 10:1075–1081.
- Kapikian AZ. 1993. Viral gastroenteritis. JAMA 269:627-630.
- Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I. 1996. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. J Infect Dis 174:65-72.
- Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. 2001. Rotaviruses. *En* Knipe DM, Howley PM (ed), Fields Virology, 4ta ed., vol. 2, pag. 1787-1833. Lippincott-Williams-Wilkins. Philadelphia, Pa.
- Kebaabetswe LP, Sebunya TK, Matsheka MI, Ndung'u T. 2005. Detection and molecular characterisation of group A rotavirus from children in northern Botswana. East Afr Med J 82:203–208.
- Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. 2006a. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. J Med Virol 78:986–994.
- Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L, Tonusin S, Sornchai P, Maneerat V, Khamwan C, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. 2006b. Emergence of

human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. J Med Virol 78:273–280.

- Kirkwook C, Masendyez PJ, Coulson BS. 1993. Characteristics and location of crossreactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotavirus. Virology 196: 79-88.
- Kirkwood CD, Boniface K, Bishop RF, Barnes GL; Australian Rotavirus Surveillance Group. 2009. Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2008/2009. Commun Dis Intell 33:382-388.
- Kitahori Y, Inoue Y, Takebe H, Imai S. 2003. Serotyping of human rotaviruses in Nara Prefecture, Japan. Jpn J Infect Dis 56:39-41.
- Kobayachi N, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. 1994. Genotypic diversity of reassortants between simian rotavirus SA11 and human rotavirus having different antigenic specificities and RNA patterns. Res Virol 145:303–311.
- Kobayachi N, Taniguchi K, Kojima K, Urasawa T, Urasawa S. 1995. Preferential selection of VP7 gene from a parent rotavirus strain (SA11) in sequential passages after mixed infection with SA11 and SA11-human rotavirus single VP7 gene-substitution reassortants. Arch Virol 140:775–781.
- Kobayachi N, Okada J, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. 1996a. Selection of rotavirus VP7 gene in the genetic background of simian rotavirus SA11: implications for rotavirus reassortant vaccine development. Antiviral Res 31:185–190.
- Kobayachi N, Taniguchi K, Kojima K, Urasawa T, Urasawa S. 1996b. G (VP7) serotype-dependent preferential VP7 gene selection detected in the genetic background of simian rotavirus SA11. Arch Virol 141:1167–1176.
- Koopmans M, Brown D. 1999. Seasonality and diversity of group A rotaviruses in Europe. Acta Paediatr Suppl 88:14-19.
- Koshimura Y, Nakagomi T, Nakagomi O. 2000. The relative frequencies of G serotypes of rotavirus recovered from hospitalized children with diarrhea: a 10-year survey (1987-1996) in Japan with a review of globally collected data. Microbial Immunol 44:499-510.

- Kozek M, Bern C, Guerrant RL. 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ 81:197-204.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lai H, Lin S, Lin H, Ku C, Wang L, Yang C. 2005. Phylogenetic analyses of human rotavirus in central Taiwan in 1996, 2001 and 2002. J Clin Virol 32:199–217.
- Larralde G, Li B, Kapikian AZ, Gorziglia M. 1991. Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein. J Virol 65:3213-3218.
- Larralde G, Gorziglia M. 1992. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. J Virol 66:7438-7443.
- Lazdins I, Coulson BS, Kirkwood C, Dyall-Smith M, Masendycz PJ, Sonza S, Holmes IH. 1995. Rotavirus antigenicity is affected by the genetic context and glycosylation of VP7. Virology 209:80-89.
- Lee JB, Young SJ, Nakagomi T, Park SY, Kim TJ, Song CS, Jang HK, Kim BS, Nakagomi O. 2003. Isolation, serologic and molecular characterization of the first G3 caprine rotavirus. Arch Virol 148:643–657.
- Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. 2008. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 103:745-753.
- Li B, Gorziglia M. 1993. VP4 serotype of the Gottfried strain of porcine rotavirus. J Clin Microbiol 31:3075-3077.
- Lo JY, Szelo KC, Tsang DN, Leung KH, Lim WW. 2005. Changing epidemiology of rotavirus G-types circulating in Hong Kong, China. J Med Virol 75:170-173.
- López T, Camacho M, Zayas M, Nájera R, Sánchez R, Arias CF, López S. 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. J Virol 79:184-192.

Macedo CI, Christofoletti A, Munford V, Rácz ML. 2007. G and P rotavirus genotypes in

stool samples from children in Teresina, State of Piauí. Rev Soc Bras Med Trop 40:381-384.

- Mansell EA, Ramig RF, Patton JT. 1994. Temperature-sensitive lesions in the capsid proteins of the rotavirus mutants tsF and tsG that affect virion assembly. Virology 204:69-81.
- Martella V, Pratelli A, Greco G, Gentile M, Fiorente P, Tempesta M, Buonavoglia C. 2001. Nucleotide sequence variation of the VP7 gene of two G3-Type rotaviruses isolated from dogs. Virus Res 74:17–25.
- Martella V, Ciarlet M, Camarda A, Pratelli A, Tempesta M, Greco G, Cavalli A, Elia G, Decaro N, Terio V, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia C. 2003. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotavirus identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. Virology 314:358–370.
- Martínez M, Amarilla AA, Galeano ME, Aquino VH, Fariña N, Russomando G, Parra GI. 2010. Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asunción, Paraguay, 2006-2007. Arch Virol 155:525-533.
- Martini IJ, Gennari GM, Martins SS, Gouvêa VS, Gatti MS. 2008. Changing distribution of human rotavirus serotypes during two epidemic outbreaks of gastroenteritis in Campinas, São Paulo, Brazil, 2003-2004: detection of G6 strains. J Clin Virol 43:244-246.
- Mast TC, Chen PY, Lu KC, Hsu CM, Lin HC, Liao WC, Lin DP, Chen HC, Lac C. 2010. Epidemiology and economic burden of rotavirus gastroenteritis in hospitals and paediatric clinics in Taiwan, 2005-2006. Vaccine 28:3008-3013.
- Matson DO. 2006. The pentavalent rotavirus vaccine, Rotateq. Semin Pediatr Infect Dis 17:195-199.
- Matthijnssens J, Rahman M, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Kabue JP, Muyembe JJ, Van Ranst M. 2006. G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. J Clin Microbiol 44:1801-1809.
- Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gomara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. 2008. Full genome-

based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. J Virol 82:3204-3219.

- Maunula L, von Bonsdorff CH. 1998. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. J Gen Virol 79:321-332.
- McDonald SM, Matthijnssens J, McAllen JK, Hine E, Overton L, Wang S, Lemey P, Zeller M, Van Ranst M, Spiro DJ, Patton JT. 2009. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. PLoS Pathog 5(10):e1000634.
- McNeal MM, Sestak K, Choi AH, Basu M, Cole MJ, Aye PP, Bohm RP, Ward RL. 2005. Development of a rotavirus shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. J Virol 79:944–954.
- Mehnert DU, Stewien KE. 1993. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. App Environ Microbiol 59:140-143.
- Min BS, Noh YJ, Shin JH, Baek SY, Kim JO, Min KI, Ryu SR, Kim BG, Kim DK, Lee SH, Min HK, Ahn BY, Park SN. 2004. Surveillance study (2000 to 2001) of G- and P- type human rotaviruses circulating in South Korea. J Clin Microbiol 42:4297-4299.
- Mohan KV, Glass RI, Atreya CD. 2006. Comparative molecular characterization of gene segment 11-derived NSP6 from lamb rotavirus LLR strain used as a human vaccine in China. Biologicals 34:265-272.
- Mori Y, Borgan MA, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N. 2002. Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from Group A avian rotaviruses. Virus Res 89:145-151.
- Mukherjee A, Chattopadhyay S, Bagchi P, Dutta D, Singh NB, Arora R, Parashar UD, Gentsch JR, Chawla-Sarkar M. 2010. Surveillance and molecular characterization of rotavirus strains circulating in Manipur, north-eastern India: increasing prevalence of emerging G12 strains. Infect Genet Evol 10:311-320.

Murphy TV, Smith PJ, Gargiullo PM, Schwartz B. 2003. The first rotavirus vaccine and

intussusception: epidemiological studies and policy decisions. J Infect Dis 187:1309-1313.

- Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N, Katsushima N, Nakagomi O. 1988. Occurrence of changes in human rotavirus serotypes with concurrent changes in genomic RNA electropherotypes. J Clin Microbiol 26:2586-2592.
- Nakagomi T, Ohshima A, Akatani K, Ikegami N, Katsushima N, Nakagomi O. 1990. Isolation and molecular characterization of a serotype 9 human rotavirus strain. Microbiol Immunol 34:77-82.
- Nakagomi T, Horie Y, Koshimura Y, Greenberg HB, Nakagomi O. 1999. Isolation of a human rotavirus strain with a super-short RNA pattern and a new P2 subtype. J Clin Microbiol 37:1213-1216.
- Ni Y, Kemp MC. 1992. Strain-specific selection of genome segments in avian reovirus coinfections. J Gen Virol 73:3107–3113.
- Nielsen NM, Eugen-Otsen J, Aaby P, Mølbak K, Rodrigues A, Fischer TK. 2005. Characterisation of rotavirus strains among hospitalized and non-hospitalised children in Guinea-Bissau, 2002. A high frequency of mixed infections with serotype G8. J Clin Virol 34:13-21.
- Nishikawa K, Hoshino Y, Taniguchi K, Green KY, Greenberg HB, Kapikian AZ, Chanock RM, Gorziglia M. 1989. Rotavirus neutralization epitopes of serotype 3 strains. Virology 171:503-515.
- Offit PA, Shaw RD, Greenberg HB. 1986. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. J Virol 58:700-703.
- Oka T, Nakagomi T, Nakagomi O. 2000. Apparent re-emergence of serotype G9 in
- 1995 among rotaviruses recovered from Japanese children hospitalized with acute gastroenteritis. Microbiol Immunol 44:957-961.
- Okada J, Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. 1998. Preferential selection of heterologous G3-VP7 gene in the genetic background of simian rotavirus SA11

detected by using a homotypic single-VP7 gene-substitution reassortants. Antiviral Res 38:15–24.

- O'Mahony J, Foley B, Morgan S, Morgan JG, Hill C. 1999. VP4 and VP7 genotyping of rotavirus samples recovered from infected children in Ireland over a 3-year period. J Clin Microbiol 37:1699-1703.
- O'Neill HJ, Russell JD, Wyatt DE, McCaughey C, Coyle PV. 1996. Isolation of viruses from clinical specimens in microtitre plates with cells inoculated in suspension. J Virol Methods 62:169-178.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1976. Treatment and prevention of dehydration in diarrheal diseases. A guide for use at the primary level. Geneva: World Health Organization.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1996. The World Health report 1996: fighting disease, fostering development. Report of the Director-General. Geneva: World Health Organization.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2003. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. WHO 03.03
- Page NA, Steele AD. 2004. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from South Africa from 1984 to 1998. J Med Virol 72:320-327.
- Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Spencer E. 2004. Replication and transcription of the rotavirus genome. Curr Pharm Des 10:3769-3777.
- Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. 1998. Rotavirus. Emerg Infect Dis 4:561-570.
- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. Emerg Infect Dis 9:565-572.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. Emerg Infect Dis 12:304-306.

Parez N. 2008. Rotavirus gastroenteritis: why to back up the development of new

vaccines? Comparative immunology. Microbiol Infect Dis 31:253-269.

- Parra GI, Bok K, Martínez V, Russomando G, Gómez J. 2005. Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. J Med Virol 77:579-586.
- Parra GI, Espínola EE, Amarilla AA, Stupka J, Martinez M, Zunini M, Galeano ME, Gomes K, Russomando G, Arbiza J. 2007. Diversity of group A rotavirus strains circulating in Paraguay from 2002 to 2005: detection of an atypical G1 in South America. J Clin Virol 40:135-141.
- Payment P, Ayache R, Trudel M. 1993. A survey of enteric viruses in domestic sewage. Can J Microbiol 1:111-119.
- Perry RP, La Torre J, Kelly DE, Greenberg JR. 1972. On the lability of poly(A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. Biochim Biophys Acta 262:220-226.
- Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. 2007a. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. J Virol 81:4645-4653.
- Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. 2007b. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. Infect Genet Evol 7:656-663.
- Piec TL, Palombo EA. 1998. Sequence comparison of the VP7 of serotype G2 rotaviruses from diverse geographical locations. DNA Seq 9:369-373.
- Pongsuwanna Y, Guntapong R, Chiwakul M, Tacharoenmuang R, Onvimala N, Wakuda M, Kobayashi N, Taniguchi K. 2002. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. J Clin Microbiol 40:1390-1394.
- Rahman M, Matthijnssens J, Nahar S, Podder G, Sack DA, Azim T, Van Ranst M. 2005a. Characterization of a novel P[25],G11 human group a rotavirus. J Clin Microbiol 43:3208-3212.
- Rahman M, Matthijnssens J, Goegebuer T, De Leener K, Vanderwegen L, van der Donck I, Van Hoovels L, De Vos S, Azim T, Van Ranst M. 2005b. Predominance of

rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999-2003. J Clin Virol 33:1-6.

- Ramachandran M, Das BK, Vij A, Kumar R, Bhambal SS, Kesari N, Rawat H, Bahl L, Thakur S, Woods PA, Glass RI, Bhan MK, Gentsch JR. 1996. Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India. J Clin Microbiol 34:436-439.
- Reidy N, O'Halloran F, Fanning S, Cryan B, O'Shea H. 2005. Emergence of G3 and G9 rotavirus and increased incidence of mixed infections in the southern region of Ireland 2001–2004. J Med Virol 77:571–578.
- Rosen BI, Parwani AV, Lopez S, Flores J, Saif LJ. 1994. Serotypic differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. J Clin Microbiol 32:311-317.
- Ruggeri FM, Greenberg HB. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8* neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. J Virol 65:2211-2219.
- Ruiz AM, Lopez IV, Lopez S, Espejo RT, Arias CF. 1988. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. J Virol 62:4331-4336.
- Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, y colab. 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. N Engl J Med 354:11-22.
- Sabara M, Gilchrist JE, Hudson GR, Babiuk LA. 1985. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. J Virol 53:58-66.
- Sandino AM, Jashes M, Faundez G, Spencer E. 1986. Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. J Virol 60:797-802.
- Sánchez-Fauquier A, Wilhelmi I, Colomina J, Cubero E, Roman E. 2004. Diversity of group A human rotavirus types circulating over a 4-year period in Madrid, Spain. J Clin Microbiol 42:1609-1613.

- Sánchez-Fauquier A, Montero V, Moreno S, Solé M, Colomina J, Iturriza-Gomara M, Revilla A, Wilhelmi I, Gray J; Gegavi/VIGESS-Net Group. 2006. Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain. Emerg Infect Dis 12:1536-1541.
- Santos N, Volotão EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. 2005. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. J Clin Microbiol 43:4064-4069.
- Santos N, Hoshino Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. Rev Med Virol 15:29-56.
- Sedmak G, Bina D, MacDonald J. 2003. Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected August 1994 to December 2002. App Environ Microbiol 69:7181.7187.
- Sellwood J, Dadswell J, Slade J. 1981. Viruses in sewage as an indicator or their presence in the community. J Hyg (London) 86:217-225.
- Serravalle K, Santos N, Sardi SI, Silva SP, Ribeiro Junior Hda C, Mattos AP, Campos GS. 2007. Molecular characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Salvador, Bahia, Brazil. Braz J Infect Dis 11:35-39.
- Schumann T, Hotzel H, Otto P, Johne R. 2009. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. Virology 386:334-343.
- Shen S, Burke B, Desselberger U. 1994. Rearrangement of the VP6 gene of a group A rotavirus in combination with a point mutation affecting trimer stability. J Virol 68:1682-1688.
- Shinozaki K, Okada M, Nagashima S, Kaiho I, Taniguchi K. 2004. Characterization of human rotavirus strains with G12 and P[9] detected in Japan. J Med Virol 73:612-616.
- Stupka JA, Parra Gi, Gomez J, Arbiza J. 2007. Detection of human rotavirus G9P[8] strains circulating in Argentina: phylogenetic analysis of VP7 and NSP4 genes. J Med

Virol 79:838-842.

- Stupka JA, Carvalho P, Amarilla AA, Massana M, Parra GI; Argentinean National Surveillance Network for Diarrheas. 2009. National Rotavirus Surveillance in Argentina: high incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics. Infect Genet Evol 9:1225-1231.
- Svensson L, Sheshberadaran H, Vene S, Norrby E, Grandien M, Wadell G. 1987. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. J Gen Virol 68:643-651.
- Svensson L, Dormitzer PR, von Bonsdorff CH, Maunula L, Greenber HB. 1994. Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly. J Virol 68:5204-5215.
- Taniguchi K, Urasawa S, Urasawa T. 1985. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. J Gen Virol 66:1045-1053.
- Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Gorziglia M, Urasawa S. 1990. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. J Virol 64:5640-5644.
- Timenetsky M, Santos N, Gouvea V. 1994. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. J Clin Microbiol 32:2622-2624.
- Tosser G, Labb M, Brémont M, Cohen J. 1992. Expression of the major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses. J Virol 66:5825-5831.
- Trinh QD, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Li Y, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. 2007. Sequence analysis of the VP7 gene of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in the context of changing distribution of rotavirus G-types. J Med Virol 79:1009-1016.
- Trojnar E, Otto P, Johne R. 2009. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian

strains.Virology 386:325-333.

- Unicomb LE, Podder G, Gentsch JR, Woods PA, Hasan KZ, Faruque AS, Albert MJ, Glass RI. 1999. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. J Clin Microbiol 37:1885-1891.
- Ursu K, Kisfali P, Rigó D, Ivanics E, Erdélyi K, Dán A, Melegh B, Martella V, Bányai K. 2009. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. Arch Virol 154:1365-1369.
- Urasawa S, Hasegawa A, Urasawa T, Taniguchi K, Wakasugi F, Suzuki H, Inouye S, Pongprot B, Supawadee J, Suprasert S, y colab. 1992. Antigenic and genetic analyses of human rotaviruses in Chiang Mai, Thailand: evidence for a close relationship between human and animal rotaviruses. J Infect Dis 166:227-234.
- van Doorn LJ, Kleter B, Hoefnagel E, Stainier I, Poliszczak A, Colau B, Quint W. 2009. Detection and genotyping of human rotavirus VP4 and VP7 genes by reverse transcriptase PCR and reverse hybridization. J Clin Microbiol 47:2704-2712.
- Van Zyl WB, Page PA, Grabow WOK, Steele AD, Taylor MB. 2006. Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. Appl Environ Microbiol 72:4554-4560.
- Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, y colab. 2006. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. N Engl J Med 354:23-33.
- Villena C, El-Senousy WM, Abad FX, Pintó RM, Bosch A. 2003a. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. Appl Environ Microbiol. 69:3919-3923.
- Villena C. 2003b. Vigilancia ambiental molecular de rotavirus grupo A humanos. Tesis Doctoral. Facultad de Barcelona. España.
- Volotão EM, Soares CC, Maranhão AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. 2006. 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 78:263-272.

- Ward RL, Knowlton DR, Hurst PL. 1988. Reassortant formation and selection following coinfection of cultured cells with subgroup 2 human rotaviruses. J Gen Virol 69:149-162.
- Ward RL, Knowlton DR. 1989. Genotypic selection following coinfection of cultured cells with subgroup 1 and subgroup 2 human rotaviruses. J Gen Virol 70:1691-1699.
- Widdowson MA, van Doornum GJ, van der Poel WH, de Boer AS, Mahdi U, Koopmans M. 2000. Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea. Lancet 356:1161-1162.
- Xin KQ, Morikawa S, Fang ZY, Mukoyama A, Okuda K, Ushijima H. 1993. Genetic variation in VP7 gene of human rotavirus serotype 1 (G1 type) isolated in Japan and China. Virology 197:813-816.
- Xu Z, Woode GN. 1994. Studies on the influence of the VP7 gene on rotavirus replication. Virology 198:394-398.
- Zar JH. 1996. Z-test for comparing two proportions. In Biostatistical analysis, 3rd ed. Electronic Technical Publishing, NJ.
- Zárate S, Espinosa R, Romero P, Méndez E, Arias CF, López S. 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. J Virol 74:593-599.
- Zizdić S, Ridjanović Z, Masić I. 1992. Newly discovered rotavirus serotypes in 4 years of collecting samples from children with diarrheal syndromes. Med Arh 46:15-18.

Publicaciones y comunicaciones derivadas de esta tesis

Trabajos publicados en revistas científicas internacionales

- Barril P, Martínez L, Giordano M, Castello A, Rota R, Isa M, Masachessi G, Ferreyra L, Glikmann G, Nates S. Detection of group A human rotavirus G9 genotype circulating in Cordoba, Argentina, as early as 1980. 2006. J Med Virol 78:1113-1118.
- 2. Barril PA, Giordano MO, Masachessi G, Isa MB, Castello AA, Glikmann G, Nates SV. Rotavirus VP7-gene selection during coinfections in CaCo-2 cells. 2009. Infect Genet

Evol 9:210-215.

 Barril PA, Giordano MO, Isa MB, Masachessi G, Castello AA, Glikmann G, Nates SV. Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. 2010. J Med Virol 82:1277-1281.

Trabajo en proceso de escritura

 Barril PA, Giordano MO, Martínez LC, Masachessi G, Isa MB, Ferreyra LJ, Glikmann G, Nates SV. Heterogeneity and temporal evolution of G1 rotavirus genotype in Córdoba, Argentina, during the period 1979-2009.

Comunicaciones en jornadas, simposios y/o congresos

- Barril P, Martínez L, Giordano M, Castello A, Isa MB, Masachessi G, Ferreyra L, Glikmann G, Nates S. 2005. Distribución de genotipos G de rotavirus humano grupo A circulantes en Córdoba, Argentina, entre 1979 y 2003. VIII Congreso Argentino de Virología. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.
- Barril PA, Martinez LC, Giordano MO, Isa MB, Masachessi G, Ferreyra LJ, Castello AA, Glikmann G, Nates SV. 2006. Influencia metodológica en la detección de infecciones por rotavirus de G-tipo mixtas. XVI Jornadas Científicas Anuales de la Sociedad Argentina de Virología. Sociedad Argentina de Virología. Córdoba, Argentina.
- 3. Barril PA, Giordano MO, Martinez LC, Masachessi G, Isa MB, Ferreyra LJ, Castello AA, Glikmann G, Nates SV. 2007. Alta frecuencia de infecciones por rotavirus G- tipo mixtas en Córdoba, Argentina. XV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM. Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.
- Barril PA, Giordano MO, Isa MB, Masachessi G, Ferreyra LJ, Glikmann G, Nates SV. 2007. Fitness de G-tipos en co-infecciones por rotavirus. XXVII Jornadas Científicas Anuales de la Sociedad Argentina de Virología. Sociedad Argentina de Virología. Córdoba, Argentina.
- Barril PA, Giordano MO, Masachessi G, Isa MB, Ferreyra LJ, Glikmann G, Nates SV. 2007. Historia natural de la circulación de los rotavirus humanos grupo A en la naturaleza. VIII Jornadas de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- 6. Barril PA, Giordano MO, Isa MB, Masachessi G, Righetti M, Glikmann G, Nates SV.

2008. Monitoreo poblacional de G tipos de rotavirus a partir de efluentes cloacales y muestras clínicas. Córdoba, Argentina. IX Congreso Argentino de Virología. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.

- Barril PA, Isa, MB, Ferreyra LJ, Giordano MO, Masachessi G, Martinez LC, Ibarra G, Nates SV. 2009. Detección de rotavirus en aguas del Río Suquía que atraviesan la Ciudad de Córdoba. X Jornadas de Investigación Científica. Il Jornadas de Virología. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- 8. Barril PA, Giordano MO, Ferreyra LJ, Isa, MB, Masachessi G, Martinez LC, Castello AA, Glikmann G, Nates SV. 2009. Cepas de rotavirus de genotipo G9 linaje III circulan en Córdoba, Argentina, desde el año 1980. XXIX Jornadas Científicas Anuales de la Sociedad Argentina de Virología. Sociedad Argentina de Virología. Córdoba, Argentina.
- Barril PA, Isa, MB, Ferreyra LJ, Giordano MO, Masachessi G, Martinez LC, Macedo R, Ibarra G, Nates SV. 2010. Occurrence of enteric viruses in influent, effluent and river waters downstream of Córdoba City's wastewater treatment plant. Argentina, 2009. I Simposio Latinoamericano de Virología Ambiental. Instituto Oswaldo Cruz. Fiocruz. Río de Janeiro, Brasil.
- Barril P, Giordano M, Isa MB, Martínez L, Masachessi G, Ferreyra L, Glikmann G, Nates S. 2010. Heterogeneidad y dinámica de evolución temporal del genotipo G1 de rotavirus grupo A en Córdoba, Argentina. XXX Jornadas Científicas Anuales de la Sociedad Argentina de Virología. Sociedad Argentina de Virología. Córdoba, Argentina.

Para citar este documento

Patricia Angelica Barril. (2015). Epidemiología molecular y filogenia intragenotípica de cepas de rotavirus humano grupo a circulantes en Córdoba, Argentina, durante el período 1979-2006 (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina: Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto. Disponible en: http://ridaa.demo.unq.edu.ar