

Universidad Nacional de San Martín
Instituto de Investigaciones Tecnológicas
Maestría en Microbiología Molecular



TESIS DE MAESTRIA

CARACTERIZACION MOLECULAR DE ROTAVIRUS
GRUPO A EN ARGENTINA

AUTOR: BIOQ. JUAN A. STUPKA

DIRECTOR: DR. GABRIEL I. PARRA

Año : 2014

Laboratorio de Gastroenteritis Virales. Departamento de Virología
INEI, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

A Camila y Julieta

Por lo demás, el problema central es irresoluble: la enumeración, siquiera parcial, de un conjunto infinito. En ese instante gigantesco, he visto millones de actos...ninguno me asombro como el hecho de que todos ocuparan el mismo punto, sin superposición y sin transparencia. Lo que vieron mis ojos fue simultaneo: lo que transcribiré, sucesivo, porque el lenguaje lo es. Algo sin embargo, recogeré.

— *El Aleph*. Jorge L. Borges (1899-1986)

Patterns and structure. Everywhere we look we see them. What appears random and chaotic also has order. And on Earth much of the order is linked to interrelationships that drive constant change. Cycles and rhythms. Pulses and flows...process and connection. Nature flows through webs of structure and shifting time... Natural rhythms.

—Payson R. Stevens (1946-)

INDICE

	pagina
1. INTRODUCCION.....	10
1.1. Historia.....	11
1.2. Epidemiologia.....	11
1.2.1. Impacto de las infecciones gastrointestinales.....	11
1.2.2. Impacto de la infección por rotavirus.....	12
1.3. Características generales de la enfermedad por Rotavirus.....	13
1.4. Características del virus.....	14
1.4.1. Estructura Viral.....	14
1.4.2. Proteína VP7.....	15
1.4.3. Proteína VP4.....	18
1.4.4. Ciclo Viral.....	19
1.4.4.1. Pegado y desnudamiento viral.....	19
1.4.4.2. Replicación genómica y ensamblado del core.....	21
1.4.4.3. Regulación del ensamblado de la cápside externa.....	21
1.5. Clasificación.....	22
1.6. Patogenia e inmunidad.....	24
1.7. Vacunas Antirotavirus.....	25
1.7.1. Estrategias de desarrollo.....	26
1.7.2. Experiencia con Rotashield®.....	26
1.7.3. Experiencia con la vacuna pentavalente Rotateq® de MSD.....	27
1.7.4. Experiencia con Rotarix® de GSK.....	27
1.7.5. Implementación.....	28
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	30
2.1. Hipótesis.....	31
2.2. Objetivo General.....	31
2.3. Objetivos Específicos.....	31
3. MATERIALES Y METODOS.....	32
3.1. Muestras estudiadas.....	33
3.2. Extracción del ARN viral.....	33
3.2.1. Método de TRIZOL®.....	33
3.2.2. Método de Boom.....	34
3.3. Caracterización molecular del gen de la VP7, VP4 y NSP4.....	35

3.3.1 Retrotranscripción, amplificación y genotipificación del gen de la proteína VP7: Determinación del G-tipo.	36
3.3.2. Retrotranscripción, amplificación y genotipificación del gen del proteína VP4 : Determinación del P-tipo.	40
3.3.3. Retrotranscripción, amplificación y genotipificación del gen de la NSP4.....	41
3.4. Obtención y análisis de las secuencias	42
3.5. Análisis estructural de la proteína VP7.....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Caracterización Molecular de los rotavirus en Argentina.	45
4.1.1. Resultados generales.....	45
4.1.2. Distribución temporal de los genotipos de Rotavirus: 1996-2005.	47
4.2. Emergencia del G9 en Argentina.	50
4.2.1. Resultados a partir del gen de la VP7.	50
4.2.1.1. Variación molecular del gen codificante para la proteína VP7: Análisis Filogenético de G9.....	50
4.2.1.2. Analisis de la Similaridad (%) de las cepas G9.....	52
4.2.1.3. Análisis de las secuencias de aminoácidos de las cepas G9.....	54
4.2.2. Resultados a partir del gen de la NSP4.....	57
4.2.2.1. Analisis Filogenético.....	57
4.2.2.2. Analisis de similaridad (%) del gen de la NSP4.....	59
4.2.3. Resultados de los perfiles de electroferotipos de las cepas G9.....	60
4.2.4. Origen de la cepa G9P[8] con alta prevalencia en Argentina.....	60
4.3. Epidemiología Molecular de Rotavirus G1 en Argentina.....	63
4.3.1. Resultados a partir del gen de la VP7.....	63
4.3.1.1 Analisis filogenético.....	63
4.3.1.2. Porcentaje de similaridad intra e interlinajes de las cepas G1.....	65
4.3.1.3. Sublinajes de Rotavirus G1 de Argentina.....	66
4.3.1.4. Análisis de variantes o alelos intra sublinaje G1-IIb.	67
4.3.1.5. Diferencia Aminoacídicas entre las cepas G1. Analisis de las mutaciones.....	69
4.3.2. Resultados en base la gen de la VP4.....	73
4.3.2.1. Analisis filogenético del gen de la VP4.....	73
4.3.3. Asociacion de linajes/sublinajes de G1 y P[8] en las cepas circulantes.....	75

4.4. Analisis comparativo del Rotavirus G1 en Argentina y las cepas vacunales.....	77
4.4.1. Analisis Filogenético.....	77
4.4.2. Analisis basados en la similaridad (%).....	77
4.4.3. Analisis de las diferencias aminoacídicas de los linajes/sublinajes G1 argentinos con las cepas vacunales.....	78
4.4.4. Diferencias entre las regiones antigénicas neutralizantes de Rotavirus G1 en argentina y las cepas vacunales.....	80
4.4.5. Analisis estructural de la Proteína VP7.....	82
5. DISCUSION.....	84
5.1. Genotipos de Rotavirus en Argentina.....	85
5.2. Emergencia del Genotipo G9 en Argentina.	87
5.2.1. Origen de la cepa G9 emergente.....	89
5.3. Variabilidad intragénica de las cepas G1 circulantes en Argentina.....	92
5.4. Relacion antigénica entre las cepas G1 Argentinas y las vacunales.	94
6. CONCLUSIONES	98
7. BIBLIOGRAFIA.....	101
8. AGRADECIMIENTOS.....	116
9. PRODUCTOS RELACIONADOS CON ESTA TESIS.....	117

Índice de Figuras y Tablas

Figuras:

Figura 1. Microscopia electrónica de la partícula viral de Rotavirus.....	11
Figura 2. Mortalidad por Rotavirus 1999-2009. Estimacion Global.....	13
Figura 3. Genoma y estructura viral.....	14
Figura 4. (A) Esquema de la proteína VP7. (B) Modelado estructural del trímero.....	16
Figura 5. Modelado estructural de la proteína VP7. Epitopes antigénicos.....	17
Figura 6. Extremo amino terminal de la proteína VP7. Funciones.....	18
Figura 7. Modelado estructural de la proteína VP4. Epitopes antigénicos.....	19
Figura 8. Ciclo viral.	20
Figura 9. (A). Esquema de la PCR anidada: Determinación de los G tipos. (B) Electroforesis de productos de PCR: Caracterización de G tipos. (C) Esquema de PCR anidada: Determinación de P tipos (D) Electroforesis de productos de PCR: Caracterización de P tipos.....	39
Figura 10. G tipos de Rotavirus en Argentinas: 1996-2005.....	46
Figura 11. Distribución temporal de los G tipos de Rotavirus en Argentina. Periodo: 1996-2005.	49
Figura 12: Arbol filogenético de Rotavirus G9 en Argentina.....	51
Figura 13. Alineamiento aminoacídico de la proteína VP7.....	55 y 56
Figura 14. Arbol filogenético del gen de la NSP4.....	58
Figura 15. Electroferotipos de Rotavirus G9 detectados en Argentina.....	60
Figura 16. Prevalencia de Rotavirus G9. 1996-2008.....	61
Figura 17. Circulación de Rotavirus G9.	62
Figura 18. Arbol filogenético de Rotavirus G1 en Argentina, 1996-2004.....	64
Figura 19. Mutaciones Aminoacídicas en la proteína VP7 en las cepas G1 argentinas.....	70 y 71
Figura 20. Arbol filogenético de VP4 de Rotavirus G1 en Argentina.	74
Figura 21. Prevalencia (%) y distribución temporal de Linajes/sublinajes de las cepas G1P[8] en el periodo 1996-2004.....	76
Figura 22. Proteína VP7 de las cepas vacunales Rotarix (A) y RotaTeq (B) Cambios aminoacídico en los sitios antigénicos en las cepas G1 argentinas.....	82 y 83

Tablas:

Tabla 1. Oligonucleotidos utilizados para determinar el genotipo P (gen VP4).....	35
Tabla 2. Oligonucleotidos utilizados para determinar el genotipo G (gen VP7)	35

Tabla 3. Oligonucleotidos utilizados para secuenciar los genes de NSP4.....	36
Tabla 4. Caracterización Molecular de los Rotavirus en Argentina: 1996-2005.....	45
Tabla 5. Infecciones Mixtas: 1996-2005.....	46
Tabla 6. Combinaciones Inusuales de G y P genotipos: 1996-2005.....	47
Tabla 7. Distribución Anual de G y P genotipos: 1996-2005.....	48
Tabla 8. Similitud (%) del gen de la VP7 de la cepas G9 Argentinas y su relacion con los linajes de este genotipo.....	53
Tabla 9. Distancias nucleotídica (intra e intergrupo) del gen de la VP7.....	54
Tabla 10. Similitud nucleotídica (%) del gen de la NSP4 entre las cepas G9 Argentinas y los linajes descriptos.....	59
Tabla 11. Porcentaje de similitud nucleotídica entre linajes de Rotavirus G1.....	65
Tabla 12. Porcentaje de similitud con las cepas referenciales de sublinajes.....	66
Tabla 13. Porcentaje de similitud intra e inter sublinajes de las cepas G1-II Argentinas.....	67
Tabla 14. Porcentaje de similitud intra e inter variantes del sublinaje G1-IIb circulantes en Argentina.....	68
Tabla 15. Sustituciones aminoacídicas en la VP7 de los linajes/sublinajes de las cepas G1 Argentinas.....	72
Tabla 16. Asociacion de linajes/subliajes de VP7 y VP8* de las cepas G1P[8] circulantes en Argentina.....	75
Tabla 17. Asociacion de linajes/subliajes/variantes de VP7 y VP8* de las cepas G1P[8] circulantes en Argentina.....	76
Tabla 18. Porcentaje de Similitud entre las cepas G1 argentinas y las vacunales.....	77
Tabla 19. Diferencias aminoacídicas entre las proteínas VP7 de los linajes/sublinajes G1 y las cepas vacunales.....	79
Tabla 20. Residuos aminoacídicos de los epitopes neutralizantes de las proteínas VP7 (A) y VP4 (B). Diferencias entre las cepas G1P[8] argentinas y las vacunales.....	81

Definiciones y abreviaturas utilizadas:

ADN: Acido desoxirribonucleico

ARN: Acido ribonucleico

RVA: Rotavirus grupo A

G Genotipo: Clasificación de RVA basada en el gen codificante para la proteína de cápside externa VP7 y la misma implica la realización de técnicas moleculares. Esta terminología es equivalente a la denominación de G tipos y es utilizada para diferenciarse de la clasificación en “*serotipos*” en la cual se utilizan reacciones o técnicas de seroneutralización.

P Genotipo: Clasificación de RVA basada en el gen codificante para la proteína de cápside externa VP4, realizada mediante técnicas moleculares. Los Ptipos son nombrados por un número arábigo entre corchetes.

Electroferotipo o E tipo: Patrón de migración electroforético de los segmentos del genoma viral en geles de poliacrilamida. Se categorizan en: largos, cortos, súper cortos y atípicos

PCR: del inglés, Reacción en cadena de la Polimerasa.

RT-PCR: Retrotranscripción del ARN viral seguido de una PCR.

SNVS: Sistema Nacional de Vigilancia en Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

MF: Materia Fecal.

SDA: Síndrome diarreico agudo.

1. INTRODUCCION

1.1 Historia

Hasta los años '70 y a pesar de ser la primera causa de mortalidad infantil, la mayoría de los casos de diarrea aguda en niños permanecían sin diagnóstico etiológico (Estes and Kapikian 2007). Este panorama cambia paradigmáticamente cuando en 1973 Bishop y col observaron, mediante microscopía electrónica en un corte de duodeno, una partícula de 70 nm a la cual denominaron rotavirus por su semejanza a una rueda de carro (del latín rota=rueda, Figura 1) (Bishop, Davidson et al. 1973). Durante los años siguientes, rotavirus sería reconocido como el principal agente causal de diarrea aguda en niños a nivel mundial.

Figura 1. Microscopía electrónica de la partícula viral de Rotavirus

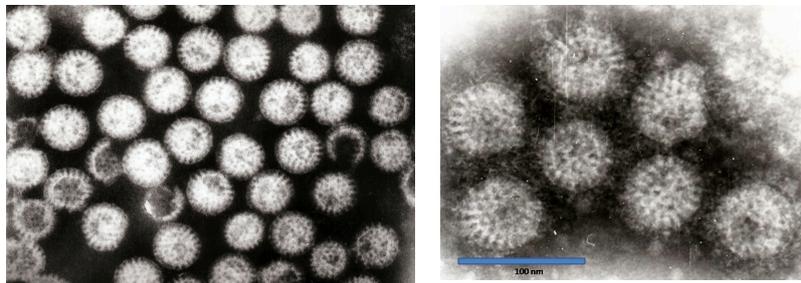


Figura adaptada de Estes, 2013.

1.2. Epidemiología

1.2.1. Impacto de las infecciones gastrointestinales en el nuevo milenio.

Las infecciones gastrointestinales continúan siendo una significativa causa de morbimortalidad en el mundo. La diarrea aguda representa la segunda entidad clínica más común después de las infecciones respiratorias y si bien, durante las últimas décadas se ha registrado una progresiva declinación de su mortalidad, la incidencia de infección se ha mantenido relativamente constante en los últimos 20 años (Fischer Walker, Perin et al. 2012). Se estima que en los años 2010 y 2011 ocurrieron anualmente alrededor de 1.700 millones de episodios de diarreas en menores de 5 años, de los cuales 36 millones progresaron a casos severos (Walker, Rudan et al. 2013). Aproximadamente 700.000 a 1 millón de niños mueren por año a causa de un síndrome diarreico agudo (SDA), muertes que se concentran principalmente en los países más pobres y en menores de 1 año de edad (Liu, Johnson et al. 2012; Walker, Aryee et al. 2012).

En la Argentina, de aproximadamente 1 millón de casos de SDA notificados anualmente al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud (SNVS), el 50% ocurren en menores de 5 años. Por otro lado, su distribución no es homogénea en el país, donde las mayores tasas de incidencia son registradas en el noroeste argentino (MSAL 2011). El SDA origina alrededor del 10% de las internaciones en la primera infancia y 100 muertes promedio al año, representando el 1,2%

de las defunciones para este grupo etario. En la región norte esta proporción se duplica (2,1%) en relación con la media nacional y casi llega a triplicar el porcentaje observado en las regiones centro y sur (0,8%) (MSAL 2011; MSAL 2012).

Actualmente se reconocen más de 20 microorganismos como causantes de SDA, considerando bacterias, virus y parásitos (O'Ryan, Prado et al. 2005). En la medida que las condiciones higiénico sanitarias de un país mejoran disminuye la diarrea aguda asociada a bacterias y parásitos. Esto último no sucede los enteropatógenos virales, cuyas tasas de infección no resultan afectadas por este tipo de intervenciones (Velazquez, Garcia-Lozano et al. 2004; Estes and Kapikian 2007).

1.2.2. Impacto de la infección por rotavirus

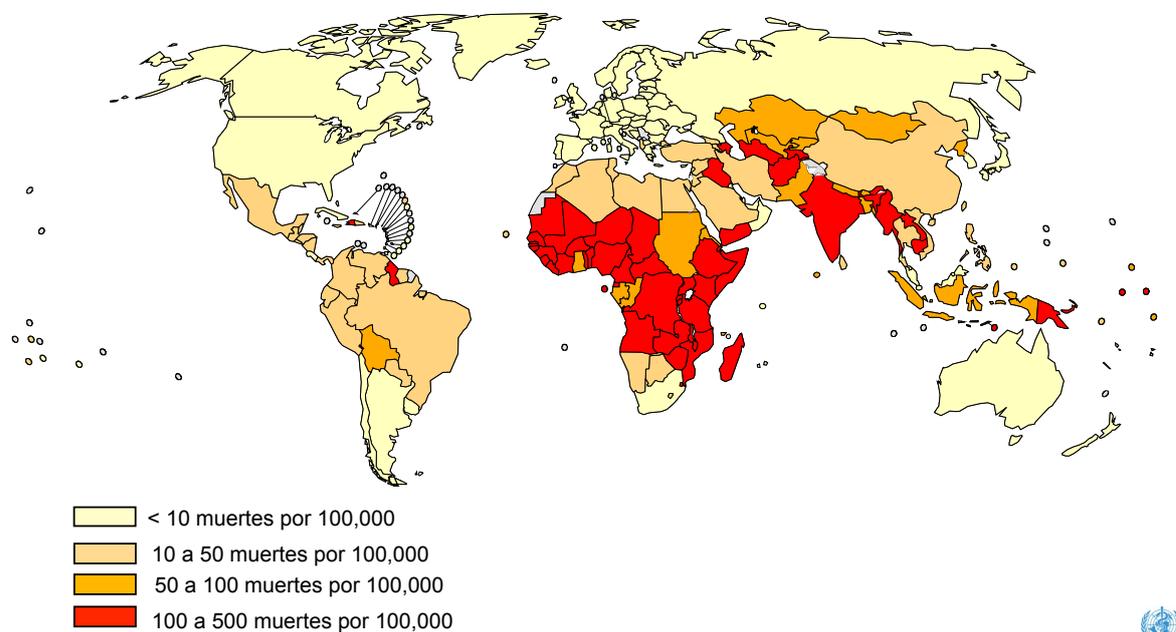
Rotavirus es el principal agente productor de diarrea aguda infantil a nivel mundial (Estes and Kapikian 2007; Dennehy 2011). Afecta anualmente a 110 millones de niños, de los cuales 2 millones requieren hospitalización y se calcula que las muertes por este agente superan los 450.000 casos, representando el 10% de las muertes prevenibles de la infancia (Gouvea, Glass et al. 1990; Parashar, Burton et al. 2009).

La tasa de infección por rotavirus es similar entre los diferentes países, así la infección por este virus no es un indicador del nivel sanitario de una población (Velazquez, Garcia-Lozano et al. 2004). Por el contrario, la mortalidad de la diarrea por rotavirus está fuertemente asociada con el nivel de desarrollo de un país. El 86% de las muertes atribuibles a este virus se concentran en los países más pobres (Figura 2). En los países desarrollados la enfermedad por rotavirus tiene un importante impacto económico, relacionado a los costos directos al sistema de salud e indirectos a la sociedad, pero en los países en desarrollo, a la problemática anterior, se le suma la mortalidad asociada a esta infección (Malek, Curns et al. 2006; Parashar, Burton et al. 2009).

En un reciente estudio que analizó la información provenientes del SNVS y la Dirección de Estadística e Información en Salud (DEIS) en el período 2009-2011, se estimó para nuestro país alrededor de 150.000 casos de diarrea, 15.000 internaciones y 30 muertes anuales en menores de 5 años a causa de este enteropatógeno.

La prevalencia de diarrea aguda por rotavirus, en el mismo grupo etario, es de alrededor del 30% destacando la importancia de este virus como agente causal de diarrea aguda infantil en nuestro país (Degiuseppe, Giovacchini et al. 2013).

Figura 2. **Estimacion Global de la Mortalidad por Rotavirus 1999-2009 (Fuente OMS).**



Fuente: WHO/IVB, 2009



1.3. Características generales de la enfermedad por Rotavirus

Después de un corto periodo de incubación de 24 a 48hs, la enfermedad por rotavirus se manifiesta con síntomas de diarrea acuosa, vómitos, fiebre y dolor abdominal. Los casos mas graves presentan diferentes grados de deshidratación y acidosis metabólica, que pueden ocasionar la muerte del paciente (Estes and Kapikian 2007). La primoinfección ocurre generalmente durante los dos primeros años de vida y en ella se observan las formas mas graves de la enfermedad. En sucesivas infecciones, la inmunidad contra este virus se incrementa y los síntomas se manifiestan de manera mas leve (Velazquez, Matson et al. 1996; Velazquez 2009). Rotavirus puede infectar a jóvenes y adultos sin causar síntomas. Es común observar brotes de diarrea por rotavirus en lugares donde se concentran individuos susceptibles, siendo los ejemplos mas característicos las guarderías y salas de internaciones pediátricas (brotes intrahospitalarios) (Bruijning-Verhagen, Quach et al. 2012; Sidler, Haberthur et al. 2012). El virus se transmite por vía fecal-oral, principalmente a través de fómites y debido a su estabilidad en el medio ambiente, la transmisión también puede ocurrir a través de la ingestión de agua o comidas contaminadas. La resistencia a las condiciones ambientales, su capacidad para sobrevivir sobre superficies en diferentes condiciones y el gran numero de viriones excretados contribuyen a su diseminación (Estes and Kapikian 2007). La diarrea por

rotavirus presenta una marcada estacionalidad en climas templados, con picos de la enfermedad en los meses de otoño-invierno, cuando puede llegar a ser responsable del 80% de los episodios de diarrea en niños menores de tres años (Turcios, Curns et al. 2006; Bruijning-Verhagen, Sankatsing et al. 2012; Degiuseppe, Giovacchini et al. 2013). Es una enfermedad endémica debido a que el virus circula durante todo el año, y algunos autores plantean que los rotavirus circulantes en los meses de baja prevalencia, funcionan como reservorio para la aparición de nuevas cepas (Iturriza-Gomara, Isherwood et al. 2001; Parra 2009; Iturriza-Gomara, Dallman et al. 2011).

1.4. Características del virus

1.4.1. Estructura Viral.

Los Rotavirus presentan simetría icosaédrica y miden aproximadamente entre 75 y 100 nm de diámetro. Son virus no envueltos que poseen una triple cápside proteica que encierra un genoma compuesto por 11 segmentos de ácido ribonucleico bicatenario (ARNdc). El mismo codifica seis proteínas estructurales (VP1-4, 6 y 7) y cinco proteínas no estructurales (NSP1-5), denominadas con números crecientes de acuerdo al orden de migración de los genes en geles de poliacrilamida (PAGE) (Figura 3).

Figura 3. Genoma y estructura viral.

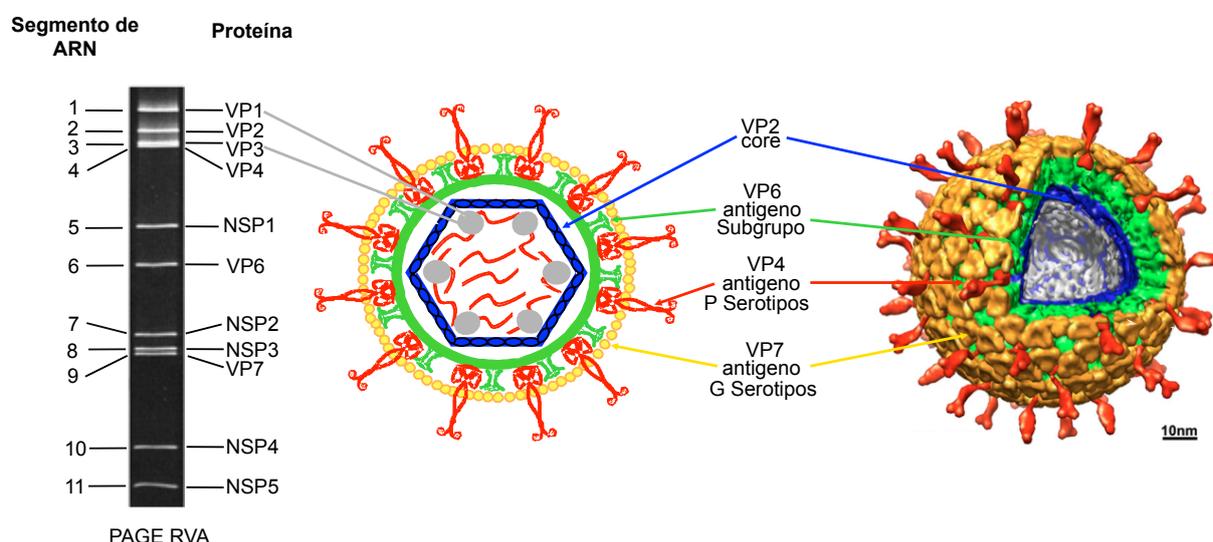


Figura adaptada de Estes, 2007

La capa más interna de la cápside forma el *core viral* (del inglés: núcleo o centro) compuesto por 120 copias de la proteína VP2 (120 KDa). Cinco dímeros de VP2 constituyen la unidad estructural del *core* y en cada una de ellas se sitúa un complejo de la VP1 (ARN polimerasa ARN dependiente: 125 KDa) y la VP3 (enzima que realiza el *capping* del ARN viral (del inglés:

adición del casquete o CAP al ARN, ver nota al pie de pagina) (Zhang, Settembre et al. 2008; Chen, Settembre et al. 2009; McClain, Settembre et al. 2010; Settembre, Chen et al. 2011).

Rodeando el core se encuentra la capa intermedia, compuesta por trímeros de la proteína VP6 y cuya unión con la VP2 actúan estabilizándolo. Es la capa mas gruesa de la cápside y la proteína mas abundante del virus (Mathieu, Petitpas et al. 2001). La cápside externa esta constituida por dos proteínas: VP7, que se dispone en trímeros sobre la porción superior de la VP6 formando una capa prácticamente continua y la VP4 que protruye a través de la VP7 formando 60 espículas constituidas por un trímero de VP4. Esta ultima proteína modula, a través de cambios conformacionales, la unión y posterior penetración del virus a la célula hospedadora (Figura 3). Debido a las implicancias biológicas de las proteínas de la cápside externa, las mismas serán descritas con un grado mayor de profundidad.

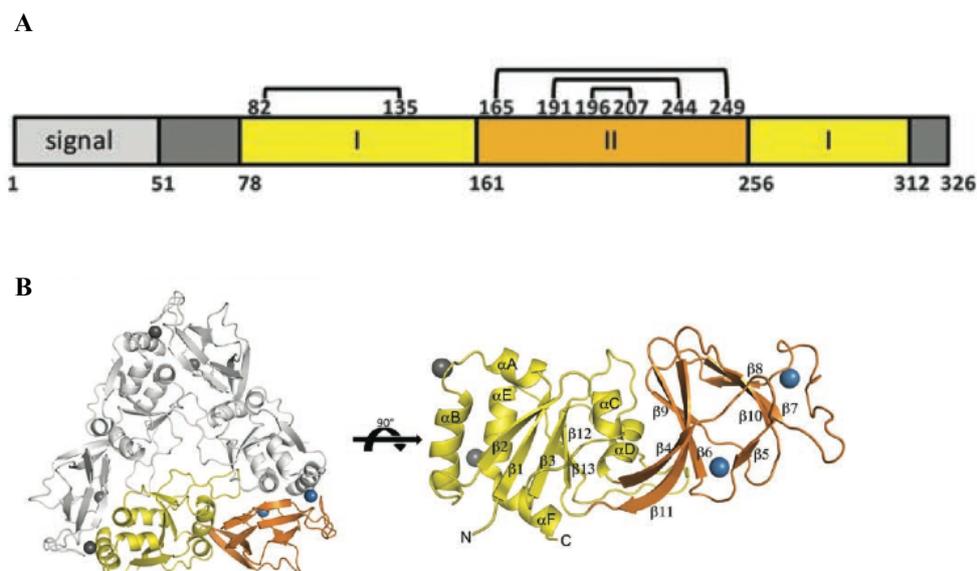
1.4.2. Proteína VP7

La proteína viral 7 (VP7), es la segunda proteína mas abundante en el virus y esta codificada por los genes 7, 8 o 9 según la cepa. El gen posee 1062 pares de bases (pb), que se traducen en una glicoproteína de 326 aminoácidos (aa). La proteína madura se forma a partir del aa 51, después de perder el péptido señal (Figura 4 A). Se han descripto nueve regiones variables a lo largo de su secuencia aminoacídica (VR1: aa 9-20, VR2: aa 25-32, VR3: aa 37-52, VR4: aa 65-76, VR5: aa 87-101, VR6: aa 120-132, VR7: aa 142-151, VR8: aa 209-225, VR9: aa 236-243). Contenidos en estas regiones variables fueron descriptos cuatro epitopes de neutralización o regiones antigénica denominadas: **A** (aa 87-100), **B** (aa 145-150), **C** (aa 211-223) y **F** (aa 235-242) (Coulson and Kirkwood 1991; Kirkwood, Masendycz et al. 1993). Además fueron descriptos otros dos sitios antigénicos llamados: **D** (aa 291) y **E** (aa 190) (Dyall-Smith, Lazdins et al. 1986; Kirkwood, Masendycz et al. 1993).

La reciente cristalización de la proteína VP7 demostró que su estructura terciaria posee dos dominios conformacionales y que en el virión maduro se encuentran asociadas en trímeros (Figura 4A y B). En estos, las subunidades de VP7, se unen por sus extremos conformando una estructura triangular con una depresión central, cuya superficie externa es la mas variable a nivel aminoacídico y la interna se encuentra cargada negativamente e interactuando con la VP6 (Aoki, Settembre et al. 2009; Aoki, Trask et al. 2011).

Nota: del ingles **cap**: caperuza, casquete, cofia, **capping**: proceso enzimático por el cual se añade una breve secuencia nucleotídica en el extremo 5' de un ARNm eucariota, mediante enlaces fosfodiéster 5'-5', después de la transcripción. Se trata, por lo general, de uno a tres guanilatos (GTP). Cada nucleótido añadido suelen estar metilados en posiciones características)

Figura 4. (A) Esquema de la proteína VP7. (B) Modelado estructural del trímero.



Los dominios estructurales de la VP7 están representados en amarillo (I) y naranja (II). Figura adaptada de Aoki, S. T. 2009.

El conocimiento de la estructura terciaria de la VP7 permitió la localización conformacional de: *i)* los sitios de unión a los anticuerpos neutralizantes; *ii)* las sustituciones aminoacídicas en las mutantes de escapes, esto produjo un cambio paradigmático en la definición de las regiones o epitopes antigénicos para esta proteína. Así, los trabajos de Aoki y col, redefinieron a solo dos las regiones antigénicas de la VP7. La denominada 7-1 constituye un sitio antigénico conformacional formado por las regiones anteriormente descritas como A, C, D y F. La misma se ubica en los extremos de cada subunidad, en las zonas limítrofes o de unión entre estas y ha sido subdividida en 7-1a y 7-1b (Figura 5). Por otro lado, la region 7-2 incluye principalmente a los epitopes de los sitios antigénico B y E, localizándose en la porción media de cada subunidad de VP7 (entre ambos dominios conformacionales), orientada hacia el interior de la depresión central de cada trímero. Ambas regiones se ubican en la cara externa del mismo, expuestas hacia la superficie en la partícula viral. En la región 7- 1 se localizan el 85% de las mutaciones de escape a la neutralización descritas hasta la actualidad (Figura 5) (Aoki, Settembre et al. 2009).

Figura 5. Modelado estructural de la proteína VP7. Epitopes antigénicos.

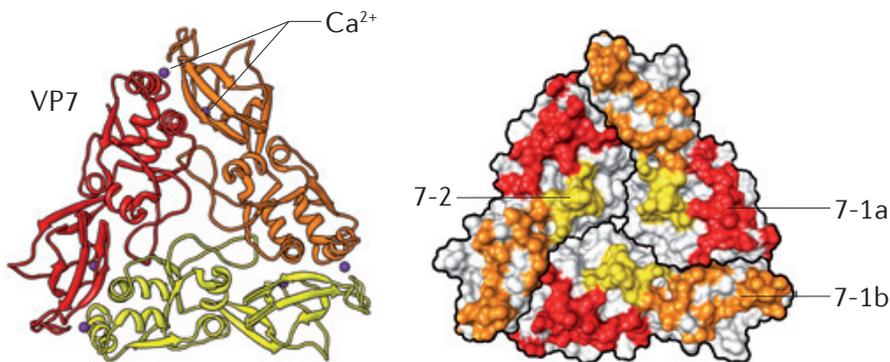


Figura adaptada de Aoki, S. T. 2009.

Se ha propuesto que el mecanismo de neutralización de los anticuerpos dirigidos contra los epitopes de la región 7-1 se produciría por estabilización de la unión entre las subunidades de VP7, impidiendo los cambios conformacionales que la misma realiza en la etapa de pegado y desnudamiento viral bloqueando la penetración a la célula (*lockingdown*). Los anticuerpos dirigidos contra la región 7-2 actuarían de un modo similar, produciendo la fijación de estructuras conformacionales asociadas al virión. Estas uniones podrían ocurrir dentro de un trímero o por uniones cruzadas entre subunidades de trímeros adyacentes y al igual que en caso anterior estabilizarían la estructura de la VP7 impidiendo las fases iniciales de la infección (Aoki, Trask et al. 2011).

A pesar de que la cara interna de los trímeros de VP7 se asientan directamente sobre la VP6, estas proteínas mantienen un mínimo contacto entre si. Los extremos amino terminales de las VP7 son flexibles y toman formas de “ganchos” que rodean a una pequeña protrusión de la VP6, anclando de este modo a la VP7 sobre la porción apical de la VP6 y constituyendo el principal contacto entre ambas proteínas (Chen, Settembre et al. 2009; Settembre, Chen et al. 2011) (Figura 6 A).

Por otro lado, los residuos 51 al 58 de los extremos amino terminales de las VP7 se entrecruzan entre las subunidades de un mismo trímero y con las de trímeros adyacentes (Chen, Settembre et al. 2009). Entonces, además de fijar la VP7 a la capa intermedia, estos extremos crean un contacto intra e intertrímeros reforzando la integridad de la capa externa y generando una interacción cooperativa (Figura 6 B). De que este modo los extremos amino terminales de las VP7, son los responsables de importantes interacciones que estabilizan la cápside externa y están involucrados en los principales mecanismos que gobiernan el desnudamiento y posterior ensamblado de la cápside viral (Ludert, Ruiz et al. 2002; Trask and Dormitzer 2006; Chen, Settembre et al. 2009).

Figura 6. Extremo amino terminal de la proteína VP7. Funciones.

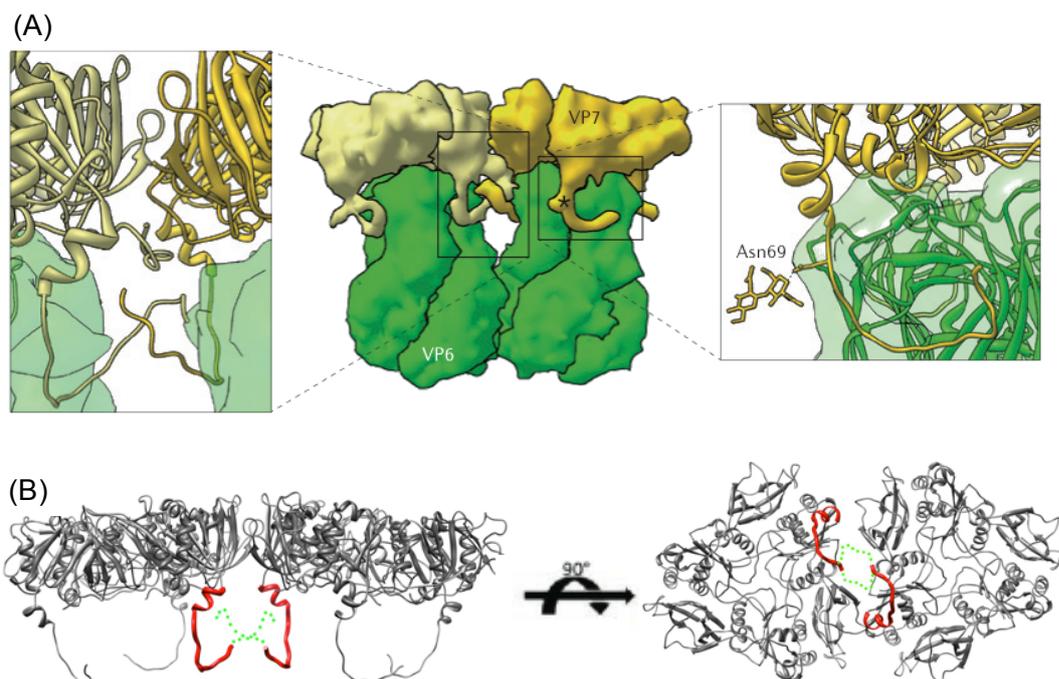


Figura adaptada de Chen, J. Z. 2009 y Trask, S. D. 2012. (A) Se muestra la función de anclaje a la VP6 (verde) del extremo amino terminal de la VP7 (amarillo). (B) En puntos verde señalizados los residuos 51 al 58 de los extremos amino terminales de las VP7 (en rojo).

Proteína VP4

La proteína VP4, es el producto del cuarto segmento del genoma viral. Este gen codifica, en la mayoría de los rotavirus humanos, una proteína de 775 aa que se asocia formando trímeros y constituye las espículas virales. En el virión maduro, por acción de la tripsina, VP4 es clivada en dos subproductos VP5* y VP8*, tornando infectivo al virus. En las espículas, VP8* representa la cabeza globular y el cuerpo de las mismas, mientras que la base está constituida por la proteína VP5* (Figura 7). Ambas poseen múltiples epítopes antigénicos que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes. En VP8* se han definido cuatro epítopes estructurales (8-1 al 8-4) para los cuales la mayoría de los anticuerpos dirigidos contra estos sitios bloquean el pegado o unión del virus a las células (Ruggeri and Greenberg 1991; Dormitzer, Sun et al. 2002). Por su parte, en VP5* se han definido cinco epítopes (5-1 al 5-5) cuya neutralización impiden la interacción con la membrana endosomal inhibiendo la penetración a la célula (Dormitzer, Nason et al. 2004) (Figura 7).

Figura 7. Modelado estructural de la proteína VP4. (A) Se muestran los dominios VP8* y VP5*. (B) Se señalan los respectivos epítipes antigénicos.

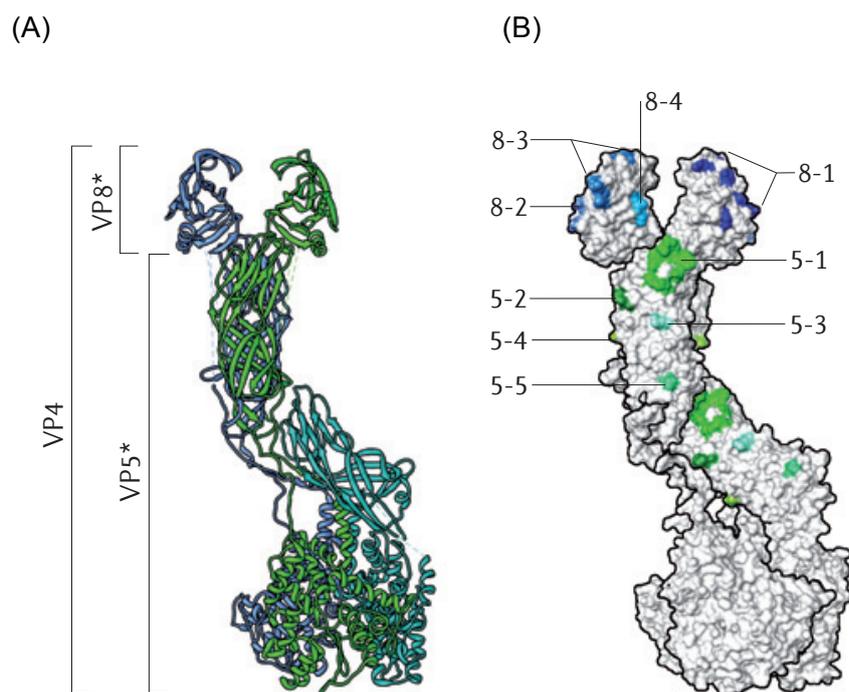


Figura adaptada de Trask, S. D. 2012.

1.4.4. Ciclo Viral

1.4.4.1. Pegado y desnudamiento viral

Rotavirus infecta los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado y replica exclusivamente en el citoplasma celular. Los nuevos viriones no son infectivos hasta que la espícula de VP4 es clivada proteolíticamente en los fragmentos: VP8* (28 KDa) y VP5* (60KDa) por la tripsina intestinal del huésped (Yeager, Berriman et al. 1994; Crawford, Mukherjee et al. 2001). Si bien, no se conoce exactamente el proceso de penetración del virus a la célula, se hipotetiza que el clivaje de la VP4 induce cambios conformacionales en la VP5*, mediante los cuales se exponen regiones altamente hidrofóbicas con capacidad de disrumpir la membrana celular y generar poros (Dormitzer, Greenberg et al. 2001; Yoder, Trask et al. 2009; Wolf, Vo et al. 2011). Por otra parte, se ha demostrado que la proteína VP7 tiene funciones reguladoras de la conformación y de la actividad de penetración de la VP5* (Arias, Romero et al. 1996). Durante la entrada o penetración del rotavirus a la célula, la TLP (del inglés *Triple Layered Particle*) es internalizada vía endocitosis y conducida a los endosomas primarios, donde la baja concentración de calcio gatilla el desensamblado de la VP7. Esta disociación sirve como señal para los rearrreglos de VP4 que permiten que el virión penetre la membrana endosomal por acción de la VP5* (Ludert, Ruiz et al. 2002). El resultado neto del proceso anterior, es la liberación de una partícula subviral (DLP, del inglés *Double Layered Particle*) al citosol de la célula hospedadora (Figura 8 A).

Figura 8. Ciclo de Replicación del Rotavirus

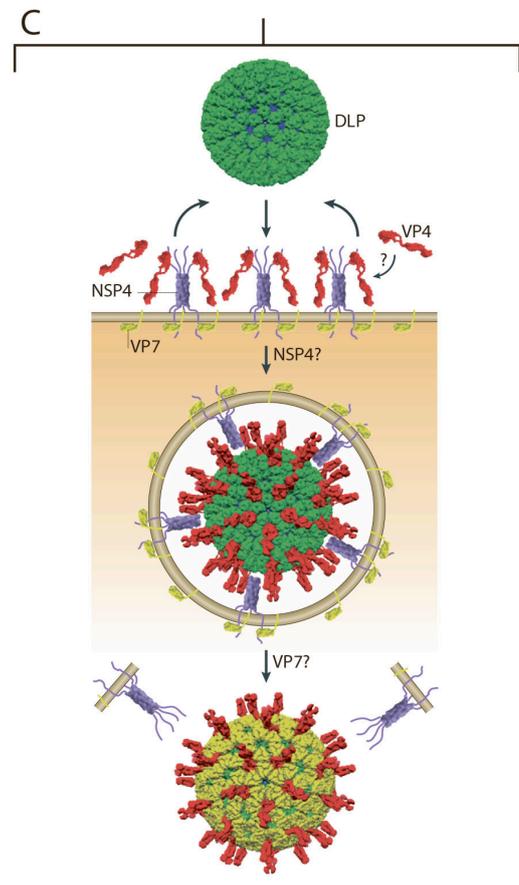
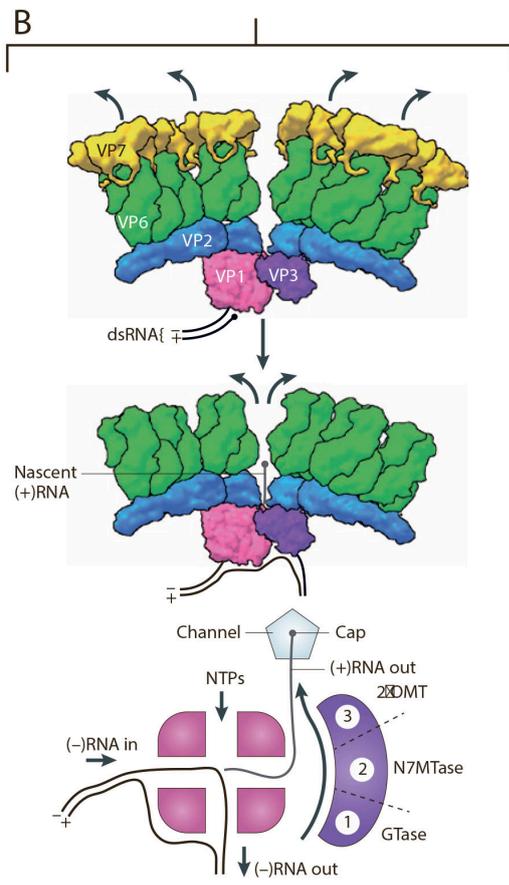
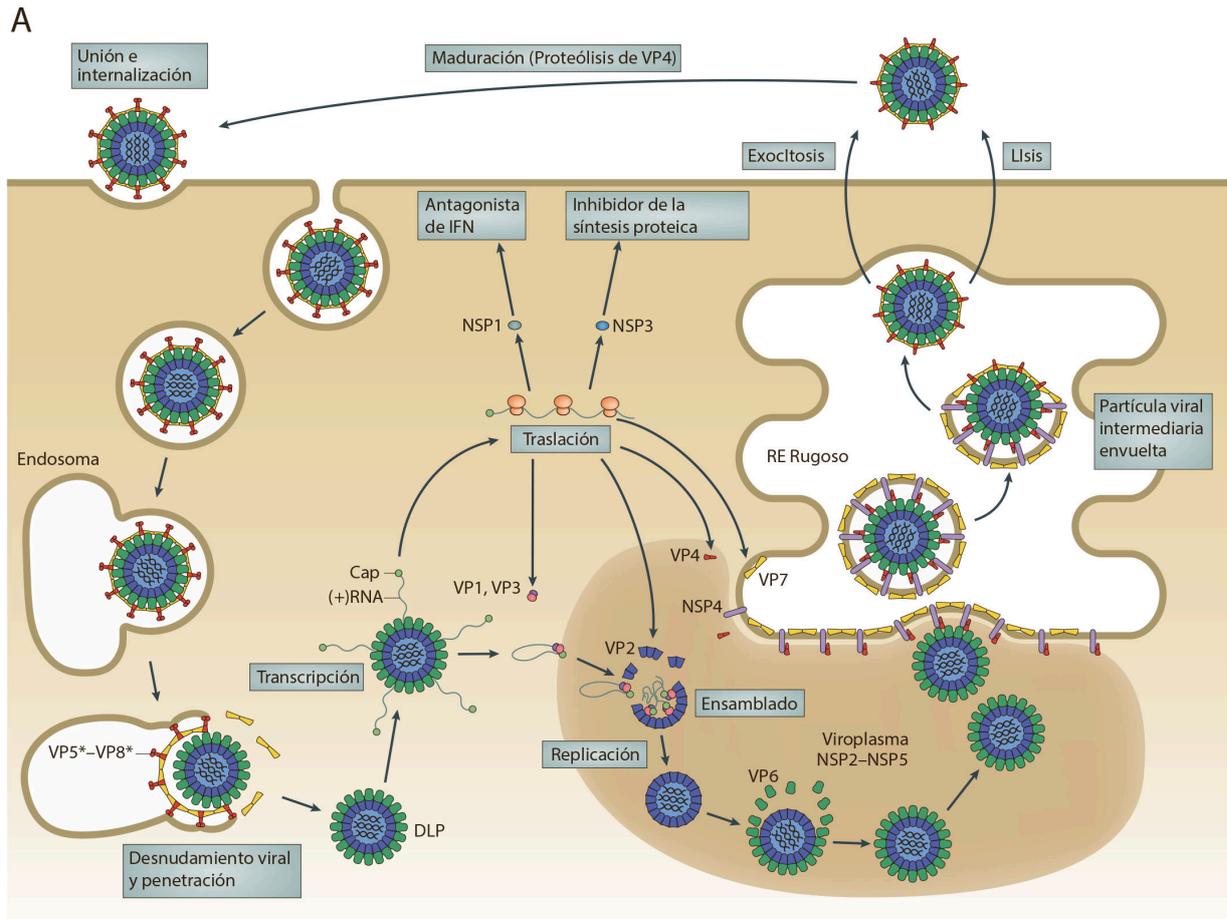


Figura adaptada de Trask, S. D. 2012.

El desnudamiento viral induce la transcripción en las DLPs liberadas en el citoplasma de la célula target. Los complejos de la polimerasa viral de las mismas son transcripcionalmente activos e inmediatamente comienzan la síntesis de los ARNm, usando como templados las cadenas de ARN(-) (cadena complementaria o *antisense*) del genoma (Figura 8 B) (Mendez, Weiner et al. 2008; McDonald and Patton 2011).

1.4.4.2. Replicación genómica y ensamblado del core.

La replicación viral ocurre en los viroplasmos que se observan como cuerpos de inclusión en el citoplasma celular. Estas estructuras constituyen los sitios de ensamblado de las DLPs y posterior transcripción del ARN(+) para originar las DLPs.

El ARN(+) (cadena de ARN codificante o *sense*) tienen un rol dual en el ciclo replicativo viral, ya que actúa como ARNm para la síntesis de proteína y como templado para la replicación del genoma (Silvestri, Taraporewala et al. 2004; Jiang, Jayaram et al. 2006; Taraporewala, Jiang et al. 2006; Martin, Ouldali et al. 2011) (Figura 8).

Aunque no se conoce en profundidad el proceso de replicación y empaquetado del genoma, se postula que copias individuales de los complejos VP1:VP3 se unen al extremo 3' terminal de los segmentos de ARN(+). La posterior unión con un decámero de VP2 activa el mencionado complejo, sintetizándose la hebra de ARN(-) para producir el ARNdc. Durante este proceso la VP2 se autoensambla originando el *core* viral, compuesto por doce decámeros de VP2 que se asocian a once complejos de VP1:VP3-ARN(+) (Silvestri, Taraporewala et al. 2004; McDonald and Patton 2011). El mecanismo por el cual la VP2 activa a la VP1 e inicia la síntesis de ARNdc no es conocido en su totalidad. Es probable que las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 comanden el proceso de ensamblado de las DLPs. La NSP2 se ha demostrado que interactúa con la VP2 y VP1 en la fase de síntesis del ARNdc y por su parte la NSP5 actúa en la unión de la VP6 (capa intermedia) sobre el *core* viral (Figura 8 A) (Berois, Sapin et al. 2003). En esta etapa de la replicación existe, en el viroplasma, una coordinada y compleja interacción de las proteínas virales con el ARN. Mediante la misma se modula el ensamblado de la partícula viral y se asegura que las porciones genómicas estén correctamente encapsidadas e iniciar así su replicación (Trask, McDonald et al. 2012).

1.4.4.3. Regulación del ensamblado de la cápside externa.

El mecanismo por el cual las DLPs adquieren la cápside externa es uno de los procesos menos conocidos. El ensamblado viral completo implica la salida de las DLPs del viroplasma, su asociación con las espículas de VP4 y la adquisición de la VP7 en el retículo endoplasmático (RE). La compartimentalización de la VP7 en el RE, asegura al virus que las DLPs serán convertidas a TLPs, después que estas abandonen el viroplasma y el proceso

replicativo se haya completado (Trask, McDonald et al. 2012). La proteína NSP4 (20KDa) es una proteína de membrana que se acumula en el RE en cercanía al viroplasma. Su extremo amino terminal se extiende hacia el lumen del RE e interactúa con la VP7, mientras que la porción carboxilo terminal se une a las VP6 de las DLPs y a la VP4.

Aunque los datos son incompletos el modelo del ensamblado de la cápside externa contempla una partícula viral intermedia envuelta (Figura 8C).

En el viroplasma las DLPs interactúan, sobre la cara citológica de la membrana del RE, con la porción carboxilo terminal de la NSP4. De igual modo la NSP4 capta las proteínas VP4 sintetizadas en el citosol (Au, Mattion et al. 1993; Taylor, O'Brien et al. 1996; O'Brien, Taylor et al. 2000). Simultáneamente en el lumen del RE la VP7 interactúa con la porción amino terminal de la NSP4 (Poruchynsky and Atkinson 1991). Estas interacciones inducen a una invaginación de la membrana del RE que envuelve el complejo DLPs –VP4 –NSP4, introduciéndolo al lumen del RE y generando una partícula viral intermedia envuelta (Poruchynsky and Atkinson 1991). Posteriormente, y a través de un mecanismo desconocido, la membrana del RE es removida junto con la NSP4 y la VP7 es ensamblada sobre la superficie de la DLP (Lopez, Camacho et al. 2005). Durante este proceso se requiere que primero se adicione la VP4 y después la VP7. Esto es así, debido a que la porción basal de la VP4 es demasiado grande para ser insertada posteriormente a través de los poros que deja la VP7 para la protrusión de las espículas de VP4 (Figura 8 C). Por ultimo para la liberación de los viriones, los estudios in vitro indican que los mismos son capaces de egresar de las células infectadas a través de mas de un mecanismo, ya sea por lisis celular o por secreción de la superficie apical de las células epiteliales (Musalem and Espejo 1985; Jourdan, Maurice et al. 1997).

Los Rotavirus logran un preciso control de su ciclo replicativo a través de un secuencial desensamblado del virus con un posterior armado de la partícula viral en diferentes compartimentos del citoplasma celular.

1.5. Clasificación

Rotavirus es uno de los doce géneros que conforman la Familia Reoviridae (Orthoreovirus, Orbivirus, Rotavirus, Coltivirus, Aquareovirus, Cypovirus, Fijivirus, Phytoreovirus, Oryzavirus, Seadornavirus, Idnoreovirus, and Mycoreovirus) (Mertens, Duncan et al. 2005).

Históricamente la primer clasificación utilizada para este genero se baso en las diferencias antigénicas de la proteína VP6 y en los patrones de migración electroforético de los segmentos genómicos. Según la misma, los rotavirus se ordenan en “grupos” denominados de la A hasta la G, de los cuales, los tres primeros (RVA, RVB y RVC) infectan a humanos y otros mamíferos, mientras que los restantes (RVD, RVE, RVF y RVG) han sido recuperados principalmente aves (Ciarlet and Estes 2002). RVA es el mas importante epidemiológicamente, constituye el principal agente etiológico de diarrea aguda en menores de 5 años. RVB solo ha

sido identificado en brotes de diarrea en China e India y RVC grupo C ha sido detectado en casos esporádicos en muy baja prevalencia.

Para RVA, se han usado varios sistemas de clasificaciones basados en: (i) las propiedades antigénicas de las proteínas VP6, VP7 y VP4, clasificándolos en subgrupos, G serotipos, P serotipos, respectivamente; (ii) Según el patrón de migración electroforético del ARN viral en geles de poliacrilamida, llamados “electroferotipos” y categorizados en: largos, cortos, súper cortos y atípicos; (iii) Patrones de hibridación RNA-RNA del genoma completo, que separa los RVA en “genogrupos”; (iv) Estudio de la variabilidad de los genes que codifican las proteínas VP7 y VP4, determinándose así los G y P genotipos respectivamente (también llamados G tipos y P tipos); (v) Análisis basados en la secuenciación nucleotídica de los 11 segmentos genómicos (determinación de genotipos) (Estes and Kapikian 2007; Matthijnssens, Ciarlet et al. 2011).

Como se ha mencionado, la proteína VP6 porta diferentes epítopes que permiten diferenciar a los rotavirus grupo A en “subgrupos” (SG), de acuerdo con su reactividad contra esta proteína los RVA se clasificaron en : SG I, SG II y SG I+II o SG no I, no II.

Posteriormente, en 1989 fue propuesto un sistema de clasificación binario, basado en la reactividad inmunológica frente a las proteínas de cápside externa (VP7 y VP4). Esta clasificación fue realizada mediante técnicas de neutralización usando sueros hiperinmunes provenientes de cepas patrones. De este modo, los rotavirus se clasificaron en P serotipos (en base a la VP4, proteasa sensible) y G serotipos (en base a la VP7, glicoproteína) (Ciarlet and Estes 2002; Estes and Kapikian 2007).

Debido a la complejidad necesaria para su realización, sumado al crecimiento de las técnicas moleculares, esta clasificación fue lentamente reemplazada por un sistema basado en el estudio de los determinantes genéticos que codifican las variaciones antigénicas de los diferentes serotipos. Al utilizar este tipo de metodologías se determinan los G o P genotipos (también denominados G o P tipos). De este modo y hasta la actualidad se han descrito 27 G y 37 P genotipos (Matthijnssens, Ciarlet et al. 2008). Rotavirus provenientes de 11 G tipos (G1– G6, G8–G12) y 11 P tipos (P[8], P[4], P[6], P[9], P[10], P[3], P[1], P[11], P[14], P[19], P[25]) han sido aislados causando infección en humanos (Santos and Hoshino 2005; Matthijnssens, Ciarlet et al. 2011).

Para estudiar la homología entre los genomas de rotavirus se han utilizado técnicas de hibridación RNA-RNA en condiciones de alta astringencia (Nakagomi, Nakagomi et al. 1989). Tres genogrupos de rotavirus humanos, representados por las cepas WA, DS-1 y AU-1, fueron descritos. Esta metodología mostró una estrecha relación entre las cepas humanas y animales y confirmando la ocurrencia de reordenamientos genómicos naturales. Una de las principales limitaciones de este tipo de estudios es que virus parciales o completamente divergentes en sus constelaciones genómicas respecto de las cepas prototípicas, no fueron fácilmente caracterizables. En ese sentido, posteriormente fueron descritas cepas inusuales y

virus quiméricos portadores de una mezcla de genes derivados de repetidos reordenamientos que no pudieron ser analizados retrospectivamente con técnicas de hibridación (Nakagomi and Nakagomi 1991; Khamrin, Maneekarn et al. 2006; Banerjee, Iturriza-Gomara et al. 2007; Li, Duan et al. 2008; Matthijnssens, Rahman et al. 2008).

Cuando las cepas de RV fueron estudiadas mediante secuenciación de sus 11 genes, como en los trabajos iniciados por Maunula y col. las relaciones genéticas entre las mismas pudo ser claramente determinada (Maunula and Von Bonsdorff 2002). Resultados recientes mediante secuenciación han demostrado que el origen de las cepas del genogrupo Wa-like tiene un origen común porcino, mientras que el del genogrupo DS-1 like podría ser bovino (Matthijnssens, Ciarlet et al. 2008).

En el año 2008, un sistema de clasificación basado en la secuenciación nucleotídica del genoma completo del rotavirus fue desarrollado. Mediante análisis filogenético se establecieron los valores de corte para la definición de genotipos en los 11 segmentos del genoma viral. Se propusieron así, modificaciones a la clasificación existente para los genotipos de VP4, VP7 y NSP4 y un nuevo sistema para VP1, VP2, VP3, VP6, NSP1, NSP2, NSP3 and NSP5/6. De este modo los genes de las proteínas :VP7-VP4-VP6-VP1- VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 , son ahora descritos usando la siguiente nomenclatura : Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (donde x = un número arábigo, con inicio en 1) (Matthijnssens, Ciarlet et al. 2008).

La reciente conformación del Rotavirus Classification Working Group (RCWG), que nuclea a investigadores de todo el mundo, genera un ámbito de discusión unificado respecto a la designación, caracterización y nomenclatura de nuevos genotipos y cepas de rotavirus. Se intenta proveer así, un marco normalizado que permita y facilite el estudio de las relaciones evolutivas de rotavirus, eventos de reordenamientos genéticos intra e intergenogrupos y describa unívocamente la emergencia de nuevos genotipos de rotavirus (Matthijnssens, Ciarlet et al. 2008; Matthijnssens, Ciarlet et al. 2011).

1.6. Patogenia e inmunidad.

Rotavirus infecta los enterocitos maduro, ubicados en la porción apical de las vellosidades del intestino delgado (ID), en los cuales se produce una intensa replicación del virus con excreción de hasta 10^{12} partículas/ml de heces durante el pico de la enfermedad (Estes and Kapikian 2007). Se ha demostrado que la fisiopatogenia de la diarrea producida por este virus es multifactorial (Ramig 2004). La misma posee un componente malabsortivo, relacionado principalmente con el daño causado al epitelio intestinal y el achatamiento o atrofia de las microvellosidades intestinales. Así, al anular la capacidad digestiva y absorbente del ID, se produce un desbalance respecto de las funciones excretoras de las criptas intestinales. Lo anterior, junto con un bolo indigesto osmóticamente activo son las principales causas de la

diarrea malabsortiva (Estes, Kang et al. 2001; Ramig 2004). La destrucción del epitelio se compensa con una hiperplasia de las células cripticas, lo cual aumenta la secreción, contribuyendo a la diarrea.

Por otro lado, se ha asociado a la proteína no estructural 4 (NSP4) con la manifestación de diarrea. La administración oral de esta proteína aislada de cultivo fue capaz de producir síntomas de diarrea en modelos animales (Estes 2003; Hyser and Estes 2009). La misma actuaría como enterotoxina viral amplificando los efectos secretorios de la infección vía activación del sistema nervioso entérico (SNE). Por otro lado se ha demostrado que esta proteína, a través del aumento de la concentración de calcio intracelular, produce alteraciones del citoesqueleto celular y disrupción de la integridad de las “uniones densas” de los enterocitos (Lundgren, Peregrin et al. 2000; Lundgren and Svensson 2001; Hagbom, Sharma et al. 2012). La recuperación de la enfermedad puede llevar de 5 a 7 días y a medida que esto ocurre, el virus va disminuyendo su título en heces.

A pesar de que la infección se desarrolla en la superficie de la mucosa intestinal, los rotavirus inducen tanto una respuesta inmune local, como una respuesta inmune humoral (Ward 2009). Varios estudios indican que la inmunidad local es la responsable de la protección contra la diarrea por rotavirus, sugiriendo que el éxito de una posible vacuna dependería de la habilidad de la misma para inducir este tipo de respuesta inmune. En niños, se producen anticuerpos neutralizantes dirigidos contra los epitopes de las proteínas VP7 y VP4, correspondientes al genotipo de la cepa responsable de la primera infección (respuesta inmune homotípica). Con sucesivas infecciones se producen anticuerpos dirigidos hacia distintos genotipos (respuesta inmune heterotípica). El grado de protección contra la diarrea por rotavirus se correlaciona con el título de anticuerpos en suero y por lo tanto, niños que ya han sido infectados están más protegidos contra una reinfección por el mismo genotipo que contra otro diferente (Velazquez, Matson et al. 1996; Velazquez, Matson et al. 2000; Xu, Dennehy et al. 2005). Es posible, aunque poco frecuente, que un niño tenga dos infecciones sintomáticas graves, lo cual será más probable si el segundo virus es completamente diferente al primero. Este concepto de protección homotípica y heterotípica es relevante en el desarrollo de vacunas antirotavirales (Yuan, Ishida et al. 2004). En los primeros meses de vida, los anticuerpos que se transfieren a través de placenta y por medio de la leche materna también juegan un papel importante en la protección contra la diarrea por rotavirus (Prameela and Vijaya 2012).

1.7. Vacunas Antirotavirus

En relación con las estrategias de prevención, se ha demostrado que las mejoras en las condiciones higiénico-sanitarias no impactan de manera sustancial en la disminución de las muertes e internaciones asociadas a este virus (Velazquez, Garcia-Lozano et al. 2004). Este es

uno de los principales motivos por el cual la Organización Mundial de la Salud ha priorizado la inmunoprevención como estrategia (WHO 2007).

1.7.1. Estrategias de desarrollo

La comprobación clínico experimental de que un episodio de infección natural en niños confería protección contra nuevas infecciones, fue la base que estimuló la producción de vacunas anti-rotavirus (Velazquez, Matson et al. 1996) (Bishop, Barnes et al. 1983). Las estrategias de desarrollo han sido fundamentalmente dos: la primera, basada en el uso de una sola cepa de rotavirus (denominada vacuna monovalente, obtenida de animales o humanos) y la segunda basada en el uso de más de una cepa (vacuna multivalente). Estas últimas incluyen diferentes genotipos producto de reordenamientos entre virus animales y humanos (Angel, Franco et al. 2007).

Las vacunas monovalentes de virus animales se basaron en el concepto de inmunidad heterotípica, que supone que la protección conferida por la vacuna permitirá proteger contra rotavirus humanos aunque su tipo VP7 y/o VP4 sean diferentes. Los estudios de eficacia no resultaron consistentes y esta estrategia de desarrollo fue abandonada, siendo reemplazada por el uso de virus de procedencia humana o de reordenantes. Sin embargo, debe mencionarse que existe una vacuna licenciada en China con una cepa originaria de oveja, producida por el Instituto Linzhou, de la cual no se tiene mayor información científica. Las vacunas monovalentes humanas se basan en el concepto de que un rotavirus humano protegerá más eficientemente contra la infección que uno obtenido de animales. Esta estrategia es la base de la vacuna Rotarix® desarrollada por Glaxo SmithKline Biologicals (GSK) cuya cepa humana serotipo P[8]G1 fue atenuada con múltiples pasajes en el laboratorio (Bernstein, Sack et al. 1999; Vesikari, Karvonen et al. 2004). En igual sentido, diferentes cepas de Rotavirus provenientes de neonatos asintomáticos han sido propuestas como candidatas a cepas vacunales, encontrándose el desarrollo de las mismas en diferentes etapas.

Por otra parte, las vacunas multivalentes mantienen el concepto de utilizar un virus animal como base (virus simio o bovino) modificando su VP7 y/o VP4 mediante reordenamiento genético. Los virus seleccionados son quimeras que incluyen 10 segmentos genéticos del virus animal original y un segmento humano, correspondiente a aquel que codifica para la proteína VP7 o VP4. Las vacunas multivalentes incluyen a cuatro o cinco virus antigénicamente diferentes, cubriendo así los serotipos predominantes, G1, G2, G3, y G4 en caso de Rotashield® de Laboratorios Wyeth, y G1, G2, G3, G4 y P8 en el caso de Rotateq® de MSD (Vesikari, Clark et al. 2006; Angel, Franco et al. 2007).

1.7.2. Experiencia con Rotashield®

La vacuna multivalente, recombinante simio-humana, de Wyeth Lederle fue la primera vacuna

anti-rotavirus licenciada en el mundo, en el año 1998. La misma fue ampliamente estudiada por más de 10 años en diferentes regiones del planeta y en resumen se puede señalar que la protección anti-rotavirus conferida fue cercana al 50% contra todo tipo de infección, de 80%-95% contra infección moderada a grave y de 75% a 100% contra hospitalización por diarrea con deshidratación (Kapikian, Hoshino et al. 1996; Joensuu, Koskenniemi et al. 1997; Perez-Schael, Guntinas et al. 1997). Los estudios de Fase II y III demostraron que la vacuna era segura, aunque se detectó una mayor tendencia, aunque no significativa, a desarrollar casos de invaginación intestinal en niños vacunados. La vacuna fue aprobada para su uso en EEUU en 1998. Sin embargo, en 1999 se dieron a conocer los resultados de un estudio caso-control realizado por el Rotavirus Vaccine Field Investigation Team, del CDC, que demostraron un aumento de incidencia de invaginación intestinal en niños vacunados (CDC 1999; CDC 1999; Simonsen, Viboud et al. 2005). Estos resultados llevaron a suspender el uso de esta vacuna y a su retiro del mercado por parte de Wyeth. Las razones de este raro evento adverso con Rotashield® no están claramente dilucidadas. Una posibilidad es que esta vacuna compuesta por virus con proteínas propias de virus que infectan a simios y humanos, hubiese despertado una respuesta intestinal anómala en un pequeño número de lactantes predispuestos a desarrollar invaginación intestinal (teoría del gatillo) (Murphy, Morens et al. 2003). La consecuencia de este suceso fue que las nuevas vacunas, junto con demostrar adecuada eficacia, deberían asegurar su no asociación con invaginación intestinal. Ello requeriría de estudios de campo que incluyan al menos 60.000 niños (Hyser and Estes 2009).

1.7.3. Experiencia con la vacuna pentavalente Rotateq®

Las hospitalizaciones y consulta por rotavirus disminuyeron 96% en vacunados respecto del grupo control para una cohorte completa de aproximadamente 70.000 niños. La protección reportada contra gastroenteritis por rotavirus con cualquier grado de severidad fue del 74% y contra gastroenteritis grave fue del 98%. Además, fue demostrado que la vacunación con Rotateq® no tiene asociación con invaginación intestinal (Vesikari, Matson et al. 2006; Ciarlet, Sani-Grosso et al. 2008; Heyse, Kuter et al. 2008; Vesikari, Karvonen et al. 2010).

El tamaño de muestra utilizado permitió demostrar protección significativa contra infección por los genotipos: G1, (75%, IC 95%: 67- 88%) y G2, (63%, I.C. 95%: 2,6-88%). No se pudo demostrar protección contra G3, G4, ni G9 (Vesikari, Matson et al. 2006).

1.7.4. Experiencia con Rotarix®

Es una vacuna monovalente obtenida de un virus vivo atenuado, la cepa 89-12 desarrollada por Richard Ward y David Bernstein del Gamble Institute (EEUU). Pertence al genotipo G1[P8] y fue adquirida por GSK Biologicals que la sometió a nuevos procedimientos de atenuación. El estudio de Fase III, con más de 63.000 niños enlistados, se realizó en 11 países latinoamericanos y en Finlandia durante el año 2003 y 2004 demostrándose en forma

concluyente que Rotarix® no se asocia con invaginación intestinal. La protección global contra gastroenteritis grave definida por dos criterios (necesidad de rehidratación y por el score clínico de Vesikari) fue del 85%, destacando que la protección contra hospitalización por toda diarrea aguda independientemente de su etiología fue de 42%, hallazgo que sugiere una incidencia de diarrea por rotavirus mayor que la detectada por los métodos de ELISA usados en el estudio (Linhares, Velazquez et al. 2008). Se ha determinado protección significativa contra los serotipos G1, G3 y G9. Para G2 hubo una reducción no significativa del 41%, y para G4 no se pudo determinar debido al escaso número de infecciones por este genotipo incorporadas al estudio (Ruiz-Palacios, Perez-Schael et al. 2006; Linhares, Velazquez et al. 2008).

Esta vacuna se administra en forma oral y la primera dosis se recomienda suministrarla a las 6-14 semanas de edad y la segunda a las 14-24 semanas, con un intervalo mínimo entre dosis de 4 semanas. Dos dosis de Rotarix®, en el esquema indicado, presentan una respuesta inmune (IgA sérica), superior al 60%. La co-administración con otras vacunas incluyendo polio oral a los dos y cuatro meses de edad no se asocia con una disminución de la seroconversión tanto para rotavirus como para las otras vacunas (DTP, polio, Hib). La vacuna se puede co-administrar con vacunas regulares del Programa Ampliado de Inmunizaciones y otras vacunas extraprogramáticas (O'Ryan and Linhares 2009).

1.7.5. Implementación

A partir de 2009, la Organización Mundial de la Salud recomienda la incorporación de una vacuna antirotavirus a los calendarios nacionales de inmunización, intensamente en los países cuya tasa de mortalidad asociada a la diarrea en menores de 5 años sea mayor del 10% (WHO 2009). En la Región de las Américas, 15 países han incorporado alguna de las dos vacunas licenciadas (Rotarix® y RotaTeq®) a su calendario oficial (de Oliveira, Danovaro-Holliday et al. 2011). En la Argentina se comercializan ambas, pero aún no han sido implementadas en el programa nacional de inmunizaciones. Se ha estimado su administración sólo en el 10% de la cohorte anual de nacidos vivos, principalmente en el subsector privado. Estas vacunas han mostrado una reducción significativa de la mortalidad asociada a la diarrea aguda en numerosos países en desarrollo de la región, como Brasil, El Salvador, México, Nicaragua y Panamá (de Palma, Cruz et al. 2010; Lanzieri, Costa et al. 2010; Lanzieri, Linhares et al. 2011; Molto, Cortes et al. 2011). Asimismo, en los países desarrollados han logrado gran éxito en la disminución de la internación a causa de esta patología (Buttery, Lambert et al. 2011; Vesikari, Uhari et al. 2013). En los Estados Unidos permitieron una reducción del 98% de este parámetro, con el consiguiente impacto en los costos directos e indirectos asociados a la hospitalización (Curns, Steiner et al. 2010).

En relación a la circulación viral en los países que implementaron la vacuna monovalente (Rotarix®) se observó un aumento en la detección de G2P[4] y un aumento de G3P[8] en los que utilizaron como estrategia la vacuna pentavalente (Rotateq®). Basados en estos hallazgos

algunos autores han sugerido derivas génicas o reemplazos de genotipos favorecidos por la introducción de la vacuna (Hull, Teel et al. 2011; Kirkwood, Boniface et al. 2011). Frente a una estrategia como la inmunoprevención, el estudio de los genotipos circulantes resulta de suma importancia para evaluar cambios en la ecología viral propiciados por mecanismos de selección. Por otro lado, este conocimiento es fundamental para analizar posibles variaciones en la efectividad vacunal post implementación de este tipo de estrategias.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipotesis

- En Argentina la frecuencia de los diferentes genotipos de rotavirus tendra una gran variabilidad a lo largo de un periodo de 10 años, con cambios de estacion a estacion como ha sido observado en otros paises.
- Pese a que se espera la prevalencia de una variante en un determinado año, tambien se demostrara co-circulacion de multiples genotipos, en concordancia con el comportamiento observado a este nivel en los paises en desarrollo.
- El análisis filogenético de las cepas argentinas permitirá establecer vínculos epidemiológicos con cepas circulantes en la region y detectar la emergencia de nuevos tipos o linajes intragenotipos en la region.

2.2. Objetivo General

Este trabajo tiene como objetivo general contribuir al conocimiento de la epidemiologia molecular de las cepas de rotavirus humano en Argentina previo a la introducción de una vacuna antirotavirus.

2.3. Objetivos específicos:

- 2.3.1. Identificar los genotipos de rotavirus circulantes, en el periodo 1996-2005, mediante la caracterización molecular del los genes de las proteínas VP7 y VP4.
- 2.3.2. Estudiar la variabilidad del gen de la proteína VP7 y VP4 de las cepas prevalentes y atípicas, y establecer sus relaciones epidemiológicas mediante análisis filogenéticos.
- 2.3.3. Estudiar y establecer la relación a nivel molecular de la cepa vacunal de Rotarix® (GSK) y las cepas salvajes G1P[8] circulantes en nuestro país.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Muestras estudiadas

El presente trabajo fue un estudio retrospectivo con un muestreo de conveniencia. Durante el periodo 1996-2005 fueron derivadas, al Laboratorio de Gastroenteritis Virales del INEI-ANLIS, 3205 muestras de materia fecal rotavirus positivas. Del total mencionado, fueron seleccionadas 1433 muestras para su posterior análisis según los siguientes criterios: *i.* provenir de un paciente con un diagnóstico clínico de síndrome diarreico agudo, *ii.* menor a cinco años de edad *iii.* ambulatorio o Internado, *en este ultimo caso con no mas de 48 hs de hospitalización* *iv.* la muestra debió presentar condiciones optimas para su análisis (cantidad y desecación fueron las características mas importantes en este criterio). El total de las muestras seleccionadas provinieron de trece provincias de la Argentina (Formosa, Chaco, Salta, Misiones, Tucumán, Catamarca, Mendoza, Cordoba, Santa Fe, Buenos Aires, Santa Cruz, Neuquén y Tierra del Fuego).

3.2. Extracción del ARN viral:

3.2.1. Método de TRizol® (Invitrogen Inc.)

El ARN viral se extrajo de suspensiones fecales al 10 % utilizando el reactivo comercial TRizol®, siguiendo las recomendaciones del fabricante levemente modificadas.

Drogas y reactivos utilizados: Buffer PBS (pH: 7,4); Reactivo TRizol®; cloroformo (Sigma®); isopropanol (Sigma®); agua tratada con DPEC (Dietihyl Pyrocarbonate).

El protocolo realizado fue el siguiente: 150 µl de suspensión de materia fecal al 10 % (en Buffer PBS, pH: 7,4) fueron mezclados, mediante vortex, con 500 µl de TRizol® en un tubo tipo eppendorf. Posterior a una incubación de cinco minutos, a temperatura ambiente, se de agregaron 100 µl de cloroformo a cada muestra y nuevamente se incubaron tres minutos en iguales condiciones a la anterior. Para separar la fase acuosa de la clorofórmica se centrifugo 15 minutos a 14.000 rpm a 4 °C, transfiriéndose la primera a un nuevo tubo mediante micropipeta. Con el objetivo de precipitar el ARN viral, se agregaron 450 µl de isopropanol, incubándose 10 minutos a temperatura ambiente y se realizó una segunda centrifugación (en igual condiciones que la anterior). La totalidad del sobrenadante fue removido con una pipeta automática y los pellets o sedimento fueron secados en un flujo laminar. Por ultimo, el ARN precipitado fue suspendido en 50 µl de agua tratada con DEPC.

Condiciones de validez: La extracción fue considerada válida si los controles negativos no amplificaban al realizar posteriormente la RT-PCR y en los positivos se obtenían los amplicones correspondientes. Se utilizó como control negativo agua de PCR, y como controles positivos cepas de rotavirus de referencia.

3.2.2. Método de Boom

En muestras negativas para la PCR y con el fin de eliminar inhibidores de la misma, se realizó la técnica de extracción de ARN viral según lo descrito por Boom y col (Boom, Sol et al. 1990) Drogas y Reactivos utilizados: Tris Base (Promega); Isotiocianato de Guanidina (GuSCN) (Invitrogen Inc.); HCl (Sigma®); Silica (Sigma®) ; EDTA (Sigma®); Triton X-100 (Sigma®); Etanol absoluto (Sigma®); Acetona (Sigma®).

Procedimientos preliminares realizados:

Activación de la silica: Se mezclaron 60 grs. de Silica (SiO₂) con 500 ml de agua desmineralizada dejándose sedimentar durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminaron 430 ml del sobrenadante y el sedimento fue resuspendido con 500 ml agua destilada. Se repitió el procedimiento anterior (sedimentación y eliminación del sobrenadante) y el sedimento obtenido fue acidificado con 600 µl de HCl (32% p/v, pH final de 2). Por ultimo, la silica fue alicuotada en fracciones de 4 ml, autoclavada (20 minutos a 121°C) y almacenada a TA al resguardo de la luz.

Preparación del Buffer de Lisis: Se disolvieron 120 grs de GuSCN en 100 ml de TRIS 0.1 M (Ph:6,4). Posteriormente, se agregaron 22 ml de EDTA 0.2 M pH:8 (pH ajustado con NaOH) y 2.6 grs de Tritón X 100. La mezcla fue homogeneizada y guardada en heladera protegida de la luz, debidamente rotulada (pH final menor a 7).

Preparación del Buffer de Lavado: Se disolvieron 120 grs de GuSCN en 100 ml de TRIS 0.1 M (Ph:6,4). Proteger de la luz, rotular y guardar en la heladera (pH final =7).

Preparación del Buffer de Elución: Solución de buffer Tris 10mM- 1mM EDTA (pH: 8). Autoclavar 20 minutos a 121 °C. pH final >8

Procedimiento de extracción:

En un tubo tipo eppendorf se agregaron 900 µl de buffer de lisis, 40 µl de la silica activada y 50 µl de muestras de MF, homogeneizándose mediante vortex.

La mezcla fue incubada 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugada 15 segundos a 12.000 x G (10.400 rpm). El sobrenadante obtenido, fue eliminado y el pellet de silica fue sometido a los siguientes ciclos de lavados y respectivos centrifugados: 2 veces con 1ml de buffer de lavado, 2 veces con 1 ml de etanol al 70 % y 1 vez con 1 ml de acetona. Posterior al lavado con acetona, el sedimento fue secado a 56°C en un baño termostático (durante 10 minutos) con el tubo abierto. La elución de los AN se realizó agregando 75 µl del buffer de elusión al producto anterior e incubando 10 minutos a 56°C (previa homogeneización con vortex). Por ultimo, los tubos fueron centrifugados durante 3 min a 10.400 rpm y el sobrenadante transferido a un nuevo tubo. Los sobrenadantes contienen los AN virales y fueron conservados en el freezer a – 20°C, para su uso posterior.

Condiciones de validez: Idem a la metodología de Trizol.

3.3. Caracterización molecular del gen de la VP7, VP4 y NSP4.

La determinación de los G tipos se realizó en base a lo descrito previamente por Das y col (Das, Gentsch et al. 1994), adicionándole los cebadores para la detección del genotipo G5 publicados por Gouvea y col. Tabla 1 (Gouvea, Glass et al. 1990; Gouvea, Santos et al. 1994). Los P tipos fueron determinados según el trabajo de Gentsch y col. Tabla 2 (Gentsch, Glass et al. 1992). La amplificación del gen de la NSP4 fue realizada según las siguientes referencias (Cunliffe, Woods et al. 1997; Lee, Wang et al. 2000). Tabla 3.

Reactivos y Enzimas utilizados:

Retrotranscriptasa del virus de la Leucemia Moloney Murina recombinante (RT-MMLV): 200 U/ul (Invitrogen Inc), Taq. ADN polimerasa (recombinante): 5 U/ul (Invitrogen Inc), dNTP Mix: 10 mM (Invitrogen Inc.), Buffer 10X, Buffer 5X, DMSO (Dimetil Sulfoxido), TBE (90 mM TRIS base, 2,4 mM EDTA, 88 mM ácido Bórico), agarosa, buffer de corrida. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 1-3.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para determinar el G genotipo (gen VP7).

Nombre y polaridad	Formulación (5'-3')	Especificidad
Beg (+)	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1er round
End (-)	GGTCACATCATAAATTCTAATCTAAG	1er round
9C1 (-)	TAGCTCCTTTTAATGTATGG	VP7-Consenso
9T-1 (-)	TCTTGTCAAAGCAAATAATG	G1
9T-2 (-)	GTTAGAAATGATTCTCCACT	G2
9T-3P (-)	GTCCAGTTGCAGTGTAGC	G3
9T-4 (-)	GGGTCGATGGAAAATTCT	G4
FT5 (-)	CATGTACTCGTTGTTAGCTC	G5
9T9B (-)	TATAAAGTCCATTGCAC	G9

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para determinar el P genotipo (gen VP4)

Nombre y polaridad	Formulación (5'-3')	Especificidad
Con3 (+)	TGGCTTCGCCCATTTTATAGAC	VP4-Consenso
Con2 (-)	ATTTTCGGACCATTATAACC	VP4-Consenso
3-T1 (-)	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	P[6]
4-T1 (-)	TGAGACATGCAATTGGAC	P[9]
5-T1 (-)	ATCATAGTTAGTAGTCGG	P[10]
1T-1 (-)	TCTACTTGGATAACGTGC	P[8]
P4K2 (-)	CTATTAGARAAATCACYC	P[4]
P8K (opcional) (-)	CCAGTAGATAGACAATAT	P[8]

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para secuenciar los genes de NSP4.

Nombre y polaridad	Formulación (5'-3')	Nota
130 (+)	GAGAGCGCGTGCGGAAAGATGG	Consenso para cepas humanas
131 (-)	GACCATTCCCTTCCATTAACGTC	y animales.
INI (+)	ATGGATAAGCTTGCCGAC	Amplifica el ORF de cepas
FIN (-)	CATRGATGCAGTCACTTC	humanas.

Las siguientes cepas de referencia fueron cultivadas en células MA 104 y utilizadas como controles en los ensayos de caracterización: WA: G1P[8], DS1: G2P[4], ITO: G3P[8], ST3: G4P[6], K8: G1P[9], 69M: G8 P[10], OSU: G5P[7], F45: G9P[8].

3.3.1 Retrotranscripción, amplificación y Genotipificación del gen de la proteína VP7: Determinación del G genotipo (G tipo).

La tipificación del noveno gen de las cepas de rotavirus se realizó mediante una técnica de RT-PCR multiplex anidada. El gen fue retrotranscrito y amplificado utilizando un par de iniciadores consensos, posteriormente se realiza una segunda amplificación utilizando iniciadores específicos para cada genotipo. La metodología utilizada se describe a continuación:

i. Desnaturalización y pegado de iniciadores:

En un tubo de PCR (0,2 ml) se combinan 5 ul del producto de extracción (ARN viral) con 1 ul de la siguiente mezcla de iniciadores:

Mezcla de Iniciadores:	ul
Beg/End 10 uM	0,3
DMSO	0,7
Total	1

Los tubos fueron colocados en el termociclador para la realización de la reacción de desnaturalización y pegado de iniciadores (duración de 7 minutos aprox.)

Se describen a continuación los pasos de la mencionada reacción:

Primer paso: 94 °C. 5 min. (Desnaturalización)

Segundo paso: 4 °C (Pausa)

ii. Reacción de retrotranscripción (RT):

Una vez completado el paso anterior se adiciona 4 ul de la mezcla de RT a cada tubo, y se lleva a cabo la reacción de retrotranscripción, la misma consta de tres pasos con una duración de 1 hora 8 minutos.

Mezcla de RT	
5X Buffer RT	2.00
5 mM dNTP's	0.80
MMLV RT	0.10
Agua	1.10
Total	4.00

Programa utilizado:

Primer paso: 37 °C. 60 min. (Retrotranscripción)

Segundo paso: 70 °C. 5 min. (Desnaturalización de la MMLV RT remanente)

Tercer Paso: 4 °C. Pausa.

iii. Primera Ronda de Amplificación (PCR)

Finalmente se amplifica la muestra (Primera ronda), agregando 15 ul de la siguiente mezcla por tubo:

Mezcla de PCR	ul
Buffer 10X	2.50
50 mM Cl ₂ Mg	0.50
5 mM dNTP's	0.20
DMSO	1.05
10 uM Beg/End	0.50
Taq Pol	0.25
Agua	10.00
Total	15.00

Colocar los tubos en el ciclador y ejecutar el programa de la primera ronda que consta de cuatro pasos con una duración de 2 horas 47 minutos 11 segundos.

Primer paso: Desnaturalización inicial 94 °C por 2 minutos

Segundo Paso: Treinta ciclos de amplificación:

Desnaturalización:	94 °C por 1 minuto	} 30 ciclos
Pegado de primers:	50 °C por 1 minuto	
Síntesis de cadena complementaria:	72 °C. por 2 minutos	

Tercer Paso:

Síntesis de cadenas complementarias

remanentes: 72°C por 7 minutos

Cuarto Paso: Pausa 4 °C

iv. Electroforesis en gel de agarosa:

Los tubos de PCR se mantuvieron a 4 °C hasta ser corridos en un gel de agarosa al 2%, con Bromuro de Etidio como agente intercalante del ADN. Los resultados se visualizaron a la luz UV en un transiluminador. Se considera válida la reacción cuando se observe la banda característica de 1062 pares de bases en los controles positivos de extracción y control de amplificación de PCR y no se observe ninguna banda en los controles negativos.

v. Segunda Reacción de Amplificación: Nested PCR

La segunda amplificación fue realizada utilizando iniciadores específicos para cada genotipo (polaridad negativa) y un iniciador consenso (9C-1, polaridad positiva) Tabla1. Los iniciadores específicos están diseñados en distintas zonas del gen a amplificar de modo que el tamaño de la banda obtenida para cada G tipo es diferente, permitiendo identificar de este modo el genotipo de la cepa en estudio. La reacción de Nested PCR se encuentra optimizada para detectar los siguientes genotipos: G1 (Iniciador 9T-1), G2 (Iniciador 9T-2), G3 (Iniciador 9T3-P), G4 (Iniciador 9T-4), G5 (Iniciador FT-5), G9 (Iniciador 9T9-B).

La mezcla de reacción utilizada se detalla a continuación:

Mezcla de Nested	(microlitros: ul)
Buffer AmpliTaq 10XII	5,00
Cl ₂ Mg 50 mM	2,00
dNTP'S 5 mM	4,00
Mezcla de primers (9C1,9T1-4)10 microM	1,00
Primer 9T9 B 10 microM	1,00
Primer FT 5 10 micro M	1,00
Amplitaq	0,50
Agua	30,50
Total	45,00

En un tubo de PCR conteniendo 45 ul de mezcla de reacción de segundo round, se cargaron 1 ul del producto de las muestras positivas y controles positivos del primer round y 5 ul del producto de muestras negativas y controles negativos. Los tubos fueron ubicados en el termociclador para la realización de la reacción del segundo round, la misma consta de 30 ciclos con una duración de 1 hora 45 minutos y comprende las siguientes etapas

Desnaturalización	94 °C 30 segundos	} 30 ciclos consecutivos
Pegado de iniciadores:	42 °C 30 segundos	
Síntesis de cadena complementaria:	72 °C 45 segundos	
Síntesis de cadenas remanentes:	72°C. 7 minutos.	
Pausa:	4 °C	

Posteriormente se realizó una segunda corrida electroforética, sembrando 12 ul del producto de amplificación del segundo round en un gel de agarosa al 2 %, el mismo fue visualizado de igual manera que el anterior.

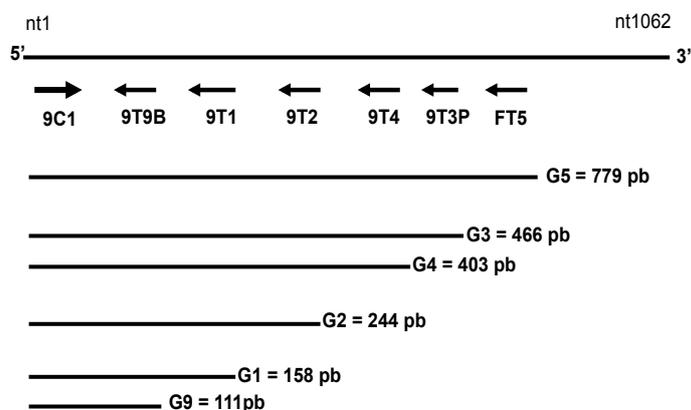
Se observa el número de pares de bases de las bandas obtenidas que debe corresponder a alguno de los siguientes tamaños de amplicones.

Tipo de G	Pares de bases (pb)
G1	158
G2	244
G3	406
G4	403
G5	779
G9	111

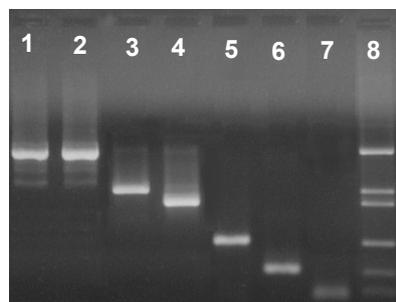
En la figura 9 A se esquematiza la PCR anidada para la determinación de los G tipos, mientras que la 9 B corresponde a una corrida electroforética de los amplicones obtenidos en dicha reacción.

Figura 9

A. Esquema de la PCR anidada: Determinación de los G tipos

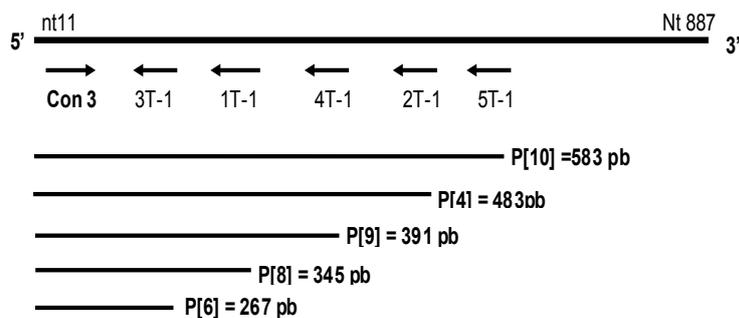


B. Electroforesis de productos de PCR: Caracterización de G tipos

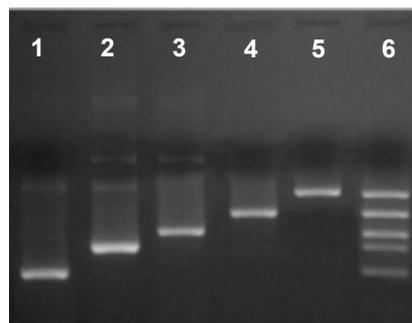


Calles: 1 y 2: **G5** (OSU), 3: **G3** (ITO)
G4: (ST3), 5: **G2** (DS1), 6: **G1** (WA)
 7: **G9** (F45), 8: Marcador

C. Esquema de la PCR anidada: Determinación de los P tipos



B. Electroforesis de productos de PCR: caracterización de P tipos



Calles: 1: **P[6]** (ST3), 2: **P[8]** (WA), 3: **P[9]** (K8)
 4: **P[4]** (DS1), 5: **P[10]** (69M), 6: Marcador

3.3.2. Retrotranscripción, amplificación y Genotipificación del gen de la proteína VP4 : Determinación del P genotipo (P tipo).

La tipificación del cuarto gen se realizó mediante una técnica similar a lo descrita anteriormente. El gen fue retrotranscrito y amplificado utilizando un par de iniciadores consensos (Con 2 y Con 3) a partir de 5 ul de la suspensión de ARN, posteriormente se realiza una segunda amplificación utilizando iniciadores específicos para cada P tipo. La metodología utilizada se describe a continuación:

Cinco ul de la suspensión de ARN de las muestras es desnaturalizada a 94 °C durante 5 minutos y después de ser llevadas a 4 °C, se agregan 20 ul de la siguiente mezcla de RT a cada tubo:

Mezcla de RT:	ul
5X Buffer RT	5.00
5 mM dNTP's	2,00
Iniciadores Con2-3. 20 uM	1.50
MMLV RT	0.08
Agua	11,42
Total	20.00

La reacción de retrotranscripción se lleva a cabo de igual modo que en el caso de la VP7 y posteriormente se procede al paso de amplificación utilizando la siguiente mezcla de reacción:

PCR MIX

Buffer 10X	2.50
50 mM Cl ₂ Mg	1.00
5 mM dNTP's	200
Taq Pol.	0.25
Agua	19.25
Total	25.00

Los programas de ciclado y visualización del producto de amplificación son los mismos a los utilizados para el gen de la VP7.

La visualización de una banda de 876 pb indica la amplificación del producto esperado y solo debe utilizarse 1 ul de producto en la segunda reacción de amplificación. Por el contrario, se utilizan 5 ul en el caso de no observarse banda. En este caso, los iniciadores utilizados en la segunda amplificación, también se encuentran diseñados en diferentes zonas del gen con el fin de distinguir el tipo P detectado en base a diferencias de pb en los productos amplificados. La reacción está optimizada para detectar los siguientes P tipos: P[4] (iniciador 2T-1), P[6] (iniciador 3T-1), P[8] (iniciador 1T-1), P[9] (iniciador 4T-1), P[10] (iniciador 5T-1).

Se utiliza la siguiente mezcla de reacción y el mismo programa de ciclado que en la nested de VP7.

Mezcla de Nested VP4.	(microlitros)
Buffer AmpliTaq 10XII	5,00
Cl ₂ Mg 50 mM	2,00
dNTP'S 5 mM	4,00
Mezcla de primers (3-5 T1, con3, P8K, P4k2) 20µM	1,00
Amplitaq	0,50
Agua	32,50
Total	45,00

Una vez concluida la amplificación, los tubos se mantienen a 4°C, hasta realizarse la corrida electroforética utilizándose 12 ul del producto. Los tamaños se comparan con un patrón de peso molecular para distinguir los genotipos según el número de pb del amplicón obtenido. En la figura 9 C y D, se muestran el esquema de la PCR anidada para determinar el P Tipo y una corrida electroforética de los productos de amplificación de la mencionada reacción de genotipificación.

3.3.4. Amplificación y genotipificación del gen de la NSP4.

Para la amplificación de la NSP4 se usaron un par de iniciadores genéricos para secuencias humanas y animales denominados 130 y 131 (Tabla 3) que permitió amplificar parcialmente el gen codificante de la proteína NSP4. Si no se obtenían amplificados con estos iniciadores, se repetía la experiencia con oligonucleótidos internos: INI y FIN (tabla 3). La genotipificación se realizó mediante secuenciación del amplicón obtenido de la RT-PCR anterior.

Para la retrotranscripción y amplificación de este gen, 10 ul del ARN de doble cadena obtenido fue desnaturalizado a 94°C por 5 min, con posterior agregado de 90 ul de la siguiente mezcla de reacción:

RT-PCR MIX: NSP4	ul
Buffer 10X	10 ul
ClMg 50 mM	4 ul
dNTP (5mM)	4 ul
M-MLV-RT	0.15 ul
Taq Polimerasa	0,5 ul
Primer For (20 uM) 130	1 ul
Primer Rev (20 uM) 131	1 ul
Agua	69.35 ul
Total	90 ul

El protocolo de ciclado fue el siguiente:

Descripción: Consta de 6 pasos , con una duración de **3 horas 47 minutos**.

Primer paso: **42 °C. 60 min.** (Retrotranscripción)

Segundo paso: **95 °C. 5 min.** (Desnaturalización de la MMLV RT remanente)

Posteriormente realiza **30 ciclos de: 1 minuto a 94 °C/ 1 minuto a 49 °C/ 2 minutos a 72 °C**(Desnaturalización/annealing/síntesis de cadena complementaria por la polimerasa, respectivamente)

Realiza una **incubación final de 7 minutos a 72°C**(Síntesis de cadenas complementarias remanentes por la polimerasa)

Finalmente: **4 °C (pausa)**.

La reacción fue considerada positiva si se obtenía un amplicon de 751 pb, correspondiente al producto esperado.

La mezcla y protocolo de ciclado utilizados para la secuenciación del gen de la NSP4 fueron los siguientes:

Mezcla:

Ciclado:

Descripción: Consta de 5 pasos, con una duración de **3 horas 42 minutos**

Primer paso: **95°C.10 seg**

Segundo paso: **49°C. 5 seg**

Posteriormente realiza **39 ciclos de 10 segundos a 95°C/ 5 segundos a 49°C/ 4 minutos a 60°C**

Finalmente: **4°C (pausa)**

3.4. Obtención y análisis de las secuencias

Las secuencias parciales del gen de las proteínas VP7, VP4 y NSP4 se obtuvieron a partir de los amplicones generados en sus respectivas RT-PCR. Los mismos fueron purificados del gel de agarosa por medio de equipos comerciales y posteriormente secuenciados en un secuenciador automático ABI PRISM 377 y/o 3100.

Las secuencias se ensamblaron, editaron, alinearon y compararon con el programa BioEdit v 7.0.1 (Hall 1999). Las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas fueron calculadas por medio del método de neighbor-joining, utilizando Kimura 2-parametros como modelo de sustitución nucleotídica, utilizando el software MEGA v5 (Tamura, Peterson et al. 2011).

3.5. Análisis estructural de la proteína VP7

Para el análisis de las mutaciones aminoacídicas en los sitios antigénicos de la VP7 de las cepas G1 argentinas y su posterior comparación con las vacunales, se utilizó la estructura determinada por cristalografía (Protein data Bank (PDB) código de acceso: 3FMG) de la VP7

de la cepa RVV (Rhesus Rotavirus). Las estructuras fueron visualizadas utilizando el programa MacPyMol (DeLano Scientific LLC).

Los sitios o epitopes antigénicos fueron coloreados de la siguiente manera: 7-1a y 7-1b de color rojo y canela, mientras que el 7-2 de violeta.

Las diferencia de los linajes G1-I, G1-II and G1-V argentinos respecto de Rotarix™ o RotaTeq™ fueron mostradas en verde, cian y azul respectivamente (Figura 22, pag. 82 y 83).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización Molecular de los rotavirus en Argentina.

4.1.1. Resultados generales.

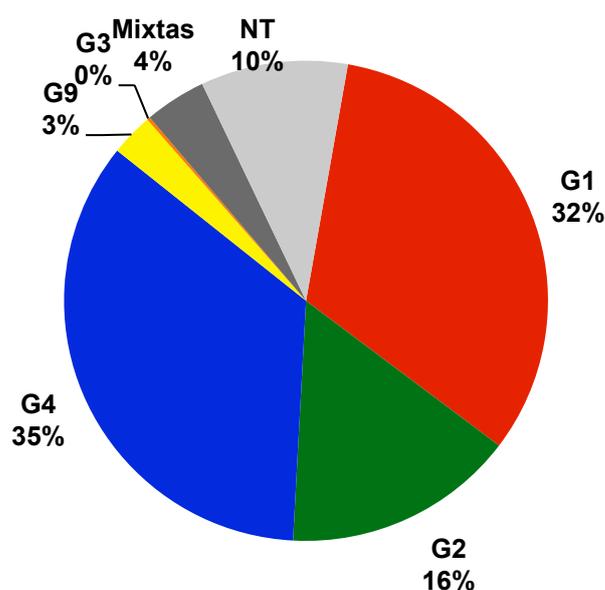
Con el objetivo de caracterizar molecularmente las cepas de rotavirus circulantes en el periodo 1996- 2005, fueron analizadas 1.433 muestras de heces en las cuales se investigo el G y P tipo viral. El 90,4% (n=1295) de las mismas fueron total o parcialmente caracterizadas. De este modo, en el 76,4% (n=1.095) de las muestras se determinó el G y P tipo de rotavirus, en el 13,7% (n=197) únicamente se identifico el G tipo, en el 0,2% (n=3) solo el P tipo y en el 9,6% (n=138) las cepas resultaron no tipificables mediante la metodología empleada.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la caracterización molecular de los rotavirus en Argentina en el periodo 1996-2005, mientras que en la Figura 10 se graficó la proporción de G tipos en el mismo periodo. Las combinaciones de G y P tipos mas frecuentemente encontrada fueron las siguientes: G4P[8] (28,3 %, n=405), G1P[8] (26,1 %, n=374) y G2P[4] (14,3%, n=205) y en menor proporción: G9P[8] (1,5%, n=22) y G9P[6] (1,3%, n=19). Asimismo, fueron detectadas 59 (4,1%) infecciones mixtas y 16 muestras con combinaciones inusuales de G y P tipo (Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización Molecular de los rotavirus en Argentina: 1996-2005.

Genotipos	n	%
G4P[8]	405	28,3
G1P[8]	374	26,1
G2P[4]	205	14,3
G9P[8]	22	1,5
G9P[6]	19	1,3
G3P[8]	3	0,2
G4P[no tipable]	93	6,5
G1P[no tipable]	78	5,4
G2P[no tipable]	18	1,3
G(no tipable)P[8]	2	0,1
G(no tipable)P[6]	1	0,1
Mixtas	59	4,1
Inusuales	16	1,1
G y P (no tipables)	138	9,6
Total	1433	100

Figura 10. G tipo de Rotavirus en Argentina. 1996-2005



En las infecciones mixtas los genotipos que se encontraron coinfectando más comúnmente fueron: G1/G4, G1/G2 y G2/G4, en 25, 21 y 7 casos respectivamente. Las coinfecciones G1/G2 se agruparon principalmente en el año 1997 y las G1/G4 en el año 1998 (Tabla 5)

Tabla 5. Infecciones Mixtas. Genotipos coinfectantes en el periodo 1996-2005.

Genotipos/Año*	1996	1997	1998	1999	2002	2004	Total
G1/G2 P[8]/P[4]	1						1
G1/G2 P[8]	0	1					1
G1/G2 P[4]	2	10	2				14
G1/G2 P[-]	2	3					5
G1/G4 P[8]			18	4	1		23
G1/G4 P[6]			1				1
G1/G4 P[-]	1						1
G1/G9 P[-]				1			1
G1 P[8]/P[6]			1				1
G1 P[8]/P[4]			1				1
G2/G4 P[8]/P[4]						1	1
G2/G4 P[8]						1	1
G2/G4 P[4]	1	3					4
G2/G4 P[-]		1					1
G4 P[8]/P[6]			1				1
G4 P[8]/P[4]			1				1
G4/G9 P[8]/P[6]				1			1
Total	7	18	25	6	1	2	59

*Los años en los cuales no se detectaron coinfecciones no están consignados en la tabla.

En relación a las combinaciones inusuales, fueron encontradas las siguientes asociaciones de Gy P tipos no comunes: G1P[4], G1P[6] y G4P[4] (Tabla 6).

Tabla 6. Combinaciones Inusuales de genotipos. Periodo: 1996-2005.

Genotipos/Año*	1996	1997	1998	2001	Total
G1P[6]	3	-	2	1	6
G1P[4]	-	6	2		8
G4P[4]	-	2	-		2
Total	3	8	4	1	16

*Los años en los cuales no fueron detectados combinaciones inusuales no están consignados en la tabla.

4.1.2. Distribución temporal de los genotipos de Rotavirus: 1996-2005

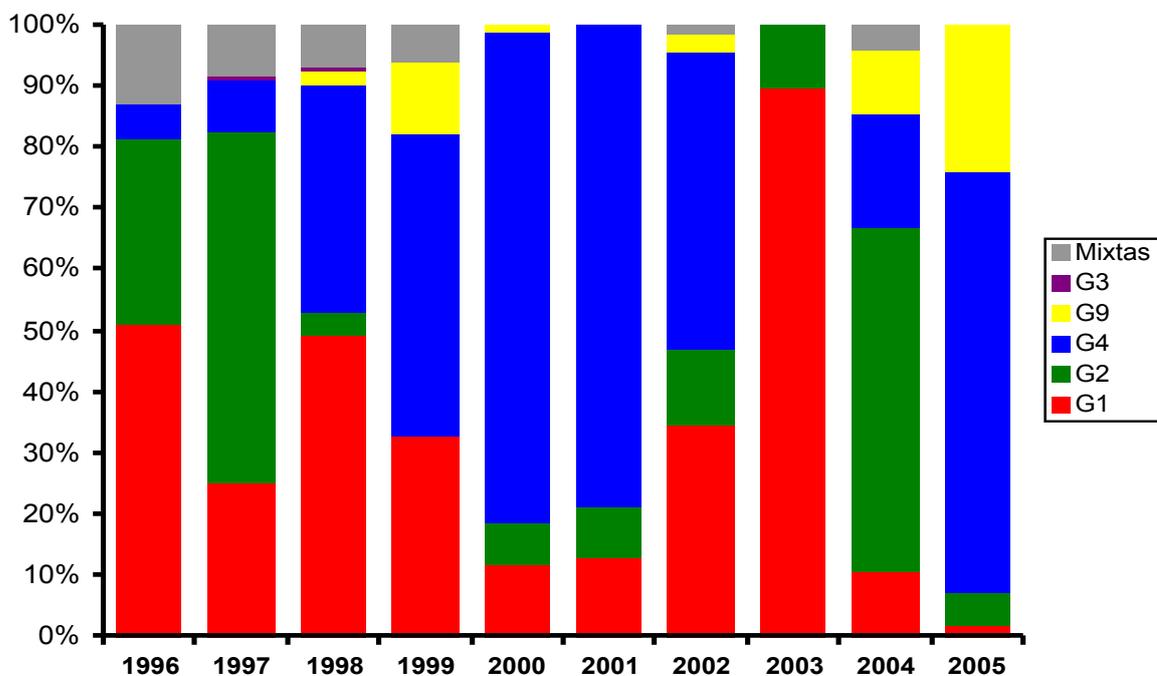
La distribución anual de los genotipos de rotavirus desde el año 1996 al 2005 se muestra en la **Tabla 7** y la variación de los G tipos en el mismo tiempo de análisis se encuentra detallada en la **Figura 11**. Al analizar los genotipos de rotavirus en función de los años, estos presentaron la siguiente distribución: durante 1996 los genotipos G1 y G2 fueron de mayor prevalencias (46,6% y 27,6 respectivamente), cabe destacar que durante este año el muestreo fue posterior al pico estacional de la enfermedad, no contándose con información anualizada. En 1997, G2 fue el genotipo de mayor prevalencia (53,8%) y G1 el segundo en circulación, con un porcentaje de identificación del 20,6 %. En tanto, en 1998, G1 y G4 fueron los genotipos predominantes (45,7% y 35,1% respectivamente) y la actividad del G2 decayó al 3,5%. Durante los siguientes cuatro años, G4 fue el genotipo mas detectado, con valores de prevalencia del 43,5%, 55,7%, 46% y 38,2% en los años 1999, 2000, 2001 y 2002 respectivamente. En el mismo periodo, G1 fue le segundo genotipo en importancia con porcentajes de identificación del : 28,7%, 7,8%, 7,1% y 27,1% para cada año. Cabe destacar que en los años 1998 al 2000 se detecto la circulación del genotipo G9 asociado a P[6] en un 2,1%, 9,3% y 0,7% respectivamente, en tanto en el 2002 se identificaron 2 casos de G9 asociados a P[8] (2,5%). Durante el 2003, G1 circulo con un porcentaje de identificación del 83,9% y G2 (segundo en prevalencia) con un 9,8%. Durante el 2004, G2 fue el genotipo predominante con un 54% de identificación, seguido por G4 (18%), detectándose un 10% de circulación de G9 asociado a P[8]. En el año 2005, los principales genotipos detectados fueron G4 y G9 con valores de prevalencia del 66,6% y 23 % respectivamente, en tanto la del G2 disminuyo a un 5% de los casos.

Tabla 7. Distribución Anual de G y P tipos periodo 1996-2005.

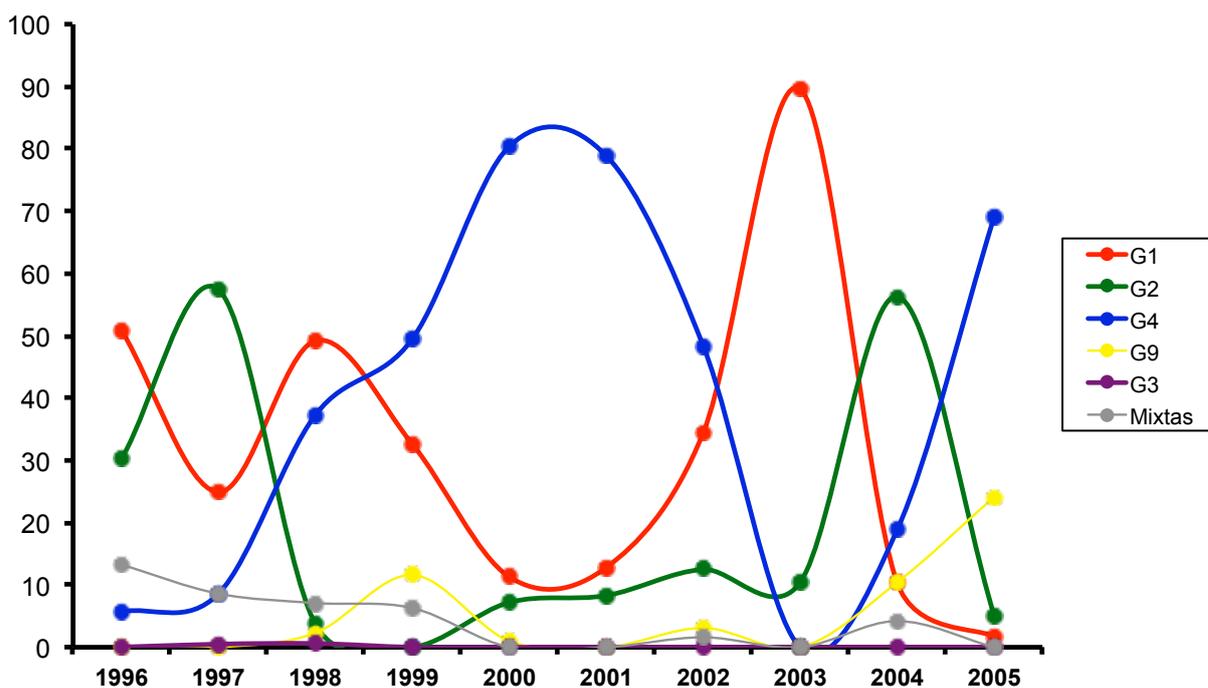
Año	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	Totales
Num.Muest. Estud. Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	58	223	376	108	115	219	81	143	50	60	1433
G1P[8]	10 (17,2)	29 (13,0)	149 (39,6)	17 (15,7)	9 (7,8)	19 (8,7)	21 (25,9)	114 (79,7)	5 (10,0)	1 (1,7)	374 (26,1)
G1P[NT]	14 (24,1)	17 (7,6)	21 (5,6)	14 (13,0)	2 (1,7)	3 (1,4)	1 (1,2)	6 (4,2)	0	0	78 (5,4)
G2P[4]	11 (19,0)	117 (52,5)	12 (3,2)	0	7 (6,1)	10 (4,6)	6 (7,4)	14 (9,8)	27 (54,0)	1 (1,7)	205 (14,3)
G2P[NT]	5 (8,6)	3 (1,3)	1 (0,3)	0	0	5 (2,3)	2 (2,5)	0	0	2 (3,3)	18 (1,3)
G4P[8]	0	8 (3,6)	99 (26,3)	35 (32,4)	70 (60,9)	122 (55,7)	27 (33,3)	0	9 (18,0)	35 (58,3)	405 (28,3)
G4P[NT]	3 (5,2)	8 (3,6)	33 (8,8)	12 (11,1)	8 (7,0)	20 (9,1)	4 (4,9)	0	0	5 (8,3)	93 (6,5)
G9P[6]	0	0	8 (2,1)	10 (9,3)	1 (0,9)	0	0	0	0	0	19 (1,3)
G9P[8]	0	0	0	1 (0,9)	0	0	2 (2,5)	0	5 (10,0)	14 (23,3)	22 (1,5)
G3P[8]	0	1 (0,4)	2 (0,5)	0	0	0	0	0	0	0	3 (0,2)
GNTPI[8]	0	0	0	0	0	0	1 (1,2)	0	0	1 (1,7)	2 (0,1)
GNTPI[6]	0	0	0	0	0	0	1 (1,2)	0	0	0	1 (0,1)
Mixtas	7 (12,1)	18 (8,1)	25 (6,6)	6 (5,6)	0	0	1 (1,2)	0	2 (4,0)	0	59 (4,1)
Inusuales	3 (5,2)	8 (3,6)	4 (1,1)	0	0	1 (0,5)	0	0	0	0	16 (1,1)
No Tipables	5 (8,6)	14 (6,3)	22 (5,9)	13 (12,0)	18 (15,7)	39 (17,8)	15 (18,5)	9 (6,3)	2 (4,0)	1 (1,7)	138 (9,6)

Figura 11. Distribución temporal de los G tipos de Rotavirus en Argentina durante 1996-2005. (A) Grafico de barras mostrando la proporción de G tipos para cada año. (B) Variabilidad de la prevalencia mostrada en líneas.

(A)



(B)



4.2. Emergencia del G9 en Argentina.

4.2.1. Resultados a partir del gen de la VP7

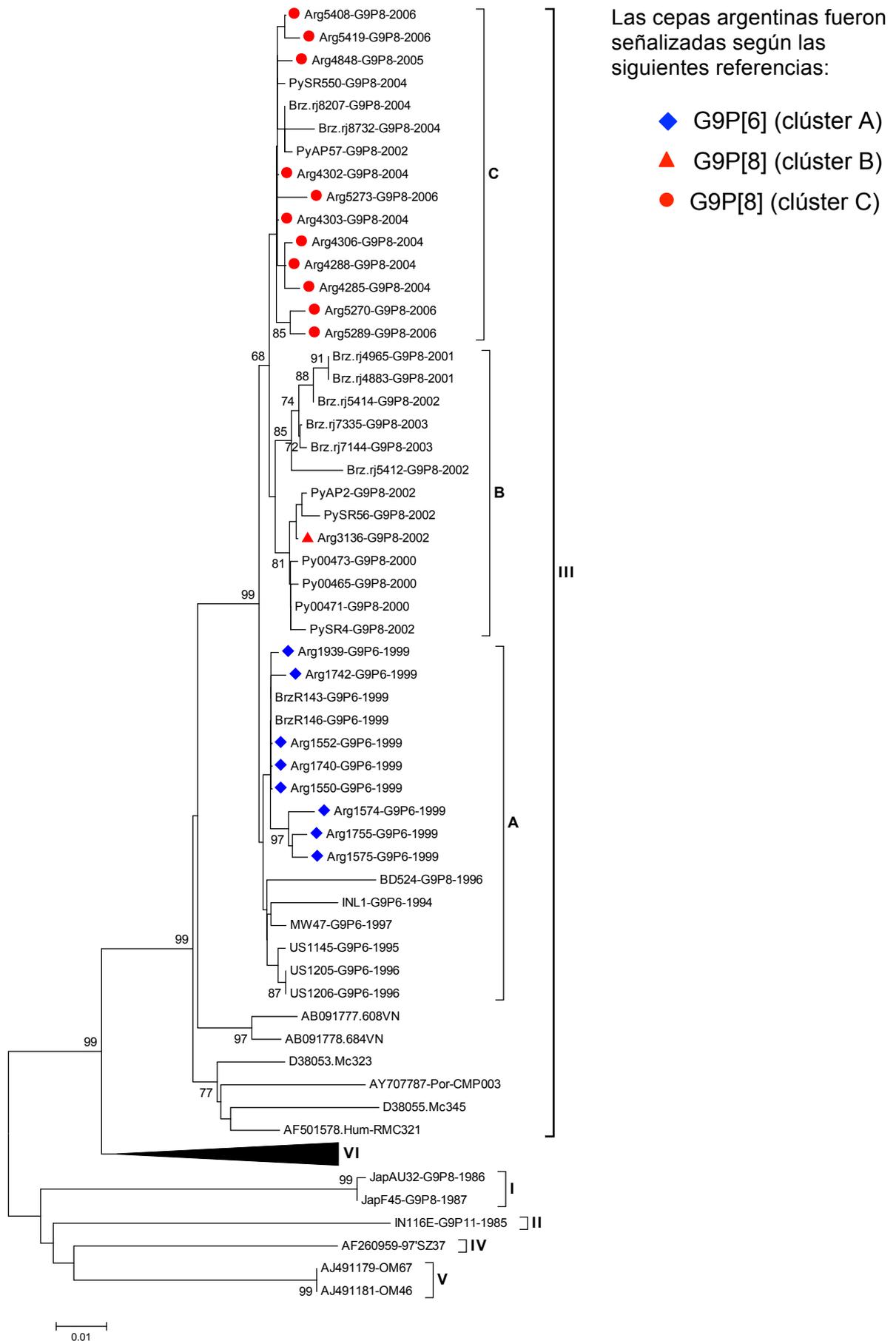
4.2.1.1. Variación molecular del gen codificante para la proteína VP7: Análisis Filogenético.

La Figura 12 corresponde a la reconstrucción filogenética del gen codificante para la proteína VP7 de los rotavirus G9, en la misma se muestran los seis linajes descritos por Phan y col. En este análisis fueron incluidas las secuencias de la VP7 de ocho cepas argentinas G9P[6] identificadas en 1999 y de 12 cepas G9P[8] circulantes en los años 2002 al 2006. En el árbol filogenético se puede observar que la totalidad de las cepas G9 aisladas en Argentina y en los países de la región agruparon en el linaje III con valores de bootstrap mayores al 90 %. Por otro lado, las cepas Argentinas se subagruparon formando tres clados diferentes con cepas del Paraguay y Brasil, manteniendo una correlación entre el P tipo y año de circulación según lo descrito por Banyai y col. (Banyai, Gentsch et al. 2004). De este modo el clado A se encuentra conformado por cepas G9P[6] circulantes en Argentina y Brasil durante los años 1998-1999. En el clado B se agruparon las cepas G9P[8] argentinas del 2002 y paraguayas del periodo 2000-2002. En tanto en el clado C se agruparon las cepas G9P[8] circulantes en Argentina, Brasil y Paraguay circulantes durante los años 2004-2006.

Figura 12: Arbol filogenético de Rotavirus G9 en Argentina, 1996-2004 (pagina 51).

La reconstrucción filogenética fue realizada mediante el método de Neighbor-Joining y usando Kimura 2P como modelos de sustitución nucleotídica, ambos disponibles en el software MEGA v5 (Tamura, Peterson et al. 2011). Los porcentajes de bootstrap mayores a 75% son mostrados en los correspondientes nodos. En el análisis de los linajes de G9 fueron incluidas las siguientes secuencias obtenidas del GenBank: AU32: AB045372; WI61: AB180969; F45: AB180970; 116E: L14072; R44: AF438227; CIT-254: AF281044; 97 SZ37: AF260959; JP35-7: AB176683; JP16-3: AB176680; JP32-4: AB176682; melb-G9.19: AY307089; b3482-01: AY487858; SP6.9: EF159955; BD524: AJ250543; INL1: AJ250277; 684VN: AB091778; 608VN: AB091777; Mc323: D38053; Mc345: D38055; SP1542: AB091753; K-1: AB045374; T203: AY003871; OM67: AJ491179; JP29-6: AB176681; CMP003: AY707787; A2: AB180971.

Figura 12: Arbol filogenético de Rotavirus G9 en Argentina, 1996-2004.



4.2.1.2. Analisis de la Similitud (%) de las cepas G9.

En la Tabla 8 se muestra la similitud nucleotídica entre las cepas argentinas y su relación con los linajes descritos para este genotipo. Los altos porcentajes de similitud entre las cepas patrones del linaje III y las cepas argentinas confirman los resultados obtenidos a nivel filogenético. Por otro lado, la divergencia observada respecto de las cepas prototipos F45 (Linaje I) y 116 E (linaje II), con distancias nucleotídica del $11,3 \% \pm 1,2$ y $11,9\% \pm 1,2$ respectivamente, refuerzan los resultados anteriores. En la Tabla 9, se muestra la distancia a nivel nucleotídico de las cepas argentinas intra e inter clados, la mayor divergencia se observa entre las cepas G9P[6] argentinas (que conforman el clado A) y las G9P[8] (que pertenecen a los clados B y C). En la misma tabla, se muestran las distancias nucleotídica entre los diferentes clados incluyendo las cepas Paraguayas y Brasileñas, obteniéndose los mismos resultados que en análisis anterior y se muestra además, la alta similitud entre las cepas de un mismo clado.

En el análisis de los porcentajes de similitud fueron incluidas las siguientes cepas de referencia, cuyas secuencias obtenidas del GenBank: AU32: AB045372; WI61: AB180969; F45: AB180970; 116E: L14072; R44: AF438227; CIT-254: AF281044; 97 SZ37: AF260959; JP35-7: AB176683; JP16-3: AB176680; JP32-4: AB176682; melb-G9.19: AY307089; b3482-01: AY487858; SP6.9: EF159955; BD524: AJ250543; INL1: AJ250277; 684VN: AB091778; 608VN: AB091777; Mc323: D38053; Mc345: D38055; SP1542: AB091753; K-1: AB045374; T203: AY003871; OM67: AJ491179; JP29-6: AB176681; CMP003: AY707787; A2: AB180971

Tabla 8. Similaridad (%) del gen de la VP7 de la cepas G9 Argentinas y su relacion con los linajes de este genotipo.

Similaridad (%) del gen de la VP7 entre las cepas G9 argentinas y los linajes descriptos para este genotipo.

	Linaje I		Linaje II	Linaje III						Linaje IV	Linaje V	Linaje VI	
	F45	AU32		INL1	MW47	BD524	Mc323	608VN	RMC321			CMP003	Humano
Arg99	98,6	Arg02	Arg04-06	INL1	MW47	BD524	Mc323	608VN	RMC321	CMP003	97Sz37	Linaje V	Linaje VI
Arg99	88,5	88,4	88,1	98,0	99,1	97,3	96,1	96,4	96,4	94,6	89,1	89,6	93,5
Arg02	88,7	88,6	88,3	97,7	98,7	96,9	96,3	96,1	96,3	95,0	89,0	89,5	93,4
Arg04-06	88,9	88,8	88,1	97,8	98,8	97,0	96,5	96,2	96,5	94,9	88,9	89,3	93,6
F45	99,9	99,9	88,0	88,6	88,9	86,7	89,0	88,0	88,9	88,0	90,1	88,9	88,5
AU32			87,9	88,5	88,7	86,5	88,9	87,9	88,7	87,9	89,9	88,7	88,3
IN116E				88,6	88,5	88,2	88,0	88,5	87,9	87,6	89,2	89,0	87,6
INL1					98,4	96,6	95,2	95,5	95,5	93,6	88,9	89,2	92,7
MW47						97,4	96,2	96,5	96,5	94,6	89,5	89,8	93,8
BD524							94,7	95,0	95,2	93,4	87,6	88,0	92,1
Mc323								96,8	97,4	95,8	88,7	88,3	93,6
Mc345								94,4	96,2	94,6	87,4	86,4	91,8
608VN									96,8	94,6	88,6	88,9	94,2
RMC321										95,8	88,9	88,3	93,8
CMP003											87,7	88,7	91,2
97Sz37												90,8	88,3
L V													89,2
LVI humano													88,4
L VI Porcino													89,5

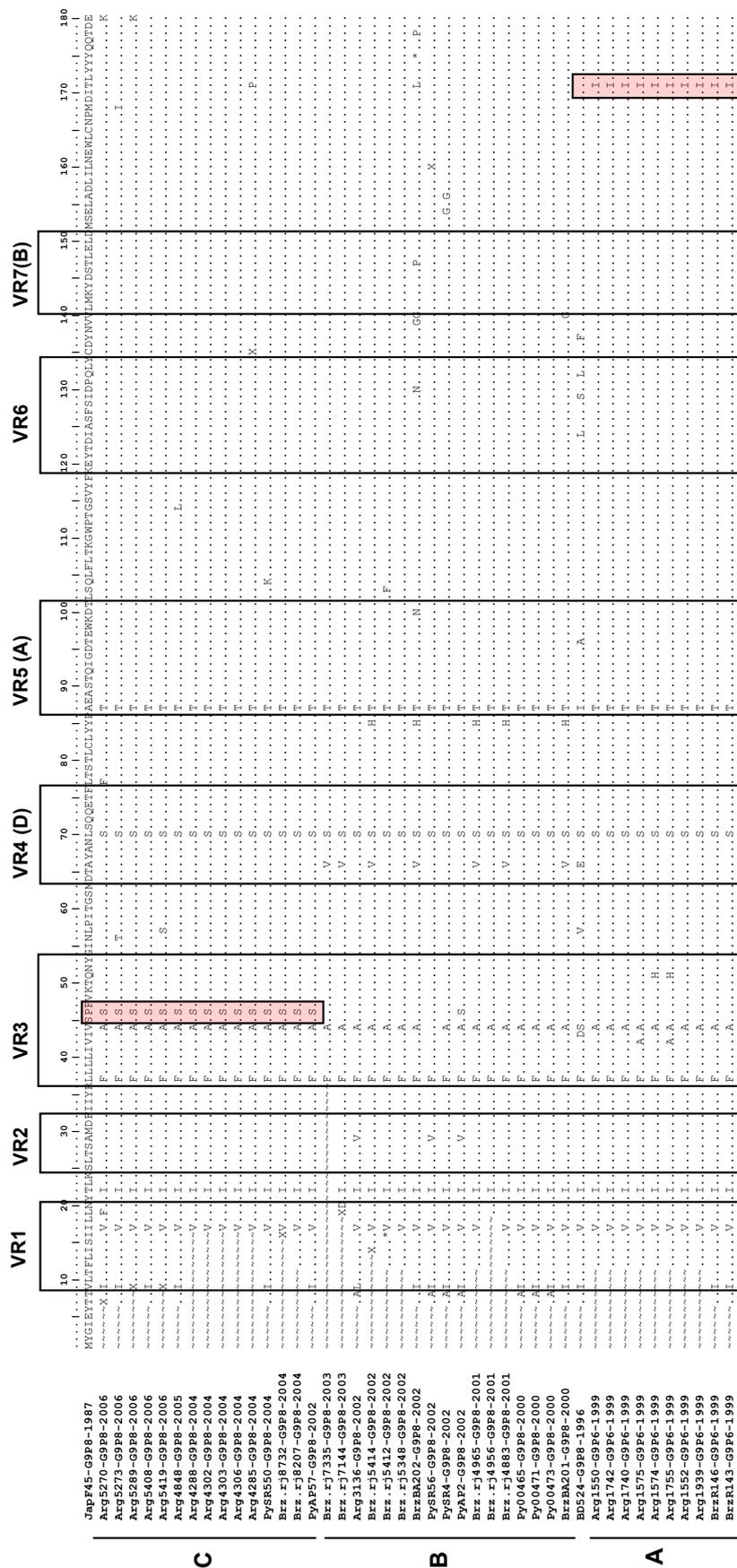
Tabla 9. Distancias nucleotídica (intra e intergrupo) del gen de la VP7: a) para las cepas G9 argentinas y b) para los clados A, B y C descriptos previamente.

Cepas	Distancias nucleotídicas intra e intergrupos (%)		
	G9.Arg.1999	G9.Arg.2002	G9.Arg.2004-06
G9.Arg. 1999	0,6± 0,2		
G9.Arg.2002	1,4	NA	
G9.Arg. 2004-06	1,3	1,1	0,6± 0,2
Clados	A	B	C
A	0,5± 0,1		
B	1,6	1,1± 0,2	
C	1,2	1,3	0,6± 0,1

4.2.1.3. Análisis de las secuencias de aminoácidos de las cepas G9.

Mediante la reconstrucción aminoacídicas del marco de lectura abierto del gen de la VP7 se analizaron las mutaciones que presento esta proteína viral en las cepas argentinas, las mismas fueron comparadas con la cepa patrón F45. Los resultados se muestran en la Figura 13. La totalidad de las cepas G9 presentaron doce mutaciones aminoacídicas conservadas en las siguientes posiciones: 17 : I→V , 22: T→I, 37: L→F, 44: V→A, 70: L→S, 87: A→T, 186: A→S, 208: T→I, 220: A→T, 242: T→N, 250: R→K y 267: E→D . De las cuales, ocho se localizaron en las regiones variables (VR) de la VP7. Además, las cepas G9P[8] pertenecientes al clado C presentaron una mutación característica, la sustitución de P→S en el residuo 46. La misma fue encontrada en las cepas G9P[8] que circularon en Argentina y Brasil durante y posteriormente al año 2004. Llamativamente, la mutación antes mencionada, fue descrita en las cepas circulantes en Paraguay durante el año 2002 (Parra y col 2005). Por su parte, las cepas G9P[6] argentinas y brasileras, que conformaron el clado A, presentaron una mutación característica: la sustitución T→I, en la posición 171. Esta ultima mutación solo fue observada en cepas G9P[6] circulantes en América del Sur.

Figura 13. Alineamiento aminoacídico de la proteína VP7.



Referencias:

- VR Regiones variables de la proteína VP7. Entre paréntesis se consignan las regiones antigénicas (A, B o C según corresponda).
- Mutaciones características encontradas en las cepas de los clúster A y C.

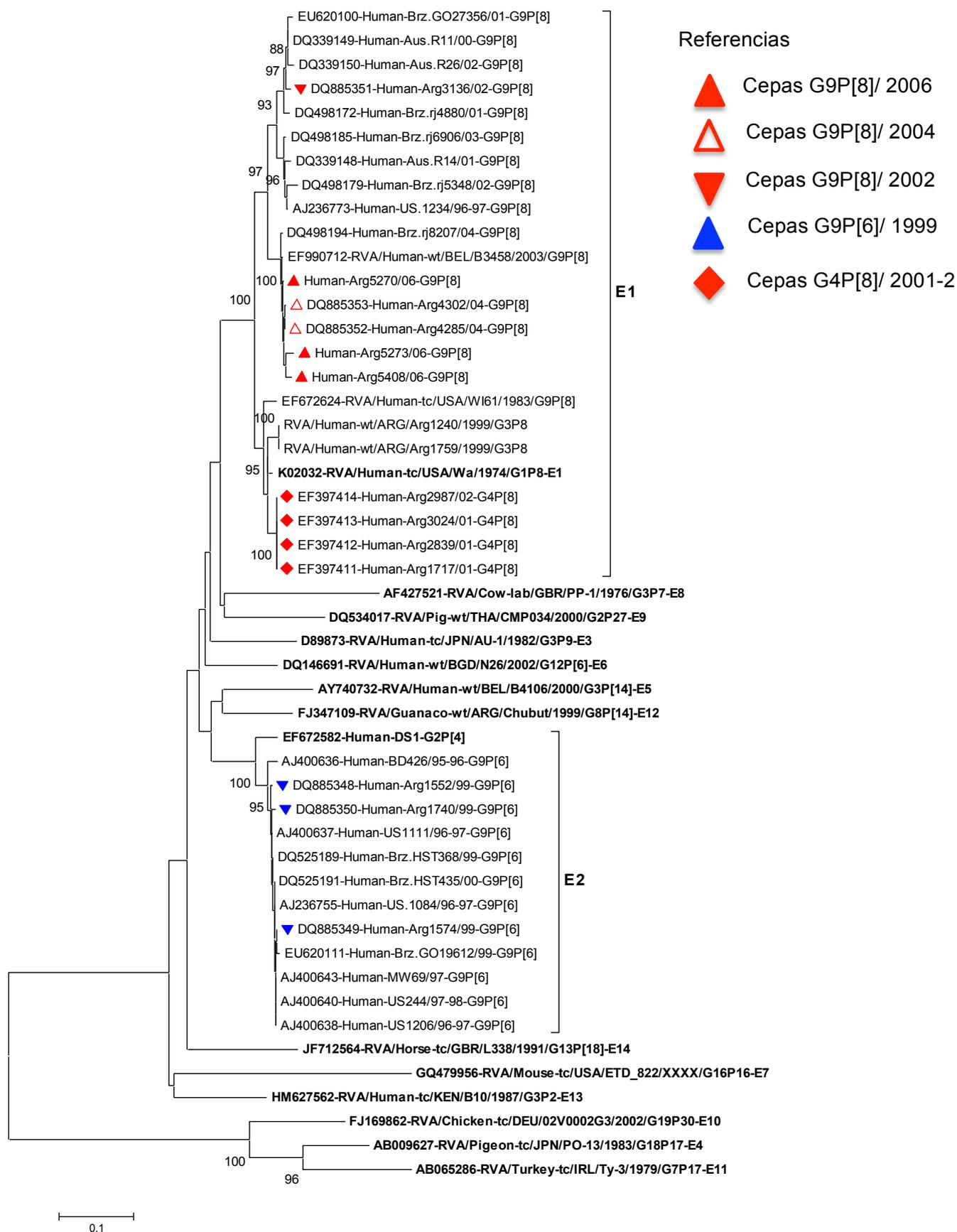
4.2.2. Resultados a partir del gen de la NSP4.

4.2.2.1. Analisis Filogenético

El análisis filogenético del gen de la NSP4 de las cepas argentinas G9P[8] y G9P[6] demostró que las mismas agruparon en dos genotipos diferentes E1 y E2 respectivamente. Las cepas argentinas G9P[6] lo hicieron junto con las cepas G9P[6] detectadas a partir de mediados de la década del los noventa. En tanto, la secuencia de los genes de la NSP4 de las cepas argentinas G9P[8] agruparon, con altos valores de bootstraps, junto al de las cepas paraguayas y brasileras que circularon durante el mismo periodo de tiempo (Figura 14).

Figura 14. Árbol filogenético de NSP4 de los rotavirus G9 detectados en Argentina, 1996-2004 (pagina 58). La reconstrucción filogenética fue realizada mediante el método de Neighbor-Joining y usando Kimura 2P como modelos de sustitución nucleotídica, ambos disponibles en el software bioestadístico MEGA v5 (Tamura, Peterson et al. 2011). Los porcentajes de bootstrap mayores a 75% son mostrados en los correspondientes nodos. El análisis de los genotipos de NPS4 fue realizado según el RCWG (Matthijnssens, Ciarlet et al. 2008; Matthijnssens, Ciarlet et al. 2011). Fueron incluidas las siguientes secuencias obtenidas del GenBank: E1: Wa, K02032; E2: DS-1, AF174305; E3: AU-1, D89873; E4: PO-13, AB0099627; E5: B4106, AY740732; E6: N26, DQ146691; E7:ETD_822, GQ479956; E8: PP-1, AF427521; E9: CMP034, DQ534017; E10: 02V0002G3, FJ169862; E11: Ty-3, AB065286; E12:Chubut, FJ347109, E13:B10, HM627562.

Figura 14. Arbol filogenético del gen de la NSP4



4.2.2.2 Analisis de similaridad (%) del gen de la NSP4.

Al analizar los porcentajes de similaridad del gen de la NSP4 de las cepas G9 argentinas aisladas, se puede observar que las cepas G9P[8] y G9P[6] muestran una alta similaridad con las cepas patrones de los genotipos E1 y E2 respectivamente, confirmándose los resultados obtenidos mediante los analisis filogenéticos para este gen (Tabla 10).

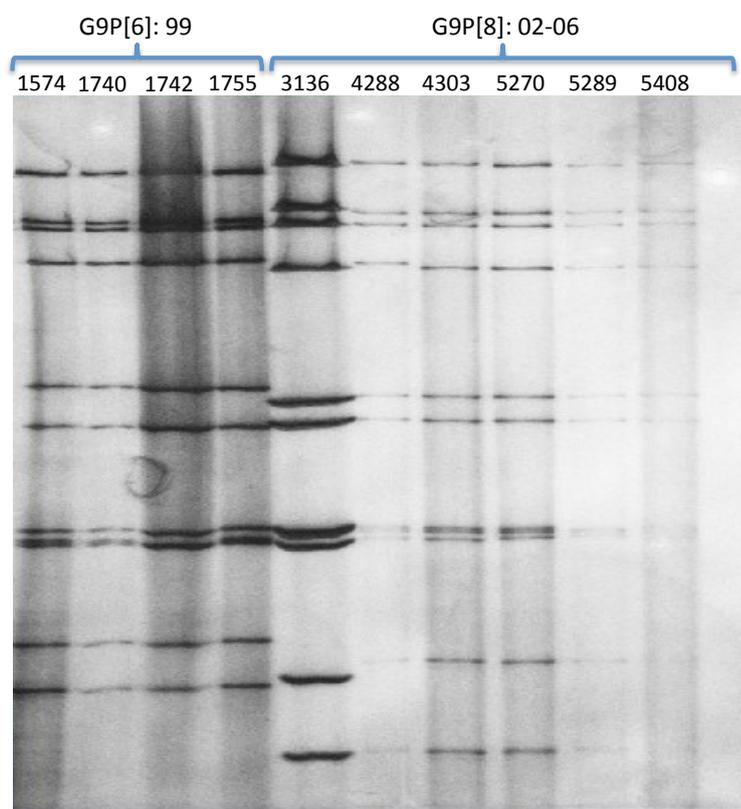
Tabla 10. Similaridad nucleotídica (%) del gen de la NSP4 entre las cepas G9 argentinas y los linajes descriptos.

Genotipos Cepas	ArgG9P[8] 2006	ArgG9P[8] 2004	ArgG9P[8] 2002	ArgG9P[6] 1999	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14
ArgG9P[8] 2006		98,9	93,9	81	93,8	81,5	81,3	47,8	76,2	81	64,4	75,1	80,2	50,6	47,3	78,3	75,6	77
ArgG9P[8] 2004			94,6	81,1	94,2	81,3	81,1	47,8	76,3	81,5	64,1	74,9	80,2	50,4	47,2	78,2	75,7	76,7
ArgG9P[8] 2002				82,4	92,1	81,6	80,3	49,5	78,8	82,7	64,1	74,6	79,4	49,9	47,9	79,2	76,6	76,4
ArgG9P[6] 1999					80,8	93,9	78,4	47	79,8	82,4	67,4	70,5	77	51,3	46,8	84,3	77,5	77,7
E1						80,7	81,4	48,4	77,7	81,2	64,1	76,4	81,2	51,4	47,7	79,9	76,8	77,2
E2						78,6	47,7	80,3	80,5	67,4	71,3	77,2	50,1	46,6	83,8	77,7	76,1	
E3						48,1	75,9	81	66,1	74,2	75,7	47,7	48,8	77,7	80,5	75,9		
E4						51,2	47,7	44,2	45,3	47,5	74,2	80,1	47,7	49	47,5			
E5						79,2	64,6	71,3	76,8	51	47,5	81,8	74,2	73,7				
E6						63,9	72,9	77,2	49,9	48,1	80,3	78,1	77,5					
E7						61,1	63	44,9	44,6	65	66,5	62,4						
E8						72,6	47,7	45,1	76,1	69,1	67,2							
E9						52,5	46,6	78,6	73,3	75,1								
E10						75,1	52,3	50,3	53									
E11						47,5	48,1	49,5										
E12						76,4	77,7											
E13						72,2												
E14																		

4.2.3. Resultados de los perfiles de electroferotipos de las cepas G9.

El análisis de los patrones de migración del ARN viral demostraron que las cepas G9P[6] (clado A) poseían un electroferotipo corto, mientras que las G9P[8] (clados B y C) presentaron un electroferotipo largo (Figura 15). Ramachandran et al. (2000) demostró, mediante técnicas de hibridación, que las cepas G9 combinadas con P[6], subgrupo I de VP6, NSP4 genotipo 2 (E2) y patrones cortos de electroferotipos provienen del genogrupo “*DS1 like*”, mientras que las cepas con la combinación G9P[8], subgrupo II, E1 y patrones largo de electroferotipos pertenecen al genogrupo “*Wa like*”. De este modo, los resultados de la caracterización de los genes de la VP7 y NSP4, junto con el análisis de los electroferotipos permiten concluir que las cepas argentinas G9P[8] y G9P[6] provienen de dos genogrupos diferentes (“*Wa like*” y *DS1 like*” respectivamente) (Stupka et al. 2007).

Figura 15. Electroferotipos de rotavirus G9 detectados en Argentina



4.2.4. Origen de la cepa G9P[8] con alta prevalencia en Argentina

La prevalencia del RV G9 en el periodo de estudio es detallada en la Figura 16, en la misma se agrega la actividad de este genotipo en los años 2006 y 2007, en los cuales circulo con valores de prevalencia del 66% y 44%. respectivamente. Se pone de manifiesto así, la importancia como genotipo emergente en nuestro país (Stupka, Carvalho et al. 2009). Los primeros

reportes de G9 para la región ocurren en Brasil durante los años 1996 -1997, en los cuales se describe la circulación de cepas G9P[8] y mas tardíamente la combinación G9P[6] (Araujo, Ferreira et al. 2001; Araujo, Assis et al. 2007). Por otro lado, en Argentina los primeros hallazgos para este genotipo fueron cepas G9P[6] detectadas durante los años 1998-1999, mientras que en Paraguay en el 2000 es documentada la circulación de G9P[8] (Bok, Palacios et al. 2001; Parra, Bok et al. 2005). Estos primeros reportes fueron coincidentes con la emergencia de G9 a nivel mundial (Figura 17 A). Posteriormente, en nuestro país se documentan casos esporádicos de cepas G9P[8] en los años 2002 y 2004 y la emergencia de G9 en el periodo 2005-2007. El análisis de las secuencias aminoacídicas determino que estas cepas portaban una mutación marcadora, una sustitución de Isoleucina por una Serina en el residuo 46 en la region variable 3 (VR-3) de la proteína VP7 (Stupka, Parra et al. 2007; Stupka, Carvalho et al. 2009).

Al realizar la búsqueda retrospectiva de esta mutación, una de las dos variantes de G9P[8] que cocircularon en Paraguay en el año 2002 constituyen el antecedente mas antiguo de esta mutación a nivel regional. Esta cepa G9P[8]^{Ser46} fue posteriormente encontrada en el brote de G9 ocurrido en Paraguay en el año 2004 y en la emergencia de este genotipo en Argentina en los años 2005-2007 (Parra, Espinola et al. 2007; Stupka, Carvalho et al. 2009).

Coincidentemente en Brasil se registra actividad de esta cepa a partir del 2004. Estos analisis sugieren la emergencia de esta cepa en Paraguay y su posterior diseminación a los países de la region. De este modo se introduce el concepto de una diseminación monofilogenética regional para este genotipo, donde a pesar de la diversidad reportada a nivel de reasociaciones y mutaciones puntuales, una única cepa es la que logra una diseminación con altos valores de prevalencia (Figura 17 B y C).

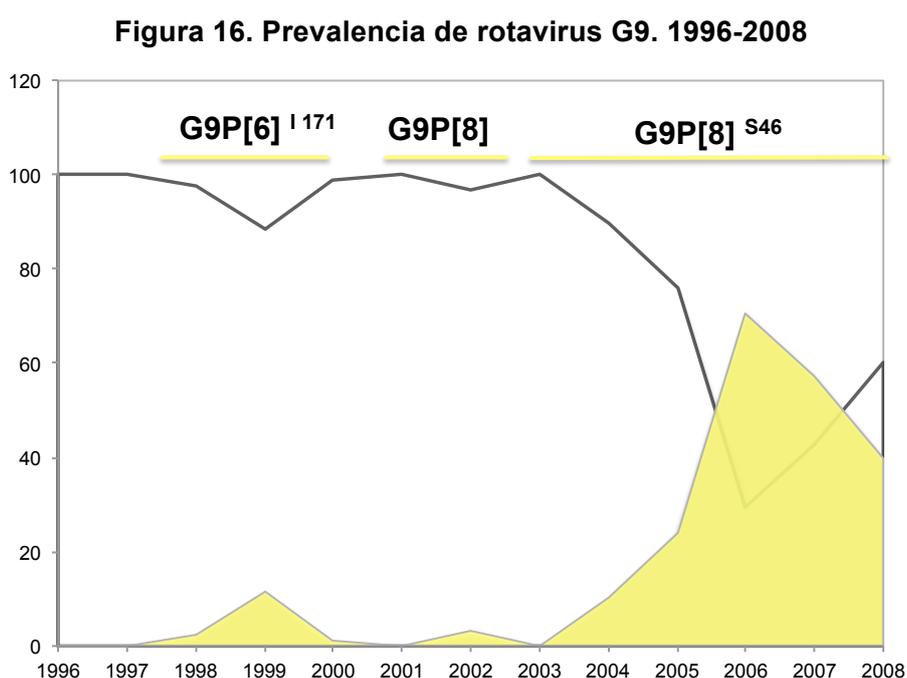
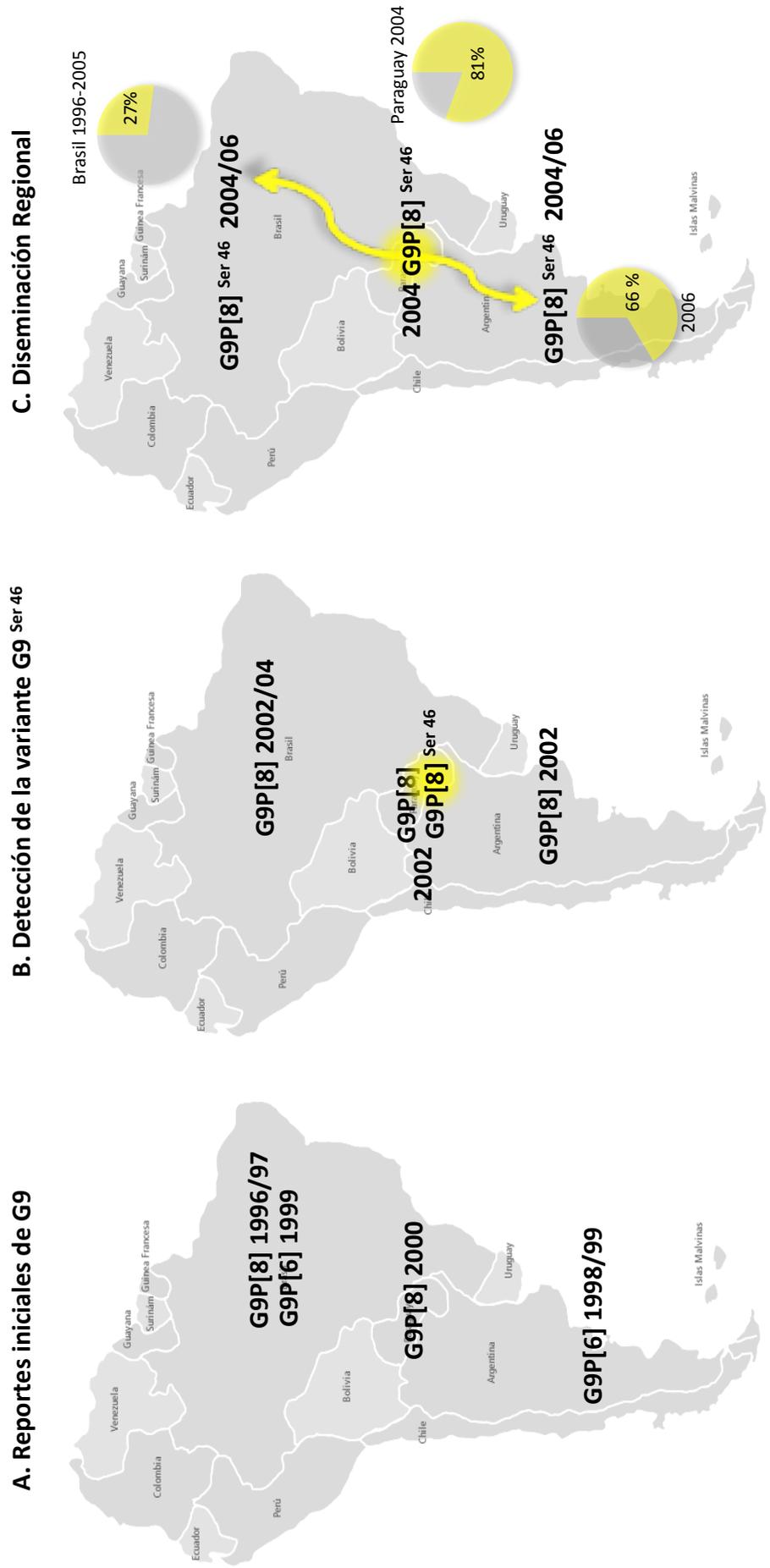


Figura 17. Circulación de rotavirus G9



4.3. Epidemiología Molecular de Rotavirus G1 en Argentina.

El estudio de la variabilidad intragenotipo de las cepas de Rotavirus G1 fue realizado en 49 cepas G1P[8] detectadas en el periodo 1996-2004. La selección de las mismas se basó en la posibilidad de contar con las secuencias, en al menos cinco cepas por año, de los genes codificantes para las proteínas VP7 y VP4. En el primero se realizó la secuenciación completa del gen (1062 pb), mientras que en el segundo gen la misma fue parcial (800 pb).

4.3.1. Resultados a partir del gen de la VP7.

4.3.1.1. Analisis filogenético.

La Figura 18 corresponde a la reconstrucción filogenética del gen codificante de la proteína VP7 de los rotavirus genotipo 1 (G1), en la misma se muestran los linajes/sublinajes de este genotipo según lo descrito por Arista y col (Arista, Giammanco et al. 2006).

Los rotavirus humanos G1 agruparon en seis linajes diferentes (G1-I al G1-VI), en tanto, las secuencias de las cepas argentinas se distribuyeron en tres de los seis linajes mencionados, específicamente en G1-I, G1-II y G1-V.

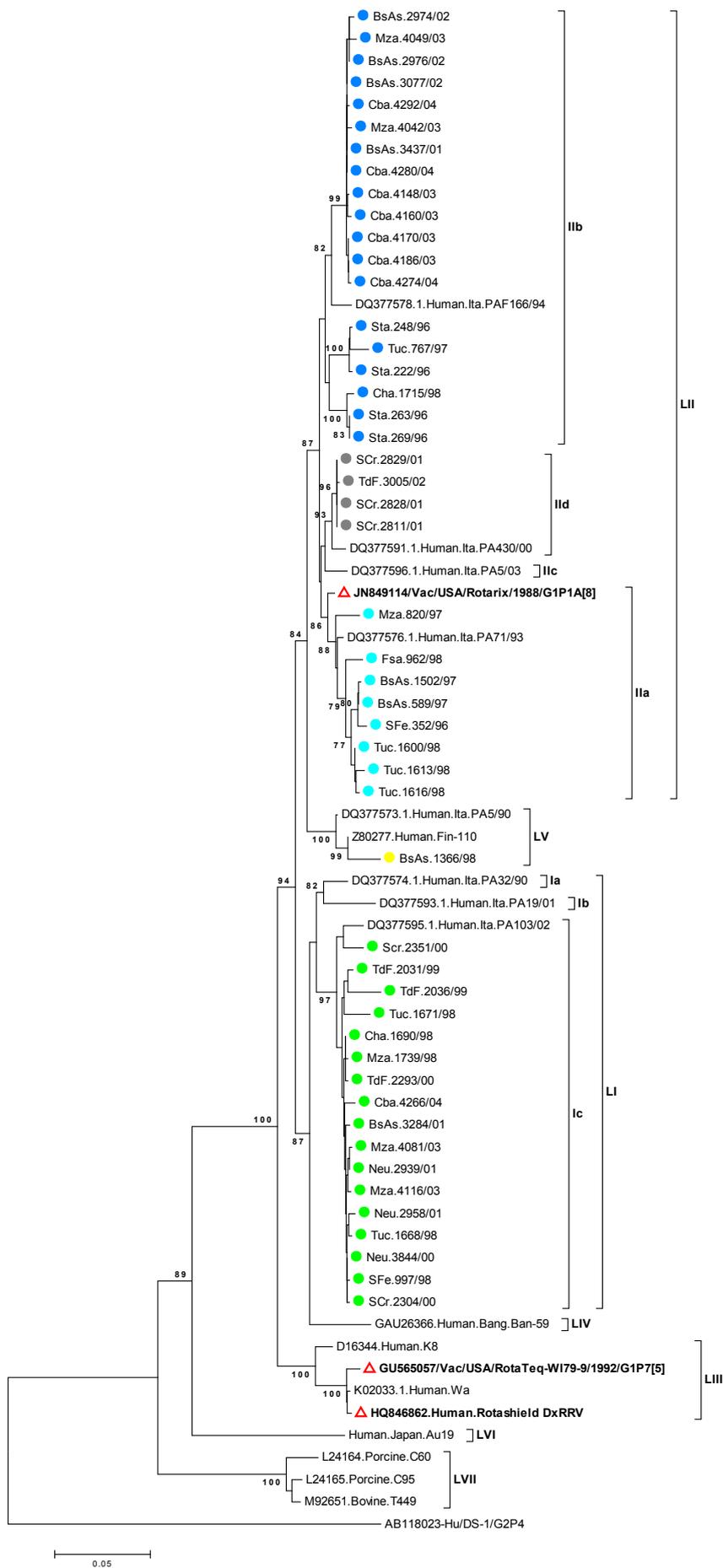
En el linaje G1-I agruparon 17 cepas argentinas, todas incluidas en el sublinaje G1-Ic. Las 32 cepas restante agruparon en el linaje G1-II, subdivididas en 3 sublinajes (8 cepas en el G1-IIa, 19 en el G1-IIb y 4 en el G1-IId) y solo una en el linaje G1- V. No se detectó circulación de los linajes humanos G1-III, G1-IV y G1-VI.

Referencias Figura 18 (pag. 64)

La reconstrucción filogenética fue realizada mediante el método de Neighbour-Joining usando Kimura 2P como modelos de sustitución nucleotídica, ambos disponibles en el software MEGA v5 (Tamura, Peterson et al. 2011). Los porcentajes de bootstrap mayores a 75% son mostrados en los correspondientes nodos. En el análisis de los linajes/sublinajes de G1 fueron incluidas las siguientes secuencias obtenidas del GenBank: DQ377578.1: Human.Ita.PAF166/94; DQ377591.1: Human.Ita.PA430/00; DQ377596.1: Human.Ita.PA51/03; JN849114: Vac/USA/Rotarix/1988/G1P1A[8]; DQ377576.1: Human.Ita.PA71/93, DQ377573.1: Human.Ita.PA5/90; Z80277: Human.Fin-110; DQ377574.1: Human.Ita.PA32/90; DQ377593.1: Human.Ita.PA19/01; DQ377595.1: Human.Ita.PA103/02; GAU26366: Human.Bang.Bang-59; D16444: Human.K8; GU565057: Vac/RotaTeq-W179-9/1992/G1P7[5]; K02033.1: Human. Wa; HQ846862: Human.Rotashield; DxRRV: Human.Japan.Au19; L24164: Porcine.C60; L24165: Porcine.C95; M92651: Bovine.T449; AB118023: Hu/DS-1/G2P[4].

Para especificar el origen geográfico de las cepas argentinas se utilizaron las siguientes abreviaturas: Buenos Aires: BsAs, Chaco: Cha, Córdoba: Cba, Formosa: Fsa, Mendoza: Mza, Neuquén: Neu; Salta: Sta, Santa Fe: Sfe, Santa Cruz: Scr, Tierra del Fuego: TdF, Tucumán: Tuc.

Figura 18: Arbol filogenético de Rotavirus G1 en Argentina, 1996-2004



En las cepas argentinas los linajes/sublinaje de G1 fueron señalizados según las siguientes referencias:

Linaje/sublinaje:

- Ic
- IIa
- IIb
- IIc
- IId
- III
- △ Cepas vacunales

4.3.1.2. Porcentaje de similitud intra e interlinajes de las cepas G1.

El análisis de la matriz de similitud del gen de la VP7 demostró que las cepas argentinas se agruparon en tres linajes principales. En la tabla 11 se muestra la similitud nucleotídica (%) de las mismas, agrupadas en los linajes I, II, V y su relación con los restantes linajes descrito por Arista. El rango de similitud fue del 83,0% al 94,9 %. El menor porcentaje fue observado respecto del linaje VII, el cual agrupa a cepas de rotavirus G1 aisladas en porcinos y bovinos en los años 1986-87 y la mayor similitud fue la determinada entre los linajes I y IV.

Tabla 11. Porcentaje de similitud nucleotídica entre linajes de Rotavirus G1

	G1-I*	G1-II*	G1-III	G1-IV	G1-V*	G1-VI	G1-VII
G1-I*							
G1-II*	94.4 ¹						
G1-III	92.1	92.8					
G1-IV	94.9²	93.5	93.0				
G1-V*	92.7	94.2	92.0	91.9			
G1-VI	84.9	86.0	85.9	84.8	84.6		
G1-VII	84.4	84.7	83.8	84.6	83.0	84.8	

* Linajes en los que agrupan las cepas Argentinas.

¹ Resaltado en gris, se muestran las similitudes nucleotídica (%) entre las cepas argentinas de los linajes I, II, V y su relación con los restantes linajes descrito por Arista y colaboradores.

² Recuadrado y en negrita se encuentran los valores máximos y mínimos de similitud observado. Para el análisis de los porcentajes de similitud se incluyeron las siguientes secuencias de cepas argentinas y referenciales de linajes según lo descrito previamente(

***G1-I:** SFe.997/98; Cha.1690/98; Tuc.1668/98; Tuc.1671/98; Mza.1739/98; TdF.2031/99; TdF.2036/99; Neu.3834/00; SCr.2351/00; SCr.2304/00; TdF.2293/00; Neu.2939/01; Neu.2958/01; BsAs.3284/01;Mza.4081/03; Mza.4116/03; Cba.4266/04; ***G1-II:** SFe.352/96; Mza.820/97; BsAs.1502/97; BsAs.589/97; Fsa.962/98; Tuc.1616/98; Tuc.1600/98; Tuc.1613/98, Sta.222/96; Sta.263/96; Sta.269/96; Sta.248/96; Tuc.767/97; Cha.1715/98; BsAs.3437; BsAs.3077/02; BsAs.2974/02; BsAs.2976/02; Mza.4042/03; Mza.4049/03; Cba.4186/03; Cba.4148/03; Cba.4160/03; Cba.4170/03; Cba.4274/04; Cba.4280/04; Cba.4292/04, SCr.2828/01; , SCr.2829/01, SCr2811/01; TdF.3005/02; **G1-III:** K02033.1.RO29.Human.Wa/84; **G1-IV:** GAU26366.Human.Bang.Ban-59; ***G1-V:** BsAs.1366/98; **G1-VI:** AB018697.Human.Japan.Au19/97; **G1-VII:** L24164.Porcine.C60, L24165.Porcine.C95; M92651.Bovine.T449.

4.3.1.3. Sublinajes de Rotavirus G1 de Argentina.

En la Tabla 12 se muestra el porcentaje de similaridad entre las cepas marcadoras de linajes/sublinajes descriptas en la literatura y los distintos sublinajes encontrados en nuestro país. De este modo, todas las cepas argentinas G1-I estuvieron muy relacionadas con la cepa referencial de linaje/sublinaje Ic, mostrando una similaridad nucleotídica mayor al 98% con las cepas de este sublinaje y un valor del 98,9% entre si. De este modo, la totalidad de las cepas G1-I circulantes en Argentina provinieron solo del sublinaje Ic, no encontrándose mayor diversificación en este linaje. Por otro lado, se muestra la relacion entre las cepas G1-II locales y las marcadoras de sublinajes del G1-II. Así, las cepas de este linaje que circularon en nuestro país resultaron altamente relacionadas con los sublinajes G1-IIa, G1-IIb y G1-IId.

Tabla 12. Porcentaje de similaridad con las cepas referenciales de sublinajes.

Lin/Sub	G1-Ic Arg	G1-IIa Arg	G1-IIb Arg	G1-IId Arg	G1-V Arg
G1-Ia	96,2	94,1	94,8	95,1	91,9
G1-Ib	95,2	93,1	93,3	94,0	91,2
G1-Ic	98,0	93,0	94,2	93,8	91,9
G1-IIa	94,5	98,4	97,1	98,1	94,2
G1-IIb	94,3	96,2	97,8	97,8	93,7
G1-IIc	94,4	96,5	97,0	98,2	94,1
G1-IId	94,5	96,8	97,0	99,0	94,0
G1-III	92,0	92,2	92,8	93,1	91,8
G1-IV	94,9	93,0	93,6	93,9	91,7
G1-V	94,5	95,7	96,2	96,7	97,4
G1-VI	84,8	85,7	85,9	86,0	84,2
G1-VII	84,2	84,1	84,6	84,5	82,7

En la Tabla 13, se muestra, específicamente la relacion entra los diferentes sublinajes GI-II encontrados en nuestro país. La diferencia nucleotídica observada entre los mismos fue mayor al 2,5%. De igual modo se muestran los valores de similaridad nucleotídica intra sublinaje, observándose que las diferencias genética entre las cepas dentro de cada sublinaje fue menor al 2%.

Tabla 13. Porcentaje de similitud entre e intra sublinajes de las cepas G1-II Argentinas.

Lin/Sub	G1-IIa Arg	G1-IIb Arg	G1-IIc Arg
G1-IIa Arg	98,6*		
G1-IIb Arg	96,1	98,4	
G1-IIc Arg	97,0	97,4	99,9

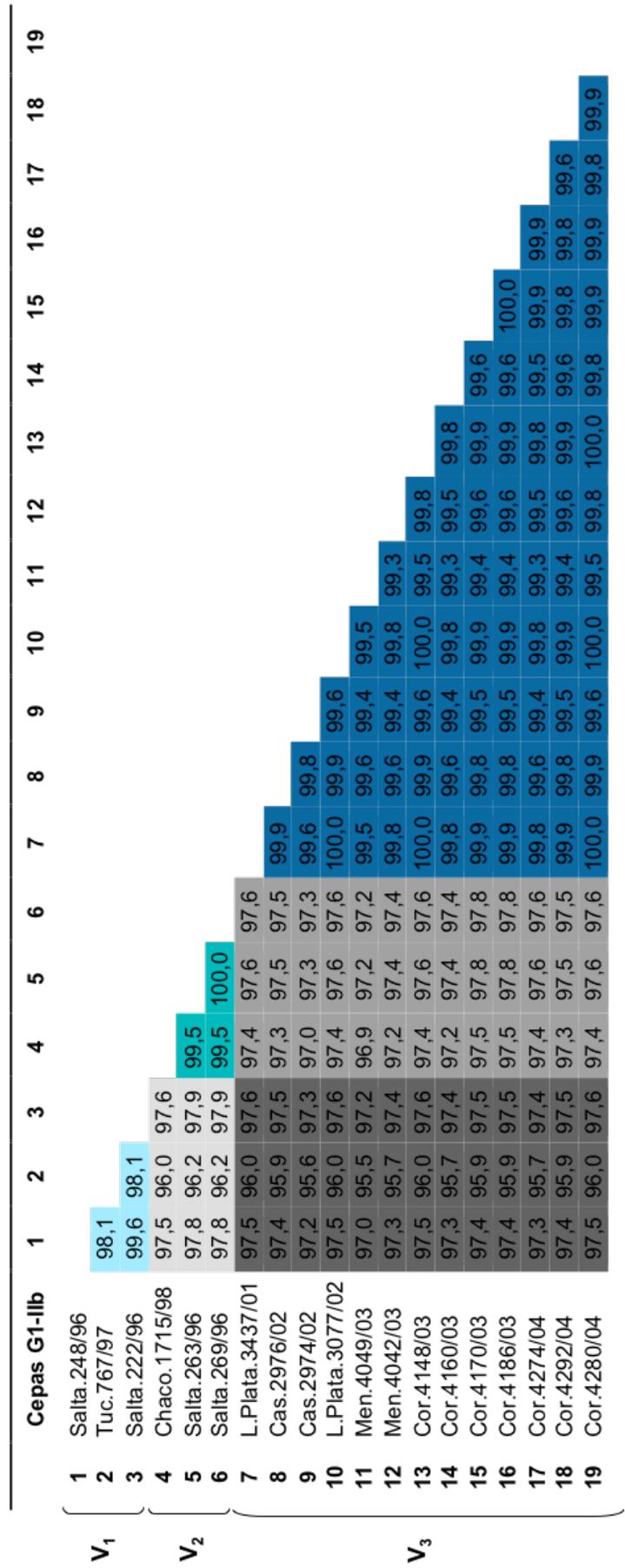
Para la obtención de los resultados de **la Tabla 12** y **Tabla 13** se utilizaron las siguientes secuencias de cepas patrones y argentinas.

G1-Ia: DQ377574.1.Human.Ita.PA32/90; **G1-Ib:** DQ377593.1.Human.Ita.PA19/01; **G1-Ic:** DQ377595.1.Human.Ita.PA103/02; **G1-IcArg:** SFe.997/98, Cha.1690/98, Tuc.1668/98, Tuc.1671/98; Mza.1739/98, TdF.2031/99, TdF.2036/99, Neu.3834/00, SCr.2351/00, SCr.2304/00, TdF.2293/00, Neu.2939/01, Neu.2958/01, BsAs.3284/01, Mza.4081/03, Mza.4116/03, Cba.4266/04; **G1-IIa:** DQ377576.1.Human.Ita.PA71/93; **G1-IIaArg:** Mza.820/97, Fsa.962/98, BsAs.1502/97, BsAs.589/97, SFe.352/96, Tuc.1600/98, Tuc.1613/98, Tuc.1616/98; **G1-IIb:** DQ377578.1.Human.Ita.PAF166/94; **G1-IIbArg:** Sta.222/96, Sta.263/96, Salta.269/96, Sta.248/96, Tuc.767/97, Cha.1715/98, BsAs.3437, BsAs.3077/02, BsAs.2974/02, BsAs.2976/02, Mza.4042/03, Mza.4049/03, Cba.4186/03, Cba.4148/03, Cba.4160/03, Cba.4170/03, Cba.4274/04, Cba.4280/04, Cba.4292/04; **G1-IIc:** DQ377596.1.Human.Ita.PA5/03, **G1-IIc:** DQ377591.1.Human.Ita.PA430/00, **G1-IIcArg:** SCr.2828/01; , SCr.2829/01, SCr.2811/01; TdF.3005/02; **G1-III:** K02033.1.RO29.Human.Wa/84; **G1-IV:** GAU26366.Human.Bang.Ban-59; **G1-V:** DQ377573.1.Human.Ita.PA5/90; **G1-VArg:** BsAs.1366/98; **G1-VI:** AB018697.Human.Japan.Au19/97; **G1-VII:** L24164.Porcine.C60, L24165.Porcine.C95; M92651.Bovine.T449.

4.3.1.4. Análisis de variantes o alelos intra sublinaje G1-IIb.

Las cepas del linaje/sublinaje G1-IIb que circularon en nuestro país mostraron la mayor divergencia intrasublinaje (Tabla 13). Al analizar la matriz de similitud de las cepas que conformaron este sublinaje (Tabla 14), las mismas pueden ser separadas en tres grupos según porcentajes de similitud nucleotídica. Estos resultados, en conjunto con los análisis filogenéticos, apoyan la hipótesis de la circulación de tres “variantes” o “clusters” en las cepas del sublinaje G1-IIb, dos de las cuales (V1 y V2) circularon durante los años 1996-98 y la tercera (V3) a partir de 2001. En la tabla 14 se muestra la matriz de similitud entre las 19 cepas pertenecientes al sublinaje G1-IIb.

Tabla 14. Porcentaje de Similitud intra e inter variantes del sublinaje G1-1lb circulantes en Argentina.



Similaridad (%) entre las cepas de la variante 1 (V₁) Similaridad (%) entre las cepas de la variante 2 (V₂)

Similaridad (%) entre las cepas de la variante 3 (V₃) Similaridad (%) entre las cepas de la V₁ vs V₂

Similaridad (%) entre las cepas de la V₂ vs V₃ Similaridad (%) entre las cepas de la V₁ vs V₃

4.3.1.5. Diferencia Aminoacídicas entre las cepas G1. Analisis de las mutaciones.

Mediante la reconstrucción aminoacídicas del marco de lectura abierto del gen de la VP7 se analizaron las mutaciones que presentó esta proteína viral en las cepas argentinas, las mismas fueron comparadas con la cepa patrón Wa (Figura 19).

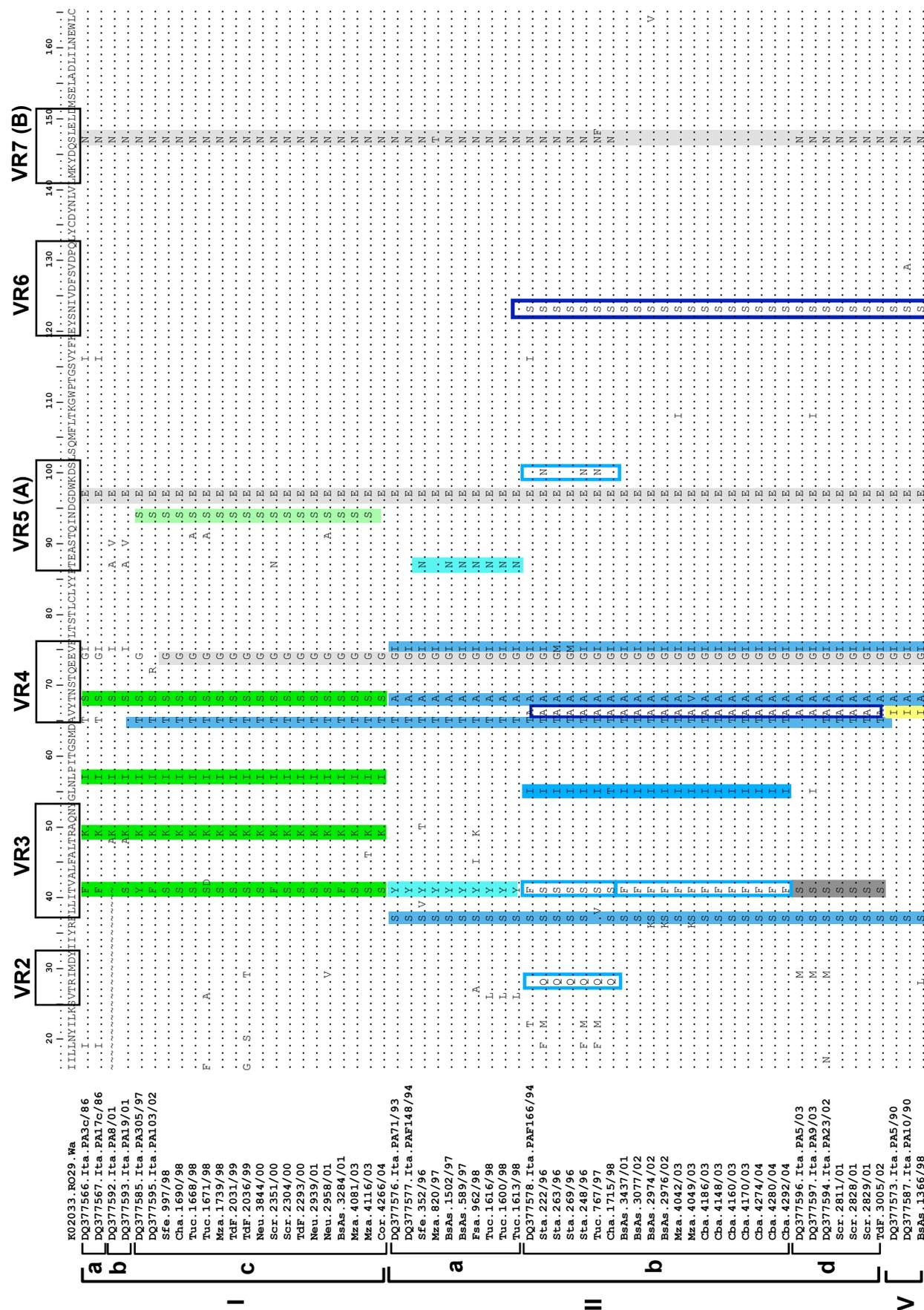
En todas las cepas G1 argentinas se observaron sustituciones aminoacídicas conservadas en las posiciones: 74: E→G; 97: D→E; 170: V→I y 218: I→V. Además, fueron descritas otras mutaciones solo conservadas entre ciertos linajes/sublinajes. Así la sustitución 65:A→T estuvo presente en los linajes G1-I y G1-II, las mutaciones en las posiciones 37:F→S; 68:T→A y 75:V→I, solo fueron encontradas en los linajes II y V. La mutación 123: N→S, fue encontrada en los linajes/sublinajes G1-IIb, G1-IId y linaje G1-V.

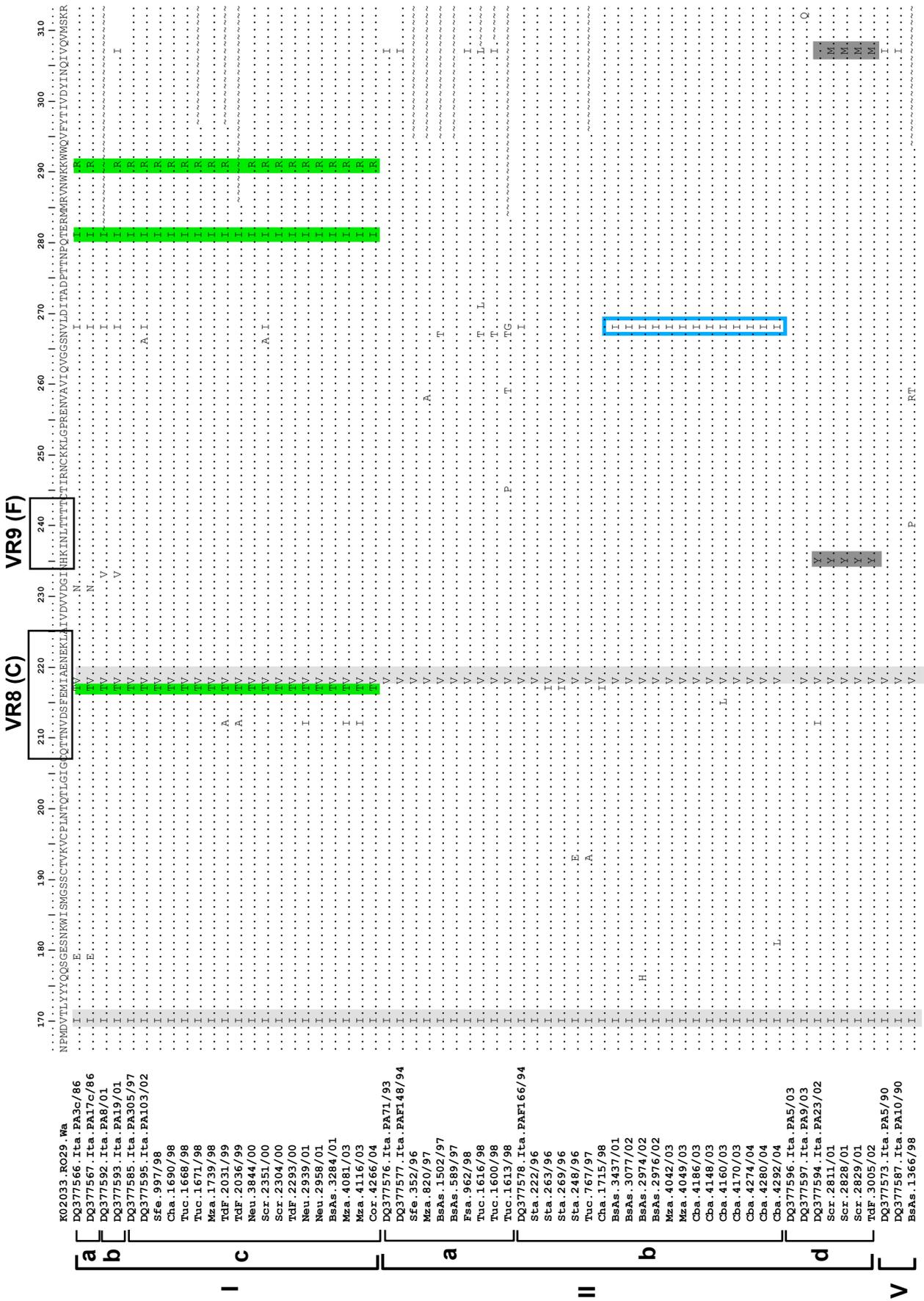
Por otro lado, se observaron sustituciones específicas de cada linaje, así el linaje I (G1-I) presentó las siguientes mutaciones: 49: R→K, 57: L→I, 68: T→S; 217: M→T; 281:T→I y 291: K→R. Por su parte, el sublinaje Ic (G1-Ic) mostró la mutación: 94: D→S, que caracteriza a este sublinaje. Las 17 cepas G1-Ic presentaron en total 14 mutaciones en su VP7 respecto de la cepa patrón Wa y seis de los mismos fueron encontradas en sitios antigénicos de esta proteína viral (Figura 19).

Por otro parte, el sublinaje G1-IIa quedó definido por la mutación en la posición 41: T→Y y 87: En el sublinaje G1-IIb, se observaron 3 variantes y las mismas presentaron mutaciones específicas, así la variante 1 (G1-IIbv₁) quedó definida por los cambios aminoacídicos en las siguientes posiciones: 28: R→Q, 41: T→S, 55:L→I y 100: D→N, en la segunda variante (G1-IIbv₂) fueron observadas las siguientes sustituciones específicas: 28: R→Q, 41: T→S y 55:L→I, mientras que la tercera variante presentó las siguientes mutaciones características: 41: T→F, 55:L→I y 268:V→I. Cabe destacar que en esta última variante, una sustitución muy conservada en todas las restantes cepas G1 (147: S→N), no estuvo presente.

El sublinaje II d (G1-II d) presentó las siguientes mutaciones específicas: 41: T→S, 235: T→F y 307: V→M. En el linaje V (G1-V) fue observada la sustitución en la posición 66: V→I, característica de linaje. Los resultados anteriormente descritos se muestran en la **Figura 19** y se resumen en la **Tabla 15**.

Figura 19. Mutaciones Aminoacídicas en la proteína VP7 en las cepas G1 argentinas.





Referencias Figura 19 y Tabla 15

VR Regiones variables de la proteína VP7. Entre paréntesis se consignan las regiones antigénicas (A, B o C según corresponda).

- Mutaciones conservadas en las cepas G1 argentinas.
- Sustituciones conservadas entre dos linajes diferentes
- Sustituciones del linaje I (G1-I)
- Sustitución específica del sublinaje Ic (G1-Ic)
- Sustituciones del sublinaje Ila (G1-Ila)
- Sustituciones del sublinaje Iib (G1-Iib)
- Sustituciones de las variantes del sublinaje Iib (G1-IIBv₁₋₃)
- Sustituciones del sublinaje Iid (G1-Iid)

Tabla 15. Sustituciones aminoacídicas en la VP7 de los linajes/sublinajes de las cepas G1 Argentinas.

G1-Ic	G1-Iia	G1-Iibv1	G1-Iibv2	G1-Iibv3	G1-Iid	G1 V
6/14* ¹	4/11	5/15	4/14	3/13	5/14	4/10
		28:R→Q	28:R→Q			
	37:F→S	37:F→S	37:F→S	37:F→S	37:F→S	37:F→S
41: T→SoF	41:T→Y	41:T→S	41:T→S	41:T→F	41:T→S	
49:R→K						
		55:L→I	55:L→I	55:L→I		
57:L→I						
65:A→T	65:A→T	65:A→T	65:A→T	65:A→T	65:A→T	
		66:V→A	66:V→A	66:V→A	66:V→A	66: V→I
68: T→S	68:T→A	68:T→A	68:T→A	68:T→A	68:T→A	68:T→A
74:E→G	74:E→G	74:E→G	74:E→G	74:E→G	74:E→G	74:E→G
	75:V→I	75:V→I	75:V→I	75:V→I	75:V→I	75:V→I
	87:T→N					
94:N→S* ²						
97:D→E	97:D→E	97:D→E	97:D→E	97:D→E	97:D→E	97:D→E
		100:D→N				
		123:N→S	123:N→S	123:N→S	123:N→S	123:N→S
147: S→N	147:S→N	147:S→N	147:S→N		147:S→N	147:S→N
170:V→I	170:V→I	170:V→I	170:V→I	170:V→I	170:V→I	170:V→I
217:M→T						
218:I→V	218:I→V	218:I→V	218:I→V	218:I→V	218:I→V	218:I→V
					235: H→Y	
				268:V→I		
281:T→I						
291:K→R						
					307: V→M	

*¹ Número de mutaciones en los sitios antigénicos/ Número total de mutaciones observadas.

*² Mutaciones en los sitios antigénicos.

4.3.2. Resultados en base la gen de la VP4

4.3.2.1. Analisis filogenético del gen de la VP4

Con el objetivo de analizar las relaciones filogenéticas del gen que codifica para la proteína VP4, fue realizada la secuenciación parcial del mismo en 40 cepas G1P[8] incluidas en el estudio. Específicamente, fue analizada la porción genómica de VP4 que codifica para la proteína VP8*.

Como se muestra en la Figura 20, los rotavirus humanos del genotipo P[8] agruparon en cuatro linajes diferentes denominados I a IV según lo descrito por Araujo y col. (Araujo, Assis et al. 2007).

Las 40 secuencias de las cepas argentinas agruparon en tres de los cuatro linajes anteriormente mencionados, específicamente en : P[8]-I, P[8]-II y P[8]-III, con 22, 2 y 17 cepas respectivamente.

En la **Figura 20** se muestra el árbol filogenético realizado mediante el método de Neighbour-Joining y Kimura 2P como modelo de sustitución nucleotídica, ambos disponibles en el software MEGA v5 (Tamura, Peterson et al. 2011). Los porcentajes de bootstrap mayores a 75% son mostrados en los nodos. Para el análisis de los linajes de P[8] fueron incluidas las siguientes cepas obtenidas del GenBank: AJ302147.1.OP351; DQ857918.1.rj8200/04.G1P[8]; DQ857907.1.rj5412/02.G9P[8]; DQ857911.1.rj6906/03.G9P[8]; DQ857906.1.rj5348/02.G9P[8]; DQ857904.1.rj5321/02.G1P[8]; DQ857917.1.rj7363/03.G1P[8]; U30716.F45; GU565044.RVA.Vaccine.USA.RotaTeq.1992.G6P[8]; DQ857925.1.rj40644/90.G5P[8]; DQ857902.1.rj4965/01.G9P[8]; L34161.1.ROHVP4OCP.WA; JN849113.HRVA.Vaccine.USA.Rotarix.1988.G1P[8]; AB008280.1.G3.strain.ITO; AJ302146.1. MW670; OP530G499; AJ302148.1.OP354; AJ540227.DS-1DQ857926.1.rj5323/02.G2P4, M58292.1.L26.P4, AJ278256.1.MW333, AY855067.1.R291, AF519205.1.GB-5737.P6.

Para especificar el origen geográfico de las cepas argentinas fueron utilizadas las siguientes abreviaturas: Buenos Aires: BsAs, Chaco: Cha, Cordoba: Cba, Formosa: Fsa, Mendoza: Mza, Neuquen: Neu; Salta: Sta, Santa Fe: Sfe, Santa Cruz: Scr, Tierra del Fuego: TdF, Tucuman: Tuc.

Figura 20. Arbol filogenético de VP4 de Rotavirus G1 en Argentina.



En esta figura y con el objetivo de visualizar la asociación entre los linajes de G1 y P[8], las cepas argentinas fueron señalizadas según los linajes/sublinajes de G1 a los cuales pertenecían.

Referencias:

Linaje/sublinaje de G1

- Ic
- IIa
- IIb
- IIc
- V
- △ Cepas vacunales

4.3.3. Asociación de linajes/sublinajes de G1 y P[8] en las cepas circulantes.

En la Tabla 16, se muestran los linajes/sublinajes de VP7 y VP4 de las cepas G1P[8] analizadas, año de circulación y procedencia, mientras que en la Tabla 17, se resume la asociación de linajes y sublinajes entre ambos genotipos.

Los resultados en la Tabla 17 muestran que todas las cepas del linaje/ sublinaje G1-Ic se asociaron a lo largo de todo el periodo estudiado con el linaje P[8]-III. De igual modo, los linajes/sublinajes G1-IIa y G1-IId estuvieron asociados al linaje P[8]-I.

Llamativamente, las cepas del sublinaje G1-IIb fueron la excepción a esta característica, en este caso particular las dos variantes más antiguas (G1-IIbv1 y G1-IIv2) se asociaron al linaje P[8]-III y II respectivamente, mientras que las cepas de la tercera variante (detectada en 2000-2002) lo hicieron con el linaje P[8]-I.

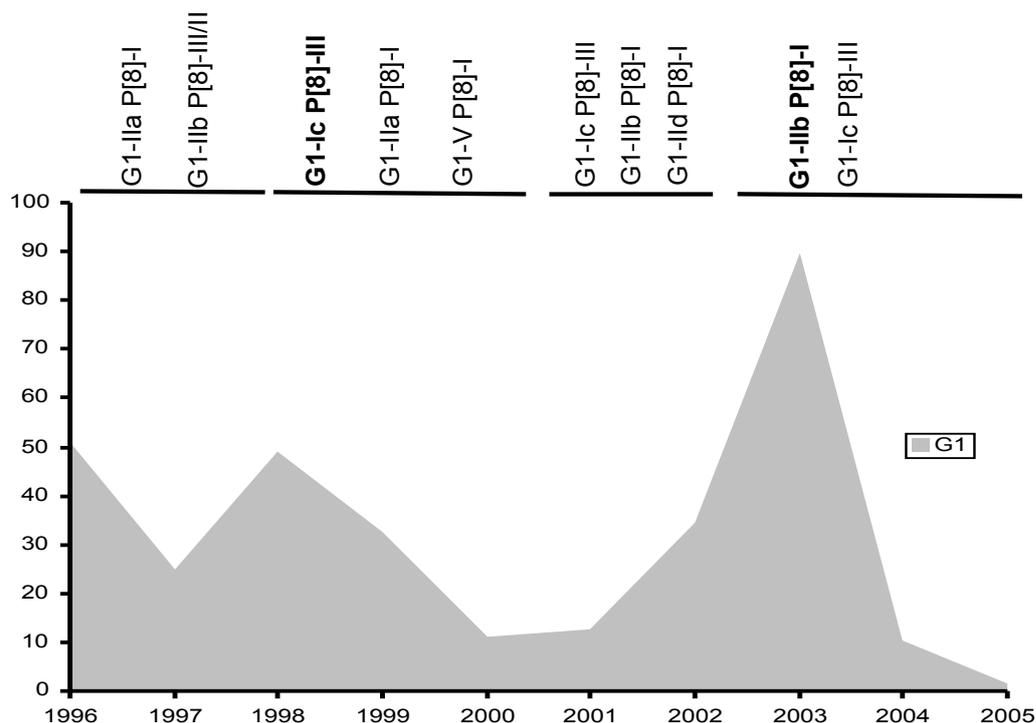
Tabla 16. Asociación de linaje/sublinajes de VP7 y VP4 del las cepas G1P[8] Argentinas.

	Muestra	Origen	Año	VP7: G1	VP4: P[8]		Muestra	Origen	Año	VP7: G1	VP4: P[8]
				Linaje/ sublinaje	Linaje					Linaje/ sublinaje	Linaje
1	222	Salta	1996	II b	III	27	2304	Santa Cruz	2000	I c	III
2	263	Salta	1996	II b	-	28	2293	Tierra del Fuego	2000	I c	III
3	269	Salta	1996	II b	II	29	2828	Santa Cruz	2001	II d	I
4	248	Salta	1996	II b	III	30	2811	Santa Cruz	2001	II d	I
5	352	Santa Fe	1996	II a	I	31	2829	Santa Cruz	2001	II d	-
6	767	Tucumán	1997	II b	-	32	2939	Neuquén	2001	I c	-
7	820	Mendoza	1997	II a	-	33	2958	Neuquén	2001	I c	III
8	1502	Buenos Aires	1997	II a	I	34	3437	Buenos Aires	2001	II b	I
9	589	Buenos Aires	1997	II a	I	35	3284	Buenos Aires	2001	I c	III
10	816	Mendoza	1997	-	I	36	3005	Tierra del Fuego	2002	II d	I
11	1739	Mendoza	1998	I c	III	37	2974	Buenos Aires	2002	II b	I
12	997	Santa Fe	1998	I c	III	38	2975	Buenos Aires	2002	II b	-
13	1690	Chaco	1998	I c	III	39	2976	Buenos Aires	2002	II b	I
14	1616	Tucumán	1998	II a	I	40	3077	Buenos Aires	2002	II b	I
15	1600	Tucumán	1998	II a	I	41	4042	Mendoza	2003	II b	I
16	1668	Tucumán	1998	I c	III	42	4049	Mendoza	2003	II b	I
17	937	Córdoba	1998	-	III	43	4081	Mendoza	2003	I c	-
18	1715	Chaco	1998	II b	II	44	4116	Mendoza	2003	I c	III
19	1366	Buenos Aires	1998	V	I	45	4148	Córdoba	2003	II b	I
20	1613	Tucumán	1998	II a	-	46	4160	Córdoba	2003	II b	I
21	1671	Tucumán	1998	I c	-	47	4170	Córdoba	2003	II b	I
22	962	Formosa	1998	II a	-	48	4186	Córdoba	2003	II b	I
23	2031	Tierra del Fuego	1999	I c	III	49	4266	Córdoba	2004	I c	-
24	2036	Tierra del Fuego	1999	I c	III	50	4274	Córdoba	2004	II b	-
25	3844	Neuquén	2000	I c	III	51	4280	Córdoba	2004	II b	I
26	2351	Santa Cruz	2000	I c	III	52	4292	Córdoba	2004	II b	I

Tabla 17. Asociación entre linajes/sublinajes/variantes de G1 y linajes de P[8] de las cepas argentinas.

VP7	VP8*		
	P[8]-I	P[8]-II	P[8]-III
G1-Ic			11
G1-IIa	5		
G1-IIb v ₁			2
G1-IIb v ₂		2	
G1-IIb v ₃	12		
G1-IIId	3		
G1-V	1		

Figura 21. Prevalencia (%) y distribución temporal de Linajes/sublinajes de las cepas G1P[8] en el periodo 1996-2004.



En la Figura 21, se muestra la prevalencia de G1P[8] detectado en cada año analizado. Los linajes y sublinajes de VP7 y VP8* circulantes en diferentes periodos son mostrados en la porción superior del gráfico.

Se pueden describir tres picos de alta prevalencia de rotavirus G1, además de una cocirculación de linajes/sublinajes, a lo largo de todo el periodo estudiado. Al analizar la circulación de los mismos y los periodos en los cuales fueron detectados, estos resultados sugerirían que la aparición de los pico de G1 estarían precedidos por la introduccion de un nuevo linaje/sublinaje de este genotipo. De este modo, el sublinaje G1-Ic es detectado a partir del pico de G1 de 1998 y si bien el sublinaje G1-IIb circulo durante los años 1996-98, este reemergió posteriormente en 2003 asociado a un linaje diferente de P[8], con cambios aminoacídicos en las regiones antigénicas de su VP7.

4.4. Analisis comparativo del Rotavirus G1 en Argentina y las cepas vacunales.

4.4.1. Analisis Filogenético.

En la Figura 18 se muestran las relaciones filogenéticas del gen que codifica para la proteínas VP7 de las cepas G1 argentinas, cepa vacunal Rotarix y el componente G1 vacunal de RotaTeq. Se puede observar que el gen de la Rotarix agrupo con las cepas argentinas del linaje G1-II (G1-IIa), mientras que Rotateq lo hizo en el linaje III, junto con las cepas de referencia Wa y K8.

4.4.2. Analisis basados en la similaridad (%).

En la Tabla 18 se muestra el porcentaje de similaridad entre los linajes/sublinajes de G1 circulantes en Argentina y las cepas vacunales.

La cepa vacunal de Rotarix presento los mayores valores de similaridad respecto de las cepas argentinas. Según lo esperado, el linaje G1- II fue el mas similar o el de mayor identidad respecto de esta cepas vacunal. A su vez, los linajes G1-I y G1-V fueron los mas distantes respecto de esta cepa vacunal. Por otra parte, las cepas G1 locales no mostraron diferencias entre si en los porcentajes de similaridad obtenidos, respecto del componente vacunal de RotaTeq.

Tabla 18. Porcentaje de Similaridad entre las cepas G1 argentinas y las vacunales.

Lin/Sub	Rotarix	RotaTeq
G1-Ic	94.78	91.55
G1-IIa	98.12	91.83
G1-IIb	97.56	92.54
G1-IId	98.55	92.84
G1-V	94.89	91.69

4.4.3. Análisis de las diferencias aminoacídicas de los linajes/sublinajes G1 argentinos con las cepas vacunales.

En general, al comparar las estructuras primarias de las proteínas VP7 de las cepas G1 argentinas respecto de las cepas vacunales se observó que las del linaje/sublinaje G1-Ic mostraron el mayor número de diferencias aminoacídicas, con 12 y 17 cambios respecto de Rotarix y RotaTeq (Tabla 19).

Al analizar la región amino terminal (comprendidas entre los residuos 51 a 78), las cepas del linaje G1-I presentaron 3 diferencias aminoacídicas respecto de Rotarix (residuos 57, 68 y 75) y 4 respecto de Rotateq (en los residuos 57, 65, 68 y 74).

Por su parte y para la misma región, las cepas del linaje G1-II mostraron escasas diferencias respecto de Rotarix, en las cuales solo se observaron dos cambios aminoacídicos en el sublinaje G1-IIb (en los residuos 55 y 56). Por el contrario, al comparar estos linajes con el componente G1 de Rotateq, en todas las cepas se observaron cuatro aminoácidos diferentes, ubicados en los residuos 65, 68, 74, y 75 y dos mutaciones adicionales (55 y 66) en los sublinajes G1-IIb (Tabla 19).

Al analizar la porción restante de la proteína VP7 (aa 78 al 326), en las cepas del linaje G1-I se observaron cinco diferencias conservadas o transversales con respecto a las cepas vacunales (ubicadas en los residuos 94, 123, 217, 281 y 291). Además, y específicamente con Rotarix se observa una mutación adicional en la posición 202, en tanto con Rotateq se observan 6 diferencias adicionales (en los residuos 97, 101, 141, 147, 170 y 218) respecto de RotaTeq. Al comparar las cepas de linaje G1-II respecto de Rotarix, se observa un rango de 1 a 3 mutaciones para esta porción de la VP7. Una sola sustitución, en el residuo 202, fue encontrada de forma conservada en todos los sublinajes de las cepas G1-II. Por otro lado, al analizar las diferencias de este linaje respecto de Rotateq, un rango de 4 a 8 aminoácidos diferentes fueron encontrados, de los cuales seis sustituciones fueron conservadas en los sublinajes de G1-II (residuos 97, 101, 141, 147, 170 y 218).

Mutaciones específicas de cada sublinaje se adicionan a las diferencias anteriormente descritas, así para el sublinaje G1-IIa se observan sustituciones en las posiciones 87 y 123, de igual modo en los residuos 100, 217 y 268 para el sublinaje G1-IIb (en las respectivas variantes) y las observadas en las posiciones 235 y 307 en el sublinaje G1-IId (Tabla 19).

Tabla 19. Diferencias aminoacídicas entre las proteínas VP7 de los linajes/sublinajes G1 y las cepas vacunales.

	Rotarix	RotaTeq
G1-Ic	37:S→F 41:Y→S/F 49:R→K 57:L→I 68:A→S 75:I→V 94:N→S* 123:S→N 202:M→T 217:M→T 281:T→I 291:K→R	41:Y→S/F 49:R→K 57:L→I 65:A→T 68:T→S 74:E→G 94:N→S 97:D→E 101:T→S 123S→N 141:F→L 147:S→N 170:V→I 217:M→T 218:I→V 281:T→I 291:K→R
G1-IIa	87:T→N 123:S→N 202:M→T	37:F→S 41:T→Y 65:A→T 68:T→A 74:E→G 75:V→I 87:T→N 97:D→E 101:T→S 123:S→N 141:F→L 147:S→N 170:V→I 218:T→V
G1-IIb v ₁	19:L→F 22:I→M 28:R→Q 41:Y→S 55:L→I 66:V→A 100:D→N 202:M→T	19:L→F 22:I→M 28:R→Q 37:F→S 41:T→S 55:L→I 65:A→T 66:V→A 68:T→A 74:E→G 75:V→I 97:D→E 100:D→N 101:T→S 141:F→L 147:S→N 170:V→I 218:T→V
G1-IIb v ₂	28:R→Q 41:Y→S 55:L→I 66:V→A 202:M→T 217:M→Y	28:R→Q 37:F→S 41:T→S 55:L→I 65:A→T 66:V→A 68:T→A 74:E→G 75:V→I 97:D→E 101:T→S 141:F→L 147:S→N 170:V→I 217:M→I 218:T→V
G1-IIb v ₃	41:Y→F 55:L→I 66:V→A 147:N→S 202:M→T 268:V→I	37:F→S 41:T→S 55:L→I 65:A→T 66:V→A 68:T→A 74:E→G 75:V→I 97:D→E 101:T→S 141:F→L 170:V→I 218:T→I 268:V→I
G1-IIId	41:Y→F 66:V→A 202:M→T 235:H→Y 307:V→M	37:F→S 41:T→S 65:A→T 66:V→A 68:T→A 74:E→G 75:V→I 97:D→E 101:T→S 141:F→L 147:S→N 170:V→I 218:T→I 235:H→Y 307:X→M
G1-V	41:Y→F 65:T→A 66:V→I 202:M→T	37:F→S 66:V→A 68:T→A 74:E→G 75:V→I 97:D→E 101:T→S 141:F→L 147:S→N 170:V→I 218:T→I

Referencias:

- Diferencias aminoacídicas en la region amino terminal (aa 51 al 78)
- Diferencias aminoacídicas conservadas en el linaje G1-I respecto de Rotarix y RotaTeq
- Diferencias aminoacídicas conservadas en el linaje/sublinajes G1-II respecto de Rotarix
- Diferencias aminoacídicas conservadas en el linaje/sublinajes G1-II respecto de Rotateq
- * Diferencias en las regiones antigénicas (A, B y C) se encuentran resaltadas en negritas

4.4.4. Diferencias entre las regiones antigénicas neutralizantes de Rotavirus G1 en argentina y las cepas vacunales. Analisis Estructural

Recientemente se han mapeado, sobre la estructura de la VP7, los epitopes antigénicos correspondientes a las proteínas externas de la cápside. En el trímero de VP7 se han definidos estructuralmente dos epitopes: 7-1 y 7-2, donde el primero se encuentra subdividido en 7-1a y 7-1b. Por otro lado, en la proteína VP4, la cual es clivada durante su activación en las proteínas VP8* y VP5*, se han localizado cuatro (8-1 a 8-4) y cinco (5-1 a 5-5) epitopes antigénicos respectivamente. Varios autores han propuesto que cambios aminoacídicos en los mencionados epitopes, en las cepas de rotavirus "wild tipe", podrían disminuir la efectividad vacunal. Para investigar si tales diferencias existen entre las cepas G1 argentinas y las cepas vacunales, se comparó la composición aminoacídica de sus respectivos epitopes antigénicos en las proteínas VP7 y VP8* .

Los residuos aminoacídicos que constituyen los epitopes 7-1a, 7-1b y 7-2 de las cepas G1 argentinas y las cepas vacunales Rotarix y Rotateq se muestran en la Tabla 20 (a) y en las figuras 22 (a y b).

Las cepas G1 argentinas mostraron nueve aminoácidos diferentes en los epitopes antigénicos de la VP7 respecto de la cepa de Rotarix y diez diferencias con la cepa G1 (W179-9) de Rotateq. En ambas situaciones la mayoría de las diferencias fueron encontradas en el epitope 7-1a y en menor medida en el 7-2. Cabe destacar que no se observaron aminoácidos diferentes o mutaciones en la region 7-1b en ninguno de los linajes estudiados.

Las diferencias entre las cepas G1 argentinas y la cepa vacunal Rotarix fueron observadas en los residuos aminoacídicos de las posiciones 87, 94, 100, 123, 147, 217 y 291. Con respecto al componente vacunal de Rotateq, además de los cambios anteriormente mencionados, la totalidad de las cepas analizadas difirieron en el residuo 97.

En la Tabla 20 se puede observar que de los tres linajes de VP7 analizados, los epitopes de las cepas del linaje G1-I, contienen el mayor numero de diferencias aminoacídicas respecto de las cepas vacunales (cuatro en la region 7-1a y dos en la region 7-2).

En el linaje G1-II se observaron en general seis diferencias, que en contraposición con el linaje G1-I, fueron el resultado de los cambios presentados por el conjunto de los sublinajes y variantes de G1-II encontradas. Así, en los sublinajes G1-IIa y G1-IIb se observaron cuatro residuos diferentes, mientras que en el sublinaje G1-IId se describen solo dos cambios respecto del componente G1 de Rotateq. En el linaje V se observaron tres cambios a nivel de los epitopes de VP7.

En relacion a los epitopes descritos en la proteína VP8*, en Argentina circularon tres linajes diferentes de P[8]: P[8]-I al P[8]-III. Al analizar las diferencias a ese nivel entre las cepas G1P[8] argentinas y las vacunales, se observo que las cepas P[8]-III mostraron cinco

diferencias antigénicas respecto del P[8]-I de Rotarix y dos con las P[8]-II de Rotateq. Las diferencias en los epitopes de las cepas P[8]-III argentinas, estuvieron localizadas en los epitopes 8-1 y 8-3 al compararla con Rotarix, mientras que respecto de Rotateq solo fueron encontradas en el epitope 8-1. Según lo esperable, las cepas del linaje P[8]-I y P[8]-II fueron muy similares a los epitopes de los P[8] de Rotarix y Rotateq respectivamente. Tabla 20 (b).

Por otro lado, los linajes P8-I y P8-II argentinos presentaron cinco diferencias con Rotateq y Rotarix respectivamente. Cabe destacar que solo en dos residuos de los epitopes analizados, se observaron diferencias para ambas cepas vacunales (aminoácidos 150 y 194).

Tabla 20. Residuos aminoacídicos de los epitopes neutralizantes de las proteínas VP7 (A) y VP4 (B). Diferencias entre las cepas G1P[8] argentinas y las vacunales.

(A)

	7-1a										7-1b					7-2													
	87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	201	211	212	213	238	242	143	145	146	147	148	190	217	221	264
Rotarix	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	M	N	G
RotaTeq	T	T	N	G	D	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	S	L	S	M	N	G
G1-Ic	T	T	S	G	E	W	K	D	Q	N	V	V	D	R	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	T	N	G
G1-Ila	N	T	N	G	E	W	K	D	Q	N	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	M	N	G
G1-IIb v1	T	T	N	G	E	W	K	N	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	M	N	G
G1-IIb v2	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	I	N	G
G1-IIbv3	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	S	L	S	M	N	G
G1-Ild	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	M	N	G
G1-V	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	D	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	M	N	G

(B)

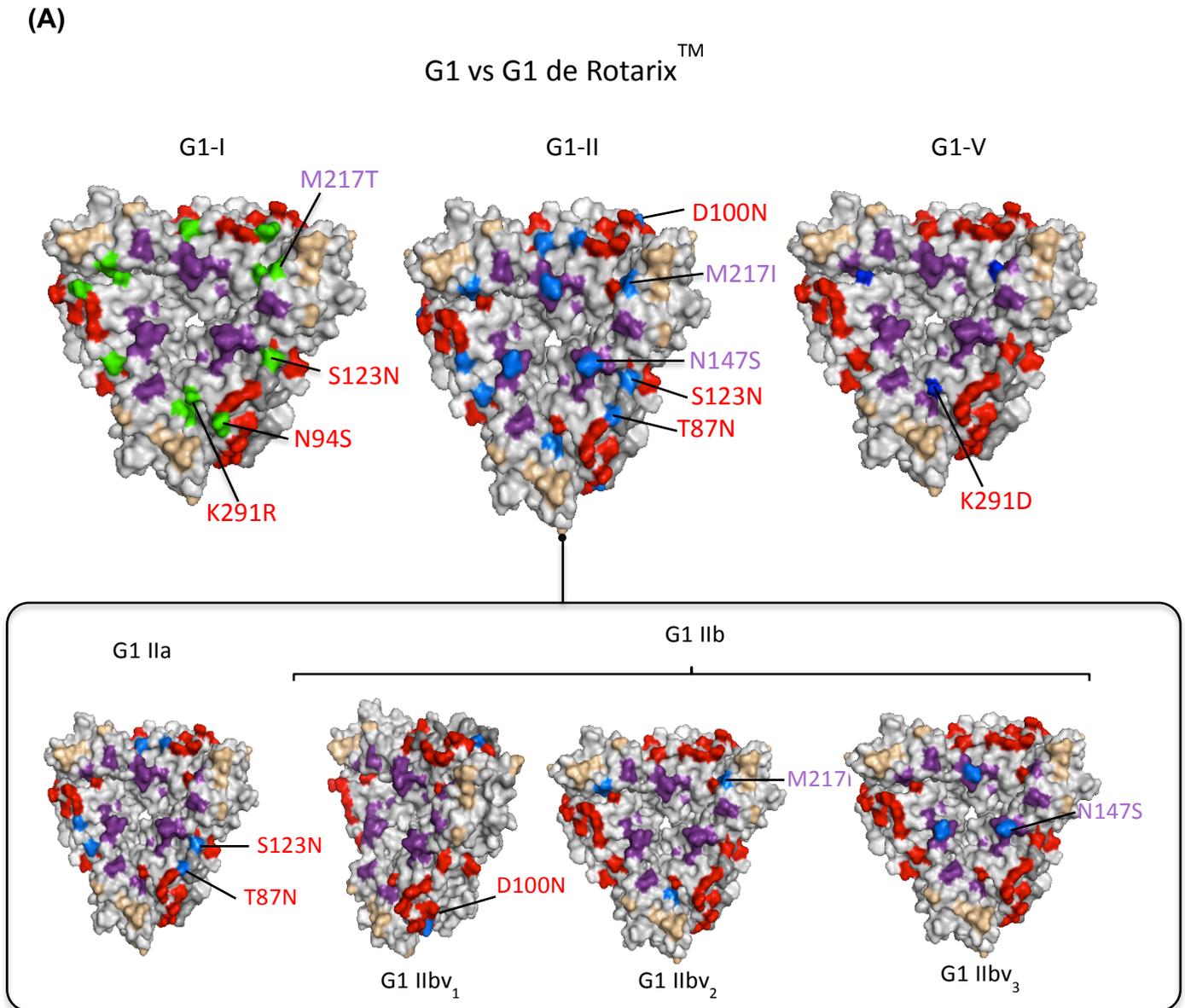
	8-1										8-2		8-3							8-4					
	100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89
Rotarix	D	S	Q	E	S	T	N	L	N	N	I	T	A	N	P	V	D	S	S	N	D	N	N	T	N
RotaTeq	D	S	Q	E	S	T	N	L	N	D	I	T	A	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N
P8-I	D	S	Q	E	S	T	N	L	N	N	I	T	A	T/N	P	V	D	S	S	N	D	N	N	T	N
P8-II	D	S	Q	E	S	T	N	L	N	D	I	T	A	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N
P8-III	D	S	Q	D	S	T	N	L	N	G	I	T	A	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N

- Residuos diferentes de Rotarix
- Residuos diferentes de RotaTeq
- Residuos diferentes de Rotarix y RotaTeq

4.4.5. Analisis estructural de la Proteína VP7.

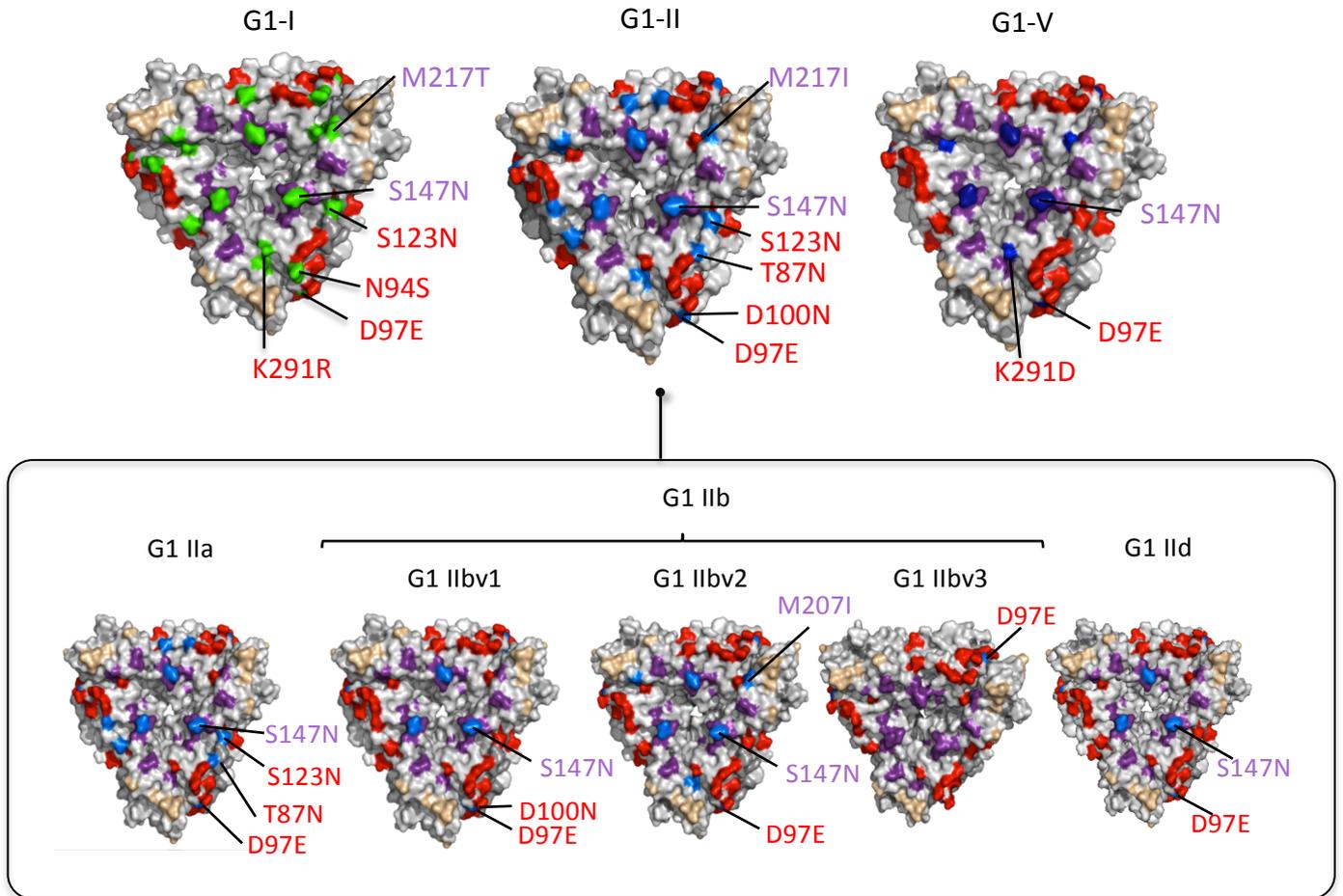
Se realizó el modelado de la superficie de la proteína VP7 de las cepas vacunales Rotarix y RotaTeq remarcando las regiones antigénicas 7-1a, 7-1b y 7-2 descritas por Aoki y col. En la Figura 22 se señalaron, en el modelado correspondiente y según referencias, las diferencias aminoacídicas encontradas en cada linaje/sublinaje de G1 circulante en nuestro país.

Figura 22. Proteína VP7 de las cepas vacunales Rotarix (A) y RotaTeq (B). Cambios aminoacídico en los sitios antigénicos en las cepas G1 argentinas.

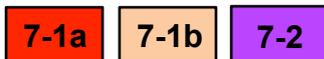


(B)

G1 vs Componente G1 de RotaTeq™



Las regiones antigénicas descritas por Aoki y col. fueron señaladas sobre la superficie de la proteína VP7 según las siguientes referencias:



Las diferencias aminoacídicas encontradas fueron identificadas según:

-  Diferencias aminoacídicas en el linaje G1-I
-  Diferencias aminoacídicas en el linaje G1-II
-  Diferencias aminoacídicas en el linaje G1-V

* Las sustituciones aminoacídicas fueron especificadas con el color de la region antigénica correspondiente.

5. DISCUSSION

5.1 Genotipos de Rotavirus en Argentina

El genoma segmentado de los rotavirus permite, mediante mecanismos de reasociación, una gran variedad de combinaciones de G y P tipos y hasta la actualidad se han descrito 42 asociaciones diferentes. En humanos solo cuatro de estas fueron encontradas con mayor frecuencia, por lo cual las asociaciones: G1P[8], G2P[4], G3P[8] y G4P[8] fueron consideradas como las combinaciones de genotipos “comunes” o “usuales” (Gentsch, Woods et al. 1996; Santos and Hoshino 2005; Sanchez-Padilla, Grais et al. 2009; Linhares, Stupka et al. 2011). Actualmente y debido su amplia diseminación global el genotipo G9 es considerado como uno de cinco genotipos comunes circulantes (Leite, Carvalho-Costa et al. 2008; Matthijnssens, Heylen et al. 2010). En este trabajo el 98,5 % de las cepas de rotavirus caracterizadas presentaron asociaciones comunes de G y P tipos, siendo principalmente detectados los genotipos G4P[8], G1P[8] y G2P[4]. Estos resultados aportan evidencia a lo descrito para Latinoamérica, en la cual la diversidad de rotavirus es mayor que en los países desarrollados y el genotipo G4 es uno de los mas frecuentemente detectados en esta región (Santos and Hoshino 2005).

En nuestro país se observó la cocirculación de diversos genotipos, con una gran fluctuación en la prevalencia de los mismos. Así durante los años 1997, 1998 y 2003, la asociación G1P[8] fue la mas frecuentemente detectada, mientras que en el periodo 1999-2002 emergió y predominó el genotipo G4P[8]. Resultados similares fueron obtenidos por Castello y colaboradores, que describió una alta prevalencia de G4 en un estudio realizado en un hospital de la provincia de Buenos Aires en el periodo 1999-2003 (Castello, Arguelles et al. 2006). Por otro lado, el trabajo de Parra y colaboradores, realizado en tres ciudades de Paraguay, demostró la importancia del G4 a nivel regional reportando valores de prevalencia del 53% y 61% para este genotipo durante los años 1998 y 1999 (Parra, Bok et al. 2005). Los análisis moleculares de las cepas de rotavirus G4 circulantes en Argentina y Paraguay han demostrado una relación filogenética entre ellas, proponiéndose que el incremento en la prevalencia de este genotipo en ambos países se debió a la introducción de nuevos sublinajes de G4 en la región (Bok, Matson et al. 2002).

Cabe destacar la escasa detección del genotipo G3 en este trabajo, si bien clásicamente es considerado uno de los genotipo mas frecuentes, solo fue encontrado esporádicamente en los años 1997 y 1998. Estudios en Argentina que han analizado muestras posteriores al 2005 han obtenido resultados similares (Barril, Martinez et al. 2006; Stupka, Carvalho et al. 2009). Llamativamente, G3 ha sido reportado en alta prevalencia en países asiáticos durante los periodos mencionados anteriormente (Phan, Trinh et al. 2007; Trinh, Pham et al. 2007; Yang, Matthijnssens et al. 2008; Huh, Kim et al. 2009). Por otra parte, en un trabajo de reciente publicación, se ha demostrado el incremento de la prevalencia de G3P[8] desde el 2008 en Argentina, representando más de la mitad de las cepas caracterizadas en el año 2009 (Stupka,

Degiuseppe et al. 2012), demostrándose la emergencia de este genotipo después de diez años de detección esporádica.

El genotipo G5 es comúnmente encontrado en porcinos y se ha demostrado su circulación en equinos y bovinos (Martella, Ciarlet et al. 2006; Park, Saif et al. 2006; Ha, Kim et al. 2009). Los primeros casos de infección en humanos fueron reportado en Brasil asociado a P[8] (Gouvea, de Castro et al. 1994). Este genotipo ha sido identificado en todas las regiones del Brasil, mostrando un amplia diseminación durante 14 años (1982-1996), luego de los cuales su prevalencia disminuyo marcadamente, perdiendo su carácter endémico y solo siendo detectado en forma esporádica (Leite, Carvalho-Costa et al. 2008; da Silva, Tort et al. 2011). Este genotipo ha sido reportado en Camerún (Esona, Armah et al. 2004; Esona, Geyer et al. 2009; Esona, Geyer et al. 2009), China (Duan, Li et al. 2007), Vietnam (Ahmed, Anh et al. 2007) y Tailandia (Chan-It, Khamrin et al. 2008) sugiriendo esto, que el G5 aunque no sea un genotipo común en humanos se encuentra presente en todo el mundo.

Los resultados obtenidos a partir de los análisis filogenéticos demostraron que las cepas humanas de rotavirus G5 fueron el resultados de dos eventos independientes de transmisión zoonótica. Estos originaron los linajes humanos circulante en Brasil (linaje I) y el de Asia y Africa (linaje II). Las cepas de rotavirus G5 que han circulado en Brasil desde 1986 hasta 2005 pertenecen exclusivamente al linaje I, y hasta la actualidad no hay evidencias de introducción de un nuevo linaje en ese país (da Silva, Tort et al. 2011). Si bien el analisis del G5 tiene una relevancia regional importante dada la amplia diseminación alcanzada por este genotipo en el mencionado país, el mismo no fue encontrado entre las cepas analizadas en el presente estudio. Este dato es coincidente con los reportes de otros autores nacionales y de Latinoamerica en donde la detección de G5, fuera del Brasil, es prácticamente nula. Sugiriendo la revisión del concepto de diseminación continental planteada por algunos autores para este genotipo(Coluchi, Munford et al. 2002).

La proporción de cepas no tipables obtenidas en este trabajo se encuentra dentro los valores descriptos para la region (Castello, Arvay et al. 2004; Linhares, Stupka et al. 2011). Una de las limitaciones, en relacion a la caracterización de los rotavirus, es que no se incluyeron cebadores para la detección de genotipos inusuales tales como G6, G8 o G12, pudiendo esto incidir en el porcentaje de cepas no tipables. Otras causas o combinaciones de ellas pueden ser las siguientes: (i) la acumulación de mutaciones puntuales en VP7 y VP4 en el sitio de pegado de los primers (ii) la presencia de muestras con falsos rotavirus positivos determinados por los elisas comerciales (iii) inhibidores de la RT-PCR en las muestras de materia fecal (iv) material genómico degradado por una mala conservación o toma de muestra (Santos, Volotao et al. 2003; Iturriza-Gomara, Kang et al. 2004).

En el 4,1 % del total de las muestras fueron identificados dos o más genotipos de rotavirus (infecciones mixtas). Si bien el porcentaje representa un valor relativamente bajo para la región, este tipo de infecciones proveen el marco para la generación de nuevas cepas mediante el reordenamiento de los segmentos genómicos (Laird, Gentsch et al. 2003).

Se destaca en este trabajo, las variaciones en las prevalencias relativas de los genotipos y la continua cocirculación de los mismos a lo largo del período analizado.

Los patrones heterogéneos de circulación de genotipos, en un contexto en el cual la principal estrategia de prevención es la inmunización, resaltan la importancia del estudio de la variabilidad viral en dos aspectos. Por un lado, permite analizar su implicancia en la efectividad vacunal y por el otro conocer el efecto esta estrategia sobre la ecología del virus en relación a posibles derivas génicas y mecanismos de selección (Ruiz-Palacios, Perez-Schael et al. 2006; Vesikari, Karvonen et al. 2007; Gurgel, Cunliffe et al. 2008; Hull, Teel et al. 2011; Kirkwood, Boniface et al. 2011).

5.2 Emergencia del Genotipo G9 en Argentina.

Hasta mediados de la década del noventa el conocimiento acerca de los genotipos de rotavirus proponía que cuatro asociaciones de G y P tipos (G1P[8], G3P[8], G4P[8] y G2P[4]) predominaban a nivel mundial. El desarrollo de nuevos métodos de caracterización y el fortalecimiento de los sistemas de vigilancia permitieron detectar nuevos genotipos y reasociaciones genómicas inusuales como así también la emergencia de cepas a nivel mundial. Ejemplo de lo anterior es la detección del G5 en Brasil, de G6 y G8 en África y la descripción de la emergencia global del G9 (Santos and Hoshino 2005; Leite, Carvalho-Costa et al. 2008; Stupka, Carvalho et al. 2009; Page, Esona et al. 2010).

El genotipo G9 fue detectado inicialmente en Estados Unidos, en la ciudad de Filadelfia, en el año 1983 y la cepa fue denominada W161 (Clark, Hoshino et al. 1987). Posteriormente entre 1985 y 1986 otros dos nuevos aislamientos fueron descritos en Japón y denominados F45 y AU 32 (Nakagomi, Ohshima et al. 1990).

Estas tres primeras cepas de G9 aisladas poseen características genotípicas y antigénicas comunes. Todas estuvieron asociadas a un P tipo [8], mostraron un electroferotipo largo en los análisis por PAGE y poseen especificidad de subgrupo II para VP6. De acuerdo a estas características y según lo descrito por Nakagomi y colaboradores, las mismas pertenecen al genogrupo "*Wa-like*" (Nakagomi, Nakagomi et al. 1989; Nakagomi and Nakagomi 1996; Nakagomi and Nakagomi 2002). Entre 1986 y 1993, fueron descritas cepas de G9 en Tailandia e India, en ambos casos asociadas a P tipos inusuales (P[19] y P[11] respectivamente). Siendo las últimas aisladas en neonatos asintomáticos (Urasawa, Hasegawa et al. 1992; Das, Gentsch et al. 1994; Okada, Urasawa et al. 2000).

El escaso número de reportes de G9 hasta mediados de la década del noventa indicó que la circulación de este genotipo fue esporádica. A partir de ese momento, se comienza a describir a nivel mundial un notable incremento en su frecuencia de detección (Santos and Hoshino 2005). Estados Unidos es uno de los ejemplos en la descripción de este fenómeno, donde posteriormente a una década sin actividad de G9 este genotipo fue nuevamente identificado en Filadelfia con una prevalencia del 50% en la temporada 1995-1996. Desde entonces, ha circulado en forma continua y con una amplia distribución geográfica en ese país (Griffin, Kirkwood et al. 2000; Clark, Lawley et al. 2004). Asimismo en Japón, durante el brote estacional de 1998-1999, fue el genotipo de mayor prevalencia en las ciudades de Tokio y Sapporo con frecuencias del 52 % y 71 % respectivamente (Zhou, Li et al. 2000). En Australia fue identificado por primera vez en 1997 y en los picos estacionales de los años 1999-2000 y 2000-2001, G9 fue el segundo genotipo en prevalencia (10% y 18,1%, respectivamente) (Masendycz, Bogdanovic-Sakran et al. 2000; Masendycz, Bogdanovic-Sakran et al. 2001). Posteriormente, en el periodo 2001-2002 representó el 40,4% de los aislamientos, alcanzando valores de prevalencia del 80,5% en algunas ciudades, siendo durante este periodo el genotipo de mayor circulación en ese país (Kirkwood, Bogdanovic-Sakran et al. 2002). En el sudeste asiático, emergió en Bangladesh el año 1995 volviéndose predominante en 1996 y 1997. En India ha sido reportado desde 1993 (Ramachandran, Das et al. 1996; Unicomb, Podder et al. 1999; Jain, Das et al. 2001). En África la circulación de este genotipo ha sido demostrada desde 1997-1998 y en Europa desde 1996 (Arista, Vizzi et al. 1997; Armah, Steele et al. 2003; Martella, Terio et al. 2003; Steele and Ivanoff 2003).

En Latinoamérica G9P[8] fue identificado inicialmente en Brasil en 1996 observándose una rápida diseminación de este genotipo en todo el país representando el 27% de las cepas de rotavirus durante el periodo 1996-2005 (Araujo, Ferreira et al. 2001; Leite, Carvalho-Costa et al. 2008). En Paraguay fue detectado por primera vez en 1999 (Parra, Bok et al. 2005), siendo el genotipo de mayor prevalencia durante los años 2000, 2004 y 2005 (Parra, Espinola et al. 2007). Estos datos avalan la emergencia del G9 a nivel global a partir un notable incremento en su detección en asociación con una gran diversidad de P tipos (Santos and Hoshino 2005). En Argentina la primera detección de G9 fue en el año 1998 asociado a P[6]. Posteriormente en los años 2002 y 2004 se observaron casos esporádicos de este genotipo con una especificidad de P tipo diferente: P[8]. En el año 2005 esta asociación representó el 23,3 % de las cepas analizadas y durante el año 2006 fue el genotipo de mayor prevalencia en todos los sitios estudiados (Bok, Palacios et al. 2001; Stupka, Parra et al. 2007; Stupka, Carvalho et al. 2009). Cabe destacar que si bien el G9 circuló en Argentina desde el año 1998 es en el 2006 cuando alcanza niveles de prevalencia que lo tornan el principal genotipo circulante, con una emergencia tardía a nivel regional en comparación con los reportes de Paraguay y Brasil (Parra, Espinola et al. 2007; Leite, Carvalho-Costa et al. 2008).

5.2.1 Origen de la cepa G9 emergente

Aunque teóricamente la naturaleza segmentada del genoma de rotavirus permite la creación de cientos de constelaciones genómicas mediante mecanismos de reasociación, varios estudios sugirieron que los G tipos de la mayoría de las cepas están asociadas a un solo P tipo, un electroferotipo (E tipo) y Subgrupo. Esto fue demostrado por estudios de hibridación ARN-ARN en los cuales el intercambio de segmentos genómicos entre las principales familias de genes, representadas por las cepas de electroferotipo largo y corto (Wa y DS1) es relativamente restringido (Nakagomi, Nakagomi et al. 1989; Gentsch, Woods et al. 1996). Los genotipos de rotavirus G1, G3 y G4, están más frecuentemente asociados a P[8], presentan un electroferotipo largo y subgrupo II y pertenecen al genogrupo Wa-like; en contraste, el genotipo G2 está asociado a P[4], presenta un electroferotipo corto y especificidad de subgrupo I, perteneciendo al genogrupo DS1-like (Gentsch, Woods et al. 1996). Desde su detección inicial el G9 fue encontrado en asociación con una amplia variedad de P tipos, electroferotipos y subgrupos sugiriendo una capacidad inusual en su habilidad para generar reordenantes (Laird, Gentsch et al. 2003). Así, por ejemplo, en un estudio en Bangladesh se encontraron cinco cepas de G9 formadas por distintas combinaciones de genes, las cuales presentaron electroferotipos largos y cortos, mostrando una alta frecuencia de reordenamientos intergenogrupos (Unicomb, Podder et al. 1999).

En Estados Unidos, donde las infecciones mixtas representan alrededor del 2%, se han descrito solo dos constelaciones genómicas para G9, que presentaron las siguientes características genéticas: constelación *i*) G9P[6], electroferotipo corto, Sub I y *ii*) G9P[8], electroferotipo largo, Sub II (Ramachandran, Kirkwood et al. 2000). En tanto en India, donde las infecciones mixtas alcanzaron aproximadamente el 21% en 1988, fueron encontradas cuatro constelaciones diferentes de G9. Las mismas incluyeron a las anteriormente descritas y las *iii*) G9P[6], electroferotipo largo, Sub II y *iv*) G9P[11], electroferotipo largo, Sub II (Unicomb, Podder et al. 1999; Jain, Das et al. 2001). Considerando otros estudios, se han descrito hasta siete constelaciones genómicas de G9 en países en desarrollo(

Estos datos sustentan la hipótesis de que un gran número de infecciones mixtas provee un medio ambiente favorable para la generación de reordenantes y resaltan la capacidad que tiene este genotipo en la generación de los mismos, a la cual se agrega una alta eficacia para su diseminación (Laird, Gentsch et al. 2003). En Argentina, al igual que lo sucedido en Inglaterra y Estados Unidos, las primeras cepas detectadas de rotavirus G9 estuvieron asociadas a P[6] y presentaron un electroferotipo corto. En tanto las cepas detectadas posteriormente estuvieron asociadas a P[8] y presentaron un electroferotipo largo, sugiriendo que la cepa emergente en Argentina en 2005-2006 provienen de un genogrupo diferente al de las G9P[6].

Los primeros trabajos que analizaron filogenéticamente la diversidad de las cepas G9, describieron tres linajes en base al gen de la VP7 (Laird, Gentsch et al. 2003; Hoshino, Jones et al. 2004; Cao, Santos et al. 2008). Siguiendo la nomenclatura utilizada por estos autores, el linaje 1 incluye los primeros aislamientos descritos en la década del ochenta (cepas prototipos WI61, F45 y AU32). El linaje 2 comprende a la cepa prototipo 116 E (cepas aislada en India a partir de neonatos asintomáticos) y el linaje 3 se encuentra conformado por las cepas de G9 descritas a partir de mediados de los 90 (incluye a las cepas prototipos: INL1, BD524, US1205, R44 y R143). Phan y col, en el año 2007 reclasifica los linajes del G9, describiendo seis linajes de VP7 (Phan, Okitsu et al. 2007). En esta clasificación los linajes I, II y III d son coincidentes con los linajes 1, 2 y 3 descritos originariamente por Hoshino, agregándose los denominados IV, V y VI que comprenden nuevas cepas de G9 de origen humano y porcino.

Recientemente, Mathijnssen y col. propone dividir el Linaje III en dos sublinajes: el denominado menor en el cual agrupan las cepas humanas y porcinas de G9P[19] y un sublinaje mayor que contiene a la mayoría de las cepas G9P[8], G9P[6] y G9P[4] circulantes en la actualidad. Este trabajo introduce el concepto de que un solo sublinaje de G9 (el sublinaje mayor del III, que contiene a más del 90% de las cepas de G9 conocidas) fue el que tuvo la capacidad de diseminarse globalmente en tan solo una década (Matthijnssens, Heylen et al. 2010)

En este apartado, se usará la clasificación de linajes propuesta por Phan y col, según las modificaciones propuestas por Martínez-Lazo (Phan, Okitsu et al. 2007; Martínez-Lazo, Roman et al. 2009)

El alto grado de similitud nucleotídica y aminoacídica observado en el gen de la VP7 entre las actuales G9 y la divergencia que presentan con las primeras cepas de referencia, indican que estas no desciende directamente de las cepas G9 detectadas en la década del 80 (linaje I y II) en Estados Unidos, Japón e India y fueron introducidas recientemente en la población por uno o más eventos de reordenamientos (Kirkwood, Gentsch et al. 1999).

Los pocos trabajos epidemiológicos realizados a mediados de los noventa (Clark, Lawley et al. 2004), proveen evidencia a la hipótesis de que las cepas G9P[6] emergieron primero mediante reasociación entre un linaje contemporáneo de electroferotipo corto y la cepa G9 progenitora. Posteriormente y mediante un segundo reordenamiento de la VP7, se originaron las cepas G9P[8] que circulan actualmente (Laird, Gentsch et al. 2003). El análisis filogenético del gen de la VP7 de las cepas G9 argentinas demostró que todas pertenecen al linaje III. Las mismas se agruparon en tres cluster bien definidos, cada uno de ellos conformado por cepas argentinas y de países de la región altamente relacionadas entre sí. Estos resultados sugirieron que el origen del G9P[8] emergente en nuestro país se debió a la introducción de una nueva cepa, a través de los países vecinos, más que a un evento de recombinación de las G9P[6] que circularon previamente.

Esta hipótesis es sustentada por el análisis de aminoácidos de las proteínas VP7, en el cual se observa la presencia de una mutación característica: una sustitución por una Serina en la posición 46 en todas las cepas G9P[8] del cluster C y la ausencia de la Isoleucina en la posición 171, mutación presente en todas las cepas G9P[6] de la región (Bok, Palacios et al. 2001; Stupka, Parra et al. 2007). De igual modo, resulta altamente improbable que las cepas G9P[6] hayan revertido, mediante deriva génica, la mutación en la posición 171 y recombinado posteriormente con cepas del *genogrupo Wa Like*, originando la cepa G9P[8] emergente. Los resultados anteriores demuestran que dichos genes evolucionaron separadamente.

Por otro lado, el análisis filogenético basado en los genes de la NSP4 agrupó a las cepas G9 argentinas en tres clúster separados (específicamente las NSP4 de las cepas G9P[6] se ubicaron en un genogrupo diferente) y ninguno de ellos relacionado con las NSP4 de las cepas G4P[8] circulantes en alta prevalencia hasta el 2003 en Argentina. Estos resultados refuerzan lo enunciado, ya que descarta la hipótesis de un evento de recombinación a nivel local con cepas de alta prevalencia (Stupka, Carvalho et al. 2009). Así, el origen del G9P[8] que circuló a partir 2004 se debería a la introducción de una nueva cepa a través de países vecinos. El antecedente más antiguo de la aparición de la cepa G9P[8]^{Ser 46} en la región fue en Paraguay durante el año 2002, sin evidencia de su circulación hasta 2004 para el resto de los países de Latinoamérica. (Parra, Espinola et al. 2007).

Este trabajo describe la emergencia del genotipo G9 en nuestro país analizando su posible origen y pone de manifiesto la capacidad de diseminación a nivel regional de este enteropatógeno.

Recientemente se ha determinado, mediante análisis bayesianos, que el origen del linaje III del genotipo G9 linaje III fue en el año 1989 (1986-1992) (Matthijnssens, Heylen et al. 2010). Esta estimación, por la cual un nuevo linaje/sublinaje logra diseminarse mundialmente en menos de una década, enfatiza la necesidad de una vigilancia continua que detecte estos potenciales eventos en sus etapas iniciales. Por otra parte, la reciente introducción de dos vacunas antirotavirus (Rotarix® y Rotateq®) en la población humana agregan una presión selectiva adicional a las cepas de rotavirus circulantes, donde la posibilidad de generación de nuevas variantes (por ejemplo mutantes de escapes vacunales o nuevos reordenantes) con una alta capacidad de diseminación, representan un desafío para esta estrategia y refuerzan el concepto de vigilancia anteriormente mencionado.

5.3 Variabilidad intragénica de las cepas G1 circulantes en Argentina.

De los 27 genotipos de rotavirus descritos hasta la actualidad, G1 se encuentra distribuido universalmente y es uno de los genotipos de mayor circulación a nivel mundial. Por otro lado, se ha demostrado que su prevalencia es significativamente mayor en los países desarrollados, así en Estados Unidos y países de Europa se han reportado valores de hasta un 75% (Santos and Hoshino 2005; Matthijnssens, Ciarlet et al. 2011). Asimismo, un reciente meta análisis que avaluó la circulación de genotipos de rotavirus en Latinoamérica y el Caribe documentó una proporción de G1 del 34 % para esta región (Linhares, Stupka et al. 2011).

En Argentina, Arguelles y col han reportado una prevalencia para este genotipo del 39% en los años 1996-1998 (Arguelles, Villegas et al. 2000), resultados similares fueron obtenidos por Castello y col. con un porcentaje global de identificación del 40% durante el período 1999-2003 (Castello, Arguelles et al. 2006). Resultados obtenidos en este trabajo, en relación a los genotipos circulantes, documentaron que el 31,5 % de las cepas analizadas fueron G1. Estos valores de prevalencia demuestran su importancia a nivel local, donde representa más de un tercio de las cepas circulantes en nuestro país.

Con el propósito de profundizar en el conocimiento de este genotipo, uno de los objetivos principales de esta tesis fue estudiar la variabilidad intragénica del G1 analizando la distribución y selección de linajes a lo largo de una década de circulación.

Los análisis filogenéticos basados en el gen de la VP7 de cepas G1 humanas han demostrado la existencia de al menos 6 linajes y de varios sublinajes a nivel mundial (Arista, Giammanco et al. 2006; Phan, Khamrin et al. 2007).

Las cepas argentinas analizadas agruparon en tres linajes diferentes : G1-I, G1-II y G1-V y en cuatro sublinajes : G1-Ic, G1-IIa, G1-IIb, G1-IId, de acuerdo a la clasificación de linajes/sublinajes propuesta por Arista y col. (Arista, Giammanco et al. 2006). Estos resultados coinciden con estudios publicados recientemente, los cuales proponen a los linajes I y II como los principales linajes de G1 actualmente a nivel mundial (Banyai, Gentsch et al. 2009; Le, Chung et al. 2010; Maranhao, Vianez-Junior et al. 2012; Nagaoka, Tatsumi et al. 2012; Zeller, Patton et al. 2012). La mayor diversidad fue encontrada en el linaje II, en el cual fueron identificados tres sublinajes y particularmente en el sublinaje G1-IIb fueron detectadas tres variantes (G1-IIbv₁₋₃). Las mismas circularon en períodos diferentes, la dos primera lo hicieron entre los años 1996-98 y la tercera emergió en el pico de G1 registrado durante 2003-2004.

Durante el período analizado no fueron detectadas cepas del linaje VI, IV y III, cabe destacar que a este último linaje pertenece la principal cepa de referencia del genotipo G1 (cepa WA), las cepas vacunales W179-9 (componente G1 de Rotateq[®]) y la Cepa D (cepa vacunal de Rotashield[®]). Estos resultados aportan información a otros estudios que sugieren la extinción de este linaje a nivel mundial (Arista, Giammanco et al. 2006; Rodríguez-Castillo, Ramírez-

Gonzalez et al. 2006; Le, Chung et al. 2010).

Mientras que, entre 1996 y 2004 los genotipos G2P[4] , G4P[8] y G9P[8] tuvieron grandes variaciones en sus prevalencias, no siendo detectados en determinados periodos, las cepas G1 circularon en forma continua, observándose tres picos de alta prevalencia en los años 1996, 1998 y 2003. Estos aumentos en la prevalencia estuvieron asociados a la circulación o introducción de nuevas cepas, así en 1996 fueron detectadas las variantes más antiguas del sublinaje IIb (G1-IIbv_{1,2}), a partir de 1998 el sublinaje G1-1c y durante los años 2003-2004 fue observada la emergencia de una nueva variante del sublinaje IIb (G1-IIbv₃).

Al analizar la relación entre los linajes/sublinajes de VP7 y VP4 la totalidad de las cepas G1-1c se asociaron al linaje III de P[8]. De igual modo las cepas del sublinajes G1-IIa y G1-IId solo se asociaron al linaje I de P[8].

La excepción a esta especificidad, entre linajes/sublinajes de VP7 y VP4, fue observada entre las cepas del sublinaje G1-IIb. Las cuales se asociaron a los linajes I, II y III de P[8], detectándose así un reordenamiento a nivel del gen de la VP4 para este sublinaje.

Al comparar las secuencias aminoacídicas de las proteínas VP7 entre las cepas G1 se observaron importantes cambios aminoacídicos entre las cepas G1 detectadas en años consecutivos. Por ejemplo las cepas del linaje G1-I , emergente en 1998, presento catorce diferencias aminoacídicas en su VP7 respecto de las cepas del linaje G1-II que circularon previamente.

Los resultados anteriormente expuestos, en los cuales los análisis filogenéticos y aminoacídicos demostraron una alta heterogeneidad intragenotipo, apoyan la hipótesis de que esta variabilidad es una de las principales causas para la continua circulación y persistencia de este genotipo a nivel local y mundial (Arista, Giammanco et al. 2006; Phan, Khamrin et al. 2007; Maranhao, Vianez-Junior et al. 2012; Barril, Martinez et al. 2013). Por otro lado, resaltan la importancia de las mutaciones puntuales como uno de los principales mecanismo para la diversificación de este genotipo. Este ultimo mecanismo evolutivo ha sido estudiado profundamente en el virus Influenza, si analizamos el grado de evolución de la hemoaglutinina (HA), una de las proteína inmunogenicas más importante de este virus, la misma exhibe un grado de acumulación de mutaciones aminoacídicas de $5 \cdot 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año (Hay, Gregory et al. 2001; Lin, Xiong et al. 2012). Este parámetro ha sido recientemente estimado para la VP7 de rotavirus G1 en $7,25 \cdot 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año, este valor sugiere un grado de evolución menor respecto de la HA de Influenza A (Nagaoka, Tatsumi et al. 2012).

Estos resultados deben ser analizados teniendo en cuenta las características que presenta rotavirus G1 en su circulación, en el cual a diferencia de Influenza A donde las diferentes variantes van desplazando a la anterior y ocupando su nicho ecológico, en este genotipo varios linajes cocirculan en la población al mismo tiempo.

Es por esta característica que sus mecanismos evolutivos parecen ser más similares a los del Virus Influenza B, en el cual esta demostrado que la alternancia en la circulación de los linajes

reduce la presión de selección mediante el reciclado de los mismos, resultando en un grado de evolución menor (Lindstrom, Hiromoto et al. 1999; Matsuzaki, Sugawara et al. 2004)

Independientemente del grado de sustitución estimado, este trabajo resalta la variabilidad de las cepas G1 de rotavirus en Argentina donde las mutaciones puntuales representarían el principal mecanismo evolutivo para este genotipo, describiendo la emergencia, reemergencia y una gran cocirculación de linajes/sublinajes a lo largo de una década de estudio.

5.4 Relación antigénica entre las cepas de Rotavirus G1 argentinas y las vacunales.

Dos vacunas antirotavirus han sido licenciadas e incorporadas al calendario nacional de inmunizaciones en 14 países de Latino America (de Oliveira, Danovaro-Holliday et al. 2008; de Oliveira, Danovaro-Holliday et al. 2011). Rotarix[®] (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) es una vacuna monovalente constituida por una sola cepa atenuada de rotavirus humano G1P[8] y RotaTeq[®] (Merk and Sanofi Pasteur MSD, NJ, USA) es una vacuna oral pentavalente compuesta por 5 reordenantes bovino-humano, cuyas VP7 y VP4 humanas especifican para los genotipos G1- G4 y P[8]. Ambas contienen cepas parentales que fueron aisladas en la década del 80 (Ciarlet and Schodel 2009; Ward and Bernstein 2009).

El resultado de su implementación produjo una importante reducción de la carga de la enfermedad en varios países de la región (Brasil, Paraguay, El Salvador, Nicaragua y México) y en otros países del mundo (Austria, Bélgica, Australia y Estados Unidos), reportándose altos porcentaje de efectividad vacunal independientemente de la vacuna utilizada (Patel, Pedreira et al. 2009; Curns, Steiner et al. 2010; de Palma, Cruz et al. 2010; Paulke-Korinek, Rendi-Wagner et al. 2010; Buttery, Lambert et al. 2011; Desai, Oliveira et al. 2011; do Carmo, Yen et al. 2011; Molto, Cortes et al. 2011; Richardson, Parashar et al. 2011; Tate, Cortese et al. 2011; Patel, Parashar et al. 2012).

Particularmente contra el rotavirus genotipo G1 ha sido demostrada una alta eficacia con ambas vacunas, debido fundamentalmente a que este fue el genotipo predominante durante los ensayos clínicos (Ruiz-Palacios, Perez-Schael et al. 2006; Vesikari, Matson et al. 2006; Vesikari, Karvonen et al. 2007; Ciarlet and Schodel 2009; Vesikari, Karvonen et al. 2010). Por otra parte, varios autores han demostrado que los linajes de G1 pueden poseer propiedades antigénicas diferentes entre si, que les permitiría escapar de la inmunidad adaptativa del huésped (Jin, Ward et al. 1996; Hoshino, Honma et al. 2005; Banyai, Gentsch et al. 2009).

Con el objetivo de investigar tales diferencias, se analizo la disparidad entre las cepas G1 argentinas y las cepas vacunales de Rotarix y RotaTeq. Los analisis mencionados se basaron en el gen de la VP7 y VP4, codificantes de las proteínas inmunológicamente mas importantes de este virus (Kapikian 2007).

Los componentes G1 de las cepas vacunales presentaron marcadas diferencias entre sí a nivel filogenético, Rotarix agrupó con cepas pertenecientes al linaje II mientras que RotaTeq lo hizo en el linaje III.

En forma general, la cepa vacunal de Rotarix mostró el mayor grado de similitud nucleotídica con las cepas G1 argentinas, observándose una identidad menor entre estas y el componente G1 de RotaTeq. Esto último debido, fundamentalmente, a que el reordenante utilizado en la vacuna RotaTeq proviene de la cepa humana W179 perteneciente al linaje III de G1, en este linaje se agrupan cepas antiguas con un grado de divergencia importante respecto de los linajes que circulan en la actualidad. Cabe destacar que el linaje III no fue detectado en Argentina durante el periodo de estudio y varios autores proponen su extinción a nivel mundial (Le, Chung et al. 2010; Barril, Martínez et al. 2013).

El gen de la VP7 codifica una proteína que constituyen los monómeros o subunidades de los trímeros de la VP7 (Dormitzer, Greenberg et al. 2000; Settembre, Chen et al. 2011). La reciente cristalización de la proteína de VP7 permitió su reconstrucción estructural y junto con el análisis de las mutaciones que impiden la neutralización viral, mediante el estudio de mutantes de escape, se definieron o mapearon dos regiones sobre la superficie de esta proteína denominadas 7-1 y 7-2. La primera constituye un sitio antigénico conformacional formado por las regiones anteriormente denominadas A, C, D y F y la segunda incluye a los epítomos localizados en las regiones antigénicas B y E.

Al analizar las mutaciones en el marco de lectura de las VP7 de las cepas G1 argentinas se detectaron un total de 42 diferencias aminoacídicas al ser comparadas con las cepas vacunales. Las cepas del linaje/sublinaje G1-Ic mostraron el mayor número de sustituciones con 12 y 17 mutaciones con respecto a Rotarix y RotaTeq. El linaje II mostró resultados dispares según la cepa vacunal analizada, así presentó escasas diferencias aminoacídicas respecto de Rotarix, con un rango de 3 a 6 sustituciones entre los diferentes sublinajes. Por el contrario al compararlo con RotaTeq el número de mutaciones halladas fueron significativamente mayores, observándose un rango de 12 a 15 cambios aminoacídicos en los diferentes sublinajes. Así, las sustituciones observadas en las posiciones aminoacídicas 87, 94, 97, 100, 123 y 291 se sitúan en la región antigénica 7-1, mientras que las diferencias en las posiciones 147 y 217 se localizaron en el dominio antigénico 7-2, estos cambios ocurrieron en importantes sitios inmunodominantes, en los cuales se ha demostrado su implicancia en la neutralización viral (Aoki, Trask et al. 2011). Se ha propuesto que el mecanismo de neutralización de los anticuerpos dirigidos contra los epítomos de la región 7-1 sería estabilizando la unión entre las subunidades de VP7 y de este modo el trímero completo, impidiendo así los cambios conformacionales que sufre la VP7 en la etapa de pegado y desnudamiento viral bloqueando la penetración a la célula (Dormitzer, Both et al. 1994; Ludert, Ruiz et al. 2002; Aoki, Settembre et al. 2009).

Los anticuerpos dirigidos contra la región 7-2 actuarían de un modo similar, pero en este caso produciendo la fijación de estructuras conformacionales asociadas al virión mediante uniones intersubunidades. Estas uniones podrían ocurrir dentro de un trímero o por uniones cruzadas entre subunidades de trímeros adyacentes sobre la superficie viral. Estos anticuerpos, igual que en caso anterior, actuarían estabilizando la estructura de VP7 e impedirían las fases iniciales de la infección (Aoki, Settembre et al. 2009; Aoki, Trask et al. 2011)

Por otra parte en este trabajo fueron descritas mutaciones en residuos próximos a las regiones 7-1 y 7-2, particularmente los cambios ocurridos en las posiciones 101, 141, 202, 218 y 268. El rol biológico de las mismas no ha sido todavía señalado, pero podría especularse que debido a la estrecha cercanía con las regiones mencionadas, su significado podría ser similar al propuesto para las mutaciones que ocurren en ellas.

Por otro lado, se han observado mutaciones en todos los linajes de G1 en las regiones que corresponden al extremo amino terminal de la VP7, así se describieron al menos 7 mutaciones en esta región de 26 aminoácidos.

Estos extremos constituyen, mediante su interacción con la VP6, el principal mecanismo de anclaje de las VP7 a las DLPs (Chen, Settembre et al. 2009). Además, a través del contacto de los extremos adyacentes, están implicados en la interacción entre los trímeros de VP7. Este contacto intertrímero crea una continuidad o cooperatividad dentro de la capa de VP7 que forma la triple cápside (Chen, Settembre et al. 2009). De este modo, los extremos amino terminales son responsables de muchas de las interacciones que estabilizan la cápside externa del virión. Si bien, la implicancia de los cambios a este nivel todavía no han sido establecidos, estos podrían impactar en el mecanismo que gobierna el desnudamiento y ensamblado de la cápside externa del rotavirus.

Es posible que sustituciones aminoacídicas críticas en determinados epitopes de VP7 permitan al virus escapar de la respuesta inmune del huésped. Hasta la actualidad no está demostrado que los mecanismos de escape, debido a diferencias antigénicas entre varios linajes/sublinajes, puedan resultar en una efectividad vacunal disminuida o en la selección de linajes. Por el contrario, los estudios sobre efectividad sugieren que los diferentes componentes G1 vacunales confieren una buena protección homotípica (Ruiz-Palacios, Perez-Schael et al. 2006; Ward and Bernstein 2009; Vesikari, Karvonen et al. 2010; Vesikari, Karvonen et al. 2010). Sin embargo algunos autores han demostrado diferencias significativas en los títulos neutralizantes contra diferentes linajes de G1, para un determinado esquema vacunal (Jin, Ward et al. 1996; Yuan, Ishida et al. 2004).

En este trabajo se estudió la variabilidad intragenotípica de las cepas G1 de rotavirus y su relación con las cepas vacunales, encontrándose importantes diferencias a nivel antigénico. Las mismas fueron descritas en una población no vacunada, representando estas variaciones la capacidad natural de las cepas de rotavirus G1 para generar diversidad.

La gran variabilidad observada, producto de múltiples mecanismos evolutivos, hace necesario profundizar los estudios que relacionen la dinámica viral con la respuesta inmunitaria y efectividad vacunal, permitiendo así conocer su real impacto en las estrategias de inmunoprevención.

6. CONCLUSIONES

- En Argentina RVA presentó una gran diversidad de genotipos que mostraron una continua cocirculación y grandes fluctuación en sus prevalencias relativas durante el periodo de estudio.
- Estos patrones heterogéneos de circulación de los genotipos, en un contexto en el cual la principal estrategia de prevención es la inmunización, destacan la necesidad de una vigilancia continua de los mismos. El conocimiento de la dinámica de su circulación permitirá, por un lado analizar la implicancia de la diversidad del virus en la efectividad vacunal y por el otro, el efecto o presión selectiva que ejerce esta estrategia sobre la ecología virus.
- Se describió la emergencia del genotipo G9 y su origen debido a la introducción de una nueva cepa a través de los países limítrofes, demostrándose la capacidad de diseminación de este enteropatógeno a nivel regional.
- Los análisis filogenéticos y aminoacídicos demostraron una alta heterogeneidad intragenotipo para las cepas G1 estudiadas, apoyando la hipótesis de que esta variabilidad es una de las principales causas para la continua circulación y persistencia de este genotipo.
- En las cepas de rotavirus G1 las mutaciones puntuales representarían el principal mecanismo para la diversificación de este genotipo, esto permitiría una gran cocirculación de linajes/sublinajes de G1 durante la década de estudio.
- El reordenamiento de segmentos genómicos ha sido propuesto como una de las formas de evolución mas importantes para RV. Este mecanismo fue observado intragenotípicamente en las cepas G1, en las cuales un sublinaje (G1 Ic) se asoció a diferentes linajes de P[8]. Esta capacidad de ofrecer continuamente a la selección natural diferentes variantes biológica, le permitiría a este genotipo prevalecer a lo largo del tiempo.
- Al comparar los niveles de diversificación entre los genotipos G1 y G9, el primero presento una gran diversidad intragenotípica, mientras que el G9 emergió y se diseminó en la region a expensas de un solo linaje (diseminación monofilogenética). Esto sugeriría diferencias en las capacidades evolutivas entre los diferentes genotipos de rotavirus, planteando la necesidad de profundizar los analisis y hacerlo extensivo a otros genotipos con el objetivo de estudiar tales diferencias.

- El estudio entre las cepas G1 circulantes en Argentina y los componentes G1 vacunales mostró diferencias en sitios antigénicas para ambas vacunas. Las mismas fueron descritas en una población no inmunizada, representando estas variaciones la capacidad natural de las cepas de rotavirus para generar diversidad.
- Al analizar las diferencias anteriores, con las descritas en cepas G1 provenientes de poblaciones vacunadas, ambas presentaron o mostraron iguales cambios en los sitios antigénico. Si bien es necesario profundizar los analisis en ese sentido, estos hallazgos sugieren que la vacunacion no ha ejercido presión sobre la evolución natural de este genotipo.
- Lo anterior plantea la necesidad de profundizar los estudios que relacionen la dinámica viral con la respuesta inmunitaria y efectividad vacunal, permitiendo así conocer su real impacto en las estrategias de inmunoprevención.

7. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, K., D. D. Anh, et al. (2007). "Rotavirus G5P[6] in child with diarrhea, Vietnam." Emerg Infect Dis **13**(8): 1232-1235.
- Angel, J., M. A. Franco, et al. (2007). "Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations." Nat Rev Microbiol **5**(7): 529-539.
- Aoki, S. T., E. C. Settembre, et al. (2009). "Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab." Science **324**(5933): 1444-1447.
- Aoki, S. T., S. D. Trask, et al. (2011). "Cross-linking of rotavirus outer capsid protein VP7 by antibodies or disulfides inhibits viral entry." J Virol **85**(20): 10509-10517.
- Araujo, I. T., R. M. Assis, et al. (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**(7): 995-1001.
- Araujo, I. T., M. S. Ferreira, et al. (2001). "Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil." J Clin Microbiol **39**(5): 1999-2001.
- Arguelles, M. H., G. A. Villegas, et al. (2000). "VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina." J Clin Microbiol **38**(1): 252-259.
- Arias, C. F., P. Romero, et al. (1996). "Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity." J Virol **70**(9): 5832-5839.
- Arista, S., G. M. Giammanco, et al. (2006). "Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population." J Virol **80**(21): 10724-10733.
- Arista, S., E. Vizzi, et al. (1997). "Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea." Arch Virol **142**(10): 2065-2071.
- Armah, G. E., A. D. Steele, et al. (2003). "Changing patterns of rotavirus genotypes in Ghana: emergence of human rotavirus G9 as a major cause of diarrhea in children." J Clin Microbiol **41**(6): 2317-2322.
- Au, K. S., N. M. Mattion, et al. (1993). "A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28." Virology **194**(2): 665-673.
- Banerjee, I., M. Iturriza-Gomara, et al. (2007). "Molecular characterization of G11P[25] and G3P[3] human rotavirus strains associated with asymptomatic infection in South India." J Med Virol **79**(11): 1768-1774.
- Banyai, K., J. R. Gentsch, et al. (2009). "Trends in the epidemiology of human G1P[8] rotaviruses: a Hungarian study." J Infect Dis **200** **Suppl 1**: S222-227.
- Banyai, K., J. R. Gentsch, et al. (2004). "Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001." J Med Microbiol **53**(Pt 8): 791-801.
- Barril, P., L. Martinez, et al. (2013). "Genetic and antigenic evolution profiles of G1 rotaviruses in Cordoba, Argentina, during a 27-year period (1980-2006)." J Med Virol **85**(2): 363-369.

- Barril, P. A., L. C. Martinez, et al. (2006). "Detection of group a human rotavirus G9 genotype circulating in Cordoba, Argentina, as early as 1980." J Med Virol **78**(8): 1113-1118.
- Bernstein, D. I., D. A. Sack, et al. (1999). "Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial." Lancet **354**(9175): 287-290.
- Berois, M., C. Sapin, et al. (2003). "Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2." J Virol **77**(3): 1757-1763.
- Bishop, R. F., G. L. Barnes, et al. (1983). "Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children." N Engl J Med **309**(2): 72-76.
- Bishop, R. F., G. P. Davidson, et al. (1973). "Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis." Lancet **2**(7841): 1281-1283.
- Bok, K., D. O. Matson, et al. (2002). "Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype g4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina." J Clin Microbiol **40**(6): 2016-2022.
- Bok, K., G. Palacios, et al. (2001). "Emergence of G9 P[6] human rotaviruses in Argentina: phylogenetic relationships among G9 strains." J Clin Microbiol **39**(11): 4020-4025.
- Boom, R., C. J. Sol, et al. (1990). "Rapid and simple method for purification of nucleic acids." J Clin Microbiol **28**(3): 495-503.
- Bruijning-Verhagen, P., C. Quach, et al. (2012). "Nosocomial rotavirus infections: a meta-analysis." Pediatrics **129**(4): e1011-1019.
- Bruijning-Verhagen, P., V. Sankatsing, et al. (2012). "Rotavirus-related hospitalizations are responsible for high seasonal peaks in all-cause pediatric hospitalizations." Pediatr Infect Dis J **31**(12): e244-249.
- Buttery, J. P., S. B. Lambert, et al. (2011). "Reduction in rotavirus-associated acute gastroenteritis following introduction of rotavirus vaccine into Australia's National Childhood vaccine schedule." Pediatr Infect Dis J **30**(1 Suppl): S25-29.
- Cao, D., N. Santos, et al. (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**(8): 4175-4179.
- Castello, A. A., M. H. Arguelles, et al. (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**(6): 2046-2050.
- Castello, A. A., M. L. Arvay, et al. (2004). "Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years." Pediatr Infect Dis J **23**(10 Suppl): S168-172.
- CDC, C. f. D. C. a. P. (1999). "Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--United States, 1998-1999." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **48**(27): 577-581.
- CDC, C. f. D. C. a. P. (1999). "Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **48**(43): 1007.

- Chan-Ir, W., P. Khamrin, et al. (2008). "Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses." J Clin Microbiol **46**(4): 1169-1173.
- Chen, J. Z., E. C. Settembre, et al. (2009). "Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(26): 10644-10648.
- Ciarlet, M. and M. K. Estes (2002). Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. Encyclopedia of environmental microbiology. G. Britton. New York, Wiley: 2573–2773.
- Ciarlet, M., R. Sani-Grosso, et al. (2008). "Concomitant use of the oral pentavalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine and oral poliovirus vaccine." Pediatr Infect Dis J **27**(10): 874-880.
- Ciarlet, M. and F. Schodel (2009). "Development of a rotavirus vaccine: clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq." Vaccine **27 Suppl 6**: G72-81.
- Clark, H. F., Y. Hoshino, et al. (1987). "Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype." J Clin Microbiol **25**(9): 1757-1762.
- Clark, H. F., D. A. Lawley, et al. (2004). "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**(4): 1434-1438.
- Coluchi, N., V. Munford, et al. (2002). "Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay." J Clin Microbiol **40**(5): 1709-1714.
- Coulson, B. S. and C. Kirkwood (1991). "Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype." J Virol **65**(11): 5968-5974.
- Crawford, S. E., S. K. Mukherjee, et al. (2001). "Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike." J Virol **75**(13): 6052-6061.
- Cunliffe, N. A., P. A. Woods, et al. (1997). "Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups." J Med Virol **53**(1): 41-50.
- Curns, A. T., C. A. Steiner, et al. (2010). "Reduction in acute gastroenteritis hospitalizations among US children after introduction of rotavirus vaccine: analysis of hospital discharge data from 18 US states." J Infect Dis **201**(11): 1617-1624.
- da Silva, M. F., L. F. Tort, et al. (2011). "VP7 Gene of human rotavirus A genotype G5: Phylogenetic analysis reveals the existence of three different lineages worldwide." J Med Virol **83**(2): 357-366.
- Das, B. K., J. R. Gentsch, et al. (1994). "Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India." J Clin Microbiol **32**(7): 1820-1822.

- de Oliveira, L. H., M. C. Danovaro-Holliday, et al. (2008). "Rotavirus vaccine introduction in the Americas: progress and lessons learned." *Expert Rev Vaccines* **7**(3): 345-353.
- de Oliveira, L. H., M. C. Danovaro-Holliday, et al. (2011). "Progress in the introduction of the rotavirus vaccine in Latin America and the Caribbean: four years of accumulated experience." *Pediatr Infect Dis J* **30**(1 Suppl): S61-66.
- de Palma, O., L. Cruz, et al. (2010). "Effectiveness of rotavirus vaccination against childhood diarrhoea in El Salvador: case-control study." *BMJ* **340**: c2825.
- Degiuseppe, J. I., C. Giovacchini, et al. (2013). "[Rotavirus epidemiology and surveillance in Argentina: 2009-2011]." *Arch Argent Pediatr* **111**(2): 148-154.
- Dennehy, P. H. (2011). "Viral gastroenteritis in children." *Pediatr Infect Dis J* **30**(1): 63-64.
- Desai, R., L. H. Oliveira, et al. (2011). "Reduction in morbidity and mortality from childhood diarrhoeal disease after species A rotavirus vaccine introduction in Latin America - a review." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **106**(8): 907-911.
- do Carmo, G. M., C. Yen, et al. (2011). "Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis." *PLoS Med* **8**(4): e1001024.
- Dormitzer, P. R., G. W. Both, et al. (1994). "Presentation of neutralizing epitopes by engineered rotavirus VP7's expressed by recombinant vaccinia viruses." *Virology* **204**(1): 391-402.
- Dormitzer, P. R., H. B. Greenberg, et al. (2000). "Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers." *Virology* **277**(2): 420-428.
- Dormitzer, P. R., H. B. Greenberg, et al. (2001). "Proteolysis of monomeric recombinant rotavirus VP4 yields an oligomeric VP5* core." *J Virol* **75**(16): 7339-7350.
- Dormitzer, P. R., E. B. Nason, et al. (2004). "Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus." *Nature* **430**(7003): 1053-1058.
- Dormitzer, P. R., Z. Y. Sun, et al. (2002). "The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site." *EMBO J* **21**(5): 885-897.
- Duan, Z. J., D. D. Li, et al. (2007). "Novel human rotavirus of genotype G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea." *J Clin Microbiol* **45**(5): 1614-1617.
- Dyall-Smith, M. L., I. Lazdins, et al. (1986). "Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10): 3465-3468.
- Esona, M. D., G. E. Armah, et al. (2004). "Detection of an unusual human rotavirus strain with G5P[8] specificity in a Cameroonian child with diarrhea." *J Clin Microbiol* **42**(1): 441-444.
- Esona, M. D., A. Geyer, et al. (2009). "Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon." *Emerg Infect Dis* **15**(1): 83-86.
- Esona, M. D., A. Geyer, et al. (2009). "Genomic characterization of human rotavirus G8 strains from the African rotavirus network: relationship to animal rotaviruses." *J Med Virol* **81**(5): 937-951.

- Estes, M. K. (2003). The rotavirus NSP4 enterotoxin: current status and challenge. Viral gastroenteritis. U. Desselberger and J. Gray. Amsterdam ; Boston, Elsevier: 207-224.
- Estes, M. K., G. Kang, et al. (2001). "Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis." Novartis Found Symp **238**: 82-96; discussion 96-100.
- Estes, M. K. and A. Z. Kapikian (2007). Rotaviruses. Fields virology. B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Fischer Walker, C. L., J. Perin, et al. (2012). "Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review." BMC Public Health **12**: 220.
- Gentsch, J. R., R. I. Glass, et al. (1992). "Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction." J Clin Microbiol **30**(6): 1365-1373.
- Gentsch, J. R., P. A. Woods, et al. (1996). "Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development." J Infect Dis **174 Suppl 1**: S30-36.
- Gouvea, V., L. de Castro, et al. (1994). "Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children." J Clin Microbiol **32**(5): 1408-1409.
- Gouvea, V., R. I. Glass, et al. (1990). "Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens." J Clin Microbiol **28**(2): 276-282.
- Gouvea, V., N. Santos, et al. (1994). "Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR." J Clin Microbiol **32**(5): 1338-1340.
- Griffin, D. D., C. D. Kirkwood, et al. (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**(7): 2784-2787.
- Gurgel, R. Q., N. A. Cunliffe, et al. (2008). "Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review." J Clin Virol **43**(1): 1-8.
- Ha, T. P., H. J. Kim, et al. (2009). "Sequence analysis of unusual P[7]G5 bovine rotavirus strains reveals evidence of interspecies transmission." J Clin Microbiol **47**(10): 3329-3332.
- Hagbom, M., S. Sharma, et al. (2012). "Towards a human rotavirus disease model." Curr Opin Virol **2**(4): 408-418.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)(41): 95-98.
- Hay, A. J., V. Gregory, et al. (2001). "The evolution of human influenza viruses." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1416): 1861-1870.
- Heyse, J. F., B. J. Kuter, et al. (2008). "Evaluating the safety of a rotavirus vaccine: the REST of the story." Clin Trials **5**(2): 131-139.
- Hoshino, Y., S. Honma, et al. (2005). "A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains." Virology **332**(1): 177-188.

- Hoshino, Y., R. W. Jones, et al. (2004). "Rotavirus serotype G9 strains belonging to VP7 gene phylogenetic sequence lineage 1 may be more suitable for serotype G9 vaccine candidates than those belonging to lineage 2 or 3." J Virol **78**(14): 7795-7802.
- Huh, J. W., W. H. Kim, et al. (2009). "Genotypic distribution of rotavirus strains causing severe gastroenteritis in Gyeonggi province, South Korea, from 2003 to 2005." Arch Virol **154**(1): 167-170.
- Hull, J. J., E. N. Teel, et al. (2011). "United States rotavirus strain surveillance from 2005 to 2008: genotype prevalence before and after vaccine introduction." Pediatr Infect Dis J **30**(1 Suppl): S42-47.
- Hyser, J. M. and M. K. Estes (2009). "Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008." Curr Opin Gastroenterol **25**(1): 36-43.
- Hyser, J. M. and M. K. Estes (2009). "Rotavirus Vaccines and Pathogenesis: 2008."
- Iturriza-Gomara, M., T. Dallman, et al. (2011). "Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network." Epidemiol Infect **139**(6): 895-909.
- Iturriza-Gomara, M., B. Isherwood, et al. (2001). "Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999." J Virol **75**(8): 3696-3705.
- Iturriza-Gomara, M., G. Kang, et al. (2004). "Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses." J Clin Virol **31**(4): 259-265.
- Jain, V., B. K. Das, et al. (2001). "Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India." J Clin Microbiol **39**(10): 3524-3529.
- Jiang, X., H. Jayaram, et al. (2006). "Cryoelectron microscopy structures of rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA complexes: implications for genome replication." J Virol **80**(21): 10829-10835.
- Jin, Q., R. L. Ward, et al. (1996). "Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses." Arch Virol **141**(11): 2057-2076.
- Joensuu, J., E. Koskenniemi, et al. (1997). "Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis." Lancet **350**(9086): 1205-1209.
- Jourdan, N., M. Maurice, et al. (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**(11): 8268-8278.
- Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, et al. (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** Suppl 1: S65-72.
- Kapikian, M. K. E. a. A. Z. (2007). "Rotaviruses." Fields virology 5th ed. Bernard N Fields; David M Knipe; Peter M Howley; et a.

- Khamrin, P., N. Maneekarn, et al. (2006). "Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions." *J Med Virol* **78**(7): 986-994.
- Kirkwood, C., N. Bogdanovic-Sakran, et al. (2002). "Report of the Australian Rotavirus Surveillance Program, 2001/2002." *Commun Dis Intell Q Rep* **26**(4): 537-540.
- Kirkwood, C., P. J. Masendycz, et al. (1993). "Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses." *Virology* **196**(1): 79-88.
- Kirkwood, C. D., K. Boniface, et al. (2011). "Distribution of rotavirus genotypes after introduction of rotavirus vaccines, Rotarix(R) and RotaTeq(R), into the National Immunization Program of Australia." *Pediatr Infect Dis J* **30**(1 Suppl): S48-53.
- Kirkwood, C. D., J. R. Gentsch, et al. (1999). "Genetic and antigenic characterization of a serotype P[6]G9 human rotavirus strain isolated in the United States." *Virology* **256**(1): 45-53.
- Laird, A. R., J. R. Gentsch, et al. (2003). "Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993 to 2001." *J Clin Microbiol* **41**(7): 3100-3111.
- Lanzieri, T. M., I. Costa, et al. (2010). "Trends in hospitalizations from all-cause gastroenteritis in children younger than 5 years of age in Brazil before and after human rotavirus vaccine introduction, 1998-2007." *Pediatr Infect Dis J* **29**(7): 673-675.
- Lanzieri, T. M., A. C. Linhares, et al. (2011). "Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil." *Int J Infect Dis* **15**(3): e206-210.
- Le, V. P., Y. C. Chung, et al. (2010). "Genetic variation of prevalent G1P[8] human rotaviruses in South Korea." *J Med Virol* **82**(5): 886-896.
- Lee, C. N., Y. L. Wang, et al. (2000). "NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea." *J Clin Microbiol* **38**(12): 4471-4477.
- Leite, J. P., F. A. Carvalho-Costa, et al. (2008). "Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**(8): 745-753.
- Li, D. D., Z. J. Duan, et al. (2008). "Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China." *J Clin Virol* **42**(2): 141-148.
- Lin, Y. P., X. Xiong, et al. (2012). "Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(52): 21474-21479.
- Lindstrom, S. E., Y. Hiromoto, et al. (1999). "Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes." *J Virol* **73**(5): 4413-4426.
- Linhares, A. C., J. A. Stupka, et al. (2011). "Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis." *Rev Med Virol*.

- Linhares, A. C., F. R. Velazquez, et al. (2008). "Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study." Lancet **371**(9619): 1181-1189.
- Liu, L., H. L. Johnson, et al. (2012). "Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000." Lancet **379**(9832): 2151-2161.
- Lopez, T., M. Camacho, et al. (2005). "Silencing the morphogenesis of rotavirus." J Virol **79**(1): 184-192.
- Ludert, J. E., M. C. Ruiz, et al. (2002). "Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation." J Virol **76**(13): 6643-6651.
- Lundgren, O., A. T. Peregrin, et al. (2000). "Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea." Science **287**(5452): 491-495.
- Lundgren, O. and L. Svensson (2001). "Pathogenesis of rotavirus diarrhea." Microbes Infect **3**(13): 1145-1156.
- Malek, M. A., A. T. Curns, et al. (2006). "Diarrhea- and rotavirus-associated hospitalizations among children less than 5 years of age: United States, 1997 and 2000." Pediatrics **117**(6): 1887-1892.
- Maranhao, A. G., J. L. Vianez-Junior, et al. (2012). "Polymorphism of rotavirus genotype G1 in Brazil: in silico analysis of variant strains circulating in Rio de Janeiro from 1996 to 2004." Infect Genet Evol **12**(7): 1397-1404.
- Martella, V., M. Ciarlet, et al. (2006). "Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain." Virology **346**(2): 301-311.
- Martella, V., V. Terio, et al. (2003). "Detection of the emerging rotavirus G9 serotype at high frequency in Italy." J Clin Microbiol **41**(8): 3960-3963.
- Martin, D., M. Ouldali, et al. (2011). "Structural organisation of the rotavirus nonstructural protein NSP5." J Mol Biol **413**(1): 209-221.
- Martinez-Laso, J., A. Roman, et al. (2009). "Phylogeny of G9 rotavirus genotype: a possible explanation of its origin and evolution." J Clin Virol **44**(1): 52-57.
- Masendycz, P., N. Bogdanovic-Sakran, et al. (2001). "Report of the Australian Rotavirus Surveillance Program, 2000/2001." Commun Dis Intell Q Rep **25**(3): 143-146.
- Masendycz, P., N. Bogdanovic-Sakran, et al. (2000). "Annual report of the Rotavirus Surveillance Programme, 1999/2000." Commun Dis Intell **24**(7): 195-198.
- Mathieu, M., I. Petitpas, et al. (2001). "Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion." EMBO J **20**(7): 1485-1497.
- Matsuzaki, Y., K. Sugawara, et al. (2004). "Genetic diversity of influenza B virus: the frequent reassortment and cocirculation of the genetically distinct reassortant viruses in a community." J Med Virol **74**(1): 132-140.

- Matthijnssens, J., M. Ciarlet, et al. (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**(7): 3204-3219.
- Matthijnssens, J., M. Ciarlet, et al. (2011). "Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)." *Arch Virol* **156**(8): 1397-1413.
- Matthijnssens, J., M. Ciarlet, et al. (2008). "Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments." *Arch Virol* **153**(8): 1621-1629.
- Matthijnssens, J., E. Heylen, et al. (2010). "Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread." *Mol Biol Evol* **27**(10): 2431-2436.
- Matthijnssens, J., M. Rahman, et al. (2008). "Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin." *J Gen Virol* **89**(Pt 10): 2630-2635.
- Maunula, L. and C. H. Von Bonsdorff (2002). "Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains." *J Virol* **76**(23): 11793-11800.
- McClain, B., E. Settembre, et al. (2010). "X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution." *J Mol Biol* **397**(2): 587-599.
- McDonald, S. M. and J. T. Patton (2011). "Rotavirus VP2 core shell regions critical for viral polymerase activation." *J Virol* **85**(7): 3095-3105.
- Mendez, II, S. G. Weiner, et al. (2008). "Conformational changes accompany activation of reovirus RNA-dependent RNA transcription." *J Struct Biol* **162**(2): 277-289.
- Mertens, P. P. C., R. Duncan, et al. (2005). *Reoviridae. Virus taxonomy: eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam, Elsevier: 447–560.
- Molto, Y., J. E. Cortes, et al. (2011). "Reduction of diarrhea-associated hospitalizations among children aged < 5 Years in Panama following the introduction of rotavirus vaccine." *Pediatr Infect Dis J* **30**(1 Suppl): S16-20.
- MSAL (2011) "Boletín Epidemiológico Anual 2010. Argentina."
- MSAL (2012) "Indicadores básicos 2011. Argentina."
- Murphy, B. R., D. M. Morens, et al. (2003). "Reappraisal of the association of intussusception with the licensed live rotavirus vaccine challenges initial conclusions." *J Infect Dis* **187**(8): 1301-1308.
- Musalem, C. and R. T. Espejo (1985). "Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11." *J Gen Virol* **66 (Pt 12)**: 2715-2724.
- Nagaoka, Y., M. Tatsumi, et al. (2012). "Phylogenetic and computational structural analysis of VP7 gene of group A human rotavirus G1P[8] strains obtained in Sapporo, Japan from 1987 to 2000." *J Med Virol* **84**(5): 832-838.

- Nakagomi, O. and T. Nakagomi (1991). "Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus." Arch Virol **120**(1-2): 43-55.
- Nakagomi, O. and T. Nakagomi (1996). "Molecular epidemiology of human rotaviruses: genogrouping by RNA-RNA hybridization." Arch Virol Suppl **12**: 93-98.
- Nakagomi, O., T. Nakagomi, et al. (1989). "Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization." Mol Cell Probes **3**(3): 251-261.
- Nakagomi, T. and O. Nakagomi (2002). "Genogroup characterization of reemerging serotype G9 human rotavirus strain 95H115 in comparison with earlier G9 and other human prototype strains." Microbiol Immunol **46**(8): 575-578.
- Nakagomi, T., A. Ohshima, et al. (1990). "Isolation and molecular characterization of a serotype 9 human rotavirus strain." Microbiol Immunol **34**(1): 77-82.
- O'Brien, J. A., J. A. Taylor, et al. (2000). "Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle." J Virol **74**(11): 5388-5394.
- O'Ryan, M. and A. C. Linhares (2009). "Update on Rotarix: an oral human rotavirus vaccine." Expert Rev Vaccines **8**(12): 1627-1641.
- O'Ryan, M., V. Prado, et al. (2005). "A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world." Semin Pediatr Infect Dis **16**(2): 125-136.
- Okada, J., T. Urasawa, et al. (2000). "New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus." J Med Virol **60**(1): 63-69.
- Page, N., M. Esona, et al. (2010). "Characterization of genotype G8 strains from Malawi, Kenya, and South Africa." J Med Virol **82**(12): 2073-2081.
- Parashar, U. D., A. Burton, et al. (2009). "Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004." J Infect Dis **200 Suppl 1**: S9-S15.
- Park, S. H., L. J. Saif, et al. (2006). "Molecular characterization of novel G5 bovine rotavirus strains." J Clin Microbiol **44**(11): 4101-4112.
- Parra, G. I. (2009). "Seasonal shifts of group A rotavirus strains as a possible mechanism of persistence in the human population." J Med Virol **81**(3): 568-571.
- Parra, G. I., K. Bok, et al. (2005). "Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay." J Med Virol **77**(4): 579-586.
- Parra, G. I., E. E. Espinola, et al. (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**(2): 135-141.
- Patel, M., C. Pedreira, et al. (2009). "Association between pentavalent rotavirus vaccine and severe rotavirus diarrhea among children in Nicaragua." JAMA **301**(21): 2243-2251.
- Patel, M. M., U. D. Parashar, et al. (2012). "The Rotavirus Experience in Mexico: Discovery to Control." Clin Infect Dis.

- Paulke-Korinek, M., P. Rendi-Wagner, et al. (2010). "Universal mass vaccination against rotavirus gastroenteritis: impact on hospitalization rates in austrian children." *Pediatr Infect Dis J* **29**(4): 319-323.
- Perez-Schael, I., M. J. Guntinas, et al. (1997). "Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela." *N Engl J Med* **337**(17): 1181-1187.
- Phan, T. G., P. Khamrin, et al. (2007). "Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004-2005." *Infect Genet Evol* **7**(2): 247-253.
- Phan, T. G., S. Okitsu, et al. (2007). "Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses." *Infect Genet Evol* **7**(5): 656-663.
- Phan, T. G., Q. D. Trinh, et al. (2007). "Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004." *Clin Lab* **53**(1-2): 41-48.
- Poruchynsky, M. S. and P. H. Atkinson (1991). "Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles." *J Virol* **65**(9): 4720-4727.
- Prameela, K. K. and L. R. Vijaya (2012). "The importance of breastfeeding in rotaviral diarrhoeas." *Malays J Nutr* **18**(1): 103-111.
- Ramachandran, M., B. K. Das, et al. (1996). "Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India." *J Clin Microbiol* **34**(2): 436-439.
- Ramachandran, M., C. D. Kirkwood, et al. (2000). "Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection." *Virology* **278**(2): 436-444.
- Ramig, R. F. (2004). "Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection." *J Virol* **78**(19): 10213-10220.
- Richardson, V., U. Parashar, et al. (2011). "Childhood diarrhea deaths after rotavirus vaccination in Mexico." *N Engl J Med* **365**(8): 772-773.
- Rodriguez-Castillo, A., J. E. Ramirez-Gonzalez, et al. (2006). "Analysis of human rotavirus G1P[8] strains by RFLP reveals higher genetic drift in the VP7 than the VP4 gene during a 4-year period in Mexico." *J Virol Methods* **138**(1-2): 177-183.
- Ruggeri, F. M. and H. B. Greenberg (1991). "Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture." *J Virol* **65**(5): 2211-2219.
- Ruiz-Palacios, G. M., I. Perez-Schael, et al. (2006). "Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis." *N Engl J Med* **354**(1): 11-22.
- Sanchez-Padilla, E., R. F. Grais, et al. (2009). "Burden of disease and circulating serotypes of rotavirus infection in sub-Saharan Africa: systematic review and meta-analysis." *Lancet Infect Dis* **9**(9): 567-576.

- Santos, N. and Y. Hoshino (2005). "Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine." Rev Med Virol **15**(1): 29-56.
- Santos, N., E. M. Volotao, et al. (2003). "VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR." Virus Res **93**(1): 127-138.
- Settembre, E. C., J. Z. Chen, et al. (2011). "Atomic model of an infectious rotavirus particle." EMBO J **30**(2): 408-416.
- Sidler, J. A., C. Haberthur, et al. (2012). "A retrospective analysis of nosocomial viral gastrointestinal and respiratory tract infections." Pediatr Infect Dis J **31**(12): 1233-1238.
- Silvestri, L. S., Z. F. Taraporewala, et al. (2004). "Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm." J Virol **78**(14): 7763-7774.
- Simonsen, L., C. Viboud, et al. (2005). "More on RotaShield and intussusception: the role of age at the time of vaccination." J Infect Dis **192** **Suppl 1**: S36-43.
- Steele, A. D. and B. Ivanoff (2003). "Rotavirus strains circulating in Africa during 1996-1999: emergence of G9 strains and P[6] strains." Vaccine **21**(5-6): 361-367.
- Stupka, J. A., P. Carvalho, et al. (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**(6): 1225-1231.
- Stupka, J. A., J. I. Degiuseppe, et al. (2012). "Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008-2009: whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains." J Clin Virol **54**(2): 162-167.
- Stupka, J. A., G. I. Parra, et al. (2007). "Detection of human rotavirus G9P[8] strains circulating in Argentina: phylogenetic analysis of VP7 and NSP4 genes." J Med Virol **79**(6): 838-842.
- Tamura, K., D. Peterson, et al. (2011). "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." Mol Biol Evol **28**(10): 2731-2739.
- Taraporewala, Z. F., X. Jiang, et al. (2006). "Structure-function analysis of rotavirus NSP2 octamer by using a novel complementation system." J Virol **80**(16): 7984-7994.
- Tate, J. E., M. M. Cortese, et al. (2011). "Uptake, impact, and effectiveness of rotavirus vaccination in the United States: review of the first 3 years of postlicensure data." Pediatr Infect Dis J **30**(1 Suppl): S56-60.
- Taylor, J. A., J. A. O'Brien, et al. (1996). "The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains." EMBO J **15**(17): 4469-4476.
- Trask, S. D. and P. R. Dormitzer (2006). "Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins." J Virol **80**(22): 11293-11304.

- Trask, S. D., S. M. McDonald, et al. (2012). "Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication." Nat Rev Microbiol **10**(3): 165-177.
- Trinh, Q. D., N. T. Pham, et al. (2007). "Amino acid substitutions in the VP7 protein of human rotavirus G3 isolated in China, Russia, Thailand, and Vietnam during 2001-2004." J Med Virol **79**(10): 1611-1616.
- Turcios, R. M., A. T. Curns, et al. (2006). "Temporal and geographic trends of rotavirus activity in the United States, 1997-2004." Pediatr Infect Dis J **25**(5): 451-454.
- Unicomb, L. E., G. Podder, et al. (1999). "Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995." J Clin Microbiol **37**(6): 1885-1891.
- Urasawa, S., A. Hasegawa, et al. (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**(2): 227-234.
- Velazquez, F. R. (2009). "Protective effects of natural rotavirus infection." Pediatr Infect Dis J **28**(3 Suppl): S54-56.
- Velazquez, F. R., H. Garcia-Lozano, et al. (2004). "Diarrhea morbidity and mortality in Mexican children: impact of rotavirus disease." Pediatr Infect Dis J **23**(10 Suppl): S149-155.
- Velazquez, F. R., D. O. Matson, et al. (1996). "Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections." N Engl J Med **335**(14): 1022-1028.
- Velazquez, F. R., D. O. Matson, et al. (2000). "Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease." J Infect Dis **182**(6): 1602-1609.
- Vesikari, T., H. F. Clark, et al. (2006). "Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants." Vaccine **24**(22): 4821-4829.
- Vesikari, T., A. Karvonen, et al. (2010). "Efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq(R), in Finnish infants up to 3 years of age: the Finnish Extension Study." Eur J Pediatr **169**(11): 1379-1386.
- Vesikari, T., A. Karvonen, et al. (2010). "Sustained efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RV5, up to 3.1 years following the last dose of vaccine." Pediatr Infect Dis J **29**(10): 957-963.
- Vesikari, T., A. Karvonen, et al. (2007). "Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study." Lancet **370**(9601): 1757-1763.
- Vesikari, T., A. Karvonen, et al. (2004). "Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants." Pediatr Infect Dis J **23**(10): 937-943.
- Vesikari, T., D. O. Matson, et al. (2006). "Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine." N Engl J Med **354**(1): 23-33.

- Vesikari, T., M. Uhari, et al. (2013). "Impact and Effectiveness of Rotateq(R) Vaccine Based on Three Years of Surveillance Following Introduction of a Rotavirus Immunization Program in Finland." Pediatr Infect Dis J.
- Walker, C. L., M. J. Aryee, et al. (2012). "Estimating diarrhea mortality among young children in low and middle income countries." PLoS One **7**(1): e29151.
- Walker, C. L., I. Rudan, et al. (2013). "Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea." Lancet **381**(9875): 1405-1416.
- Ward, R. (2009). "Mechanisms of protection against rotavirus infection and disease." Pediatr Infect Dis J **28**(3 Suppl): S57-59.
- Ward, R. L. and D. I. Bernstein (2009). "Rotarix: a rotavirus vaccine for the world." Clin Infect Dis **48**(2): 222-228.
- WHO (2007). "Rotavirus vaccines." Wkly Epidemiol Rec **82**(32): 285-295.
- WHO (2009). "Rotavirus vaccines:an update." Wkly Epidemiol Rec **84**(50): 533-540.
- Wolf, M., P. T. Vo, et al. (2011). "Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes." J Virol **85**(6): 2492-2503.
- Xu, J., P. Dennehy, et al. (2005). "Serum antibody responses in children with rotavirus diarrhea can serve as proxy for protection." Clin Diagn Lab Immunol **12**(2): 273-279.
- Yang, X. L., J. Matthijnssens, et al. (2008). "Temporal changes of rotavirus strain distribution in a city in the northwest of China, 1996-2005." Int J Infect Dis **12**(6): e11-17.
- Yeager, M., J. A. Berriman, et al. (1994). "Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis." EMBO J **13**(5): 1011-1018.
- Yoder, J. D., S. D. Trask, et al. (2009). "VP5* rearranges when rotavirus uncoats." J Virol **83**(21): 11372-11377.
- Yuan, L., S. Ishida, et al. (2004). "Homotypic and heterotypic serum isotype-specific antibody responses to rotavirus nonstructural protein 4 and viral protein (VP) 4, VP6, and VP7 in infants who received selected live oral rotavirus vaccines." J Infect Dis **189**(10): 1833-1845.
- Zeller, M., J. T. Patton, et al. (2012). "Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq." J Clin Microbiol **50**(3): 966-976.
- Zhang, X., E. Settembre, et al. (2008). "Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 1867-1872.
- Zhou, Y., L. Li, et al. (2000). "Rotavirus infection in children in Japan." Pediatr Int **42**(4): 428-439.

8. AGRADECIMIENTOS

A Claudia por sus certezas y compañía, pero principalmente por el diario ejercicio de su paciencia infinita.

A mi director y amigo, Gabriel Parra, por su generosidad, pasión por la investigación y por las entrañables y “*virulentas*” discusiones sobre rotavirus.

A mis compañeros de aventuras: Karina Gomes, Karina Rivero, Ezequiel Reale y especialmente a Juan Degiuseppe “editor de lujo” del caos y deriva mental del que suscribe.

A Cecilia Freire, la mejor compañera en las peores batallas, pero sobre todo por la perseverancia y esfuerzo en su lucha por una institución mejor.

A los amigos del Servicio de Neurovirosis y del resto del departamento de Virología.

A Jorge Gomes por aquella confianza y a Virginia Alonio por la de siempre.

A Vivi Molina, por el continuo apoyo y el aplomo multitarget.

A Mirta Carlomagno por la posibilidad y facilitar la concreción de esta maestría.

A Juan y Sara, por el sacrificio realizado y el ejemplo .

Por ultimo, al viejo y querido Instituto Malbrán al cual debo mi formación y maestros que, a pesar de algunas ausencias, fueron y serán inspiradores.

9. PRODUCTOS RELACIONADOS CON ESTA TESIS

Stupka J., Degiuseppe J., Parra G. **Genetic variability of G1P[8] strains circulating in Argentina from 1996 to 2004.** Poster. 11th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses. 27 de noviembre al 1 de diciembre **2012**. San Juan. Puerto Rico.

Stupka JA, Carvalho P, Amarilla AA, Massana M, Parra GI. ***National rotavirus surveillance in Argentina: high incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics.*** Infect Genet Evol **2009**;9(6):1225-31

Stupka JA, Parra GI, Gomez J, Arbiza J. ***Detection of human rotavirus G9P[8] strains circulating in Argentina: phylogenetic analysis of VP7 and NSP4 genes.*** J Med Virol **2007**;79(6):838-42.

