



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

Tesis Doctoral

Análisis de los cambios genéticos como
mecanismos utilizados por los rotavirus para
persistir en poblaciones humanas

Iara Magaly Martínez Pereira

Orientador: Dr. Gabriel I. Parra

Co-orientador: Dra. Graciela Russomando

Postgrado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

Índice

Glosario	4
Resumen	7
Abstract	9
Introducción	10
Los Rotavirus	10
Características de la partícula viral.....	11
Diversidad y clasificación	12
Epidemiología y mecanismos de diversificación	16
Inmunidad y vacunación.....	19
Situación de la infección por rotavirus en Paraguay	22
Hipótesis.....	25
Objetivo	25
Capítulo 1	
Epidemiología molecular de las cepas de rotavirus circulantes en Asunción, Paraguay de 1998 a 2009.....	26
Antecedentes	26
Metodología	27
Resultados	32
Discusión	35
Capítulo 2	
Constelación genómica de los genotipos G1P[8] y G4P[8].	38
Antecedentes	38
Metodología	39
Resultados	39
Discusión	53
Capítulo 3	
Constelación genómica y evolución molecular de las cepas de rotavirus G9P[8].	56
Antecedentes	56
Metodología	57
Resultados	57
Discusión	66

Capítulo 4	
Constelación genómica del genotipo G2P[4]: Circulación de una única variante de genogrupo II.	67
Antecedentes	67
Metodología	68
Resultados	68
Discusión	73
Capítulo 5	
Circulación de los genotipos G3P[8], G12P[9] y G3P[9]	74
Antecedentes	74
Metodología	76
Resultados	76
Capítulo 6	
Dinámica evolutiva de la proteína VP7 de la cápside de rotavirus	89
Introducción	89
Metodología	90
Resultados	92
Discusión	98
Discusión y Conclusión Final	100
Bibliografía.....	108
Anexos	119

Glosario

Virión: partícula viral madura e infectiva

Virus no envuelto: virus en los que la partícula viral carece de envoltura lipídica externa. La partícula viral es estable y puede sobrevivir por mucho tiempo en el ambiente.

ARN de cadena doble: doble hebra de ARN similar a la estructura de la doble hélice de ADN

ARN segmentado: ARN viral no lineal, compuesto por segmentos que constituyen los genes del genoma viral.

Segmento de ARN: cada uno de los segmentos del genoma que constituye un gen que codifica una proteína viral.

Proteína estructural: proteína que forma parte de la partícula viral

Proteína no estructural: proteína codificada en el genoma viral pero que no forma parte de la partícula. Se traduce durante el proceso replicativo.

Genotipo: clasificación de un virus en base a la secuencia nucleotídica de un gen determinado

Genotipo G: clasificación de los rotavirus en base a la secuencia nucleotídica del gen que codifica la proteína VP7 de la cápside viral.

Genotipo P: clasificación de los rotavirus en base a la secuencia nucleotídica del gen que codifica la proteína VP4 de la cápside viral.

Clasificación binaria: clasificación de cepas de rotavirus en base a los

genotipos G y P.

Constelación génica: conjunto de genes que conforman el genoma.

Genogrupo: clasificación de los rotavirus en base al conjunto de genotipos que conforman su constelación génica.

Reordenamiento génico: evento que ocurre cuando en una infección con dos cepas de virus diferentes, intercambian un segmento de ARN para formar una constelación génica reordenante.

Clúster: agrupación filogenética entre virus relacionados entre sí.

Variante: virus de un determinado genotipo cuyo genoma posee variaciones en su secuencia.

Identidad: cantidad de caracteres (bases/aminoácidos) en una secuencia que coinciden exactamente con otra secuencia.

Variabilidad intragenotipo: grado de identidad entre secuencias de un mismo genotipo.

Variabilidad intergenotipo: grado de identidad entre secuencias de genotipos diferentes.

Genotipo predominante: genotipo cuya frecuencia es mayor que la de otros genotipos circulantes durante una epidemia.

Transmisión interespecie: infección de un hospedero por un virus que típicamente infecta especies diferentes.

Protección homotípica: inmunidad específica hacia un determinado patógeno, conferida por una infección o vacunación con un patógeno del mismo tipo.

Protección heterotípica: inmunidad cruzada hacia un determinado patógeno,

conferida por una infección o vacunación con un patógeno diferente, pero que comparte ciertas características en común.

Patógeno multigenotipo: patógeno que posee cepas de diferentes genotipos que son capaces de infectar a un hospedero.

Resumen

Los rotavirus son uno de los patógenos más importantes en humanos y animales. Son virus no envueltos que poseen un genoma compuesto por segmentos de ARN de cadena doble, cada uno de los cuales codifica una proteína. Las dos proteínas de superficie del virión, VP7 y VP4 poseen sitios antigénicos contra los cuales se producen los anticuerpos neutralizantes. Históricamente la clasificación de los rotavirus estaba basada en la secuencias de los genes que codifican las dos proteínas de superficie. El actual sistema de clasificación se basa en el análisis de la secuencia entera del genoma de rotavirus, donde Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx designa los genotipos para los genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 respectivamente. Este sistema de clasificación permitió determinar la compleja interacción entre las cepas humanas y animales y que los rotavirus mantienen constelaciones génicas definidas. En nuestro laboratorio poseemos una colección de más de 700 muestras tipificadas de rotavirus durante los años 1998-2009 que nos permitió estudiar la dinámica de los rotavirus en una población no vacunada. En base a las variaciones en la dominancia de un determinado genotipo y la composición de su genoma, podemos proponer que la capacidad de un genotipo determinado de rotavirus de predominar sobre otros, no es sólo el producto de cambios antigénicos en las proteínas VP7 y/o VP4, sino es más bien debido a la introducción de una nueva constelación génica. Esto pudiera sugerir que tanto combinaciones génicas óptimas para formar el virión, el rol que juegan otras proteínas en la respuesta inmune, así

como el estatus inmunológico de una población, son determinantes en la dinámica epidemiológica de los rotavirus.

Abstract

Rotaviruses are one of the most important pathogen for humans and animals. The infectious virion consists on a triple-layered protein capsid that encloses 11 segments of double-stranded RNA. Each of the 11 segments encodes one protein. The two outermost proteins, VP7 and VP4, possess antigenic sites that induce the production of neutralizing antibodies. Although initially the genotypes were assigned by using the VP7 and VP4, the current classification system assigns a genotype to each genome segment of the virus. Thus, Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx assign the genotype for the genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5. This classification system has revealed the complex interaction between human and animal rotavirus strains and that the evolutionary dynamic of rotaviruses occurs as a fluctuation of whole gene-constellations. We took advantage of a large collection (>700) of rotavirus samples, which circulated from 1998 to 2009, to study the rotavirus dynamic in a non-vaccinated population. Using large-scale genomics we have found that the seasonal shift of the predominant genotypes was not only due to the antigenic shift of the VP7 and VP4 genotypes, but also from the introduction of a new gene constellation to a population. This suggests that the gene constellation not only occur at rotavirus strains infecting different species, but also to variants infecting humans; and other viral proteins play a role in immunity. Together, the immunological status of the population and the viral protein interactions are determinant on the rotavirus strains dynamic.

Introducción

Los Rotavirus

Los rotavirus son un género dentro de la familia *Reoviridae* (1). Esta familia incluye patógenos de importancia para la salud pública como los rotavirus y virus con impacto económico en la producción animal, como los orbivirus, que afectan a ganado bovino y caprino (2). Otros miembros de la familia *Reoviridae*, como el virus de la fiebre del Colorado también afectan humanos; sin embargo la infección por rotavirus está extendida globalmente (2). Los rotavirus fueron descritos por primera vez en 1973 mediante microscopía electrónica en el epitelio del intestino delgado de niños con diarrea no bacteriana (3) y rápidamente pasaron a ser reconocidos como una de las principales causas de gastroenteritis aguda en humanos y otras especies animales (4, 5). En países de clima templado se observó que la circulación de los rotavirus tiene un pico estacional en los meses fríos mientras que en los países tropicales los rotavirus circulan todo el año sin un patrón estacional (6, 7).

En humanos la enfermedad causa episodios de diarrea acuosa no sanguinolenta y puede causar vómitos y fiebre. En la mayoría de los casos la enfermedad puede ser autocontrolada en 2 a 3 días, sin embargo, la carga de la enfermedad antes de la introducción de la vacuna era de aproximadamente 600000 muertes de niños menores de 5 años por año, ocurriendo al menos el 79% de ellas en países en desarrollo (8). Además producir un promedio de 2 millones de hospitalizaciones por año en países desarrollados, según lo

estimado por la WHO (World Health Organization) hasta el 2014 (9).

Características de la partícula viral

Los rotavirus son virus no envueltos y poseen una cápside icosaédrica formada por tres capas concéntricas de proteínas. Su genoma consiste en 11 segmentos de ARN de cadena doble, cada uno de ellos codifica una proteína, excepto por el segmento 11 que en algunas cepas codifica dos proteínas (NSP5 and NSP6) (Figura 1). Seis proteínas estructurales conforman la cápside VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 y seis proteínas no estructurales NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6 que son requeridas para la replicación del virión (Figura 1) (1, 5, 10, 11). La estructura general del virión infeccioso es una partícula de triple cápside (TLP de sus siglas en ingles). La cápside interna está constituida por la VP2, y está asociada a dos proteínas menores: la polimerasa viral (VP1) y la enzima metil-transferasa (VP3) formando un complejo requerido para la replicación viral (12). La cápside interna está rodeada de homotrómeros de VP6 formando una cápside intermedia y el mayor antígeno viral. La cápside externa está formada principalmente por homotrómeros de la glicoproteína VP7 y la espícula VP4. VP4 posee un sitio sensible a proteasas, donde la tripsina la cliva para permitir los cambios conformacionales necesarios para la penetración a la célula (11, 13-15). Las proteínas no estructurales no forman parte ni son encapsidadas dentro del virión maduro. Durante la infección cumplen funciones

que incluyen la replicación del genoma, control de la síntesis de proteínas celulares y virales, regulación del sistema inmune del hospedero, morfogénesis y maduración de la partícula (Tabla 1) (1, 16-18).

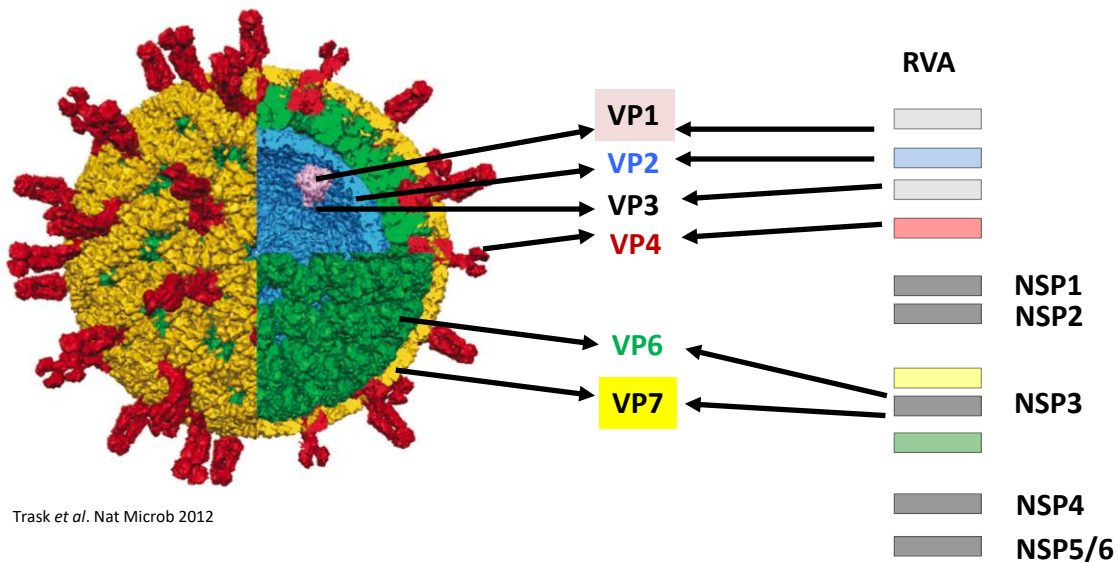


Figura 1. Partícula viral de los rotavirus. Se muestra la estructura de la cápside compuesta por una triple capa concéntrica de proteínas que encierran al genoma. Se observa la representación de los 11 segmentos de ARN doble cadena genómico y las proteínas que codifican. La posición de la proteína VP3 no está completamente definida. VP: *viral protein* (proteínas estructurales); NSP: *no structural protein* (proteína no estructural)

Diversidad y clasificación

Los rotavirus se dividen en cinco grupos (A-E) principalmente basados en las propiedades antigénicas y en la secuencia de aminoácidos de la cápside intermedia VP6. En base a estudios filogenéticos, se ha propuesto la existencia de 3 grupos más (F-H) (19). De todos estos grupos, solo los rotavirus de los grupos A-C infectan humanos, mientras que los restantes sólo fueron encontrados en animales (2). Los rotavirus del grupo A son la principal causa de diarrea en niños menores de 5 años.

Proteína	Funciones	Gen (Kb)
VP1	ARN polimerasa, dependiente de ARN, proteína de unión a ARN de cadena simple; en el virión se encuentra localizada en la cápside interna unida a VP2; forma un complejo transcripcional con VP3	3302
VP2	Proteína estructural de la cápside interna; con actividad de unión a ARN no dependiente de la secuencia; necesaria para la actividad de polimerasa de VP1	2687
VP3	Guaniltransferasa y metiltransferasa; parte del complejo de transcripción del virión junto con VP1	2595
VP4	Los trímeros de VP4 forman las acículas externas de la cápside; antígeno de neutralización P-específico; hemaglutinina determinante de la virulencia; proteína de anclaje a la célula; el corte por tripsina en VP5 y VP8 favorece la infectividad.	2362
NSP1	Se asocia con el citoesqueleto; de gran diversidad entre las cepas; tiene el rol de suprimir la respuesta IFN.	1581
VP6	Proteína principal de la cápside; proteína estructural de la cápside media, de estructura homotrimérica; antígeno subgrupo, necesaria para la transcripción.	1356
NSP3	Homodímero, se une de manera específica al extremo 3' del ARNm del rotavirus, se une al factor de elongación eIFG1; involucrada en la regulación de la traducción	1074
NSP2	NTPasa y helicasa; se une de manera no específica a ARN de cadena simple; involucrada en la formación del viroplasma; se une a NSP5 y VP1; esencial para la síntesis de ARN de doble cadena.	1059
VP7	Glicoproteína estructural de la cápside externa; antígeno de neutralización G-específico; proteína de membrana del retículo endoplásmico con sitios de unión a calcio.	1062
NSP4	Enterotoxina viral; receptor del brote de partículas de doble capa a través del retículo endoplásmico; glicoproteína; regula los niveles de calcio intracelular y la replicación de ARN; secretada como producto de corte.	751
NSP5	Interactúa con NSP2 y NSP6; forma homomultímeros; fosfo-O-glicosilada; se une a ARN de cadena simple; componente del viroplasma, esencial para la replicación viral.	666
NSP6	Producto secundario fuera del marco de lectura del marco de lectura abierto del gen NSP5; interactúa con la proteína NSP5 se localiza en los viroplasma; no todas las cepas producen este producto génico.	-

Tabla 1. Características y funciones de las proteínas de rotavirus. Adaptado de Angel, et al., Nature Reviews Microbiology 2007 y Desselberger, Virus Res. 2014.

Actualmente se cuenta con dos vacunas eficaces, pero se estima que los rotavirus siguen causando un promedio 215.000 muertes por año,

principalmente en países en desarrollo (20). La clasificación genotípica de las cepas del grupo A se basa principalmente en un esquema binario de acuerdo a la secuencia de los genes que codifican las proteínas VP7 y VP4 (genotipos G y P, respectivamente) (10). El uso de este sistema binario tiene sus limitaciones, ya que es incapaz de proveer la información necesaria para evaluar de manera completa la diversidad genética y la dinámica evolutiva de las cepas de rotavirus co-circulantes. Debido a estas limitaciones se desarrolló un nuevo sistema de clasificación basado en el análisis de la secuencia entera del genoma de rotavirus, donde se asigna un genotipo a cada uno de los genes. En la nomenclatura definida para esta clasificación, cada gen está designado por una letra seguida un número que asigna el genotipo para ese gen, así: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx designa los genotipos para VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 respectivamente (Figura 2) (21). El número de genotipos descritos para cada gen se detalla en la Tabla 2. Este nuevo sistema de clasificación permitió determinar que en la población humana circulan 3 principales agrupaciones de genes o “constelaciones” que se mantienen constantes y son responsables de la mayor parte de las infecciones (Figura 2); por ello se propone que la fluctuación temporal y geográfica de los rotavirus resulta no de la dinámica de genes individuales sino del comportamiento de una determinada constelación genética (21, 22).

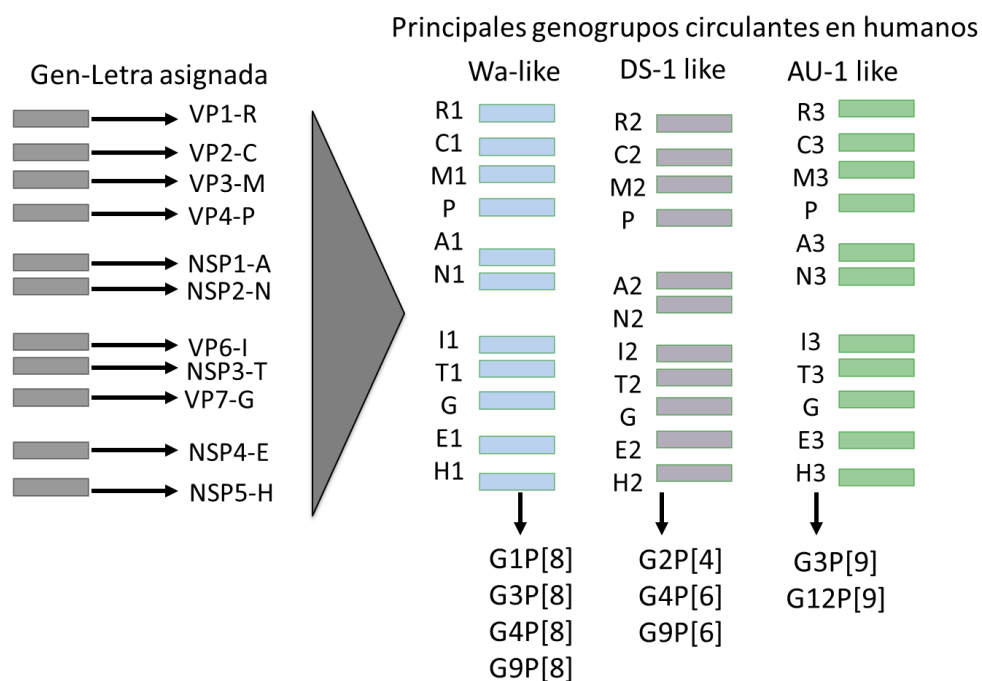


Figura 2. Clasificación de los rotavirus basada en el genoma completo. Se muestra el código de letras asignado a cada gen. Se muestran las constelaciones de los 3 genogrupos principales circulantes en humanos: genogrupo 1 o *Wa-like*; genogrupo 2 o *DS-1-like* y genogrupo 3 o *AU-1-like*.

Gen	Identidad (nucleótidos) para designar un genotipo (cut-off)	Número de genotipos descritos
VP7	80%	28 G
VP4	80%	37 P
VP6	85%	21 I
VP1	83%	14 R
VP2	84%	14 C
VP3	81%	13 M
NSP1	79%	24 A
NSP2	85%	14 N
NSP3	85%	16 T
NSP4	85%	21 E
NSP5	91%	16 H

Tabla 2. Genotipos descritos para cada gen del genoma de rotavirus. Se muestran los valores de *cut-off* de identidad de nucleótidos para definir un genotipo.

Epidemiología y mecanismos de diversificación

La epidemiología de los rotavirus es un fenómeno complejo y cambiante. Globalmente, las cepas causantes de la mayoría de las infecciones, pueden cambiar año tras año y geográficamente. Aunque en general un genotipo es el predominante en una determinada población, más de un tipo puede co-circular al mismo tiempo (6, 23, 24). Pese a que múltiples genotipos G y P han sido descritos, sólo 5 combinaciones: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8] han sido asociadas con la vasta mayoría causante de gastroenteritis en humanos (21, 25, 26); sobre todo en países de medio-alto nivel socioeconómico (27, 28). En países en desarrollo, sin embargo, se ha detectado que los genotipos dominantes cambian con más frecuencia y cepas con genotipos atípicos pueden ser causantes de las epidemias anuales (Figura 3) (29, 30).

La diversidad de los rotavirus es generada por varios mecanismos; i. acumulación de mutaciones (deriva genética que conduce a cambios antigénicos); ii. reordenamiento de genes que conduce a un virus con nuevas características genéticas y antigénicas; iii. transmisión interespecies y iv. rearreglos génicos; siendo el primero y el segundo los principalmente reportados en cepas humanas (Figura 4) (24).

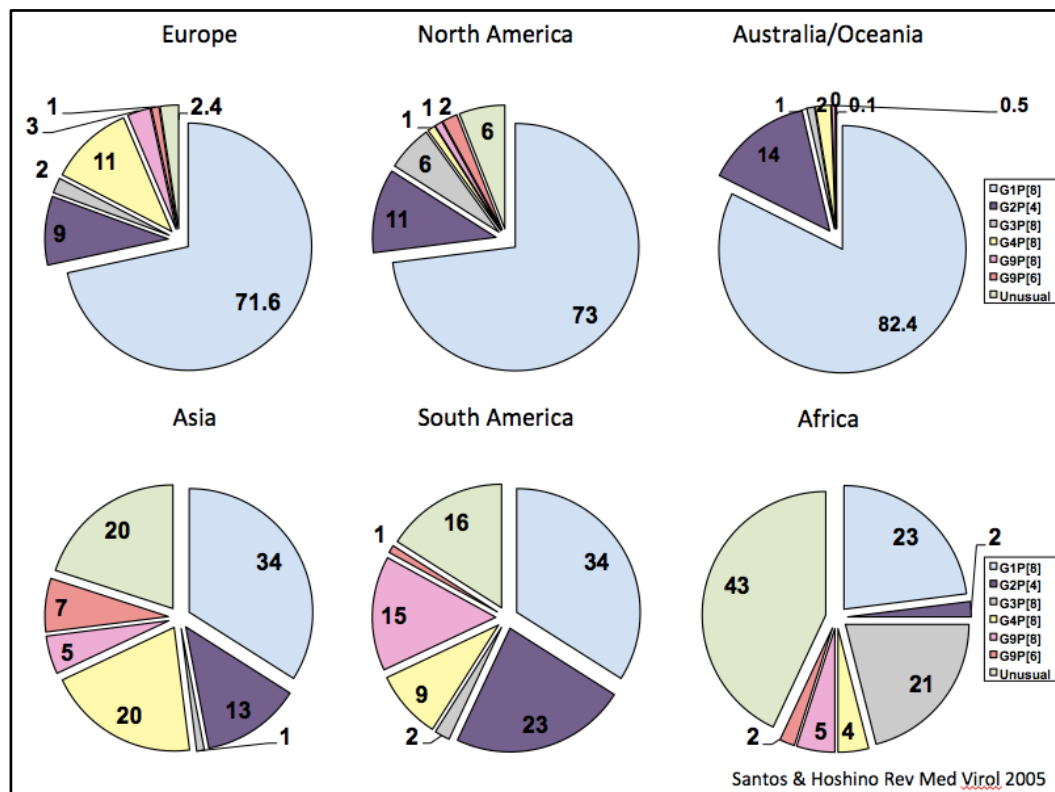


Figura 3. Distribución geográfica y frecuencia de genotipos a nivel mundial (25).

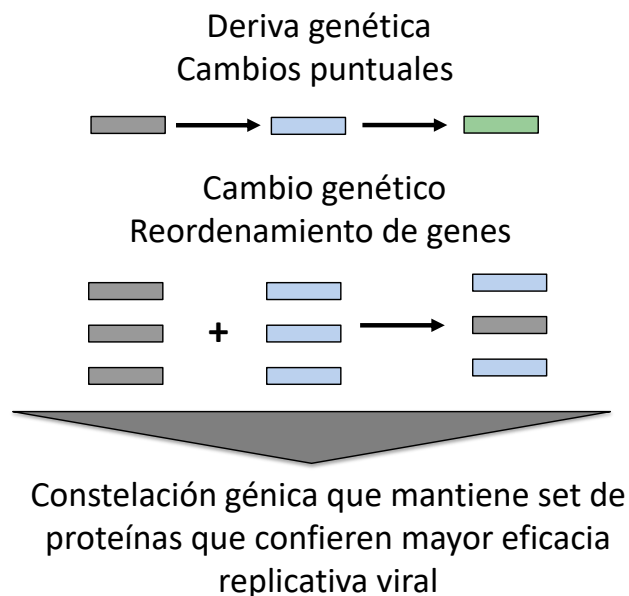


Figura 4. Mecanismos genéticos de variabilidad de los rotavirus. Se muestra el esquema de cambios mediante acumulación de mutaciones puntuales y el esquema reordenamiento de genes entre cepas diferentes.

En principio, cada uno de los 11 segmentos o genes puede segregarse de manera independiente, sin embargo se demostró que sólo ciertas combinaciones de genes ocurren naturalmente; por ejemplo, en la gran mayoría de las cepas que infectan humanos, G1 siempre está asociado a P[8] mientras que G2 se asocia a P[4] y las mismas tienen constelaciones génicas enteramente de genotipo 1 y genotipo 2, respectivamente (Figura 2) (21, 31). Similares observaciones se hicieron en animales donde G3 se asocia a P[9] y genes del genotipo 3 en gatos y perros, mientras que en conejos se asocia a P[14] (32). Estos resultados soportan la idea de que los rotavirus han mantenido evolutivamente constelaciones de genes debido a la presión selectiva que ejerce la interacción entre proteínas (22, 23, 33-35). El ensamblaje de la cápside viral es un paso clave donde la estrecha interacción entre las proteínas que la conforman (11, 36) parece seleccionar la segregación de los genes (22, 37) (Figura 5).

En países en desarrollo, la presión selectiva a favor de mantener una constelación génica preferida, puede ser superada por el constante intercambio de genes a través de co-infecciones y reordenamientos. Si bien el reordenamiento de virus animales con cepas humanas usualmente produce cepas inestables incapaces de sostener una transmisión entre personas, es sólo cuestión de tiempo hasta que ocurra uno que provea un virus capaz de circular con una capacidad de replicación y transmisión comparable los virus prevalentes en humanos (6, 26, 38).

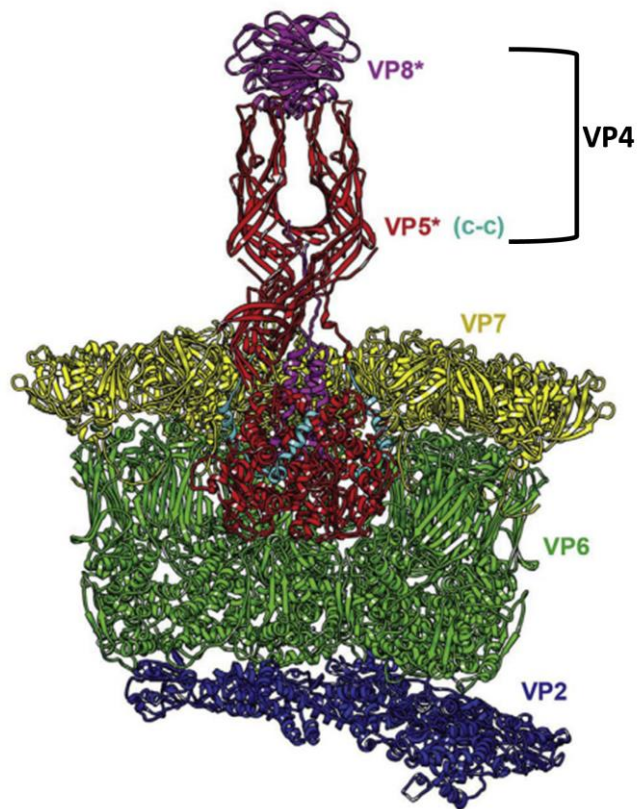


Figura 5. Interacción de las proteínas estructurales en la partícula viral de rotavirus. (Corte transversal). Modelado Settembre et al. 2011.

Inmunidad y vacunación

Actualmente hay dos vacunas aprobadas para combatir la enfermedad provocada por rotavirus. Estas vacunas son administradas temprano en la niñez ya que los niños menores de 2 años son los más afectados, ya que superada esa edad, la mayoría de los niños habrá experimentado una infección natural por rotavirus (39, 40). Las dos vacunas son orales y con virus atenuado. RotaTeq (Merck & Co., West Point, PA, USA), una vacuna pentavalente (G1, G2, G3, G4-P[8]), reordenante humano-bovino en donde los genes de cada uno de los cinco genotipos humanos se reordenaron en la cepa bovina WI79.

Rotarix, (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) una vacuna, monovalente, derivada de la cepa G1P[8] tienen licencia de uso en más de 100 países alrededor del mundo (41). En un principio, la protección de las vacunas se basa en los anticuerpos producidos contra los epítopes de neutralización presentes en las proteínas de superficie VP7 y VP4 (Figura 6).

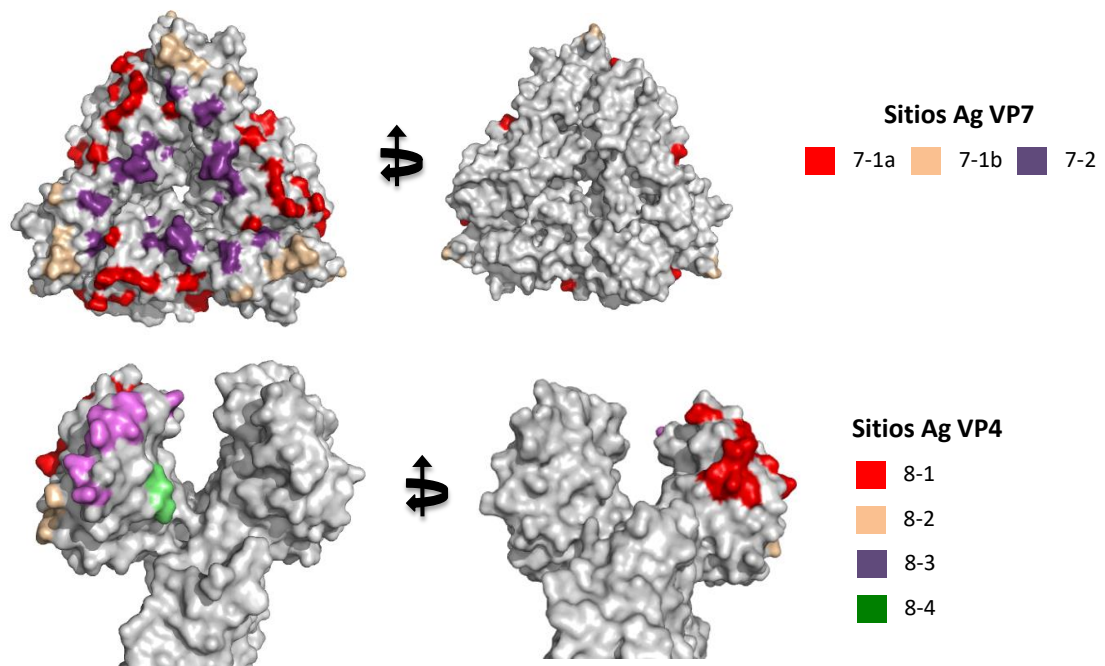


Figura 6. Sitios antigénicos en las proteínas VP7 y VP4 de rotavirus.

A partir de estudios observacionales y ensayos vacunales se vio que tanto las infecciones naturales por rotavirus como la vacunación confieren inmunidad homotípica y heterotípica. A diferencia de otros virus, las infecciones sucesivas con un mismo genotipo no solo resulta en una reducción de las síntomas sino que también confiere mayor protección heterotípica lo cual a ha sido la base para el desarrollo de la vacuna monovalente. Así la naturaleza y fortaleza de la

protección puede variar dependiendo de factores como: el número de infecciones previas, el tipo de infección/vacuna (animal, reordenante, etc) estado nutricional, lactancia, diversidad de las cepas circulantes, microbiota del intestino, entre otros (42-44). Aunque la respuesta inmune contra una infección por rotavirus no está completamente dilucidada, ha sido propuesto que además de los anticuerpos neutralizantes contra VP7 y VP4, puede existir protección debido a anticuerpos no neutralizantes contra VP6 (IgA) en el lumen del intestino y en suero. Además, está siendo estudiado el rol de los altos niveles de IgA en suero, así como el de la inmunidad mediada por células y la inmunidad innata, aunque su correlación con la protección contra infecciones permanece en controversia (18, 45, 46).

Estudios post-vacunales han mostrado que en países en desarrollo la eficacia de ambas vacunas puede prevenir entre el 85% - 100% de las gastroenteritis severas (26, 47). Así por ejemplo en México, se observó una reducción del 35% de la mortalidad a causa de la infección por rotavirus, en los dos primeros años de vacunación con Rotarix™ (Figura 7) (48). Sin embargo, por razones desconocidas la eficacia de las vacunas en países en desarrollo fue menor (49, 50) o declinó a partir del segundo año de vida de los niños vacunados (51). Varios estudios demostraron que en países en vías de desarrollo, la frecuencia de infecciones mixtas es muy alta, alrededor del 20%, y que la frecuencia de este evento es crucial en la generación de virus reordenantes lo generaría cepas que no serían completamente protegidas por las vacunas actuales (38).

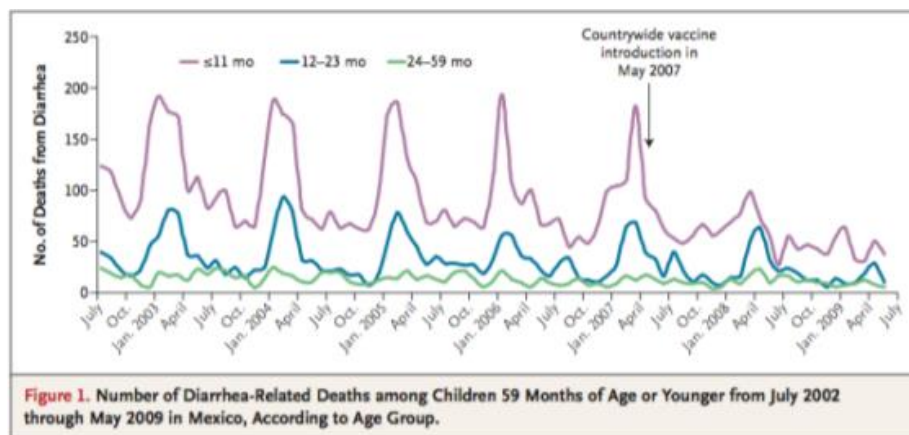


Figura 7. Reducción de casos de mortalidad a causa de diarrea en México. Se observa la reducción de casos en dos años post-introducción de la vacuna monovalente anti rotavirus (48).

Además debe tenerse en cuenta los patrones de predominancia cíclica de un genotipo y coexistencia de diferentes virus en un determinado tiempo y espacio (52). Entender como la inmunidad moldea la dinámica de patógenos multi-genotipos es esencial para determinar la presión selectiva que pueden imponer las vacunas. Actualmente existe un gran interés en elucidar la dinámica de fluctuación de los genotipos de rotavirus así como de otros patógenos multi-genotipo como papiloma virus y pneumococco, para determinar si la presión de la vacuna deriva en el incremento de nuevas cepas (52, 53).

Situación de la infección por rotavirus en Paraguay

En Paraguay, la diarrea aguda es la cuarta causa de mortalidad en niños menores de 5 años (54). Nuestro grupo ha estudiado la epidemiología del rotavirus desde 1998 y ha demostrado que: i. el promedio de la frecuencia en

niños es del 25% ii. la circulación presenta un pico estacional marcado en los meses fríos del año (Figura 8), iii. la dominancia de un genotipo cepa fluctúa año tras año, posiblemente a causa de la introducción de genotipos o variaciones intragenotipo, iv. se detectaron co-infecciones con dos o más genotipos con una frecuencia del 3 al 13%, en los diferentes años de estudio y v. la circulación de genotipos G y P atípicos (29, 30, 55).

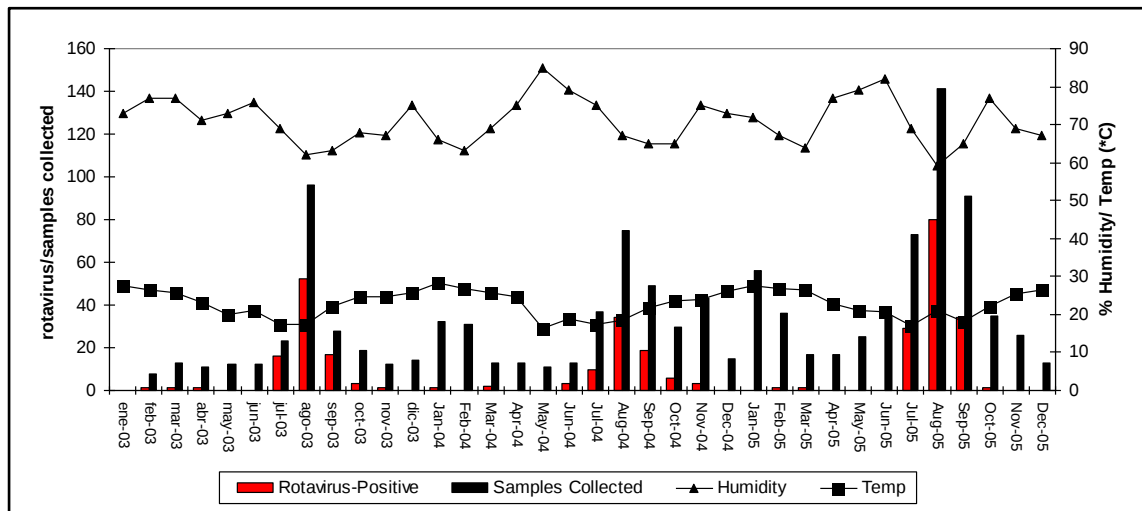


Figura 8. Estacionalidad y frecuencia de casos de rotavirus en Paraguay (7).

Llamativamente, los diferentes grupos etarios son igualmente afectados cuando una nueva cepa ingresa a la población, mientras que sólo niños de 6-24 meses son mayormente afectados cuando cepas previamente circulando predominan en un determinado año (56). Esto hace suponer que dicha fluctuación en los genotipos dominantes puede estar direccionada en parte por el estatus inmunológico de la población que selecciona diferentes proteínas VP7 y VP4

óptimas para infectar humanos.

En Paraguay vacuna monovalente Rotarix[™] fue incorporada al programa de vacunación nacional en 2010 y el promedio de cobertura en todas las regiones sanitarias fue del 75% (<http://www.mspbs.gov.py/pai/index.php/boletines-de-cobertura>). Este dato y el hecho que en nuestro laboratorio poseemos una colección de más de 700 muestras tipificadas de rotavirus durante los años 1998-2009 nos permite estudiar la dinámica de los rotavirus en una población no vacunada. Como hipótesis proponemos estudiar la dinámica de los genomas de rotavirus e identificar factores que favorezcan la dominancia y persistencia de los genotipos en el tiempo. El estudio de patógenos multigenotipo es de importancia no sólo para evaluar programas de vacunación sino también para extrapolar el comportamiento de los mismo a través del tiempo a sistemas otros de control de patógenos menos establecidos.

Hipótesis

Los rotavirus cambian sus propiedades antigénicas y biológicas periódicamente para persistir en poblaciones humanas.

Objetivo

Analizar la relación entre la composición genética y la predominancia de las cepas de rotavirus circulantes en Paraguay detectadas de 1998-2009.

Objetivos particulares

1. Analizar la filogenia de los 11 genes de las cepas de rotavirus predominantes y minoritarias de los años 1998 a 2009.
2. Determinar si los cambios detectados en el genoma producen cambios en la composición aminoacídica de las proteínas de las cepas analizadas.

Capítulo 1

Epidemiología molecular de las cepas de rotavirus circulantes en Asunción, Paraguay de 1998 a 2009.

Antecedentes

A partir de la era genómica, la clasificación de los rotavirus se basó en un sistema binario basado en la secuencia de los genes que codifican a VP7 (genotipo G) y VP4 (genotipo P), mediante transcripción reversa del ARN seguido de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (57, 58).

Los rotavirus circulantes en la población infantil y adulta de Paraguay, principalmente en Asunción y área metropolitana, han sido genotipificados anualmente desde 1998 hasta 2009 por RT-PCR y secuenciación parcial de los genes VP7 y VP4 (29, 30, 59). En un plazo de tiempo de 11 años se vio que los 5 genotipos predominantes a nivel mundial fueron detectados en diferentes porcentajes, llegando varios de ellos a ser el mayoritario al menos en una de las temporadas en la población analizada (Figura 9).

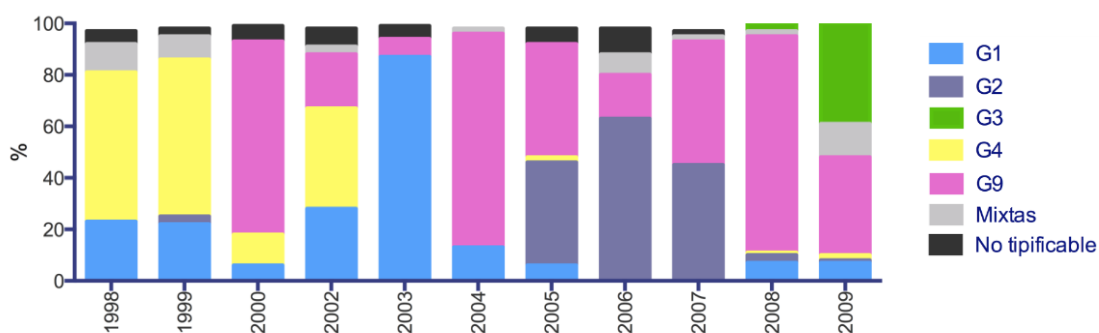


Figura 9. Cambios en la predominancia anual de genotipos G de rotavirus en Gran Asunción. Se muestran genotipos de rotavirus (%) detectados por RT-PCR en muestras rotavirus positivas analizadas entre 1998 y 2009.

Entre las muestras no tipificables por RT-PCR, fue posible detectar por secuenciación parcial de los genes VP7 y VP4, los genotipos atípicos G12P[9] y G3P[9], en los años 2006 a 2009 (30, 59).

Estos resultados nos permiten analizar los mecanismos por los que los rotavirus pudieran incrementar la variabilidad de sus constelaciones génicas y así permitir que los rotavirus circulen continuamente a lo largo del tiempo en una región geográfica delimitada. Para poder estudiar la dinámica secuenciaron los genomas de 113 rotavirus abarcando todos los genotipos identificados previamente.

Metodología

Extracción de ARN viral

El ARN de doble cadena (ARNdc) viral de 114 muestras rotavirus positivas, almacenadas a -20°C en el archivo de muestras de materia fecal del LBMB/IICS/UNA, fue extraído mediante el método sílica/tiocianato de guanidina (60) a partir de una solución fecal en PBS al 10%. Brevemente, la solución es sometida a un buffer de lisis TRIS/EDTA que contiene Tritón-x10 (Sigma, MO, USA), y tiocianato de guanidina (Invitrogen, CA, USA) permiten *i.* desnaturalizar las proteínas *ii.* que los ácidos nucleicos (AN) liberados no sean degradados por nucleasas y *iii.* puedan unirse electrostáticamente al dióxido de sílice (Sigma, MO, USA). El pellet sílica/AN fue lavado con etanol 80% y acetona (Biopack, ARG) y posteriormente el AN eluído con con agua ultrapura.

Control de calidad del ARN extraído

La integridad del ARN a ser secuenciado fue verificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (61) y RT-PCR del gen NSP5 (30).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

La separación de los fragmentos de ARN se realizó en geles de acrilamida-bisacrilamida al 7,5%, con un gel concentrador al 4,5%. La electroforesis se realizó por 1 hora a 10W constantes. El gel fue teñido con nitrato de plata al 0,1% (62).

RT-PCR del gen NSP5

En el caso de muestras donde se visualizó ARN genómico con baja intensidad, se realizó RT-PCR del gen NSP5 de rotavirus. Se realizó transcripción reversa del ARNdc, utilizando 50 ng de cebadores randómicos hexaméricos y 200U de transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen, CA, USA). El gen NSP5 fue amplificado según protocolo previamente descrito (30). Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Secuenciación de genomas

El ARN de las 113/114 muestras que cumplieron con los criterios de calidad (visualización del ARNdc por PAGE o amplificación positiva del gen NSP5); fue enviado bajo cadena de frío al J. Craig Venter Institute (Rockville, MD, USA) para la secuenciación completa de todos los genes del genoma de rotavirus utilizando Next Generation Sequencing.

Preparación de la librería

Se obtuvieron amplicones con primers que anillan de manera específica en los extremos 5' y 3' de cada gen utilizando el kit One-Step RT-PCR de Qiagen (Qiagen, Valencia, USA). El programa de ciclado consistió en 30 minutos de transcripción reversa y 50 ciclos de amplificación (94°C 10 segundos, 55°C 1 minuto, 68°C 3 minutos) más una extensión final de 10 minutos. Los amplicones fueron analizados en geles de agarosa y tratados con fosfatasa alcalina (Shrimp alkaline phosphatase Affymetrix, Cleveland, USA) y Exonucleasa I (Affymetrix). Los amplicones fueron cuantificados con SYBR® Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) y agrupados. Cada grupo fue sometido a cortes enzimáticos por 15 minutos y luego ligados a adaptadores (con código de barras) compatibles con el sistema Ion Torrent, utilizando el kit Ion Express Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific). La librería creada contenía fragmentos de 200 pares de bases (pb) que fueron repartidos

en *pools* con volúmenes equivalentes y purificados con Agencourt Ampure XP Reagent (Beckman Coulter, Inc, Brea, USA). Para calcular el factor de dilución a ser utilizado, los *pools* fueron cuantificados con PCR cuantitativa.

Enriquecimiento de la librería y secuenciación

Cada pool fue diluido apropiadamente y amplificado por PCR en emulsión con Ion Sphere Particles (ISPs) en el instrumento Ion One Touch 2 (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente las emulsiones se rompieron y fueron lavadas y las ISPs positivas fueron enriquecidas en el Ion One Touch ES instrument (Thermo Fisher Scientific). La secuenciación fue llevada a cabo en el secuenciador Ion Torrent PGM utilizando el Ion 316 Chip kit (Thermo Fisher Scientific).

Procesamiento de secuencias de los fragmentos cortos (reads) obtenidos

Los *reads* obtenidos fueron ordenados según su código de barras, y ensamblados *de novo* utilizando el programa *clc_novo_assemble* (CLC Bio, Boston, USA) y los ensamblados (*contigs*) fueron comparados con bases de datos de secuencias completas de cada segmento génico de rotavirus. Todos los reads fueron mapeados según la cepa de referencia con mayor similitud utilizando el programa *clc_ref_assemble_long* (CLC Bio, Boston, USA). Las regiones incompletas y bases ambiguas fueron resueltas por secuenciación convencional (Sanger).

Construcción de matrices e identificación de constelaciones génicas de rotavirus

Las secuencias obtenidas en cada muestra, identificadas como genes de rotavirus, fueron descargadas en un archivo *fasta*. Cada archivo *fasta* fue procesado utilizando el programa BioEdit v7.2.5 (63). Se crearon archivos de los 11 genes de cada cepa. Además se crearon matrices de cada gen de cepas de referencia de todos los genotipos, depositadas en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cada genotipo fue identificado utilizando las herramientas en línea *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (64) y *RotaC* (65). Al montar las matrices en todos los casos se utilizó la nomenclatura recomendada para las cepas de rotavirus (66). Para comprobar los genotipos identificados con las herramientas web, se alinearon las secuencias de las matrices de cada gen utilizando el algoritmo *ClustalX* con el programa v7.2.5. Los árboles fueron contruidos sin raíz, con el programa MEGA v6 utilizando el método *Neighbor-Joining*, *Kimura-2-Parameter* como modelo de sustitución de nucleótidos y como prueba estadística se utilizó el método *bootstrap* (1000 réplicas).

Resolución de discrepancias

Las cepas en las cuales el genotipo G y/o P (VP7 y VP4 respectivamente) no coincidió con la caracterización previa por RT-PCR, fueron resueltas repitiendo la genotipificación por PCR y secuenciando los amplicones. Los amplicones

fueron extraídos a partir de geles de agarosa al 0,7%, y purificados con el kit PureLink Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) según instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron enviados a Macrogen Inc, Korea, donde fueron secuenciados por secuenciación convencional. Las secuencias resultantes fueron editadas manualmente según el cromatograma obtenido.

Resultados

Control de calidad de ARN genómico de rotavirus extraídos a partir de muestras fecales

De las 114 muestras extraídas, 113 fueron fuertemente positivas por PAGE o por RT-PCR del gen NSP5 de rotavirus. Los ARN de las muestras seleccionadas fueron secuenciados (Figura 10).

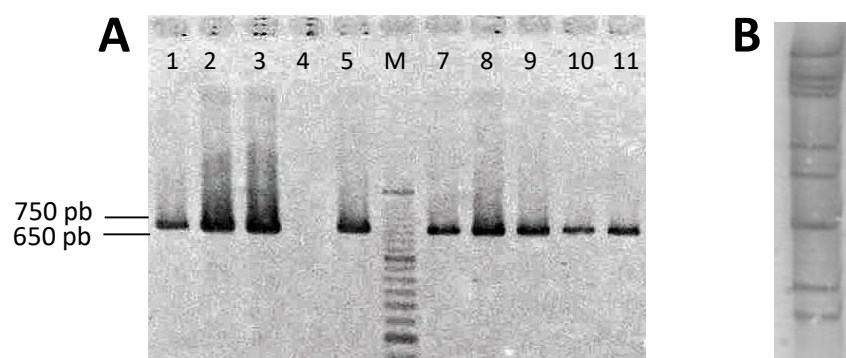


Figura 10. Control de calidad del ARN genómico de rotavirus. (A) RT-PCR del gen NSP5. Carril 4 control negativo, M marcador de peso molecular (B) PAGE de ARN segmentado.

Secuenciación del genoma de rotavirus

Se obtuvo lecturas correspondientes a genes de rotavirus en 105/113 secuenciadas. El número de muestras secuenciadas por año por genotipo se muestra en la figura 11

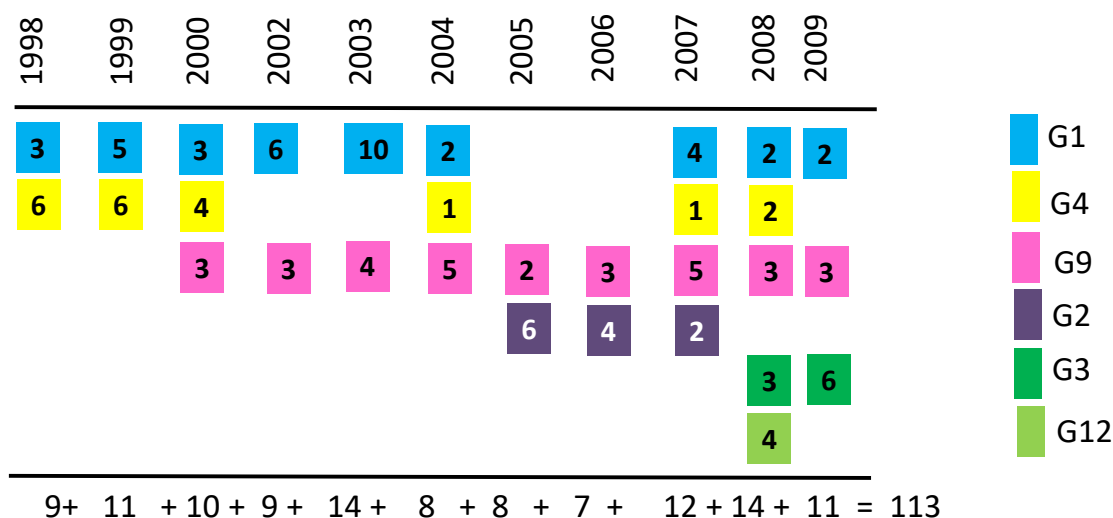


Figura 11. Muestras rotavirus secuenciadas. En la fila superior se observa el año de colecta, los cuadros corresponden al número/genotipo G de muestras secuenciadas. En la fila inferior se indica el total de muestras por año.

Constelaciones génicas

Para definir una constelación génica, nos basamos en los genogrupos predominantes definidos: genogrupo 1 (Wa-like), genogrupo 2 (*DS-1-like*) y genogrupo 3 (*AU-1-like*). Luego de analizar cada cepa (105) gen por gen, el total de las constelaciones génicas diferentes encontradas fue 11 (Figura 12).

Se detectaron 28 muestras mixtas, conteniendo hasta 3 alelos de un mismo

gen. Cuando la muestra contenía alelos del mismo genotipo, por ejemplo:

RVA/Human-wt/PRY/407/1999/G4G1P[8]

G1G4P[8]P[8]-I1-R1-C1-C1-M1-M1-A1-N1-N1-T1-E1-E1-H1-H1

Constelación											Total
VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	
G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	22
G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	14
G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	35
G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	15
G3	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	4
G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H6	5
G12	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H6	5
G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	1
G9	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	1
G9	P[4]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	1
G4	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H6	2

Figura 12. Constelaciones génicas detectadas. Se muestran los genotipos de cada gen en las constelaciones detectadas. En la columna de la derecha se observa el número encontrado para cada constelación.

Las constelaciones se resolvieron mediante filogenia y se contabilizaron ambos genotipos. En los casos en que no fue posible establecer al menos una constelación, esta muestra no fue contabilizada en la tabla de constelaciones, pero los genes fueron analizados individualmente dentro del genotipo al que pertenecen. El Anexo 1 contiene el listado de muestras y genes detectados en cada una. Todas las secuencias fueron depositadas en el GenBank. Los códigos de acceso asignados a cada gen, se encuentran en el Anexo 2.

Resolución de discrepancias

Las discrepancias entre la genotipificación por RT-PCR y la secuenciación

NGS, se resolvió secuenciando por el método de Sanger el gen VP7. Los resultados se describen en la Figura 13. De acuerdo a lo obtenido con secuenciación del gen VP/ por el método Sanger, las muestras fueron consideradas mixtas y la constelación fue definida filogenéticamente.

Muestra	RT-PCR	NGS	VP7 Sanger
1702SR	G3P[9]	G1 P[9] I3-R3-C3 M3-A3- N3-T -E3-H6	G3
1256A	G3P[9]	G4 P[9] I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H6	G3
1257A	G3P[9]	G1 P[9] I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H6	G3
1747SR	G3P[8]	G1 P[8] I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1	G3
1727SR	G3P[8]	G12 P[8] I1, I3- R1, R3- C1, C3- M1-A1-N1-N3-T1,T3-E1-H1, H6	G3
533SR	G1P[9]	G9 P[8] I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1	G1
3SR	G1P[9]	G9 P[8] I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1	G1

Figura 13. Resolución de discrepancias en el gen VP7. Se observa el nombre de archivo de la cela, resultado original de genotipificación, constelación obtenida por NGS y el resultado de la secuenciación Sanger del gen VP7.

Discusión

Los virus analizados, en su amplia mayoría forman parte del genogrupo 1 76/105 (72%) comúnmente llamado “*Wa-like*”. Este genogrupo incluye a G1, G9 y G4 en combinación con P[8] acompañados por una constelación I1 R1 C1 M1 A1 N1 T1 E1 H1. Con datos obtenidos mediante secuenciación masiva de bancos de muestras de rotavirus circulantes durante décadas alrededor del mundo, se pudo comprobar que la vasta mayoría de los genes de los virus predominantes mantienen de manera consistente estas combinaciones. El genotipo que circuló con mayor prevalencia a través del tiempo en Asunción fue G9P[8] y la primera detección en nuestro país en la década de los 90 coincide con su emergencia a nivel mundial (67-69). El genotipo G1P[8] ha sido

reportado como el de mayor prevalencia alrededor del mundo (25, 70), sin embargo en este análisis pudimos ver que circuló a baja frecuencia en 8 de los 11 años analizados y sólo en una ocasión predominó por sobre otros genotipos. Los genotipos de rotavirus tienden a circular de forma cíclica, en espacios de 3 a 7 años (52, 70) y podría esperarse su incremento luego de haber predominado en el 2003, sin embargo, debemos tener en cuenta que la vacuna monovalente Rotarix™ empezó a distribuirse de manera privada a partir del 2008 y la protección homotípica pudo haber incidido en la propagación de este genotipo.

La constelación *DS-1-like* I2 R2 C2 M2 A2 N2 T2 E2 H2 se presenta en la población humana en combinación con G2P[4] y generalmente su circulación es cíclica. Luego de la introducción de la vacuna en 2006, algunos países reportaron un aumento en la circulación de este genogrupo (71-73), sin embargo todavía queda por elucidar si el aumento pudo haberse debido a la fluctuación natural de la cepa, ya que ese aumento se vio también en países donde no estaba disponible la vacuna, como fue el caso de Paraguay. El otro genogrupo encontrado con relativa frecuencia en circulación en humanos, es el *AU-1-like* I3 R3 C3 M3 A3 N3 T3 E3 H3, relacionado a un origen felino (30, 74, 75). En nuestro laboratorio fue detectado por primera vez en 2006 el genotipo G12P[9], sin embargo en este estudio hemos encontrado que la constelación G12P[9] I3 R3 C3 M3 A3 N3 T3 E3 H6 ya circulaba de forma esporádica en nuestro país en el 2003. Posteriormente, se detectó la circulación del genotipo G3 en dos cepas diferentes, una G3P[8] I1 R1 C1 M1 A1 N1 T1 E1 H1 *Wa-*

like, y una G3P[9] I3 R3 C3 M3 A3 N3 T3 E3 H6 del tipo *AU-1-like*. Entre los genomas identificados pudimos observar dos cepas que presentaron una constelación recombinante intergenogrupo: G9P[4] I1 R1 C1 M1 A1 N1 T1 E1 H1 y G9P[4] I2 R2 C2 M2 A2 N2 T2 E2 H2. Cepas G9P[4] con constelación de genogrupo 2 fueron reportadas en diferentes países pero a diferencia de la cepa paraguaya, la NSP4 de las emergentes alrededor del mundo tenía el genotipo E6 (76, 77). Sin embargo, dado el alto número de muestras con infecciones mixtas detectadas, 28 en total, podría tratarse de muestras mixtas en las que no se lograron amplificar y secuenciar todos los genes presentes en las mismas. Cada constelación detectada será discutida en detalle en los capítulos siguientes. La fluctuación de la distribución de genotipos de rotavirus de manera geográfica y temporal ha sido ampliamente descrita (6), sin embargo el mecanismo detrás de esta fluctuación de genotipos no está completamente dilucidado.

Capítulo 2

Constelación genómica de los genotipos G1P[8] y G4P[8].

Antecedentes

Los rotavirus G1P[8] son los responsables de la mayoría de las infecciones en humanos alrededor del mundo, aunque variaciones geográficas y temporales en su incidencia son comunes(78). Debido a ello, una de las vacunas disponibles desde el 2006 se basa en una cepa atenuada de rotavirus G1P[8]; Rotarix[™] y se espera que además de la protección homotípica contra esta cepa prevalente, la vacuna sea capaz de conferir inmunidad heterotípica contra los demás genotipos de rotavirus. En nuestro país, la vacuna Rotarix[™] estuvo disponible desde el 2008 pero se introdujo al programa de vacunación nacional a partir del 2010.

Entre 1998 y 2003 hemos detectado en Asunción la co-circulación de los genotipos G4P[8] y G1P[8]. G4 predominó en 1998 y 1999 pero luego de 2002 su circulación declinó casi por completo, detectándose sólo casos esporádicos. Por otro lado, G1P[8] convivió con G4 de 1998 hasta el 2002, hasta que en el 2003 G1 causa de la mayoría de las infecciones correspondientes a rotavirus., el genotipo G1 siguió circulando hasta el 2009 con una frecuencia muy baja.

En este capítulo, analizamos variabilidad de los genes que conforman los genomas de estos dos genotipos co-circulantes y comparamos la fluctuación

de variantes en relación a los cambios en la predominancia a través de los periodos epidémicos.

Metodología

Se alineó la secuencia parcial y/o completa (al menos 85%) de los genes VP7 y VP4 con genes de cepas de linajes conocidos y previamente reportados (23, 29, 79-81), utilizando el programa *BioEdit* v7.2.5 (63). Para analizar la variabilidad intragenotípica, se construyeron árboles filogenéticos a partir de alineamientos de la región codificante (al menos 85%) de cada uno de los 9 genes de las cepas G1P[8] y G4P[8]. La reconstrucción de los árboles se realizó con el programa MEGA v6 (82). Se utilizó el algoritmo Neighbor-joining y el modelo de sustitución Kimura-2-parameter con distribución gamma. Como soporte estadístico, se implementó el método *bootstrap* (1000 réplicas).

Resultados

Distribución de linajes de los genes VP7 y VP4 de los genotipos G1, G4 y P[8]

En la Figura 14 se observa que las VP7 de las G1 circulantes entre 1998 y 2003 se distribuyen en los linajes I y II, mientras que las detectadas a partir del 2008 pertenecen al linaje I solamente. Las cepas del 2008-2009 agrupan de modo cercano con las G1 del linaje I de fines de los años noventa en nuestro país así como con cepas que circularon en el mismo periodo alrededor del

mundo. Dentro del linaje II se pueden observar dos sub-linajes definidos: II-a y el II-b el cual circuló en la temporada donde se observa el aumento en la prevalencia del genotipo G1 (Figura 9) (29).

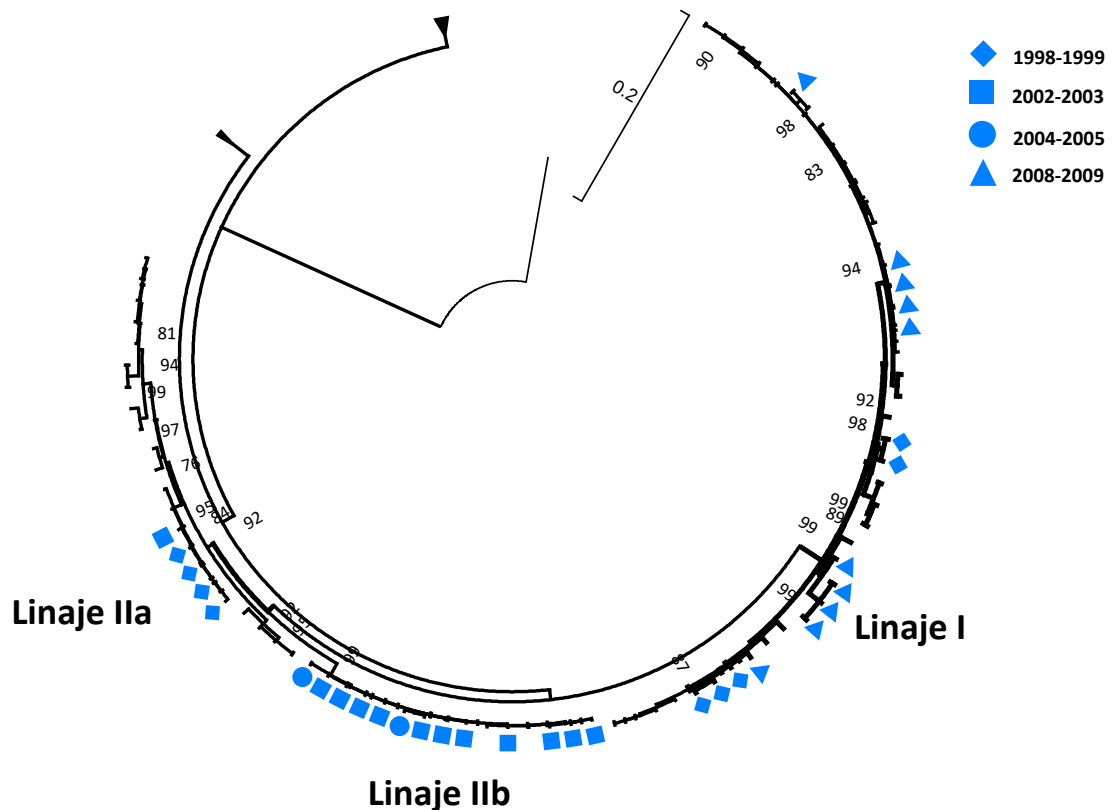


Figura 14. Árbol filogenético de la secuencia de nucleótidos del gen VP7 de genotipo G1. Los marcadores indican el año de circulación. Los linajes se indican en números romanos. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 75%. La tasa de sustituciones por base (distancia) en cada rama se muestra según escala.

Dentro del linaje I se encontraron 5 sub-grupos de alelos de VP7 entre las cepas circulantes: i. la 1747SR del 2009 formó un clúster con una cepa de Brasil del 2007 y otras cepas de Asia circulantes años más tarde (2012-2014). La misma presentó dos cambios antigénicos respecto a las demás cepas

paraguayas del linaje I; 94S-N y 148F-L (Figura 15). ii. La VP7 de las cepas 1670SR, 1679SR y 1692SR del 2008 se agrupan con cepas pre-vacunales descritas en Bélgica (83), iii. Dos cepas paraguayas de 1999: 371 y 419, siendo las más cercanas las cepas de Kenia del 2009, iv. 4 cepas del 2009, 1259A, 1701SR, 1702SR, 1755SR formaron un clúster con una cepa de Japón del 2014, v. 1638SR del 2008 junto con las cepas 55 y 56 de 1998 conformaron un clúster con una distribución geográfico-temporal bastante amplia.

Las G1 linaje I modernas (2008-2009) presentan los mismos epítopes que las de 1998/1999 (Figura 15). En este linaje se observan 3 substituciones respecto a la VP7-G1 de la vacuna Rotarix™: 94 N-S; 291 K-R en la región 7-1a y 217 M-T en la región 7-2. Las características antigénicas de la VP7 de las cepas del linaje IIa son idénticas a las de Rotarix™ mientras que el linaje IIb presenta un cambio en el sitio 148 N-S. Las G4P[8] paraguayas corresponden a los años 1998-2003, además de la G4P[9] del 2009 (1815SR) y la G4P[6] (1809SR). En la Figura 16 se observa que todas las G4 (excepto 1809SR) se agrupan dentro de linaje I. Todas (menos la 954SR) forman un mismo clado, junto con G4 circulantes en Argentina, Uruguay y Brasil en el mismo periodo de tiempo, lo que hace suponer que esta variante circuló ampliamente por la región en esos años. La cepa 954SR agrupó con rotavirus detectados en Argentina a finales de los años 90. Además dentro de ese clúster se encuentran cepas con más de diez años de diferencia, por lo que esta cepa podría ser precursora de las G4 que circularon del año 2000 en adelante alrededor del mundo (84, 85).

Región antígenica																															
7-1a																7-2								7-1b							
87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	143	145	146	147	148	190	217	221	264	201	211	212	213	238	242			
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq-W179-9/1992/G1P[5]																															
T	T	N	G	D	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	K	D	Q	S	L	S	M	N	G	Q	N	V	D	N	T			
RVA/Vaccine/USA/Rotariix/1988/G1P[8]																															
T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	K	D	Q	S	L	S	M	N	G	Q	N	V	D	N	T			
RVA/Human-wt/PRY/1638SR/2008/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/1670SR/2008/G1P[8]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/1692SR/2008/G1P[8]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/1679SR/2008/G1P[8]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/1701SR/2009/G1G3P[9]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/1702SRa/2009/G1G3P[9]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/1747SRa/2009/G1G3P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	F	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/1755SR/2009/G1P[8]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/1257A/2009/G1G3P[9]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/1679SR/2008/G1P[8]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/55/1998/G1P[8]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/56/1998/G1.G9P[8]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/371/1999/G1P[8]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/Py99419/1999/G1P[8]																															
.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	R	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/365/1999/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/404/1999/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/407/1999/G4.G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/412/1999/G1.G4P[4]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/124SR/2003/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/53SR/2002/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/139SR/2003/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/286SR/2003/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/324SR/2003/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/325SR/2003/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/326IPN/2003/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/334SR/2003/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/455SR/2004/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/610SR/2004/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/836SR/2005/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/Py02SR43/2002/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
RVA/Human-wt/PRY/Py03SR6Ad/2003/G1P[8]																															
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			

Figura 15. Cambios aminoacídicos en regiones antígenicas del gen VP7 G1. Las cepas corresponden a linajes de G1 circulantes de 1998 al 2009 en Asunción. Las regiones antígenicas se indican en la fila superior, en colores. Linajes y sublinajes se indican al costado de los nombres.

Una de las cepas G4 paraguayas (1809SR) agrupó en el linaje VII junto con cepas de origen animal y humanas de origen animal (Figura 16).

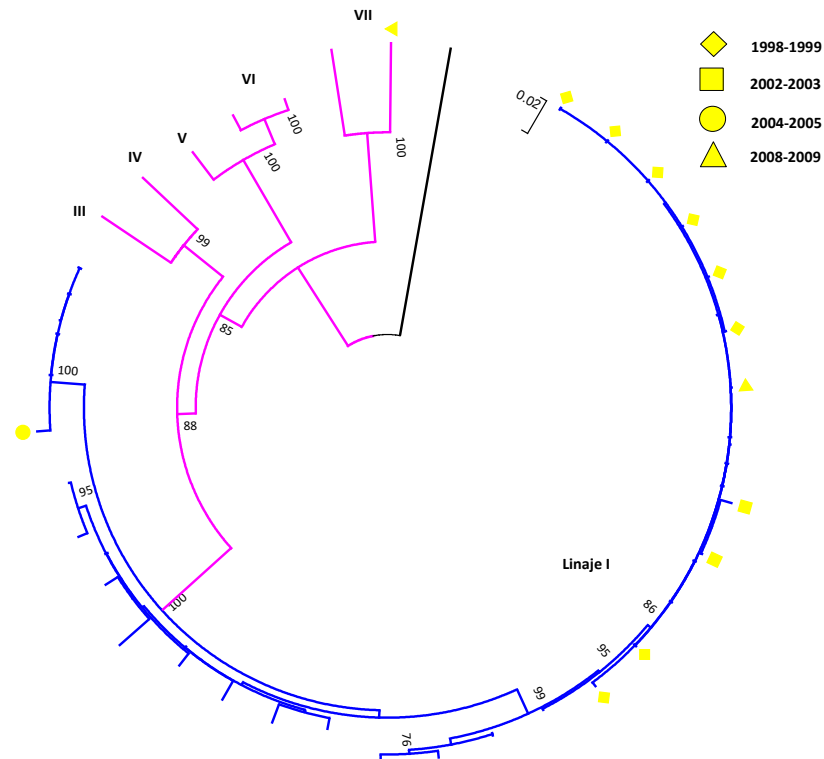


Figura 16. Árbol filogenético de la secuencia nucleótidos del gen VP7 de genotipo G4. Las cepas paraguayas se marcan en amarillo. Los marcadores indican el año de circulación. Se muestran valores de *bootstrap* mayores a 75%. La tasa de sustituciones en cada rama se muestra según escala. Los números romanos indican linajes de G4. Las ramas azules indican linajes humanos, las ramas rosadas indican linajes animales

Anteriormente se había reportado la circulación de un nuevo sub-linaje del linaje I, que presentaba una inserción de una asparragina en el sitio 76 (86). Al alinear la secuencia de aminoácidos se observó que todas presentaban la inserción, excepto 954SR que diverge de las otras cepas paraguayas y 1809SR que agrupa en un linaje animal (Figura 17).

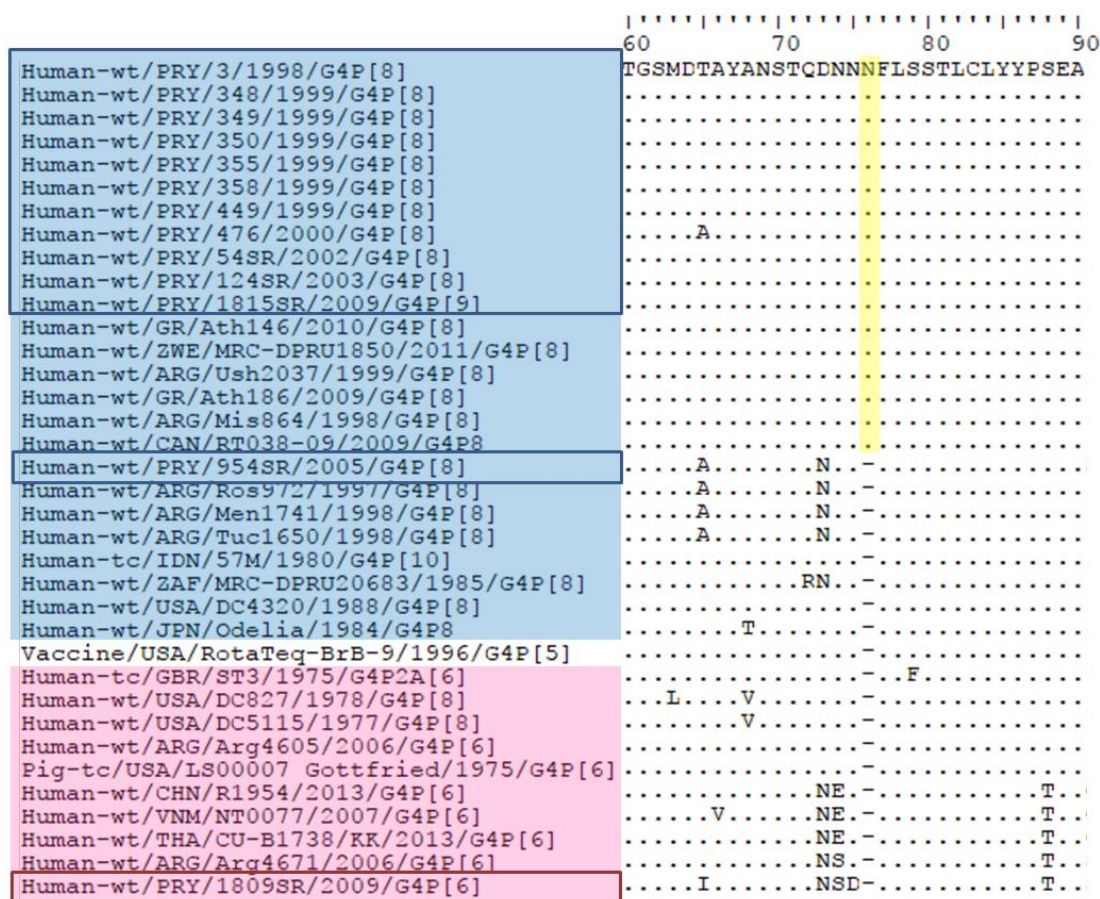


Figura 17. Inserción Asp76 en el gen VP7 de cepas de linaje I de G4. En azul cepas de origen humano, en rosa cepas de origen animal. Las cepas paraguayas se indican en recuadros.

En la Figura 18 se muestra la filogenia del gen VP4 de cepas P[8]. Las VP4-P[8] de las G1 se distribuyen en los linajes I y III. Las cepas cuya VP7 es una G1Ib agrupan en el linaje I de P[8]. Las cepas cuya VP7 agrupa en el linaje IIa y en el linaje I, poseen una P[8] linaje III. Las P[8] de las cepas G4 pertenecen al linaje III, excepto la 54SR que agrupó dentro del linaje I. Todas las P[8] del linaje I presentan 6 cambios en sitios antigénicos respecto a las P[8] del linaje III como se puede ver en las figuras 19 y 20.

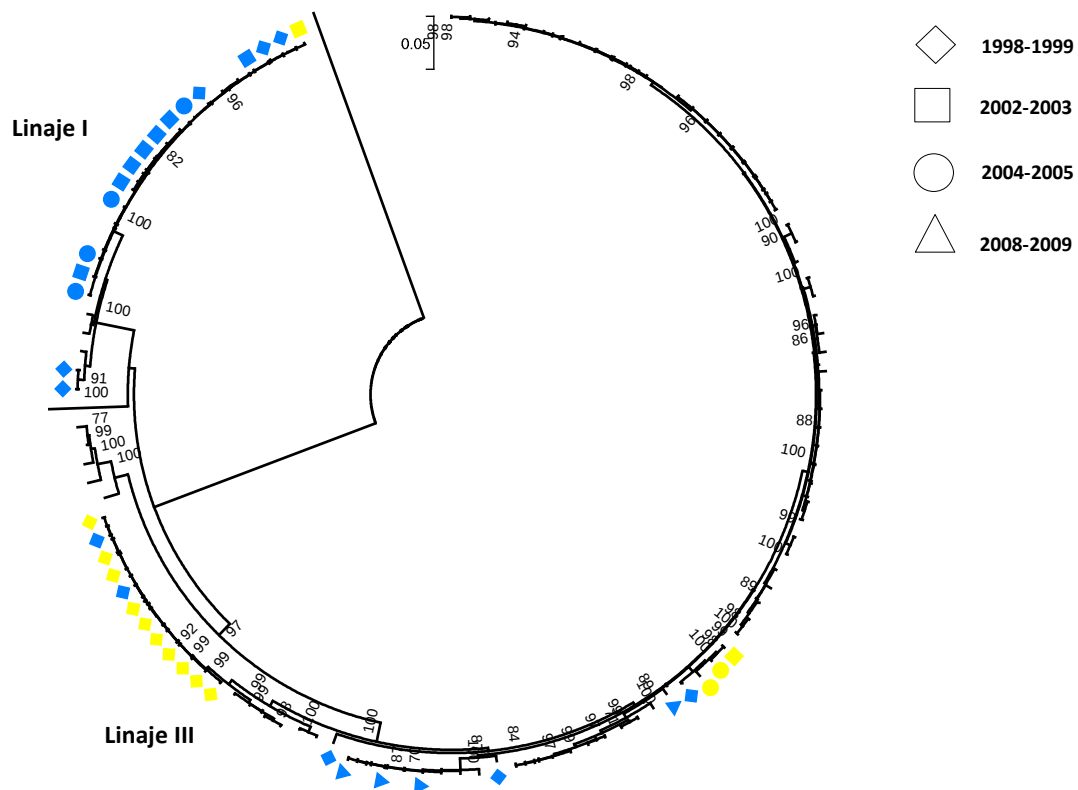


Figura 18. Árbol filogenético de la secuencia nucleótidos del gen VP4 de genotipo P[8]. Los marcadores indican el año de circulación, en celeste (G1) y amarillo (G4). Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 75% . La tasa de sustituciones en cada rama se muestra según escala.

La cepa 1809SR cuya VP7 agrupó en el linaje VII del genotipo G4, presentó un VP4 de genotipo P[6]. En la Figura 21 se observa el árbol filogenético del gen VP4 genotipo P[6]. El árbol se divide en dos grupos mayores, uno de cepas de origen humano (azul) y otro de cepas de origen animal (rosado). La cepa paraguaya se agrupa dentro del linaje I-f, junto con cepas G4P[6] Argentinas dentro del grupo de cepas derivadas de animales y proximidad es mayor a cepas porcinas que a cepas humanas derivadas de animales.

Región antigénica																												
8-1										8-2					8-3					8-5					5-4		5-2	
100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	306	459	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89	429	434
D	S	Q	E	S	T	N	L	N	N	I	R	E	T	A	N	P	V	D	S	S	N	D	N	N	T	N	L	P
RVA/Vaccine/USA/Rotarix/1988/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/59/1998/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/55/1998/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/365/1999/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/371a/1999/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/371b/1999/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/404/1999/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/535R/2002/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/3245R/2003/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/3261PN/2003/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/3255SR/2003/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/1395SR/2003/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/3345SR/2003/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/2865SR/2003/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/4555SR/2004/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/6105SR/2004/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/8365SR/2005/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/16385SR/2008/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/16705SR/2008/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/16925SR/2008/G1P8																												
RVA/Human-wt/PRY/16795SR/2008/G1P8																												

Figura 19. Cambios aminoacídicos en sitios antígenicos de la proteína VP4 de cepas de genotipo G1P[8] de rotavirus.
Las regiones antigénicas se indican en los recuadros de color.

		Región Antigenica																																	
		8-1										8-2										8-3					8-5					5-4		5-2	
		100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	306	459	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89	429	434					
RVA/Vaccine/USA/Rotarix/1988/G1P[8]	D	S	Q	E	S	T	N	L	N	N	I	R	E	T	A	N	P	V	D	S	S	S	N	D	N	N	T	N	L	P					
RVA/Human-wt/PRY/88/1998/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	D	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/3/1998/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	D	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/348/1999/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	D	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/349/1999/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	D	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/350/1999/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	D	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/355/1999/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	D	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/358/1999/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	D	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/449/1999/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	D	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/476/2000/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	D	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/124SR/2003/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	D	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/954SR/2005/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	D	*	*	N	R	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*		
RVA/Human-wt/PRY/54SR/2002/G4P8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

Linea III

Lin I

Figura 20. Cambios aminoacídicos en sitios antígenicos de la proteína VP4 de cepas de genotipo G4P[8] de rotavirus.
Las regiones antígenicas se indican en los recuadros de color.

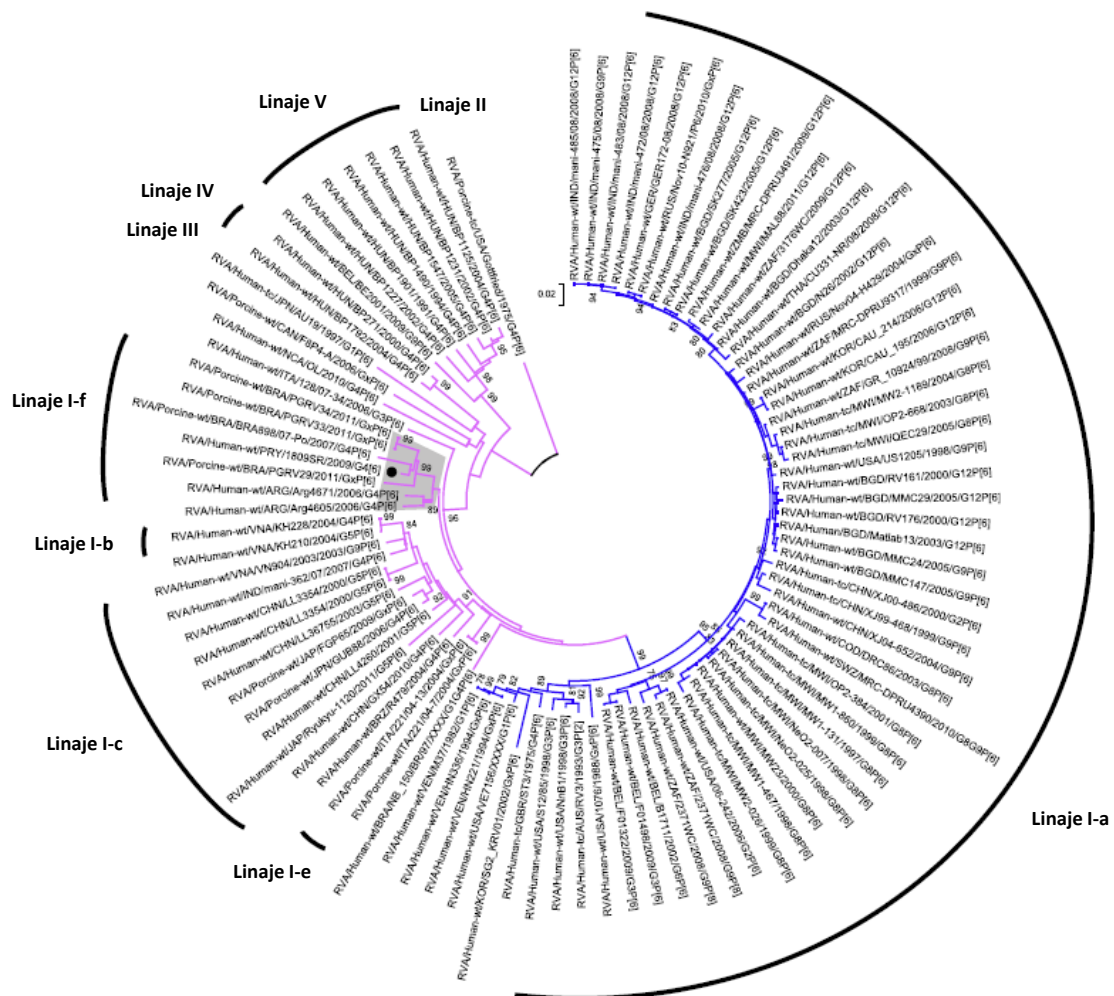


Figura 21. Árbol filogenético de nucleótidos del gen VP4 genotipo P[6]. La cepa paraguaya G4P[6] se indica con un círculo negro. Las ramas azules corresponden a cepas de origen humano. Las ramas rosadas a cepas animales o humanas de origen animal. Los linajes de P[6] son indicados con número romano.

Variación intragenotípica de los alelos que conforman las cepas paraguayas G1P[8] y G4P[8]



Figura 22. Árbol filogenético de la región codificante de los genes estructurales de todas las cepas paraguayas genogrupo 1 (Wa-like). Los marcadores indican el año de circulación de la cepa: rombo 1998-1999; cuadrado 2002-2003; círculo 2004-2005 y triángulo 2008-2009. Cepas G1 en celeste, cepas G4 en amarillo. Las ramas colapsadas corresponden a genotipos G3 (verde) y G9 (fucsia). Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 75%.



Figura 23. Árbol filogenético de la región codificante de los genes estructurales de todas las cepas paraguayas genogrupo 1 (Wa-like). Los marcadores indican el año de circulación de la cepa: rombo 1998-1999; cuadrado 2002-2003; círculo 2004-2005 y triángulo 2008-2009. Cepas G1 en celeste, cepas G4 en amarillo. Las ramas colapsadas corresponden a genotipos G3 (verde) y G9 (fucsia). Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 75%

En las figuras 22 y 23 se observa las asociaciones filogenéticas de los genes estructurales y no estructurales de constelaciones de cepas paraguayas de genogrupo I (Wa-like). Se observan los genes de cepas G1P[8] G4P[8]. Las cepas G9P[8] (fucsia) y G3P[8] (verde) que forman grupos definidos se encuentran colapsadas. En primer lugar, es posible observar que en su mayoría, las cepas G1 y G4 forman un grupo separado de las cepas G9 y G3 en los árboles de todos los genes, estructurales y no estructurales (con excepción de una cepa donde la VP2 y la NSP1 agruparon en el cluster de G9 y la NSP4 en el cluster G3). Sin embargo, los genes de las cepas G1 linaje I y linaje IIa pueden formar junto con cepas G4 clusters comunes entre ellas. Llamativamente fue posible observar que todos los genes las cepas G1-IIb P[8]-I (cuadros zules) que aparecieron en el 2002 y fueron las predominantes en el 2003, forman clusters donde se sólo agrupan entre ellas, junto con cepas G1 que circularon esporádicamente en 2004 y 2005 (círculos azules). Fue posible observar que una de las cepas G4: 54SR del 2002 (que fue la única G4 cuya VP4 agrupó dentro del linaje I de P[8]) posee genes que agruparon dentro este mismo cluster, con excepción de NSP4 y NSP1, que se agrupan con G9 de 1998 al 2002, pudiendo tratarse de una cepa reordenante.

La muestra G4P[6] presentó una constelación I1-R1-C1-M1-A8-N1-T7-E1-H1. Los genes VP6, VP1, VP2, VP3 NSP2, NSP4 y NSP5 se clasificaron como genotipo 1, asociados estrechamente con cepas detectadas en porcinos o humanas derivadas de porcinos. El gen NSP1 fue identificado con A8 y NSP3 como T7, ambos agrupados con cepas porcinas (Fig 24).



Figura 24. Árboles filogenéticos de genes estructurales y no estructurales de la cepa G4P[6] 1809SR. Las ramas azules corresponden a genes de origen humano. Y las rosadas a genes de origen animal o humano derivado de animal. El genotipos se indica con los corchetes. La distancia genética se graficó según escala.

En la Figura 25 se observa que los genes de 1809SR poseen una alta identidad con cepas de porcinos o humanas de origen porcino. La identidad mas alta en todo el genoma se dio con una cepa de Argentina (rango de valor para todos los genes 92.8–98.1%). Esta cepa fue detectada en humanos que convivían de manera cercana con porcinos (87) lo que sigiere una alta probabilidad de transmisión interespecie directa.

		RVA/Human-wt/PRY/1809SR/2009/G4P[6]								
		VP1	VP2	VP3	VP6	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Cepas de origen Humano	RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P[8]	87.2	86.9	90.1	90.7	78.6	87.4	81.8	89.9	93.9
	RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P[4]	78.2	76.9	79.0	80.7	74.8	82.1	74.6	80.7	81.6
	RVA/Human-tc/GBR/ST3/1975/G4P[6]	86.9	87.6	90.3	91.8	77.8	88.0	82.2	89.3	93.2
	RVA/Human-wt/USA/DC2241/1977/G4P[8]	87.0	86.4	90.8	91.2	78.7	92.1	82.7	90.3	93.9
	RVA/Human-wt/USA/DC4320/1988/G4P[8]	87.0	90.9	90.3	92.4	77.4	87.8	81.1	89.1	94.2
	RVA/Human-wt/USA/DC4608/1980/G4P[8]	85.7	92.1	90.9	92.6	78.1	87.7	81.4	90.1	94.2
	RVA/Human-wt/ARG/Arg6627/2009/G12P[8]	86.9	86.2	90.1	90.9	78.8	87.7	81.1	89.5	93.2
	RVA/Human-wt/ARG/Arg6653/2009/G12P[8]	86.7	86.2	90.1	90.9	78.7	87.8	81.5	87.9	93.5
	RVA/Human-wt/ARG/Arg7500/2009/G12P[8]	87.0	86.2	90.1	90.9	78.7	87.8	81.5	87.7	93.7
Cepas de origen Porcino	RVA/Pig-tc/VEN/A131/1988/G3P[7]	83.3	76.9	89.4	78.8	76.1	86.0	77.2	85.5	86.4
	RVA/Pig-tc/USA/Gottfried/1983/G4P[6]	86.4	90.7	91.4	89.8	92.4	93.0	81.9	88.9	93.9
	RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P[7]	86.7	91.9	93.3	78.8	78.9	91.9	80.9	90.7	93.2
	RVA/Pig-tc/MEX/YM/1983/G11P[7]	86.0	91.6	91.6	81.0	88.0	94.9	81.0	96.6	93.7
	RVA/Pig-tc/VEN/A253/1988/G11P[7]	82.6	78.0	89.6	80.2	76.9	88.6	78.7	88.5	89.1
Cepas de origen porcino detectadas en humanos	RVA/Pig-wt/IND/RU172/2002/G12P[7]	87.0	90.7	88.9	80.7	78.4	86.0	82.6	91.1	94.4
	RVA/Human-wt/IND/mani-253/2007/G4P[4]	86.2	85.7	79.2	94.6	89.5	87.8	81.9	90.3	95.6
	RVA/Human-wt/IND/mani-362/2007/G4P[6]	85.1	86.2	87.9	95.5	90.2	88.3	81.8	90.7	94.7
	RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6]	88.6	93.0	97.5	93.2	93.6	90.8	92.8	90.3	94.7
	RVA/Human-wt/ARG/Arg4671/2006/G4P[6]	97.2	92.1	91.6	94.3	92.1	91.2	83.4	89.9	98.1
	RVA/Human-tc/CHN/R479/2004/G4P[6]	86.9	87.3	87.9	81.0	78.4	86.0	90.4	91.8	94.7
	RVA/Human-wt/BRA/HSP180/1999/G4P[6]	86.9	89.8	95.5	92.6	82.5	90.6	92.1	90.1	98.1
	RVA/Human-wt/BEL/BE2001/2009/G9P[6]	86.4	91.0	92.1	80.5	91.3	93.3	86.6	91.1	94.2
	RVA/Human-wt/IND/mani-97/2006/G9P[19]	85.4	86.0	87.1	82.2	89.1	87.9	81.4	89.9	95.2
	RVA/Human-wt/NPL/KTM368/2004/G11P[25]	87.3	87.6	89.1	81.3	78.3	84.7	80.7	89.3	93.5
	RVA/Human-wt/HUN/BP1901/1991/G4P[6]	87.9	92.2	90.9	91.8	79.2	91.0	87.8	92.4	95.3
	RVA/Human-wt/HUN/BP1792/2004/G4P[6]	95.2	92.3	91.4	92.5	78.1	89.0	92.2	92.0	96.1
	RVA/Human-wt/HUN/BP1547/2005/G4P[6]	87.1	91.5	88.0	83.2	83.3	92.5	92.0	92.2	95.8
	RVA/Human-wt/HUN/BP1490/1994/G4P[6]	88.6	87.7	91.4	92.6	78.1	92.6	93.9	89.0	96.5
	RVA/Human-wt/HUN/BP1231/2002/G4P[6]	87.2	90.6	90.3	92.7	79.0	87.9	83.8	92.4	95.3
	RVA/Human-wt/HUN/BP1227/2002/G4P[6]	87.3	87.7	88.2	90.0	79.3	88.5	83.5	91.9	95.6
	RVA/Human-wt/HUN/BP1125/2004/G4P[6]	87.0	92.0	88.4	92.8	92.4	88.8	92.2	90.9	95.5
	RVA/Human-wt/HUN/BP271/2000/G4P[6]	87.5	87.4	88.4	92.5	91.8	85.8	93.9	91.9	95.8
	RVA/Human-wt/CHN/GX54/2010/G4P[6]	87.6	87.1	87.4	92.0	87.8	94.3	84.1	91.1	96.5
	RVA/Human-wt/CHN/GX77/2010/G4P[6]	87.6	87.1	87.4	92.0	87.8	94.3	84.1	91.1	96.5
	RVA/Human-wt/CHN/GX78/2010/G4P[6]	87.6	87.1	87.4	92.0	87.8	94.3	84.1	91.1	96.5
	RVA/Human-wt/CHN/GX82/2010/G4P[6]	87.6	87.1	87.4	91.7	87.8	94.3	84.1	91.1	96.5

Alta  Identidad (%) Baja

Figura 25. Heatmap de genes de la cepa 1809SR vs genes de cepas de origen humano y animal. Se muestra el porcentaje de similitud (Identidad) de los genes de 1809SR respecto a los genes de otras cepas animales y humanas. Se utilizó un patrón colorimétrico para visualizar identidad alta (rosa) o baja (azul).

Discusión

Los estudios sobre la diversidad de los rotavirus se han basado primeramente en los genes que codifican las proteínas antigénicas VP7 y VP4. Debido a su naturaleza segmentada, el genoma de los rotavirus es vulnerable a la ocurrencia de eventos de reordenamiento por lo que la genotipificación de VP4

y VP7 podría no ser suficiente para obtener datos conclusivos sobre la diversidad genética de estos virus (35, 88, 89).

En este capítulo reconstruimos los árboles filogenéticos de cada uno de los genes de cepas de rotavirus G1P[8] y G4P[8]. Se analizó la distribución de linajes de los genes VP7 y VP4 de ambas cepas, y se analizó la variabilidad intragenotípica de las regiones codificantes de los alelos de genotipo 1 de este estudio, así como la composición de las constelaciones génicas de las cepas circulantes. El genotipo G1P[8] circuló en la población estudiada de 1998 a 2009. En los primeros años de estudio 1998-1999 co-circularon los linajes I y IIa. Ambos presentaron el linaje III de P[8] y alelos comunes en varios genes en su constelación génica. Si bien se detectó la presencia de variantes que mantuvieron una constelación definida, algunas variantes formaron genomas reordenantes (intragenotipo). En el 2003 se observó un pico de circulación del genotipo G1. Esta cepa que predominó presentó un sublinaje nuevo de VP7 (IIb) además de la introducción del linaje I de P[8] (VP4) siendo la primera vez que este linaje se detectó en nuestra población. El mismo presentó 6 substituciones en sitios antigénicos respecto al linaje III de P[8]. Todos los demás genes estructurales y no estructurales, formaron clusteres definidos que se separaron de las demás G1 y G4. Esto puede sugerir, que al *fitness* obtenido por virus que presentó un pico de circulación en el año 2003, no está dado solamente por los cambios antigénicos en las proteínas de superficie, sino por los cambios en los genes internos de una variante.

El genotipo G4 co-circuló con cepas G1 y perteneció a un solo linaje, que presentó una sola constelación definida. Lo interesante es que, esta constelación fue la misma que la de las G1 linaje I. Sólo una cepa de G4 presentó una constelación diferente, donde compartía genes de la constelación de las cepas G1-IIb y NSP1 y NSP4 que agrupaban con genes de cepas G9.

Luego de una pausa durante 2006 y 2007, en 2008 se vuelve a detectar el genotipo G1 y la variante detectada fue nuevamente del linaje 1 y estas variantes presentaron combinaciones de los mismos alelos previamente circulantes en esta población. Esto soporta la idea, de que genotipos de rotavirus que han estado presentes en la población humana, tuvieron tiempo suficiente de generar variantes de genes que tienden a recircular (6, 83). Estos resultados agregaron evidencia de que puede existir mayor diversidad al observar las cepas co-circulantes en un mismo año en comparación a cepas circulantes con años de diferencia, cuando vuelven a circular en una población susceptible (90, 91). Un aspecto que queda por entender, es porqué la tasa de reordenamientos o la flexibilidad de un alelo de formar parte de constelaciones de genotipos G diferentes fue mayor entre cepas G1 y G4 a diferencia de genes de la constelación de cepas G9, co-circulantes en ese mismo periodo de tiempo.

Capítulo 3

Constelación genómica y evolución molecular de las cepas de rotavirus G9P[8].

Antecedentes

Hasta el año 1995, los rotavirus con genotipos G1, G2, G3 y G4 eran reconocidos como los de mayor prevalencia en la población humana (25). Sin embargo desde mediados de la década de los 90, el genotipo G9 emergió mundialmente y actualmente es considerado uno de los más prevalentes (68). Las primeras cepas G9 datan de 1980, estos rotavirus presentaban elevado porcentaje de identidad entre sus VP7 y con genes de otras cepas pertenecientes al genogrupo 1 (I1 R1 C1 M1 A1 N1 T1 E1 H1) (92-95). Hasta la fecha, al menos 6 linajes de G9 han sido descritos, sin embargo sólo uno; el linaje III, es el responsable de la propagación mundial de este genotipo (25, 79, 96, 97). Aunque el origen de este genotipo no está resuelto, se propone como potencial reservorio a los cerdos, ya que además de la humana, la porcina es la única especie en la que fue detectado hasta la fecha, donde fue encontrado frecuentemente en combinación con P[6], P[11], P[4], o P[19] y una constelación de genes con diferentes genotipos (98-100). En Paraguay, el genotipo G9 se identificó por primera vez en muestras colectadas en el año 2000 y posteriormente fue detectado de manera continua hasta el 2009 (29, 30, 59).

Metodología

La metodología utilizada está referida en el Capítulo 2.

Resultados

Identificación de linajes de VP7-G9 y VP4-P[8]

Mediante el análisis filogenético de las cepas G9P[8] paraguayas en asociación con cepas de referencia y cepas detectadas alrededor del mundo, se observó que las G9 circulantes desde 1998 al 2009 pertenecen al linaje III. En el árbol se distinguen 3 subgrupos de G9-III diferentes entre sí (Figura 25). Los subgrupos corresponden a cepas paraguayas circulantes de 1998-2002; 2003-2007 y 2008-2009. Las VP7 G9 del subgrupo 2008-2009 comparten un ancestro más cercano con el subgrupo 1998-2002 en comparación de las G9 paraguayas de 2003-2007. El grupo 1998-1999 además se asocia con cepas de otros países con mayor diferencia en tiempo de circulación (10-14 años). Las cepas 1550SR (2008) y 1765SR (2009) agruparon con las G9 2003-2007.

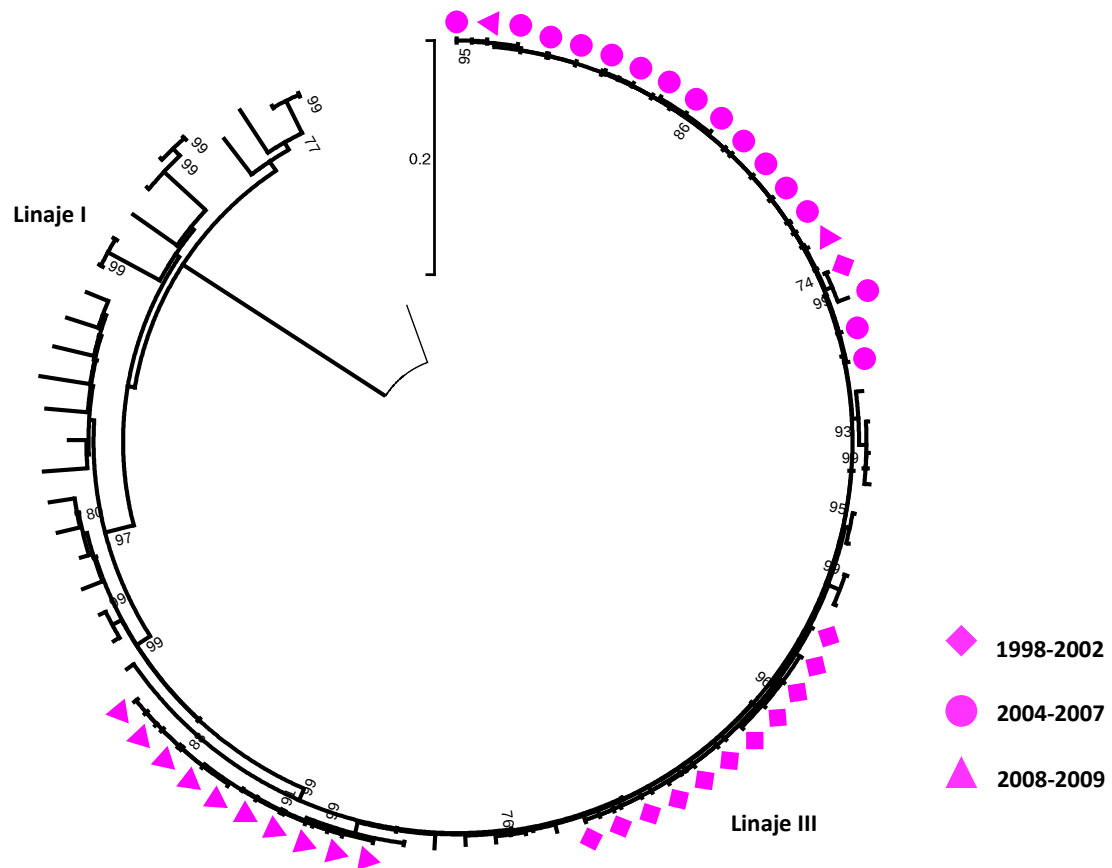


Figura 26 Árbol filogenético de la secuencia nucleótidos del gen VP7 de genotipo G. Las cepas secuenciadas en este estudio están marcadas en fucsia. Los marcadores indican el año de circulación. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 75%. La tasa de sustituciones en cada rama se muestra según escala. Los números romanos indican linajes de G4.

La Figura 26 muestra el árbol construido a partir de la secuencia completa del gen VP4 genotipo P[8] de cepas paraguayas del genogrupo 1 y secuencias de cepas circulantes alrededor del mundo. La VP4 de las cepas G9 agruparon dentro del linaje III, formando dos subgrupos: uno formado por las cepas circulantes durante 1998-2000 y otro que agrupó a las G9 de 2003 a 2009.

exhibió el genotipo G1. Por lo tanto, es muy probable que esta sea una muestra mixta, ya que todos los genes pertenecen al clúster de las G1.

Variabilidad intragenotípica de los genes de las cepas G9P[8]

En la Figura 28 y 29 se observan los árboles filogenéticos contruidos a partir de las secuencias de los marcos de lectura (ORF) de los genes de cepas G9P[8]. Fueron analizadas cepas que circularon en un lapso de 11 años (1998-2009). En los árboles de los genes que codifican proteínas estructurales (Figura 28) se pueden ver en 3 subgrupos mayores de genes: cepas 1998-2002 indicadas con un rombo fucsia; cepas 2003-2007 indicadas con un círculo fucsia y cepas 2008-2009 indicadas con un triángulo fucsia. Dos cepas circulantes durante 2008 y 2009 (1550SR y 1756SR) agruparon en el cluster 2003-2007 y no con sus contemporáneas. 1756SR es una muestra mixta G9/G3 y los genes internos obtenidos en la secuenciación agruparon con G3 por lo cual los demás genes no fueron incluidos en el análisis de G9. En los genes no estructurales se observó el mismo patrón de agrupación (Figura 29), aunque se puede ver menor distancia genética. El gen NSP2 de las cepas circulantes en los periodos 2003-2007 y 2008-2009 representa un mismo alelo.

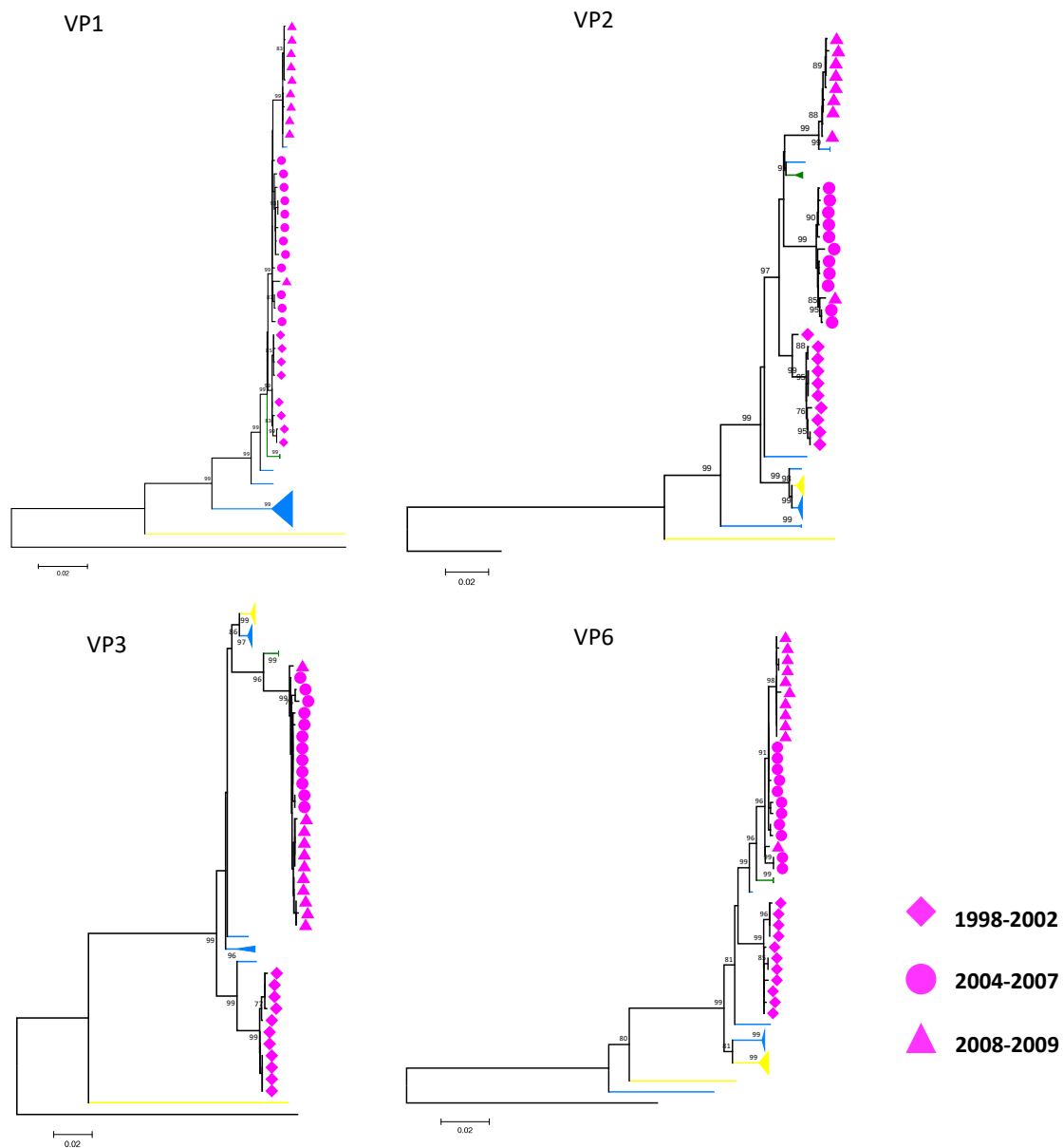


Figura 28. Árbol filogenético de la región codificante de los genes estructurales de todas las cepas paraguayas genogrupo 1 (Wa-like). Los marcadores indican el año de circulación de la cepa: rombo 1998-1999; cuadrado 2002-2003; círculo 2004-2005 y triángulo 2008-2009. Cepas G9 en fucsia. Las ramas colapsadas corresponden a genotipos G1 (celeste), G3 (verde) y G4 (amarillo). Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 75%

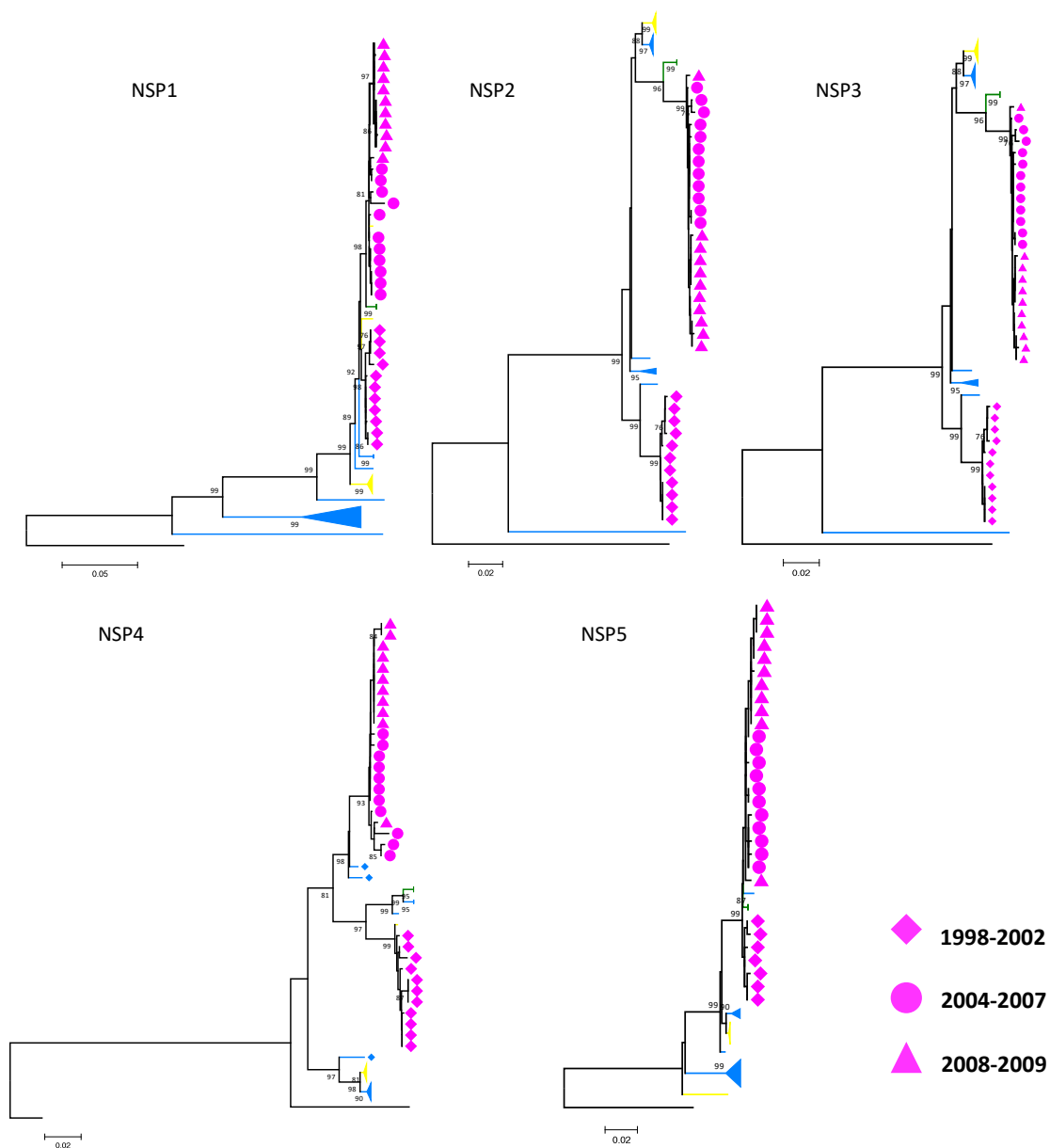


Figura 29. Árbol filogenético de la región codificante de los genes no estructurales de todas las cepas paraguayas genogrupo 1 (Wa-like). Los marcadores indican el año de circulación de la cepa: rombo 1998-1999; cuadrado 2002-2003; círculo 2004-2005 y triángulo 2008-2009. Cepas G9 en fucsia . Las ramas colapsadas corresponden a genotipos G1 (celeste), G3 (verde) y G4 (amarillo). Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 75%

Variaciones en sitios antigénicos de las proteínas VP7 y VP4

Una sola variación conservada fue encontrada en las VP7 del grupo 2008-2009 respecto a los otros dos grupos de G9 (Figura. 30), en el sitio 100 D--N de la región antigénica 7-1a. Este grupo presenta además 4 sustituciones en sitios no antigénicos (dato no mostrado). No se encontraron variaciones en los sitios antigénicos de la proteína VP4 (Figura 31).

Figura 30. Variaciones en sitios antigénicos de la proteína VP7 de cepas de genotipo G9P[8]. Las regiones antigénicas se indican con recuadros de color.

		Región antigénica																													
		8-1										8-2										8-3		8-5		5-4		5-2			
100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	306	459	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89	429	434			
RVA/Vaccine/USA/Rotarix/1988/G1P[8]	D	S	Q	E	S	T	N	L	N	N	I	R	E	T	A	N	P	V	D	S	N	D	N	N	T	N	L	P			
RVA/Human-wt/PRY/472/2000/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/468/2000/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/469/2000/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/473/2000/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/475/2000/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/465/2000/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/467/2000/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/25R/2002/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/498SR/2004/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/521SR/2004/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/615SR/2004/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/631SR/2004/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1016SR/2005/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1029SR/2005/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1041SR/2005/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1095SR/2005/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1393SR/2006/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1441SR/2006/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1541SR/2007/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1604SR/2008/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1550SR/2008/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1659SR/2008/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1557SR/2008/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1682SR/2008/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1705SR/2009/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1723SR/2009/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1720SR/2009/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1722SR/2009/G9P8	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

Figura 31. Variaciones en sitios antigénicos de las proteínas VP4 de cepas de genotipo G9P[8]. Las regiones antigénicas se indican con recuadros de color.

Discusión

El patrón de circulación de G9P[8] fue diferente al observado en los genotipos en el capítulo anterior. Las G9 que circularon en todo el periodo de estudio, pertenecieron al mismo linaje de G9 y P[8]. En su gran mayoría, variantes que mantienen una constelación determinada circulan por un tiempo para luego extinguirse totalmente, dando paso a la introducción de una nueva variante del mismo linaje estrechamente relacionada con las variantes extintas. Esto es consistente con el hecho de que G9 ha circulado de manera global desde hace sólo 20 años (67, 68), y no tuvo tiempo de generar una diversidad génica a nivel de linajes, como por ejemplo G1 (6, 24, 88). Un aspecto que llama la atención, es que los años en los que ocurrió ese recambio de variante, coincidió con los años 2000, 2004 y 2008 en que G9 fue el genotipo predominante sobre los demás. Esto puede compararse a lo observado para G1, donde un sub-linaje con una constelación completamente nueva, se volvió el dominante sobre las demás co-circulantes. Esta dinámica evolutiva diferente entre genotipos diferentes debe tenerse en cuenta al momento de evaluar los factores que pudieran incidir en la eficacia de la vacuna.

Capítulo 4

Constelación genómica del genotipo G2P[4]: Circulación de una única variante de genogrupo II.

Antecedentes

La constelación *DS-1-like* (genogrupo 2) es la segundo mayor genogrupo causante de infecciones por rotavirus. Típicamente se compone de genes con genotipo 2 acompañados de VP4 – P[4]: G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 (34). Esta constelación tiene un origen evolutivo diferente a las *Wa-like*, mientras que se propone un ancestro porcino para el genogrupo 1, los análisis apuntan a un ancestro bovino para el genogrupo 2 (89). Genes de genogrupo 2 en combinación con genes atípicos en humanos, han sido encontrados comúnmente en animales, sobre todo en diferentes especies de ungulados, Este ancestro en común facilita la posibilidad de reordenamientos interespecíficos (30, 35, 101, 102). A pesar de que la circulación de este genogrupo en la población humana se detectó desde hace 40 años, la información que se tiene sobre los genes circulantes es mucho menor que la disponible sobre las cepas *Wa-like*. Los análisis de secuenciación del genoma llevados a cabo en Brasil, Italia y USA mostraron la co-circulación de múltiples linajes en varios genes, algunos de los cuales compartían probablemente un origen animal (103-105). El reordenamiento entre virus humano y animal tiene el potencial de cambiar el *fitness* viral y promover la transmisión viral, especialmente en una población susceptible. Esto fue previamente observado

en genotipos como G9 y G12 que han logrado propagarse de manera eficiente en la población humana en menos de dos décadas (67). En Paraguay, el genotipo G2P[4] ha sido reportado circular con alta frecuencia del 2005 a 2007 (30), previo a la introducción de la vacuna, por lo que su circulación podría ser reflejo de la fluctuación natural de genotipos circulantes.

Metodología

La metodología utilizada está referida en el Capítulo 2.

Resultados

Identificación de linajes de VP7-G2 y VP4-P[4]

En la Figura 32 se observa que el gen VP7 de las cepas G2 agrupa dentro del linaje mayoritario, el linaje III, de modo muy próximo entre ellas. Sólo se observa una variante del gen no muy distante del resto (clúster 1504SR, 1533SR, 1636SR, 1613SR). Se asocia con cepas de Brasil y USA circulantes en el mismo periodo y un poco más distantes cepas de Japón del 2014. En la Figura 33, el árbol filogenético del gen VP4 agrupa a las P[4] paraguayas en el linaje IV, estrechamente asociadas entre ellas.

Variabilidad de genes en las constelaciones G2P[4]

En todos los árboles de genes estructurales de la Figura 34, se observa un solo clúster de cada gen. En todos los genes, el clúster es compartido con

cepas *DS-1-like* típicas y cepas que poseen genotipos G/P atípicos en humanos y comunes en animales, y que reordenaron con cepas del tipo DS-like (106, 107). El mismo clúster puede observarse con NSP1, NSP3 y NSP5. NSP2 se asoció principalmente a cepas humanas G2P[4] y NSP4 a cepas G2P[6].

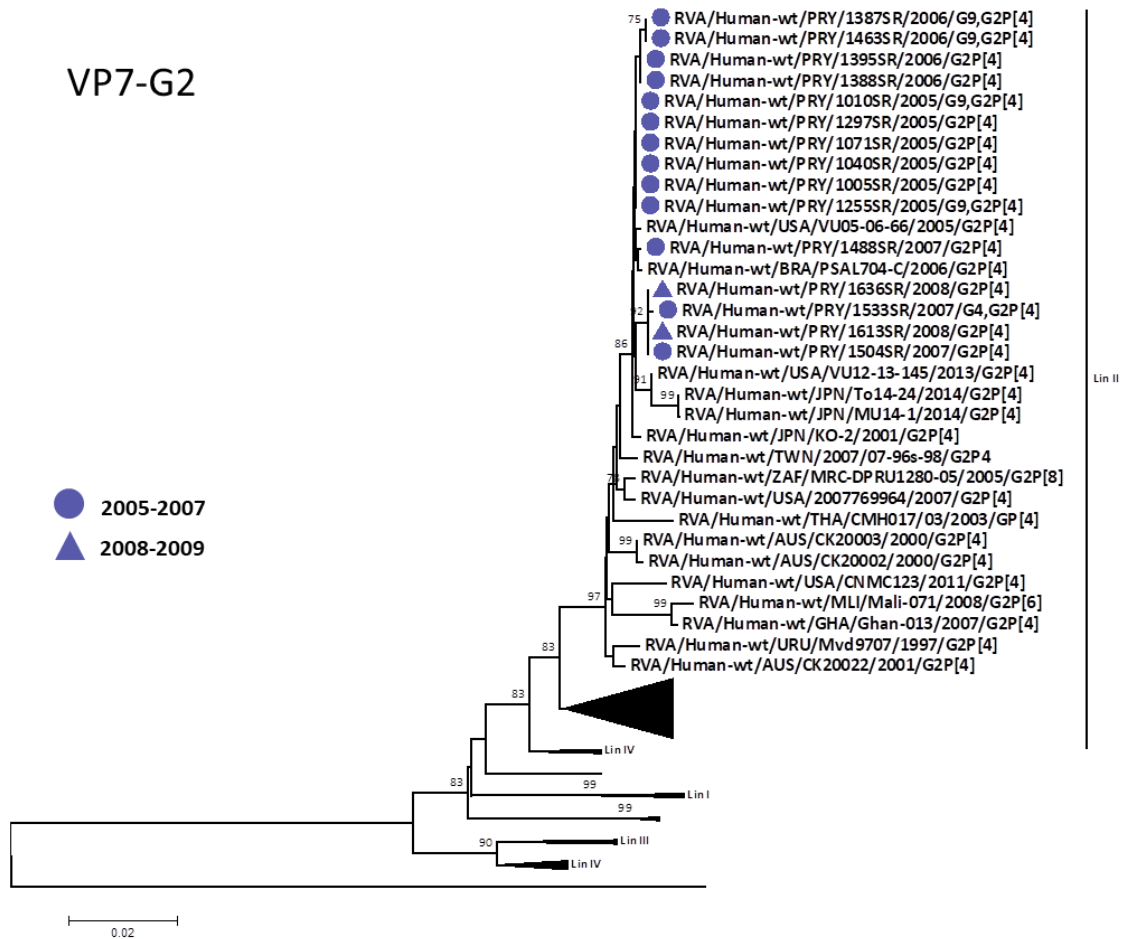


Figura 32. Árbol filogenético del gen VP7 – G2. Los linajes de G2 se indican con la barra lateral. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 75%.

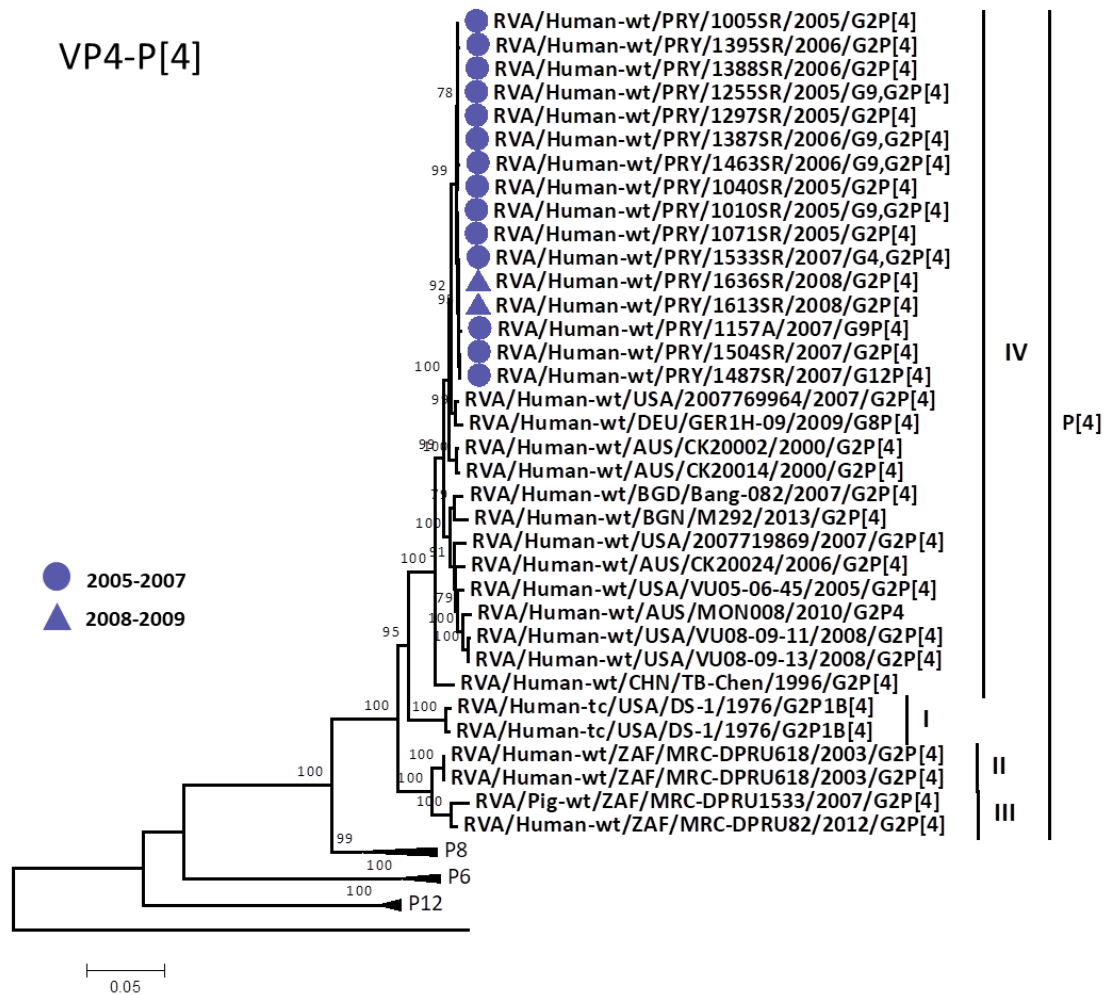


Figura 33. Árbol filogenético del gen VP4-P[4]. Los linajes de P[4] se indican con la barra lateral. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 75%.

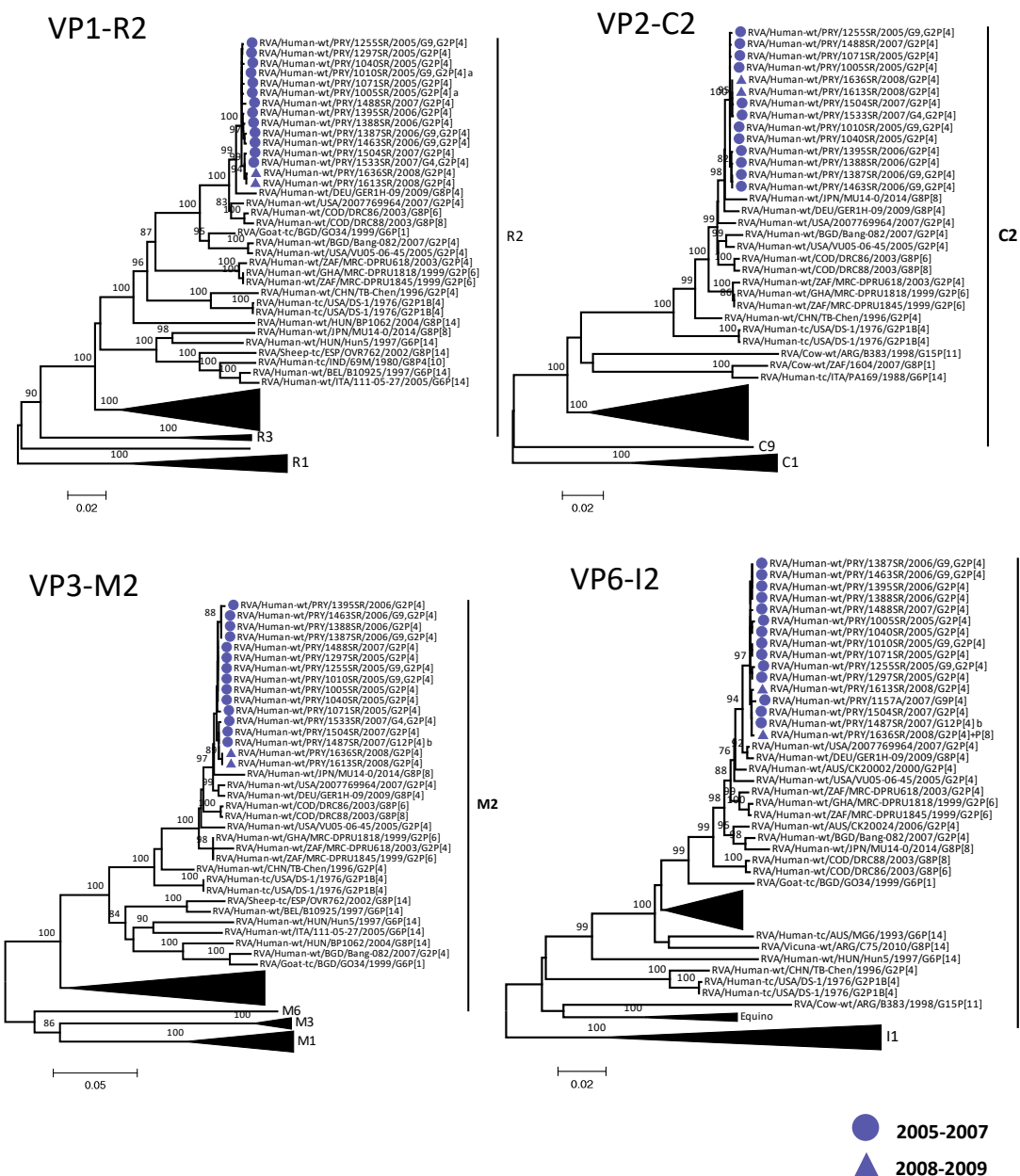


Figura 34. Árboles filogenéticos de los genes estructurales de las cepas G2P[4] circulantes en Paraguay. Los genotipos se mencionan en la barra lateral. Los arcadores indican el año de circulación del virus. Los valores de *bootstrap* mayores a 75% son mostrados.

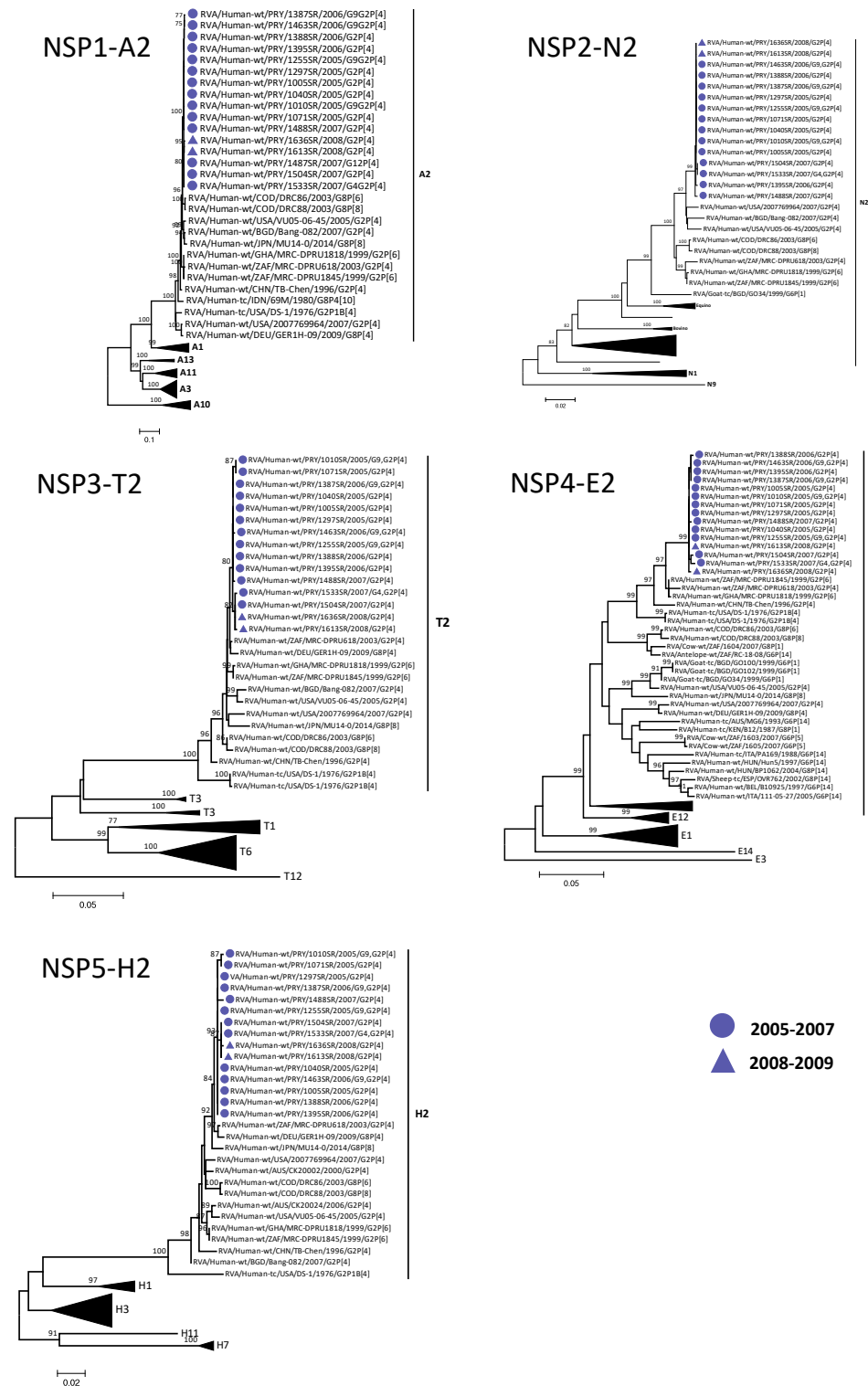


Figura 32. Árboles filogenéticos de genes no estructurales del genogrupo 2, circulantes en Paraguay. Los genotipos se mencionan en la barra lateral. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 75%.

Discusión

Una de las principales preguntas que surgieron respecto a la protección heterotípica de la vacuna Rotarix, fue si sería capaz de proteger contra cepas *DS-1-like*, que poseen una constelación completamente diferente a la vacunal, del tipo *Wa-like* (24, 108, 109). Algunos países como Brasil y USA, han reportado un aumento en la frecuencia de este genogrupo luego de la introducción de la vacuna a sus programas de inmunización (103-105). Sin embargo, los datos moleculares sobre la variación de las cepas en los periodos pre y post vacunal difieren (103, 110). En nuestro país se reportó un aumento de los casos de este genotipo desde el 2005 al 2007 (Figura 9), sin embargo en nuestro país la vacuna antirotavirus recién fue incluida en el calendario nacional de inmunizaciones desde el 2010. Además los genes de las cepas circulantes en nuestro país se asocian tanto con cepas de periodo pre-vacunal como con cepas post-vacunales. La explicación al aumento de casos de G2 puede deberse a la fluctuación natural del genotipo que se ha reportado con un promedio de 7 años (104, 110, 111). Así, luego de un periodo largo de baja circulación o ausencia del mismo, ocurre un aumento de individuos susceptibles. Más estudios a nivel genómico, geográfico y temporal, serán necesarios para dilucidar si la introducción de la vacuna pueda alterar la dinámica evolutiva natural de este genotipo.

Capítulo 5

Circulación de los genotipos G3P[8], G12P[9] y G3P[9]

Antecedentes

El genotipo G3 ha sido encontrado en humanos y varias especies de animales (monos, perros, gatos, cerdos, caballos, bovinos, cabras y ratones) (112, 113). Mediante la secuenciación de genomas de cepas humanas y animales se observó que pueden poseer genomas de diferentes genogrupos y en su constelación génica pueden poseer genes de varios genotipos (35, 113-115). Las cepas humanas G3P[8] poseen una constelación de genes con genotipo 1 y forma parte de las cepas *Wa-like* predominantes en humanos (34, 35). Las cepas G3P[9] poseen un genoma de tipo *AU-1-like*, I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 (genogrupo 3). Este genogrupo aunque posiblemente de origen felino, es considerado el tercer genogrupo capaz de circular en humanos (74, 116, 117). El genotipo G12 de rotavirus ha sido descrito en estudios en diferentes países y actualmente es reconocido como un genotipo globalmente emergente. Se ha sugerido a los porcinos como el potencial reservorio del genotipo G12 sin embargo las VP7 de humanos y porcinos son muy diferentes. El genotipo G12 ha sido encontrado en combinación con los 3 mayores genogrupos que infectan humanos, sin embargo las G12 responsables de su propagación global poseen una constelación del tipo *Wa-like* (22, 34, 67, 101, 118-120). La introducción de

G12P[8] a Sudamérica fue reportada en Argentina en el 2009 (120). Los rotavirus de genotipo G12P[9], poseen una constelación estrechamente relacionada al genogrupo *AU-1-like* (I3-R3-C3-M3-A12-N3-T3-E3-H6) y han sido detectados en el este de Asia y en Argentina (74, 75, 121, 122). Además, en Brasil, fue reportada la circulación de G12P[9] con una constelación (I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H6), estrechamente relacionada a las G12 de Asia y Argentina (123). En Paraguay, fue reportada la circulación de rotavirus G12P[9] en 2006 y 2007 (30). Posteriormente, en el 2008 y 2009, se detecta la circulación de G3P[8], (el cual predominó junto con G9P[8] en el 2009) y además la circulación de G3P[9] (Martínez et al., no publicado). En este capítulo se describe el análisis de las constelaciones génicas de las cepas que presentaron genotipo G12P[9], G3P[8] y G3P[9] con el objetivo de determinar si los virus G3P[9] fueron producto de un reordenamiento génico o su circulación fue a través de la introducción independiente de esta cepa.

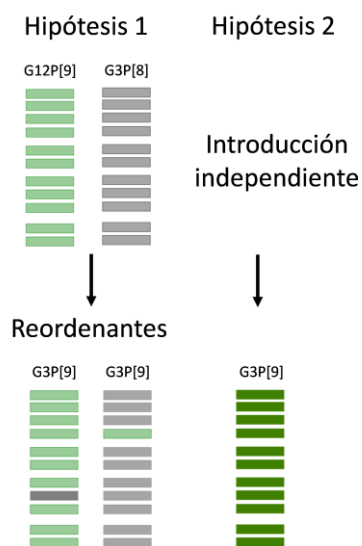


Figura 36. Introducción del genotipo G3P[9] a la población paraguaya. Se

muestran las dos hipótesis (reordenante o nueva constelación) sobre la composición genómica de las cepas G3P[9] circulantes.

Metodología

Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos se realizaron según metodología referida en el Capítulo 2.

Análisis estructurales

La estructura de las proteínas VP7, VP4 y VP6 de la cepa 1709SR (G3P[9]) se obtuvo en base al servidor I-Tasser (124) a partir de la secuencia codificante de las mismas.

Las substituciones aminoacídicas de las proteínas VP7, VP4 y VP6 de rotavirus fueron mapeadas en base al modelo atómico de la partícula de rotavirus (11), depositado en el PDB bajo el número de acceso 3IYU, utilizando el programa UCSF Chimera v1.12 (125).

Resultados

Identificación de linajes de VP7 y VP4 de cepas G12P[9], G3P[8] y G3P[9]

En la Figura 37 se muestra que la VP7 de las cepas G12 circulantes en Paraguay pertenecen al linaje II, divergente del linaje III que agrupa a las cepas de origen humano. Las cepas paraguayas G12P[9] del 2003 al 2009 forman un

clúster mayor dentro de linaje II junto con las G12P[9] de Argentina y Brasil y la T152 de Tailandia (Las cepas 1487SR, 1093SR y 74IPN son muestras mixtas).

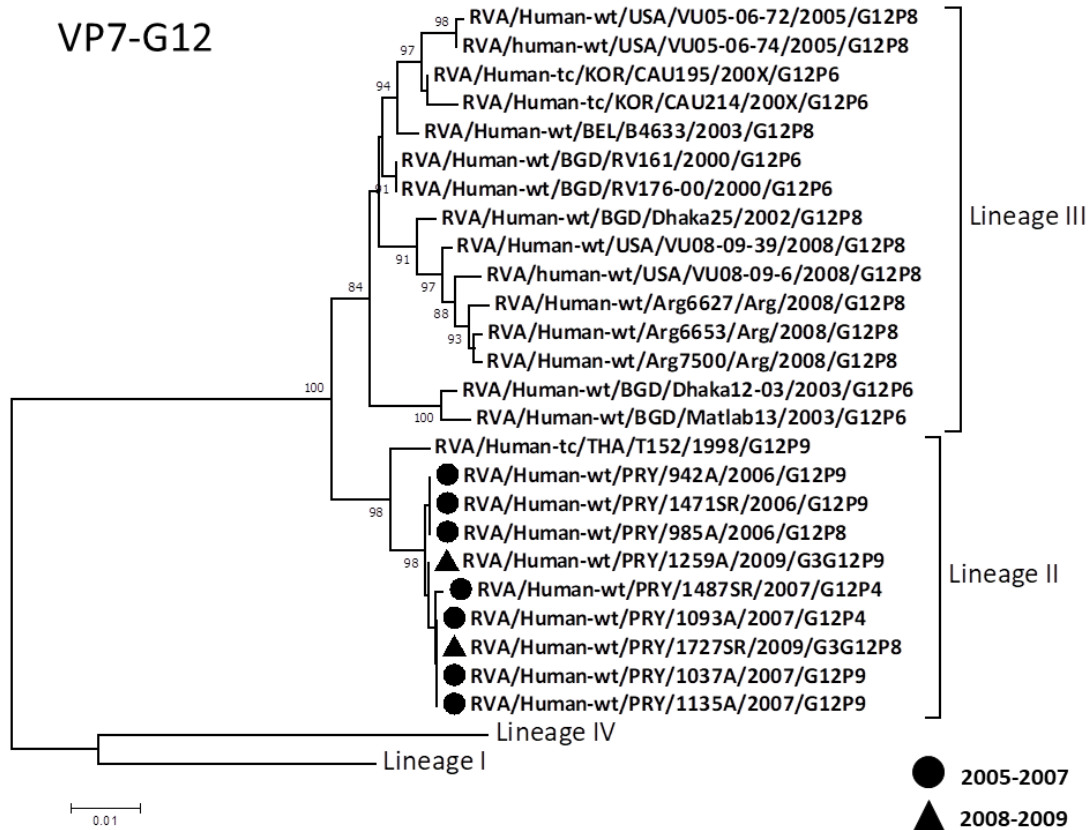


Figura 37. Árbol filogenético del gen VP7 del genotipo G12. Las muestras paraguayas se marcan en negro. Los marcadores indican el año de colecta de la muestra. Los linajes se indican con corchetes.

El árbol filogenético del gen VP7 de las cepas G3P[9] y G3P[8] circulantes en Paraguay (Figura 38), se observa que ambas agrupan en el linaje I, sin embargo se separan en sub-grupos diferentes (Ia y Ib respectivamente).

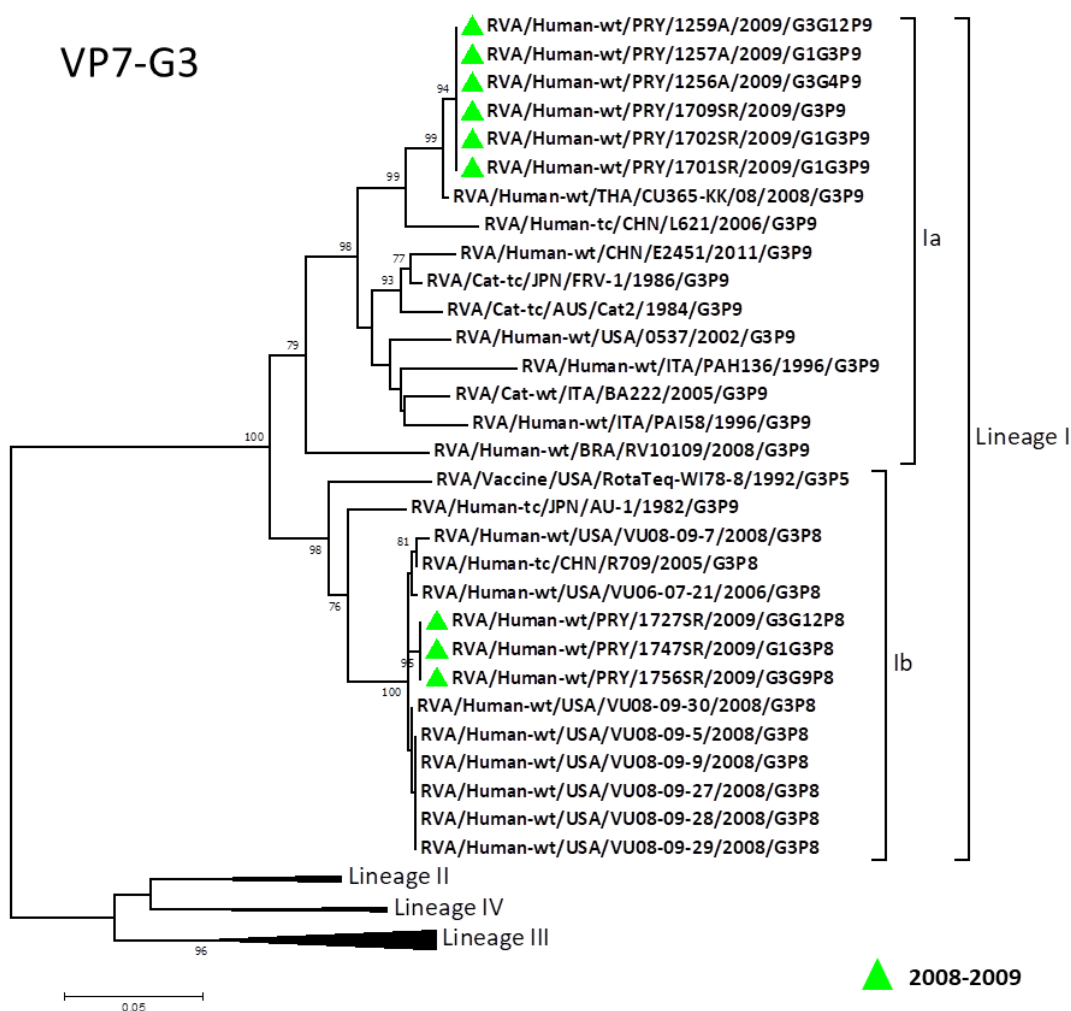


Figura 38. Árbol filogenético del gen VP7 del genotipo G3. Las muestras paraguayas se marcan en verde. Los marcadores indican el año de colecta de la muestra. Los linajes se indican con corchetes.

En la Figura 39, se observa que las VP4 genotipo P[9]-G3 y P[9]-G12 pertenecen a diferentes linajes, I y II respectivamente y agrupan con cepas que presentan la misma combinación G/P.

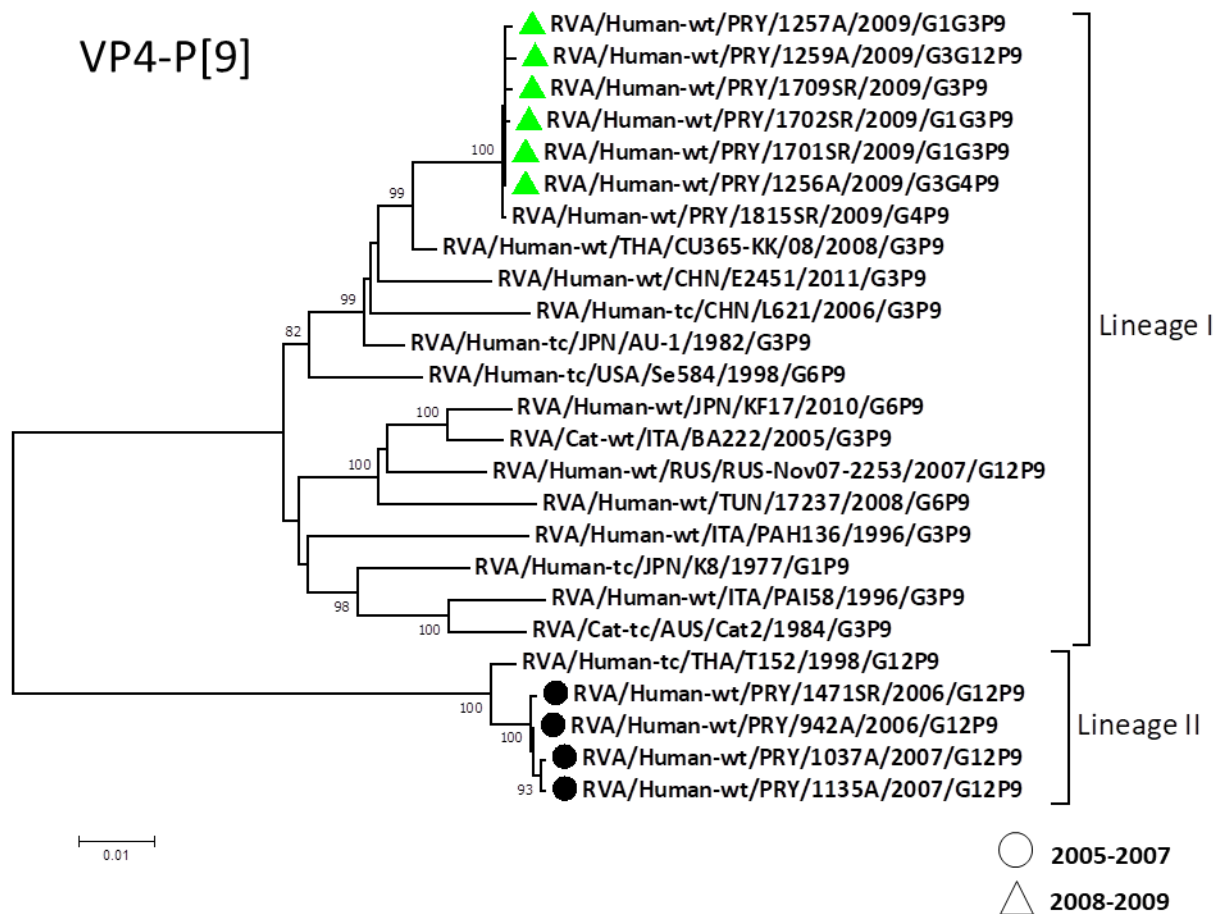


Figura 39. Árbol filogenético del gen VP4 del genotipo P[9].

Los genes estructurales como los no estructurales de las cepas G3P[9] y G12P[9] pertenecen al genotipo 3 (*AU-1-like*) mientras que los de las cepas G3P[8] pertenecen al genotipo 1 (*Wa-like*) (Figura 40 y Figura 41). En todos los árboles, los genes de las cepas G3P[9] forman clústeres monofiléticos separados de los genes de cepas G12P[9], con excepción del gen VP1 de la cepa 942A G12P[9] que agrupa con las VP1 de las cepas G3P[9].

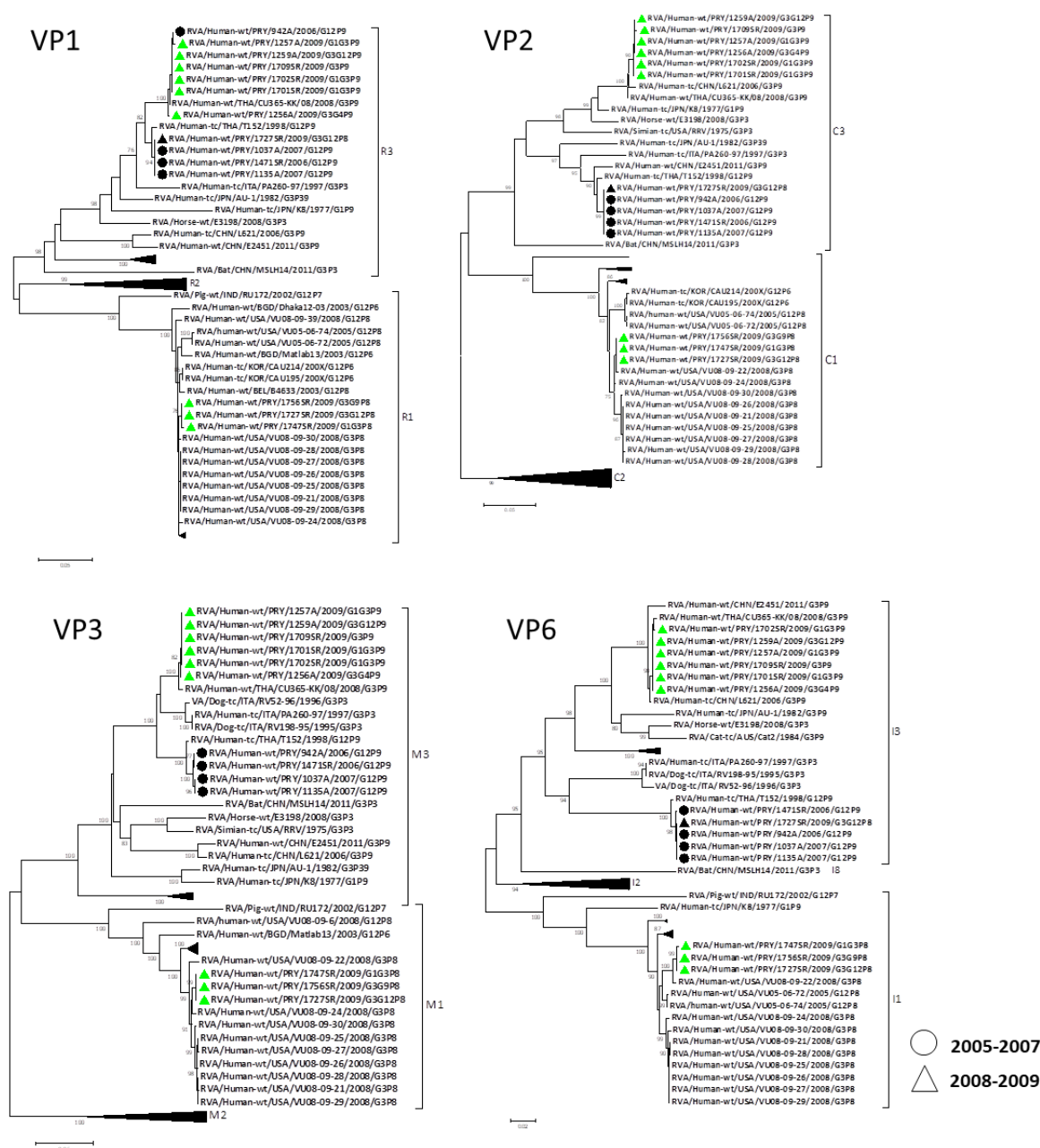


Figura 40. Árbol filogenético de genes que codifican proteínas estructurales de rotavirus Se muestran las cepas paraguayas G3P[8] y G3P[9] (verde) y G12P[9] (negro) y cepas de referencia de origen humano y animal. Los genotipos se indican con los corchetes. Los marcadores indican el año de circulación de las cepas paraguayas.

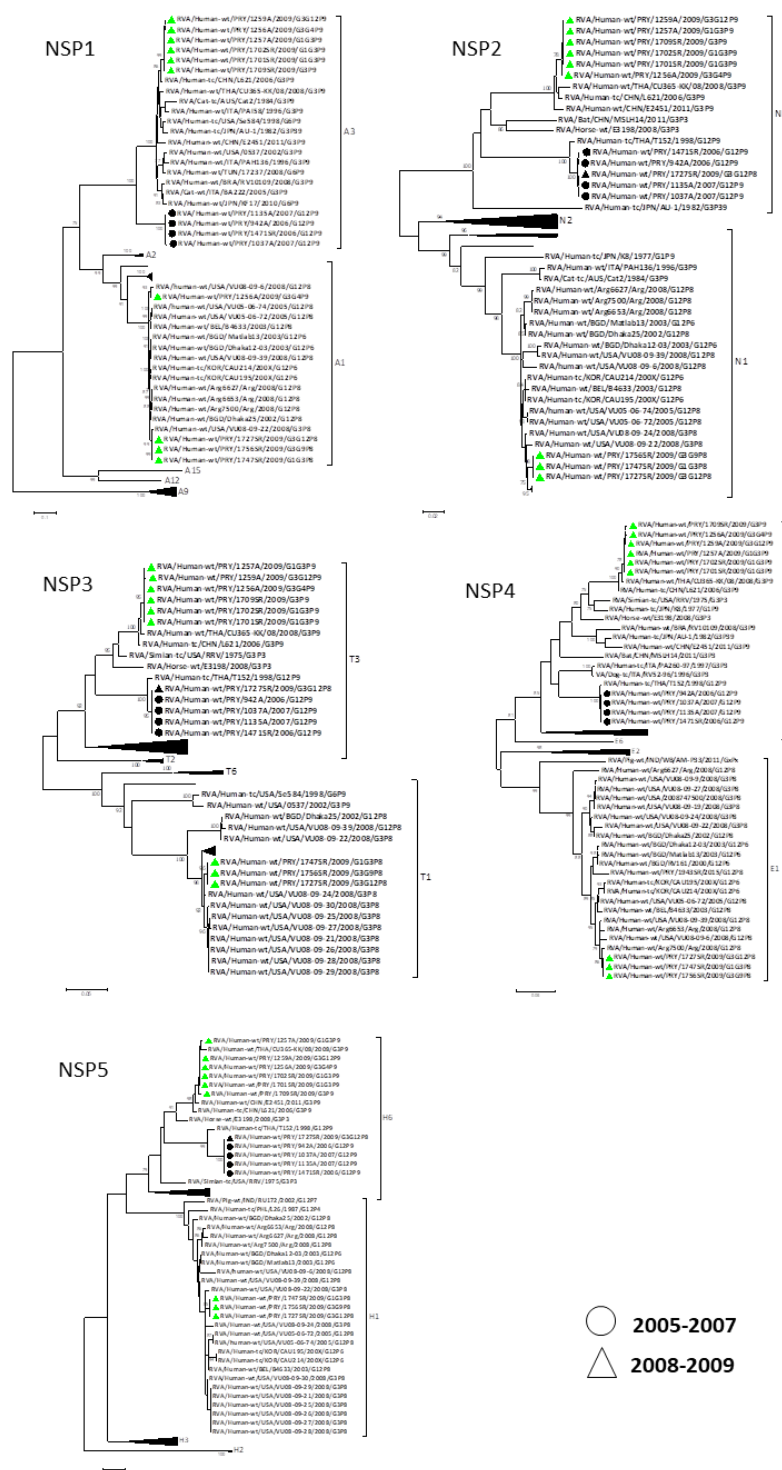


Figura 41. Árbol filogenético de genes que codifican proteínas no estructurales de rotavirus. Se muestran las cepas paraguayas G3P[8] y G3P[9] (verde) y G12P[9] (negro) y cepas de referencia de origen humano y animal. Los genotipos se indican con los corchetes. Los marcadores indican el año de circulación de las cepas paraguayas.

Región antigénica																														
7-1a															7-2										7-1b					
87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	143	145	146	147	148	190	217	221	264	201	211	212	213	238	242		
RVA/Vaccine/USA/RotaTec-WI78-8/1992/G3P[5]	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	D	A	T	L	S	E	A	G	Q	D	A	N	K	D		
RVA/Human-wt/PRV/1701SR/2009/G1G3P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	S	N	N
RVA/Human-wt/PRV/1702SR/2009/G1G3P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	S	N	N
RVA/Human-wt/PRV/1709SR/2009/G3P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	S	N	N
RVA/Human-wt/PRV/1256A/2009/G3G4P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	S	N	N
RVA/Human-wt/PRV/1259A/2009/G3G12P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	S	N	N
RVA/Human-wt/PRV/1257A/2009/G1G3P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	S	N	N
RVA/Human-wt/PRV/1727SR/2009/G3G12P[8]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	S	N	N
RVA/Human-wt/PRV/1747SR/2009/G1G3P[8]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	S	N	N
RVA/Human-wt/PRV/1756SR/2009/G3G9P[8]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	S	N	N

Figura 42. Diferencias en los sitios antigénicos de los genes VP7 de cepas G3P[8] y G3P[9]. Se utiliza como referencia la cepa G3 de la vacuna multivalente.

	Región antigénica																												8-5
	8-1								8-2								8-3												
	100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	306	459	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89		
RVA/Human-wt/PRY/1701SR/2009/G1G3P[9]	D	L	P	G	Y	Y	I	N	N	D	N	T	A	A	N	Q	N	T	Q	N	S	N	D	S	T	G	E		
RVA/Human-wt/PRY/1702SR/2009/G1G3P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1709SR/2009/G3P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1256A/2009/G3G4P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1257A/2009/G1G3P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1259A/2009/G3G12P[9]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1037A/2007/G12P[9]	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	N	.	R	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1135A/2007/G12P[9]	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	N	.	R	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/1471SR/2006/G12P[9]	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	N	.	R	.	.	.	
RVA/Human-wt/PRY/942A/2006/G12P[9]	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	N	.	R	.	.	.	
														</															

Figura 43. Diferencias en los sitios antigénicos entre los genes VP4 de cepas G3P[9] v G12P[9].

Las G3 de las cepas G3P[8] y G3P[9] presentan variaciones aminoacídicas entre sí en las regiones antigénicas 7-1a (291), 7-1b (213) y 7-2 (147) (Figura 42). Los genes VP4 de las cepas G3P[9] y G12P[9] y presentan variaciones aminoacídicas entre sí en los sitios antigénicos de la porción VP8: 8-1 (148), 8-2 (180), 8-3 (114) y 8-4 (88) (Figura 43).

En la Figura 44 se muestran los cambios en la proteína VP7 entre las cepas de origen animal (G3P[9], G12P[9]) y las cepas de origen humano (G3P[8]). Estas VP7 de origen animal interactúan con VP6 de genotipo I3 mientras que la G3 humana interactúa con VP6 de genotipo I1. Se encontraron 6 substituciones, todas fuera de regiones antigénicas de VP7, estando uno de los residuos (Ser266) interaccionando con VP6.

En la Figura 45 se muestran las diferencias entre la proteína VP6 de las cepas I3 (G3P[9], G12P[9]) e I1 (G3P[8]). Se encontraron 27 substituciones, de las cuales 13 se encuentran dentro de la región H de VP6 (aminoácidos 152 al 334), la cual interactúa con VP7.

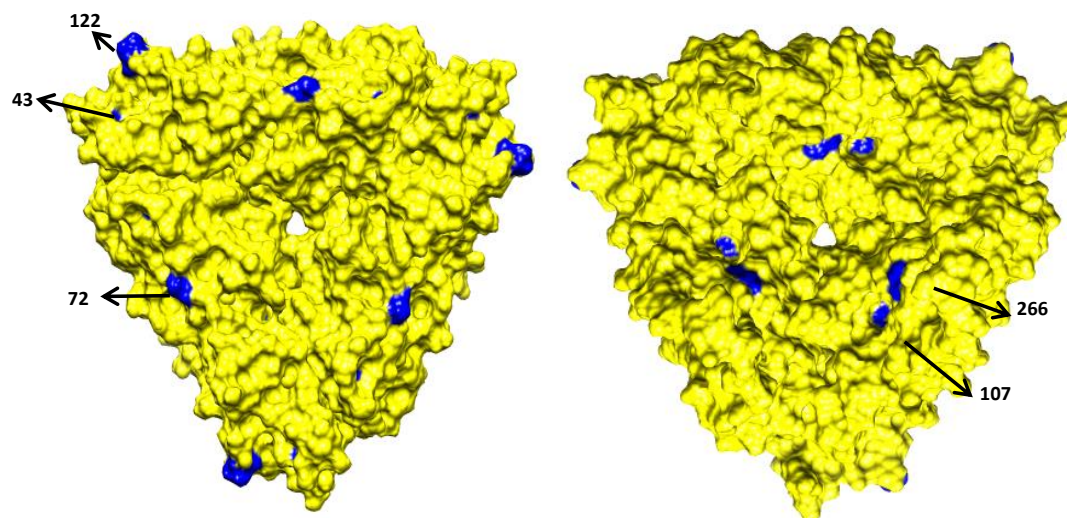


Figura 44. Substituciones en la proteína VP7. En azul se indican los cambios que presentan las cepas de origen animal (G3 y G12) respecto a las de origen humano (G3).

En la Figura 46 se muestra una sección de la cápside de rotavirus. Se mapearon substituciones en la proteína VP4 entre las cepas P[9] versus cepas P[8]. De un total de 233 substituciones, 7 de ellas se encuentran en aparente interacción con VP7 (3 sitios: 653, 602, 603) y VP6 (4 sitios: 606, 701, 705, 678) indicadas en la figura.

Discusión

Los rotavirus G3P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H6 detectados en Paraguay durante 2009 no son el producto de un evento de reordenamiento entre las cepas G12P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H6 y G3P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-

T1-E1-H1. Tanto las cepas G3P[9] como las G12P[9] se agrupan con cepas humanas de origen felino, sin embargo fueron introducidas al país de manera independiente como lo indican sus diferencias genéticas.

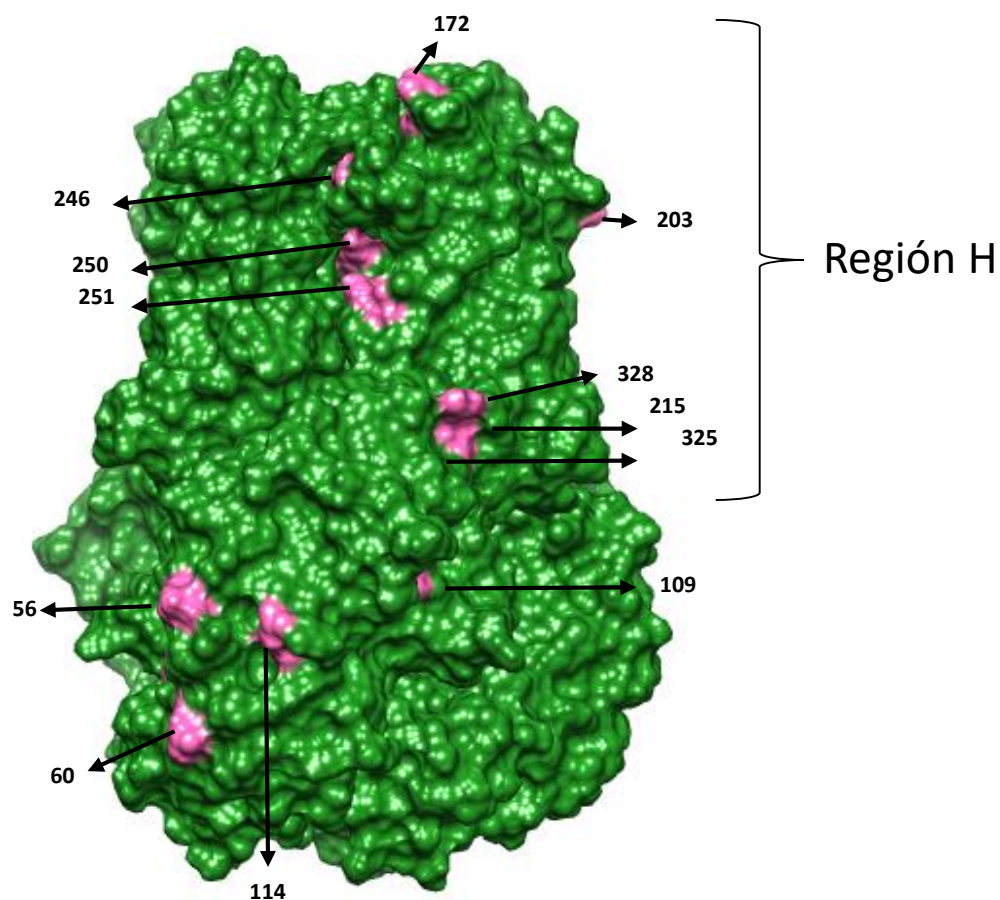


Figura 45. Substituciones en la proteína VP6. En rosa se indican los cambios que presentan las cepas de origen animal de genotipo I3 respecto a las de origen humano de genotipo I1. La Región H interacciona con VP7.

Ha sido propuesto que la transmisión interespecie es un mecanismo de diversidad genética que generalmente ocurre cuando existe similitud entre los genomas de cepas de diferentes especies, como ha sido observado en G3 (113, 114, 126).

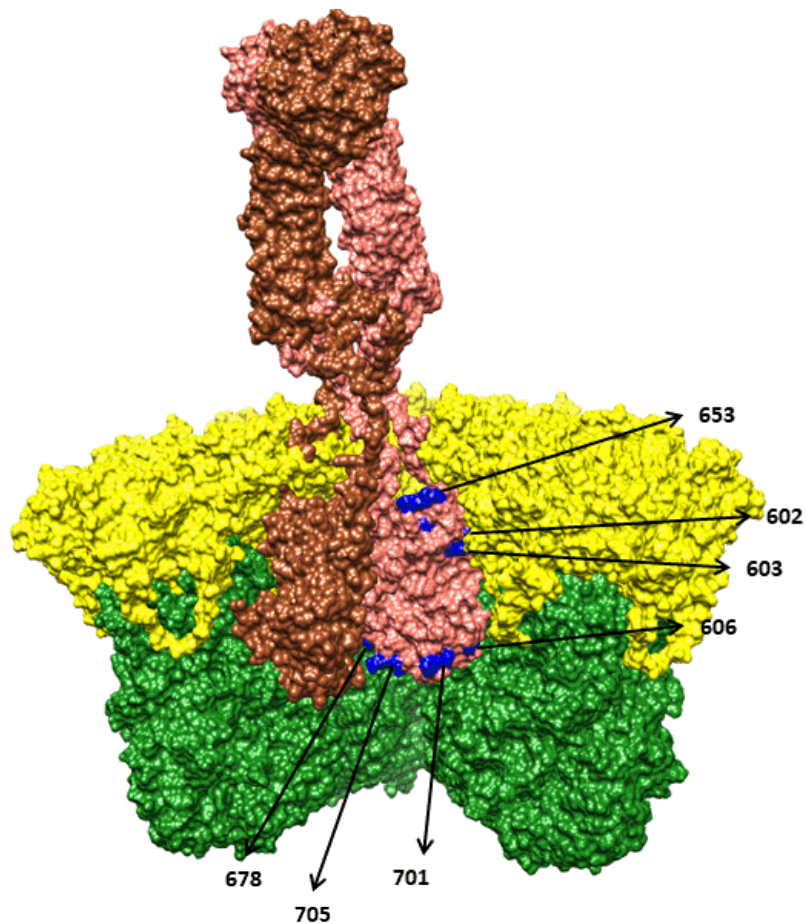


Figura 46. Modelo de una sección de la cápside de rotavirus. En azul se indican los cambios en sitios de interacción con otras proteínas de la cápside de rotavirus, presentes en la proteína VP4 de cepas de origen animal de genotipo P[9] respecto a las de origen humano P[8].

A pesar de la “oportunidad” de reordenamiento intergenotípico entre las cepas G3 Wa-like y las cepas G3 AU-1-like, o de reordenamiento intragenotípico, entre los genes de las constelaciones AU-like, solamente se observó esto último en una ocasión, donde una cepa G12P[9] presentó un gen VP1 que agrupó en el clúster de las VP1 de cepas G3P[9]. Como se ha mencionado anteriormente, los rotavirus tienden a formar constelaciones estables (33, 35). Estas constelaciones pueden estar influenciadas por la presión que ejerce la

interacción entre proteínas durante la replicación y el ensamblaje de las partículas virales. Aunque en teoría cada gen puede segregarse de manera independiente, ha sido demostrada una correlación en la segregación de los genes VP6, VP7, VP4 y NSP4 y se propone que esta correlación conduce a la selección de cepas capaces de replicar mejor en diferentes especies (22). Estas diferencias están relacionadas en gran parte al genotipo de VP6 y fueron analizadas principalmente entre genes de genotipo 1 y 2 debido a la falta de datos de genes del genotipo 3. En las figuras 44-46 se observaron sustituciones en regiones de interacción entre las proteínas de la cápside VP7, VP6 y VP4 entre cepas de rotavirus de genogrupo 3 respecto a cepas de genogrupo 1. Esas mutaciones pudieran estar relacionadas al menos en parte a la ausencia de reordenamientos entre las cepas co-circulantes.

Capítulo 6

Dinámica evolutiva de la proteína VP7 de la cápside de rotavirus

Introducción

Se ha descrito que la diversidad de los rotavirus es generada por varios mecanismos como deriva genética, reordenamiento de genes y transmisiones interespecie. A pesar de que esto puede resultar en una gran diversidad, se demostró que sólo ciertas combinaciones de genes ocurren naturalmente (23). Actualmente se propone que debido a la composición del virión, los rotavirus han mantenido evolutivamente constelaciones de genes debido a la presión selectiva que ejerce la interacción entre proteínas (22, 33).

La epidemiología de los rotavirus es un fenómeno complejo y cambiante. Globalmente, las cepas causantes de la mayoría de las infecciones, pueden cambiar año tras año y geográficamente. La gran mayoría de los rotavirus responsables de las epidemias alrededor del mundo pertenecen al genogrupo I o *Wa-like* siendo la proteína VP7 la que principalmente varía, presentando diferentes genotipos (G1, G2, G3, G4, G9) (24, 34). En Paraguay la diversidad de los rotavirus se debió principalmente a cambios en los genotipos G (VP7). Así, un genotipo determinado fue predominante por uno o dos años, hasta que fue reemplazado por otro virus con diferente genotipo. Como se discutió en capítulos anteriores estos cambios se debieron a la introducción de un virus

con una constelación génica completamente diferente. En este capítulo se analizó a nivel genómico y estructural la evolución intragenotípica del principal determinante de variabilidad de los rotavirus, la proteína de la superficie de la cápside, VP7. Principalmente, el objetivo fue determinar si dicha proteína presenta cambios debido a la presión inmune de la población.

Metodología

Base de datos

Se extrajo del Genbank secuencias de todas las cepas de rotavirus de genotipo G1, G2, G3, G3 y G9 que contengan el dato del año en que fue colectada. Sólo se analizaron las secuencias que representaron al menos el 85% el marco abierto de lectura (ORF) y contengan todos los sitios correspondientes a regiones antigénicas. Las secuencias fueron obtenidas con la herramienta *Virus variation* (127). Con estas secuencias se construyeron alineamientos para cada genotipo utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el programa MEGA v7.

Cálculo de divergencia de secuencia nucleotídica a través del tiempo

Para determinar la diversidad evolutiva en el tiempo se construyeron árboles

filogenéticos utilizando el método Maximum likelihood. Los parámetros de sustitución Tamura-3-parameter y distribución Gamma se seleccionaron en base al análisis de modelos de sustitución de acuerdo al criterio Bayesiano (BIC) implementado en el programa MEGA v7. La divergencia entre las secuencias fue calculada y visualizada con la herramienta Root-to-tip divergence del programa TempEst v1.5 (128). Se utilizó el cálculo de correlación utilizando la opción “best-fitting root” para minimizar los errores de muestreo.

Cálculo de cambios aminoacídicos a través del tiempo

Para visualizar las sustituciones de aminoácidos dentro de cada genotipo, se utilizó un algoritmo desarrollado en lenguaje *Python* (129) que calcula el número de cambios de aminoácidos para dos cepas en particular y relaciona con la diferencia en el año de aislamiento. Los gráficos (*heatmaps*) donde se visualiza la acumulación de cambios se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism v7.

Cálculo de conservación de residuos

Para calcular el grado de conservación de cada residuo en la estructura de VP7, se utilizó el programa *ConSurf* (130) que realiza los cálculos en base a la información de la secuencia aminoacídica. Los resultados arrojados por

Consurf fueron utilizados para reconstruir la estructura de la proteína VP7 mapeando el grado de conservación de los residuos. Los gráficos fueron visualizados con el programa UCSF Chimera v1.12.

Resultados

El número de secuencias por genotipo y por año así como el periodo de tiempo abarcado se detalla en la Tabla 3. Cada genotipo presentó al menos 130 secuencias de virus circulando por al menos 35 años. En la Figura 47 se observa que dentro de cada genotipo, la secuencia de nucleótidos acumula cambios a través del tiempo, sin embargo todas presentaron coeficiente de correlación (R^2) menores a 0.57.

Por el contrario, se observó que la acumulación de cambios en la secuencia de aminoácidos en un periodo de aproximadamente 40 años no sobrepasa el 10% (~33 de los 336 aminoácidos de VP7) para todos los genotipos analizados (Figura 48). En el caso de G1, la divergencia observada se debe a la presencia de dos linajes diferentes entre sí (linaje I y II observados en capítulo 4) y a la diferencia de tiempo en la aparición del segundo linaje, sin embargo, las cepas que mayoritariamente circulan hace 40 años, presentan el mismo número de cambios (<10%) a través de los años (Figura 48A).

Genotipo	Años	N° de secuencias	Rango temporal (años)
G1	1974-1979	47	40
	1980-1989	46	
	1991-1997	16	
	2000-2009	468	
	2010-2014	323	
G2	1976-1977	2	39
	1981-1989	14	
	1992-1999	16	
	2000-2009	202	
	2010-2015	176	
G3	1974-1976	6	39
	1991-1997	3	
	2000-2009	95	
	2010-2013	183	
G4	1975-1978	6	41
	1980-1988	9	
	1997-1999	19	
	2000-2009	39	
	2010-2016	57	
G9	1980-1989	7	35
	1997-1998	25	
	2000-2009	222	
	2010-2015	314	

Tabla 3. Secuencia del marco abierto de lectura del gen VP7 de rotavirus depositadas en el GenBank por genotipo por año.

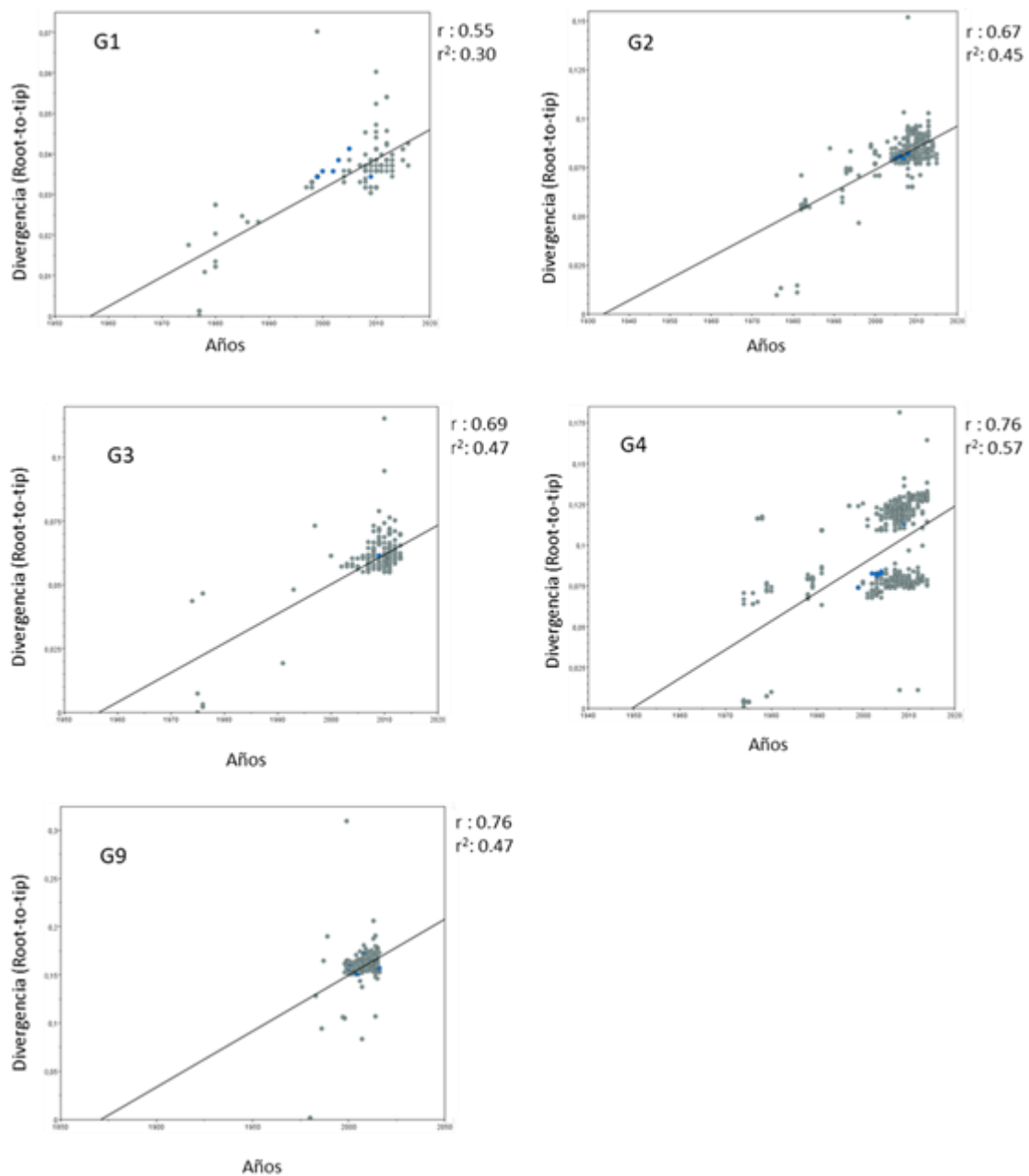


Figura 47. Divergencia de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína VP7 de rotavirus. Se grafican la correlación de cambios través del tiempo a partir del análisis filogenético utilizando el método Maximum likelihood. El coeficiente de correlación de Pearson r y de determinación r^2

En el caso de G9, se puede observar que existen cepas que presentan una divergencia mayor al 10%, las mismas corresponden al linaje I antiguo, detectado a fines de los años 80. Este linaje desaparece y emerge el linaje III responsable de la propagación de este genotipo en la población humana. Similar a los visto en G1, la secuencia de aminoácidos de cepas del linaje III de G9 permanece invariable a lo largo de sus 35 años de circulación (Figura 48E). Esta podría ser la explicación para las variantes de G4 que se observan por encima del 10% de variabilidad en el *heatmap* de este genotipo (Figura 48D). La variante que contiene una inserción en el sitio 76 de VP7 es la que predomina a nivel mundial a inicios de la década de los 90 en la población humana. Los genotipos que presentan el mayor grado de conservación intragenotipo son G2 y G3 donde se observa un patrón de variabilidad incluso menor al 10% (Figura 48B y 48C). Aunque los análisis de conservación aminoacídica (Figura 48) indican que hay pocos cambios a través del tiempo en la proteína VP7, todavía hay cambios dentro del 10%, lo cual podría incluir cambios en sitios antigénicos. Por lo tanto para determinar si cambios puntuales ocurridos en la VP7 de cada uno de los genotipos ocurren en regiones antigénicas, ploteamos el grado de conservación de cada residuo en la estructura de VP7 (azul indica conservación y rojo variabilidad). Se puede observar un alto grado de conservación dentro de cada genotipo, si bien se ven mayor cantidad de sitios variables en la superficie, no están concentrados en sitios antigénicos. Sin embargo, al comparar la variabilidad entre genotipos, se observa una substancial disminución del grado de conservación, sobre todo en

las regiones antigénicas en la superficie, en la zona interior de contacto entre los monómeros de VP7 así como el reverso en la zona de contacto con VP6.

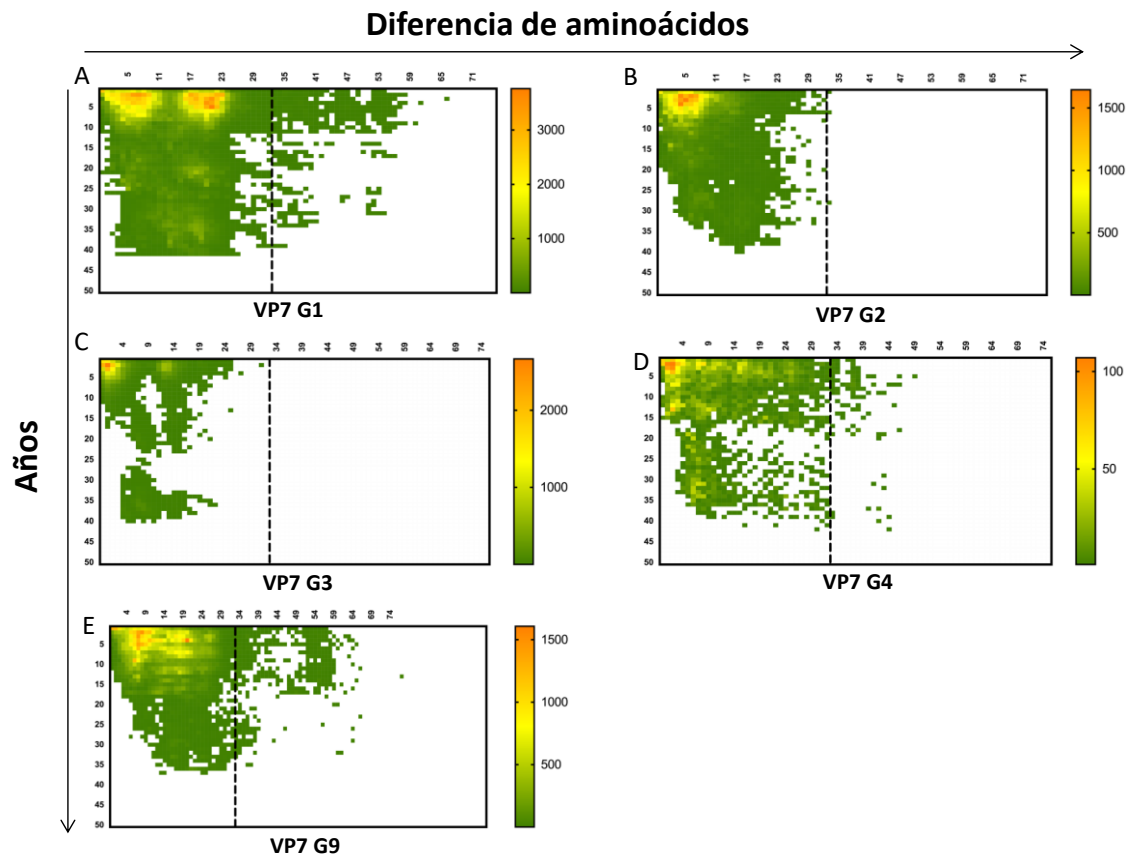


Figura 48. Mapa de acumulación de mutaciones aminoacídicas a través del tiempo en la proteína VP7 de la cápside de rotavirus. Los colores en el *heatmap* representan el número de comparaciones de una secuencia versus otra en un periodo de tiempo.

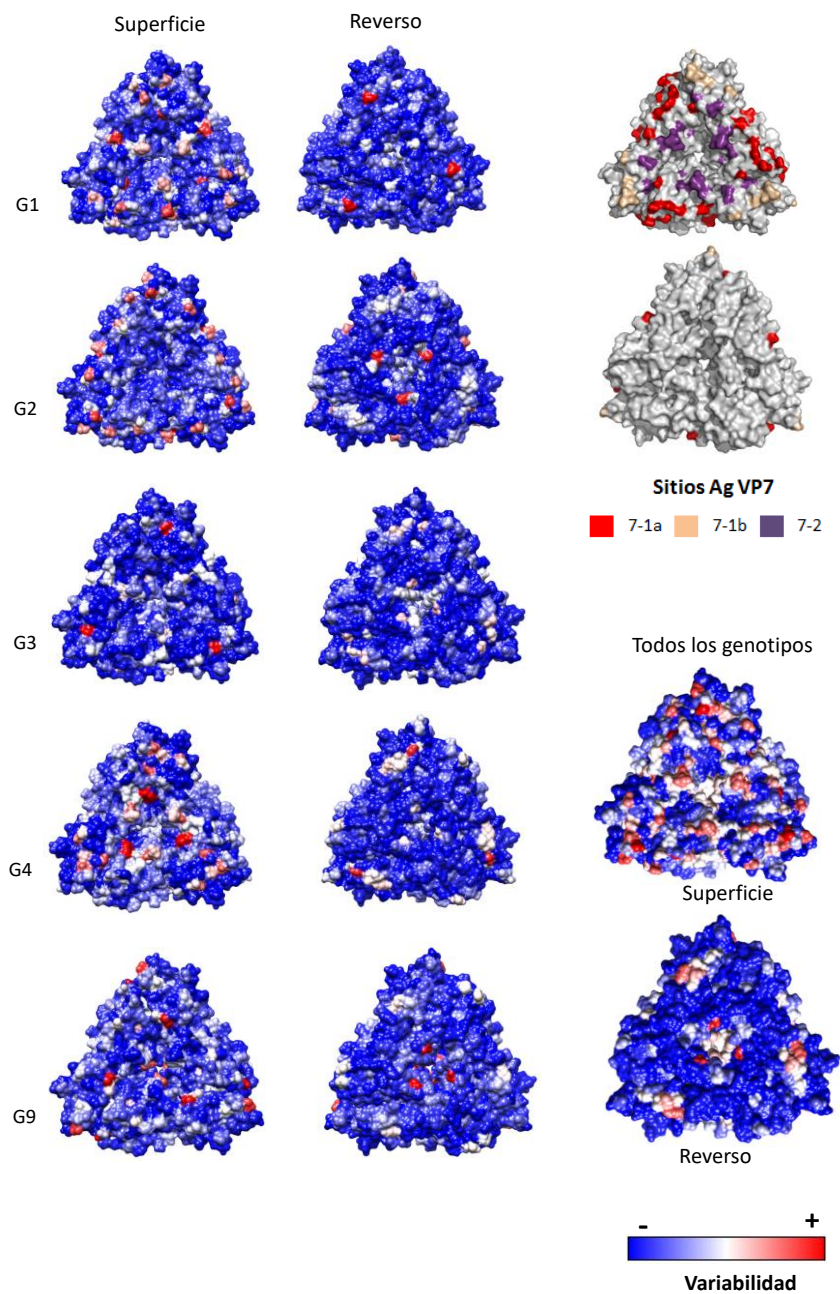


Figura 49. Mapeado del grado de conservación para cada residuo en la estructura de la proteína VP7 de los genotipos G2, G2, G3, G4 y G9. En el lado izquierdo se observa la superficie y el reverso del trímero de VP7 indicando conservación dentro de cada genotipo. En el lado derecho arriba: sitios antigénicos de VP7. Abajo: grado de conservación entre genotipos diferentes. El grado de conservación/variabilidad se indica en colores según escala.

Discusión

Un genotipo de rotavirus puede predominar en un año epidemiológico en una determinada región geográfica, para luego desaparecer y volver a circular en otro año (24, 131). Los mecanismos que llevan a este continuo intercambio de genotipos de rotavirus no están completamente dilucidados. En este capítulo hemos observado la dinámica evolutiva del mayor determinante de variabilidad de los rotavirus, la proteína VP7 de la cápside. En análisis de correlación variación/tiempo (*root-to-tip*) de la secuencia nucleotídica que codifica esta proteína se vio una evolución lineal a través del tiempo en contradicción con el alto grado de conservación a nivel de aminoácidos. Esto sugiere que los cambios en el genoma no conllevan a una acumulación de cambios aminoacídicos y que dentro de un mismo genotipo, existen restricciones que limitan la variabilidad de la proteína VP7. Esto es diferente a lo que ocurre con el virus de Influenza, donde la acumulación de mutaciones puntuales en la cápside es responsable de que un mismo genotipo pueda volver a predominar en una población determinada. Restricciones en la variabilidad de las glicoproteínas F y H de virus del sarampión fueron demostradas (132). Este grado de conservación, podría además estar relacionado con la necesidad de “compatibilidad estructural” propuesta (22) que restringe los reordenamientos entre diferentes cepas. En el análisis de evolución de la secuencia nucleotídica, se obtuvo en algunos casos un valor de correlación bajo. Esto puede deberse a la presencia de dos linajes conservados dentro de un mismo genotipo, como fue observado para el gen que codifica la proteína VP1 de Norovirus (Tohma

2018 no publicado), por lo que el análisis de correlación podría corregirse analizando cada linaje por separado.

El alto grado de conservación antigénica dentro de un mismo genotipo, podría ser entre otros factores, la causa de la variación de un genotipo predominante a otro años tras año en una determinada región geográfica, y la circulación cíclica de los mismos estaría relacionada al cambio en el estatus inmunológico de una población. El hecho de que un genotipo sea capaz de reaparecer en periodo menor de tiempo respecto a otros, podría sugerir además una diferencia en el grado de protección homotípica inducida por un determinado genotipo.

Discusión y Conclusión Final

Actualmente se llevan a cabo estudios genómicos masivos con el fin de comprender la dinámica de la fluctuación de los genotipos de rotavirus y porqué la dominancia de las cepas prevalentes es cíclica. (23, 33, 52, 83). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se llevaron a cabo en la dinámica de los rotavirus en países en desarrollo, por lo que el modelo no es generalizable a países donde la diversidad de cepas circulantes es mayor y el patrón de genotipos dominantes puede ser más variado. En este trabajo, nos basamos en la colección muestras de rotavirus que circularon en el área metropolitana de Asunción, Paraguay donde observamos 5 genotipos dominantes durante 11 años. Las conclusiones que podemos remarcar a continuación:

1- A diferencia de lo reportado en gran parte del mundo, el genotipo G1P[8] no fue el de mayor circulación en esta población. Variantes con constelaciones definidas co-circularon. Los virus con VP7 G1 del linaje I y linaje IIa que circularon en los 90 presentaron una VP4 de genotipo P[8] linaje III al igual que las cepas G4 que circularon en ese periodo de tiempo. Además, ambos genotipos compartieron alelos de genes estructurales y no estructurales del tipo *Wa-like*. Los virus con VP7 G1 linaje I se reintrodujeron 10 años después a la población, presentando la misma constelación. Cabe resaltar que los rotavirus con VP7 del linaje IIb que circularon y predominaron de 2002 a 2004 presentaron una constelación totalmente diferente a los otros virus *Wa-like* co-circulantes. Estos presentaron una VP4 P[8] de linaje I con 6 diferencias en

sitios antigénicos respecto al linaje III de P[8]. Además, todos los genes restantes formaron clústeres monofiléticos separados de los genes de otras G1.

2- Al momento de inicio del estudio el genotipo G4 fue el predominante. La mayoría de las cepas estudiadas pertenecieron al grupo de G4 "modernas", que poseen una inserción Asp76 en el gen VP7. Además todas presentaron la misma constelación génica formada por alelos que también estaban presentes en cepas G1. Se volvió a detectar sólo una cepa G4P[8] en el 2005 y la misma pertenecía al grupo de cepas antiguas sin inserción. Una cepa G4P[6] cuya constelación génica agrupó con cepas de origen animal, fue detectada en una sola muestra, por lo que posiblemente se trató de un evento de transmisión interespecie esporádico.

3- El genotipo G9 fue el de mayor circulación en este estudio. Las proteínas VP7 G9-III y VP4 P[8]-III pertenecieron a los linajes mayoritarios en humanos. El genotipo G9 fue predominante de forma cíclica (cada 4 años desde su detección): 2000, 2004 y 2008 y de acuerdo a la secuencia de nucleótidos del genoma, las cepas que circularon en esos años formaron clústeres filogenéticos separados en la mayoría de sus genes. Sin embargo esta variación produjo un sólo cambio en un sitio antigénico de la VP7 de las cepas paraguayas. Analizando además la dinámica evolutiva de los aminoácidos que componen la VP7 de cepas G9 circulantes a lo largo de 40 años se observó que el 90% del total de residuos mantuvo invariable. Queda por responder cuáles son los factores que permiten a estas variantes genéticas

volver a predominar como por ejemplo eficiencia en la replicación del genoma, ensamblaje de partículas virales o inhibición de respuesta inmune.

4- Una sola variante del genotipo G2 fue detectada. El aumento de la circulación de este genotipo se observó en 2005 a 2007 (alcanzando su pico en 2006). La circulación de este genotipo ocurre de forma cíclica cada siete años aproximadamente, según datos epidemiológicos alrededor del mundo (104, 105, 111) . Las cepas G2P[4] pertenecen al genogrupo 2 (*DS-1-like*) por lo que su genoma es enteramente diferente al de la vacuna monovalente (*Wa-like*) por lo que se fue cuestionado el grado de protección heterotípica contra este genotipo que la misma sería capaz de conferir. Uno de los primeros países en implementar la vacuna monovalente antirotavirus fue el vecino Brasil en 2006 y en Paraguay la misma fue introducida al calendario nacional en 2010. Con análisis filogenéticos observamos que las cepas paraguayas agruparon con cepas reportadas en los periodos pre y post vacunal en otros países. Todo esto sugiere que el aumento en la frecuencia de este genotipo de 2005 a 2007 en nuestro país no se debió a una presión selectiva ejercida por la vacunación, sino a la fluctuación natural de este genotipo. Esta fluctuación puede en parte darse debido a que luego de estar ausente por un periodo de tiempo, el virus vuelve a encontrar una población susceptible.

5- El genotipo G3P[8] co-circuló a igual frecuencia que G9 durante 2009. A pesar de que pocas secuencias del mismo fueron obtenidas para poder analizar su variación intragenotípica, la filogenia de los mismos mostró que sus genes agruparon en un mismo clúster separado de los genes de otros virus del

genogrupo 1. Al analizar la evolución a nivel de aminoácidos de la región codificante de las G3 paraguayas junto con cepas de otros países, se pudo observar que la mayor parte de las cepas humanas circulantes en un periodo de 40 años acumuló sólo un 6% de substituciones. Las muestras analizadas en este trabajo fueron colectadas desde 1998 y el genotipo G3 fue detectado por primera vez en el 2008, lo que implica un periodo de al menos diez años de ausencia en esta población.

6- Al mismo tiempo que G3P[8] circularon con menor frecuencia rotavirus del genogrupo 3 de genotipo G3P[9] y G12P[9]. Los genes de las mismas agruparon con cepas de origen animal y a pesar de presentar los mismos genotipos en 10 genes, la filogenia de los mismos agrupó a los genes de cada cepa por separado. Esto lleva a concluir que no ocurrió un evento de reordenamiento entre ellas o con la G3 humana. Al analizar los cambios en los modelos de las proteínas VP7, VP4 y VP6, se observó que la mitad de las substituciones en la proteína VP6 de las cepas I3 (genogrupo 3) respecto a las humanas I1 ocurrieron dentro de la región de contacto con VP7 y VP4. Además las VP4 P[9] presentaron 5 cambios en residuos que interaccionan con VP6. Estas diferencias estructurales podrían ser uno de los factores en la restricción de reordenamientos entre estas cepas co-circulantes. La proteína VP7 presentó sólo una substitución en un residuo que interacciona con VP6, lo que concuerda con el grado de conservación intragenotípica observada para VP7 y soporta lo encontrado en otros estudios (22, 37) donde se sugiere a VP6 como principal determinante de compatibilidad estructural.

7- Los resultados de presentados en este trabajo muestran que dentro de un genotipo de VP7 la variación antigénica a través del tiempo es mínima y que el cambio en la predominancia de un genotipo es el producto de la introducción de una constelación génica nueva (Figura 50).

8- Anteriormente, se demostró que la introducción de un nuevo genotipo de VP7 ampliaba el rango etéreo donde se concentraba la mayor cantidad de casos de gastroenteritis aguda por rotavirus (56) como se muestra en la Figura 51.

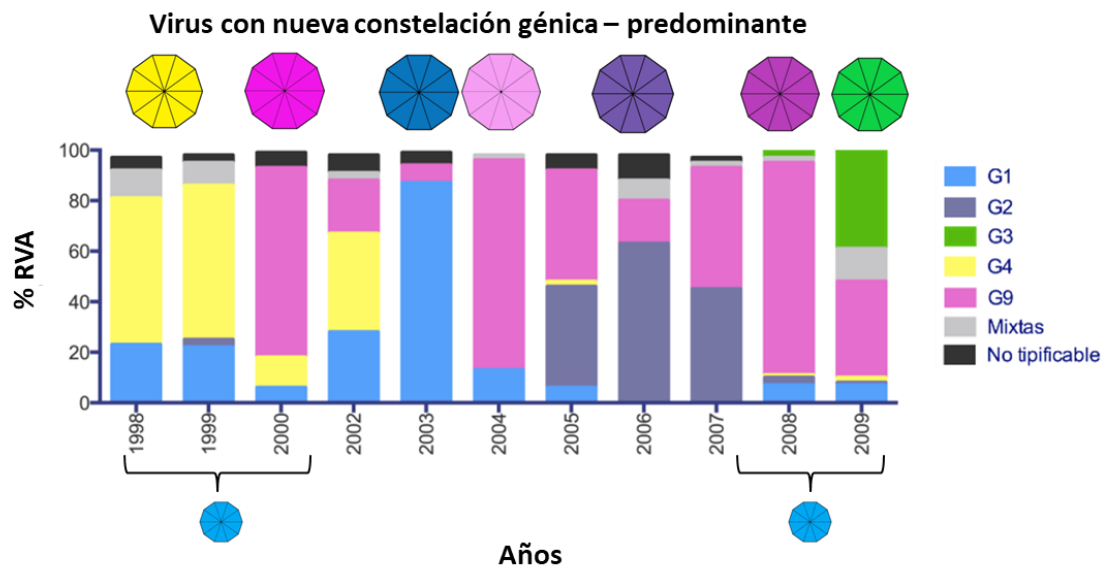


Figura 50. Virus con nuevas constelaciones génicas circulantes en Asunción de 1998 a 2009. En la parte superior se representan la constelación de los virus que predominaron ese año. El genotipo se indica según color. Las tonalidades fucsia representan variantes de G9. Tonalidades celestes representan variantes de G1.

En este trabajo se demostró que esto es producto de la introducción de una constelación completamente nueva a la población. Esta nueva constelación puede tratarse de cepas como G2 y G3 que dejaron de circular por un periodo

prolongado de tiempo y a pesar de que no variaron a través del tiempo, reaparecen cuando vuelven a encontrar una población susceptible. Por otro lado, los genotipos G1 y G9 que circularon de forma casi continua en el periodo de estudio, introdujeron variantes genéticas (pero no antigénicas) que predominaron sobre otros virus presentes y a diferencia de los demás genotipos, G9 predominó de forma cíclica en periodos de tiempo más cortos (4 años) en comparación a los demás genotipos. Esta diferencia podría deberse por un lado a ventajas replicativas que pudieran conferir estas variaciones, así como a diferencias en la respuesta inmune inducida por un genotipo determinado.

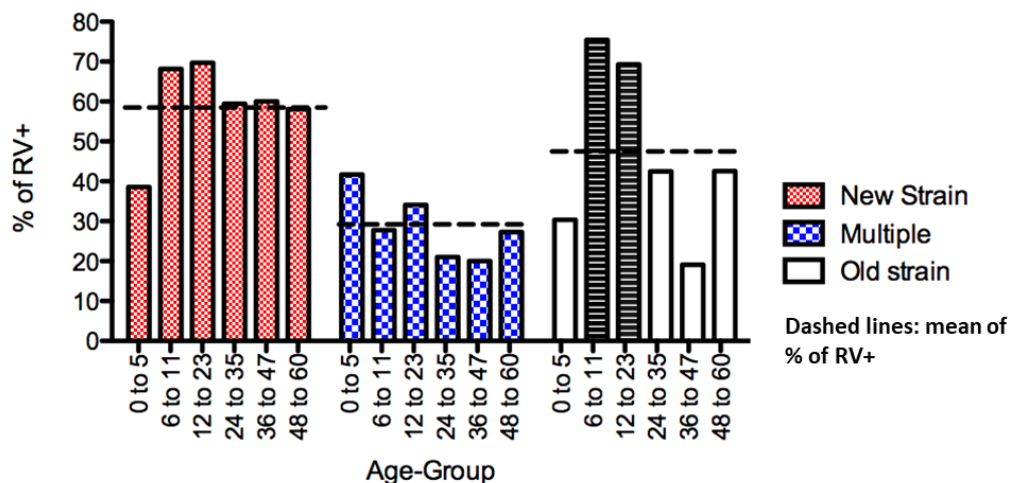


Figura 51. Cambios en la distribución de grupos etáreos en casos de infección por rotavirus (56).

Sin embargo, no debe perderse de vista, que la introducción de vacunas puede ejercer una presión selectiva y dar lugar al aumento de la circulación de cepas atípicas y/o eventos de reordenamiento donde puedan surgir variantes con alta

capacidad replicativa.

Los datos de prevalencia obtenidos en nuestro grupo, muestran una marcada tendencia de disminución de casos de rotavirus en niños menores de 5 años luego de la introducción de la vacuna en nuestro país (Figura 52).

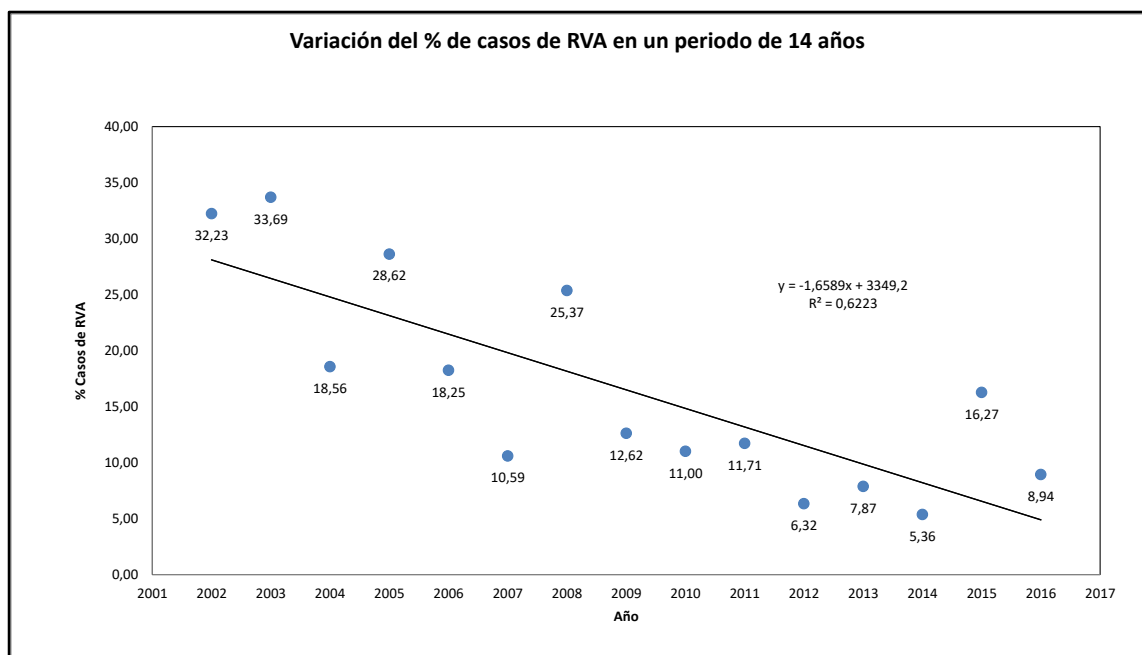


Figura 52. Frecuencia de casos de rotavirus en niños menores de 5 años. Los porcentajes están basados en casos en la población del mayor hospital infantil de la ciudad de Asunción.

En 2015 observamos un aumento de casos respecto a los años post-vacunales. Durante este año, predominó en nuestra población, una cepa que presentaba una conjunto de eventos evolutivos: un genotipo G3 de origen animal, en combinación con una P[8] humana, acompañados de un genoma del tipo *DS-1-like* (Martínez 2017 no publicado). Esta cepa fue reportada además como causante de brotes de rotavirus en diferentes países como Australia y

Brasil, además de países de Asia y Europa.

La vigilancia de la circulación de determinados genotipos en una población a través del tiempo, puede contribuir a establecer modelos predictivos sobre impacto de programas de vacunación y entender acerca de la dinámica evolutiva de patógenos multigenotipo.

Bibliografía

1. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 1989 Dec;53(4):410-49. PubMed PMID: 2556635. Pubmed Central PMCID: 372748.
2. Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. 2 volumes p.
3. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973 Dec 08;2(7841):1281-3. PubMed PMID: 4127639.
4. Petrie BL, Graham DY, Estes MK. Identification of rotavirus particle types. *Intervirology.* 1981;16(1):20-8. PubMed PMID: 6276323.
5. Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM HP, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus EE, editor. *Fields virology*. Vol. 2. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2007. p. 1917-74.
6. Patton J. Rotavirus diversity and evolution en the post-vaccine world. *Discovery Medicine* 2012;13(68):85-97.
7. Amarilla A, Espinola EE, Galeano ME, Farina N, Russomando G, Parra GI. Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research.* 2007 Jul;13(7):CR333-7. PubMed PMID: 17599029. Epub 2007/06/30. eng.
8. Hyser JM, Estes MK. Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009 Jan;25(1):36-43. PubMed PMID: 19114772. Pubmed Central PMCID: 2673536.
9. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD, World Health Organization-Coordinated Global Rotavirus Surveillance N. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2016 May 01;62 Suppl 2:S96-S105. PubMed PMID: 27059362.
10. Estes ME. Rotaviruses and their replication. 4th ed. Wilkinson LW, editor. Philadelphia 2001. 1747-87 p.
11. Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J.* 2011 Jan 19;30(2):408-16. PubMed PMID: 21157433. Pubmed Central PMCID: 3025467.
12. Lu X, McDonald SM, Tortorici MA, Tao YJ, Vasquez-Del Carpio R, Nibert ML, et al. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure.* 2008 Nov 12;16(11):1678-88. PubMed PMID: 19000820. Pubmed Central PMCID: 2602806.
13. Arias CF, Romero P, Alvarez V, Lopez S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of virology.* 1996 Sep;70(9):5832-9. PubMed PMID: 8709201.
14. Zarate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juarez KO, Camacho-Nuez M, et al. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *Journal of virology.* 2003 Jul;77(13):7254-60. PubMed PMID: 12805424.

15. Padilla-Noriega L, Dunn SJ, Lopez S, Greenberg HB, Arias CF. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3. *Virology*. 1995 Jan 10;206(1):148-54. PubMed PMID: 7530390.
16. Feng N, Kim B, Fenaux M, Nguyen H, Vo P, Omary MB, et al. Role of interferon in homologous and heterologous rotavirus infection in the intestines and extraintestinal organs of suckling mice. *Journal of virology*. 2008 Aug;82(15):7578-90. PubMed PMID: 18495762. Pubmed Central PMCID: 2493311.
17. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature reviews Microbiology*. 2007 Jul;5(7):529-39. PubMed PMID: 17571094.
18. Desselberger U, Huppertz HI. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *The Journal of infectious diseases*. 2011 Jan 15;203(2):188-95. PubMed PMID: 21288818. Pubmed Central PMCID: 3071058.
19. Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of virology*. 2012 Jun;157(6):1177-82. PubMed PMID: 22430951.
20. Parashar UD, Gibson, C. J., Bresee, J. S., and Glass, R. I. . Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(2):304-6.
21. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *Journal of virology*. 2008 Apr;82(7):3204-19. PubMed PMID: 18216098. Pubmed Central PMCID: 2268446.
22. Heiman EM MS, Barro M, Taraporewala ZF, Bar-Magen T, Patton JT. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *Journal of virology*. 2008;82(22):11106-16.
23. McDonald SM, McKell AO, Rippinger CM, McAllen JK, Akopov A, Kirkness EF, et al. Diversity and relationships of cocirculating modern human rotaviruses revealed using large-scale comparative genomics. *Journal of virology*. 2012 Sep;86(17):9148-62. PubMed PMID: 22696651. Pubmed Central PMCID: 3416154.
24. Kirkwood CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *The Journal of infectious diseases*. 2010 Sep 01;202 Suppl:S43-8. PubMed PMID: 20684716.
25. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in medical virology*. 2005 Jan-Feb;15(1):29-56. PubMed PMID: 15484186.
26. Iturriza-Gomara M, Dallman T, Banyai K, Bottiger B, Buesa J, Diedrich S, et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect*. 2011 Jun;139(6):895-909. PubMed PMID: 20707941.
27. Iturriza-Gomara M DT, Banyai K, Bottiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Koopmans M, Korsun N, Koukou D, Kroneman A, Laszlo B, Lappalainen

- M, Maunula L, Marques AM, Matthijnssens J, Midgley S, Mladenova Z, Nawaz S. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect* 2011;139(6):895-909.
28. Payne DC, Szilagyi PG, Staat MA, Edwards KM, Gentsch JR, Weinberg GA, et al. Secular variation in United States rotavirus disease rates and serotypes: implications for assessing the rotavirus vaccination program. *The Pediatric infectious disease journal*. 2009 Nov;28(11):948-53. PubMed PMID: 19859013.
 29. Parra GI, Espinola EE, Amarilla AA, Stupka J, Martinez M, Zunini M, et al. Diversity of group A rotavirus strains circulating in Paraguay from 2002 to 2005: detection of an atypical G1 in South America. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007 Oct;40(2):135-41. PubMed PMID: 17720620.
 30. Martinez M, Amarilla AA, Galeano ME, Aquino VH, Farina N, Russomando G, et al. Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asuncion, Paraguay, 2006-2007. *Archives of virology*. 2010 Apr;155(4):525-33. PubMed PMID: 20213281. Epub 2010/03/10. eng.
 31. Cunliffe NA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI, Hart CA. The expanding diversity of rotaviruses. *Lancet*. 2002 Feb 23;359(9307):640-2. PubMed PMID: 11879856.
 32. De Leener K, Rahman M, Matthijnssens J, Van Hoovels L, Goegebuer T, van der Donck I, et al. Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology*. 2004 Jul 20;325(1):11-7. PubMed PMID: 15231381.
 33. Zhang S, McDonald PW, Thompson TA, Dennis AF, Akopov A, Kirkness EF, et al. Analysis of human rotaviruses from a single location over an 18-year time span suggests that protein coadaptation influences gene constellations. *Journal of virology*. 2014 Sep 01;88(17):9842-63. PubMed PMID: 24942570. Pubmed Central PMCID: 4136370.
 34. Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current opinion in virology*. 2012 Aug;2(4):426-33. PubMed PMID: 22683209.
 35. McDonald SM MJ, Mcallen JK, Hine E, Overton L, Wang S, Lemey P, Zeller M, Van Ranst M, Spiro DJ, Patton JT. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS pathogens*. 2009;5(10):e1000634.
 36. Chen JZ, Settembre EC, Aoki ST, Zhang X, Bellamy AR, Dormitzer PR, et al. Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Jun 30;106(26):10644-8. PubMed PMID: 19487668. Pubmed Central PMCID: 2689313.
 37. Mino S, Barrandeguy M, Parreno V, Parra GI. Genetic linkage of capsid protein-encoding RNA segments in group A equine rotaviruses. *The Journal of general virology*. 2016 Apr;97(4):912-21. PubMed PMID: 26758293.
 38. Iturriza-Gomara M GJ. 4th Year Report. EuroRotaNet--European rotavirus strain surveillance network, 2011.

39. Vesikari T. Rotavirus vaccines: development and use for the prevention of diarrhoeal disease. *Ann Med*. 1999 Feb;31(1):79-85. PubMed PMID: 10219717.
40. De Vos B, Vesikari T, Linhares AC, Salinas B, Perez-Schael I, Ruiz-Palacios GM, et al. A rotavirus vaccine for prophylaxis of infants against rotavirus gastroenteritis. *The Pediatric infectious disease journal*. 2004 Oct;23(10 Suppl):S179-82. PubMed PMID: 15502699.
41. Rotavirus vaccines. WHO position paper. Switzerland: World Health Organization, 2007 Contract No.: 82.
42. Green KY, Taniguchi K, Mackow ER, Kapikian AZ. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccinees: implications for vaccine development. *The Journal of infectious diseases*. 1990 Apr;161(4):667-79. PubMed PMID: 2156942.
43. Gladstone BP, Ramani S, Mukhopadhyaya I, Muliyl J, Sarkar R, Rehman AM, et al. Protective effect of natural rotavirus infection in an Indian birth cohort. *The New England journal of medicine*. 2011 Jul 28;365(4):337-46. PubMed PMID: 21793745. Pubmed Central PMCID: 3596855.
44. Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *The New England journal of medicine*. 1996 Oct 3;335(14):1022-8. PubMed PMID: 8793926.
45. Offit PA. Immunologic determinants of protection against rotavirus disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;185:229-54. PubMed PMID: 8050280.
46. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Current opinion in virology*. 2012 Aug;2(4):419-25. PubMed PMID: 22677178. Pubmed Central PMCID: 3422408.
47. Gray J. Rotavirus vaccines: safety, efficacy and public health impact. *Journal of internal medicine*. 2011 Sep;270(3):206-14. PubMed PMID: 21668823.
48. Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, Esparza-Aguilar M, Johnson B, Gomez-Altamirano CM, et al. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *The New England journal of medicine*. 2010 Jan 28;362(4):299-305. PubMed PMID: 20107215.
49. Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 21;376(9741):606-14. PubMed PMID: 20692030.
50. Phua KB, Lim FS, Lau YL, Nelson EA, Huang LM, Quak SH, et al. Safety and efficacy of human rotavirus vaccine during the first 2 years of life in Asian infants: randomised, double-blind, controlled study. *Vaccine*. 2009 Oct 09;27(43):5936-41. PubMed PMID: 19679216.
51. Armah G, Pringle K, Enweronu-Laryea CC, Ansong D, Mwenda JM, Diamenu SK, et al. Impact and Effectiveness of Monovalent Rotavirus Vaccine Against Severe Rotavirus Diarrhea in Ghana. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2016 May 01;62 Suppl 2:S200-7. PubMed PMID: 27059357.

52. Pitzer VE, Patel MM, Lopman BA, Viboud C, Parashar UD, Grenfell BT. Modeling rotavirus strain dynamics in developed countries to understand the potential impact of vaccination on genotype distributions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Nov 29;108(48):19353-8. PubMed PMID: 22084114. Pubmed Central PMCID: 3228484.
53. Martcheva M, Bolker BM, Holt RD. Vaccine-induced pathogen strain replacement: what are the mechanisms? *Journal of the Royal Society, Interface*. 2008 Jan 06;5(18):3-13. PubMed PMID: 17459810. Pubmed Central PMCID: 2405901.
54. Indicadores de mortalidad año 2009. In: Dirección General de Información Estratégica en Salud MdSPyBS, editor. Asunción, Paraguay 2011.
55. Parra GI, Bok K, Martinez V, Russomando G, Gomez J. Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. *Journal of medical virology*. 2005 Dec;77(4):579-86. PubMed PMID: 16254962.
56. Parra GI. Seasonal shifts of group A rotavirus strains as a possible mechanism of persistence in the human population. *Journal of medical virology*. 2009 Mar;81(3):568-71. PubMed PMID: 19152398. Epub 2009/01/20. eng.
57. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of clinical microbiology*. 1990 Feb;28(2):276-82. PubMed PMID: 2155916.
58. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1992 Jun;30(6):1365-73. PubMed PMID: 1320625.
59. Martínez M, Galeano ME, Gabaglio SM, Fariña N, Cantero L, Russomando G, et al. Análisis genómico de rotavirus G12P[9] y G3P[9] circulantes en Paraguay, años 2006-2009, demuestran introducción de ambos genotipos de forma independiente.
60. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*. 1990 Mar;28(3):495-503. PubMed PMID: 1691208. Pubmed Central PMCID: 269651. Epub 1990/03/01. eng.
61. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. PubMed PMID: 5432063.
62. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*. 1994 Nov;17(5):914-21. PubMed PMID: 7840973.
63. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. . *Journal of virology. Nucl. Acids. Symp. Ser*. 41:95-98.1999.
64. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990 Oct 05;215(3):403-10. PubMed PMID: 2231712.
65. Maes P, Matthijssens J, Rahman M, Van Ranst M. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC microbiology*. 2009 Nov 23;9:238. PubMed PMID: 19930627. Pubmed Central PMCID: 2785824.

66. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology*. 2011 Aug;156(8):1397-413. PubMed PMID: 21597953. Epub 2011/05/21. eng.
67. Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Molecular biology and evolution*. 2010 Oct;27(10):2431-6. PubMed PMID: 20522727.
68. Rahman M, Matthijnssens J, Goegebuuer T, De Leener K, Vanderwegen L, van der Donck I, et al. Predominance of rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999-2003. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005 May;33(1):1-6. PubMed PMID: 15797358.
69. Afrad MH, Matthijnssens J, Afroz SF, Rudra P, Nahar L, Rahman R, et al. Differences in lineage replacement dynamics of G1 and G2 rotavirus strains versus G9 strain over a period of 22 years in Bangladesh. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014 Dec;28:214-22. PubMed PMID: 25305473.
70. Patel MM, Pitzer VE, Alonso WJ, Vera D, Lopman B, Tate J, et al. Global seasonality of rotavirus disease. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013 Apr;32(4):e134-47. PubMed PMID: 23190782.
71. Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SC, Barros VC, Fontes PB, Salustino EF, et al. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2007 Oct;13(10):1571-3. PubMed PMID: 18258011. Pubmed Central PMCID: 2851506.
72. Zeller M, Rahman M, Heylen E, De Coster S, De Vos S, Arijis I, et al. Rotavirus incidence and genotype distribution before and after national rotavirus vaccine introduction in Belgium. *Vaccine*. 2010 Nov 03;28(47):7507-13. PubMed PMID: 20851085.
73. Matthijnssens J, Zeller M, Heylen E, De Coster S, Vercauteren J, Braeckman T, et al. Higher proportion of G2P[4] rotaviruses in vaccinated hospitalized cases compared with unvaccinated hospitalized cases, despite high vaccine effectiveness against heterotypic G2P[4] rotaviruses. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014 Oct;20(10):O702-10. PubMed PMID: 24580887.
74. Gollop R, Nakagomi O, Silberstein I, Shulman LM, Greenberg HB, Mendelson E, et al. Three forms of AU-1 like human rotaviruses differentiated by their overall genomic constellation and by the sequence of their VP8*. *Archives of virology*. 1998;143(2):263-77. PubMed PMID: 9541612.
75. Castello AA, Nakagomi T, Nakagomi O, Jiang B, Kang JO, Glass RI, et al. Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. *Journal of medical virology*. 2009 Feb;81(2):371-81. PubMed PMID: 19107963.
76. Pradhan GN, Walimbe AM, Chitambar SD. Molecular characterization of emerging G9P[4] rotavirus strains possessing a rare E6 NSP4 or T1 NSP3 genotype on

- a genogroup-2 backbone using a refined classification framework. *The Journal of general virology*. 2016 Dec;97(12):3139-53. PubMed PMID: 27902372.
77. Quaye O, McDonald S, Esona MD, Lyde FC, Mijatovic-Rustempasic S, Roy S, et al. Rotavirus G9P[4] in 3 countries in Latin America, 2009-2010. *Emerging infectious diseases*. 2013 Aug;19(8):1332-3. PubMed PMID: 23880646. Pubmed Central PMCID: 3739533.
 78. Banyai K, Laszlo B, Duque J, Steele AD, Nelson EA, Gentsch JR, et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*. 2012 Apr 27;30 Suppl 1:A122-30. PubMed PMID: 22520121.
 79. Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2007 Sep;7(5):656-63. PubMed PMID: 17544926.
 80. Espinola EE, Amarilla A, Arbiza J, Parra GI. Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. *Archives of virology*. 2008;153(6):1067-73. PubMed PMID: 18463781.
 81. Dian Z, Wang B, Fan M, Dong S, Feng Y, Zhang AM, et al. Completely genomic and evolutionary characteristics of human-dominant G9P[8] group A rotavirus strains in Yunnan, China. *The Journal of general virology*. 2017 Jun;98(6):1163-8. PubMed PMID: 28613141.
 82. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 2013 Dec;30(12):2725-9. PubMed PMID: 24132122. Pubmed Central PMCID: 3840312.
 83. Zeller M, Heylen E, Tamim S, McAllen JK, Kirkness EF, Akopov A, et al. Comparative analysis of the Rotarix vaccine strain and G1P[8] rotaviruses detected before and after vaccine introduction in Belgium. *PeerJ*. 2017;5:e2733. PubMed PMID: 28070453. Pubmed Central PMCID: 5214804.
 84. Khetawat D, Dutta P, Gupta S, Chakrabarti S. Emergence of rotavirus G4P8 strain among children suffering from watery diarrhea in Calcutta, India. *Intervirology*. 2001;44(5):306-10. PubMed PMID: 11684892.
 85. Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V. Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Mar;43(3):1420-5. PubMed PMID: 15750122.
 86. Bok K, Matson DO, Gomez JA. Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype g4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina. *Journal of clinical microbiology*. 2002 Jun;40(6):2016-22. PubMed PMID: 12037057.
 87. Degiuseppe JI, Beltramino JC, Millan A, Stupka JA, Parra GI. Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013 Aug;19(8):E367-71. PubMed PMID: 23586655.
 88. Ghosh S, Kobayashi N. Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current

status and future prospects. *Future microbiology*. 2011 Sep;6(9):1049-65. PubMed PMID: 21958144.

89. Matthijnssens J, Potgieter CA, Ciarlet M, Parreno V, Martella V, Banyai K, et al. Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *Journal of virology*. 2009 Apr;83(7):2917-29. PubMed PMID: 19153225. Pubmed Central PMCID: 2655590. Epub 2009/01/21. eng.

90. Banyai K, Gentsch JR, Martella V, Bogdan A, Havasi V, Kisfali P, et al. Trends in the epidemiology of human G1P[8] rotaviruses: a hungarian study. *The Journal of infectious diseases*. 2009 Nov 01;200 Suppl 1:S222-7. PubMed PMID: 19821713.

91. Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Ramirez S, Lo Biundo C, Colomba C, et al. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. *Journal of virology*. 2006 Nov;80(21):10724-33. PubMed PMID: 16928744. Pubmed Central PMCID: 1641777.

92. Cao D, Santos N, Jones RW, Tatsumi M, Gentsch JR, Hoshino Y. The VP7 genes of two G9 rotaviruses isolated in 1980 from diarrheal stool samples collected in Washington, DC, are unique molecularly and serotypically. *Journal of virology*. 2008 Apr;82(8):4175-9. PubMed PMID: 18234798. Pubmed Central PMCID: 2293004.

93. Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, et al. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *Journal of clinical microbiology*. 1987 Sep;25(9):1757-62. PubMed PMID: 2443534. Pubmed Central PMCID: 269322.

94. Green KY, Hoshino Y, Ikegami N. Sequence analysis of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein (VP7) of two new human rotavirus serotypes. *Virology*. 1989 Feb;168(2):429-33. PubMed PMID: 2536991.

95. Nakagomi T, Ohshima A, Akatani K, Ikegami N, Katsushima N, Nakagomi O. Isolation and molecular characterization of a serotype 9 human rotavirus strain. *Microbiol Immunol*. 1990;34(1):77-82. PubMed PMID: 1691433.

96. Laird AR, Gentsch JR, Nakagomi T, Nakagomi O, Glass RI. Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993 to 2001. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Jul;41(7):3100-11. PubMed PMID: 12843049.

97. Hoshino Y, Jones RW, Ross J, Honma S, Santos N, Gentsch JR, et al. 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. *Journal of virology*. 2004 Jul;78(14):7795-802. PubMed PMID: 15220453.

98. Wu FT, Banyai K, Jiang B, Liu LT, Marton S, Huang YC, et al. Novel G9 rotavirus strains co-circulate in children and pigs, Taiwan. *Scientific reports*. 2017 Jan 18;7:40731. PubMed PMID: 28098174. Pubmed Central PMCID: 5241653.

99. Theuns S, Desmarets LM, Heylen E, Zeller M, Dedeurwaerder A, Roukaerts ID, et al. Porcine group A rotaviruses with heterogeneous VP7 and VP4 genotype combinations can be found together with enteric bacteria on Belgian swine farms. *Veterinary microbiology*. 2014 Aug 06;172(1-2):23-34. PubMed PMID: 24837191.

100. Lamhoujeb S, Cook A, Pollari F, Bidawid S, Farber J, Mattison K. Rotaviruses from Canadian farm samples. *Archives of virology*. 2010 Jul;155(7):1127-37. PubMed PMID: 20517624.

101. Rahman M, Sultana R, Ahmed G, Nahar S, Hassan ZM, Saiada F, et al. Prevalence of G2P[4] and G12P[6] rotavirus, Bangladesh. *Emerging infectious diseases*. 2007 Jan;13(1):18-24. PubMed PMID: 17370511. Pubmed Central PMCID: 2725799.
102. Jelle Matthijnssens MC, Erica Heiman, Ingrid Arijs, Thomas Delbeke, Sarah M. McDonald, Enzo A. Palombo, Miren Iturriza-Gomara, Piet Maes, John T. Patton, Mustafizur Rahman, Marc Van Ranst. Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *Journal of virology*. 2008;82(7):3204–19.
103. Dennis AF, McDonald SM, Payne DC, Mijatovic-Rustempasic S, Esona MD, Edwards KM, et al. Molecular epidemiology of contemporary G2P[4] human rotaviruses cocirculating in a single U.S. community: footprints of a globally transitioning genotype. *Journal of virology*. 2014 Apr;88(7):3789-801. PubMed PMID: 24429371. Pubmed Central PMCID: 3993531.
104. Giammanco GM, Bonura F, Zeller M, Heylen E, Van Ranst M, Martella V, et al. Evolution of DS-1-like human G2P[4] rotaviruses assessed by complete genome analyses. *The Journal of general virology*. 2014 Jan;95(Pt 1):91-109. PubMed PMID: 24077298.
105. Gomez MM, de Mendonca MC, Volotao Ede M, Tort LF, da Silva MF, Cristina J, et al. Rotavirus A genotype P[4]G2: genetic diversity and reassortment events among strains circulating in Brazil between 2005 and 2009. *Journal of medical virology*. 2011 Jun;83(6):1093-106. PubMed PMID: 21503926.
106. Pietsch C, Petersen L, Patzer L, Liebert UG. Molecular characteristics of German G8P[4] rotavirus strain GER1H-09 suggest that a genotyping and subclassification update is required for G8. *Journal of clinical microbiology*. 2009 Nov;47(11):3569-76. PubMed PMID: 19741083. Pubmed Central PMCID: 2772587.
107. Matthijnssens J, Rahman M, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Kabue JP, et al. G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. *Journal of clinical microbiology*. 2006 May;44(5):1801-9. PubMed PMID: 16672410. Pubmed Central PMCID: 1479174.
108. Burnett E, Yen C, Tate JE, Parashar UD. Rotavirus vaccines: current global impact and future perspectives. *Future virology*. 2016 Oct;11(10):699-708. PubMed PMID: 27840654. Pubmed Central PMCID: 5102270.
109. Kirkwood CD, Buttery J. Rotavirus vaccines - an update. *Expert Opin Biol Ther*. 2003 Feb;3(1):97-105. PubMed PMID: 12718734.
110. Gomez MM, Carvalho-Costa FA, Volotao Ede M, Rose TL, da Silva MF, Fialho AM, et al. Prevalence and genomic characterization of G2P[4] group A rotavirus strains during monovalent vaccine introduction in Brazil. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014 Dec;28:486-94. PubMed PMID: 25239525.
111. Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V, Cascio A, et al. G2 rotavirus infections in an infantile population of the South of Italy: variability of viral strains over time. *Journal of medical virology*. 2005 Dec;77(4):587-94. PubMed PMID: 16254979.
112. Banyai K, Papp H, Dandar E, Molnar P, Mihaly I, Van Ranst M, et al. Whole

- genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2010 Oct;10(7):1140-4. PubMed PMID: 20471499.
113. Doro R, Farkas SL, Martella V, Banyai K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. Expert review of anti-infective therapy. 2015;13(11):1337-50. PubMed PMID: 26428261.
 114. Martella V, Banyai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary microbiology*. 2010 Jan 27;140(3-4):246-55. PubMed PMID: 19781872.
 115. Matthijnssens J, De Grazia S, Piessens J, Heylen E, Zeller M, Giammanco GM, et al. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2011 Aug;11(6):1396-406. PubMed PMID: 21609783.
 116. Martella V, Potgieter AC, Lorusso E, De Grazia S, Giammanco GM, Matthijnssens J, et al. A feline rotavirus G3P[9] carries traces of multiple reassortment events and resembles rare human G3P[9] rotaviruses. *The Journal of general virology*. 2011 May;92(Pt 5):1214-21. PubMed PMID: 21228122. Epub 2011/01/14. eng.
 117. Iizuka M, Chiba M, Masamune O, Kaga E, Nakagomi T, Nakagomi O. A highly conserved genomic RNA constellation of Japanese isolates of human rotaviruses carrying G serotype 3 and P serotype 9. *Research in virology*. 1994 Jan-Feb;145(1):21-4. PubMed PMID: 8023011.
 118. Ghosh S, Kobayashi N, Nagashima S, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Ganesh B, et al. Full genomic analysis and possible origin of a porcine G12 rotavirus strain RU172. *Virus Genes*. 2010 Jun;40(3):382-8. PubMed PMID: 20157771.
 119. Jere KC, Mlera L, O'Neill HG, Potgieter AC, Page NA, Seheri ML, et al. Whole genome analyses of African G2, G8, G9, and G12 rotavirus strains using sequence-independent amplification and 454(R) pyrosequencing. *Journal of medical virology*. 2011 Nov;83(11):2018-42. PubMed PMID: 21915879.
 120. Stupka JA, Degiuseppe JI, Parra GI, Argentinean National Rotavirus Surveillance N. Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008-2009: whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012 Jun;54(2):162-7. PubMed PMID: 22410133.
 121. Rahman M, Matthijnssens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, et al. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *Journal of virology*. 2007 Mar;81(5):2382-90. PubMed PMID: 17166908. Pubmed Central PMCID: 1865926.
 122. Shinozaki K, Okada M, Nagashima S, Kaiho I, Taniguchi K. Characterization of human rotavirus strains with G12 and P[9] detected in Japan. *Journal of medical virology*. 2004 Aug;73(4):612-6. PubMed PMID: 15221908.
 123. Gomez MM, Resque HR, Volotao Ede M, Rose TL, da Silva MF, Heylen E, et al. Distinct evolutionary origins of G12P[8] and G12P[9] group A rotavirus strains circulating in Brazil. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular*

epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2014 Dec;28:385-8. PubMed PMID: 24747965.

124. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC bioinformatics. 2008 Jan 23;9:40. PubMed PMID: 18215316. Pubmed Central PMCID: 2245901.

125. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Journal of computational chemistry. 2004 Oct;25(13):1605-12. PubMed PMID: 15264254.

126. Banyai K, Bogdan A, Domonkos G, Kisfali P, Molnar P, Toth A, et al. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. Journal of medical virology. 2009 Feb;81(2):362-70. PubMed PMID: 19107981. Epub 2008/12/25. eng.

127. Hatcher EL, Zhdanov SA, Bao Y, Blinkova O, Nawrocki EP, Ostapchuck Y, et al. Virus Variation Resource - improved response to emergent viral outbreaks. Nucleic acids research. 2017 Jan 4;45(D1):D482-D90. PubMed PMID: 27899678. Pubmed Central PMCID: 5210549.

128. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). Virus evolution. 2016 Jan;2(1):vew007. PubMed PMID: 27774300. Pubmed Central PMCID: 4989882.

129. Parra GI, Squires RB, Karangwa CK, Johnson JA, Lepore CJ, Sosnovtsev SV, et al. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. PLoS pathogens. 2017 Jan;13(1):e1006136. PubMed PMID: 28103318. Pubmed Central PMCID: 5283768.

130. Ashkenazy H, Erez E, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. Nucleic acids research. 2010 Jul;38(Web Server issue):W529-33. PubMed PMID: 20478830. Pubmed Central PMCID: 2896094.

131. Desselberger U. Rotaviruses. Virus research. 2014 Sep 22;190:75-96. PubMed PMID: 25016036.

132. Fulton BO, Sachs D, Beaty SM, Won ST, Lee B, Palese P, et al. Mutational Analysis of Measles Virus Suggests Constraints on Antigenic Variation of the Glycoproteins. Cell reports. 2015 Jun 9;11(9):1331-8. PubMed PMID: 26004185. Pubmed Central PMCID: 4464907.

Anexos

1. Listado de muestras y genotipos
2. Numero de acceso al Genbank
3. Publicación