



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE *RUMINOCOCCUS* SPP., Y DE IGA
ANTI-ROTAVIRUS EN MUESTRAS FECALES DE NIÑOS CON
GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS DE DIFERENTES GRADOS DE
SEVERIDAD: ESTUDIO PILOTO EN POBLACIONES DE GRAN
ASUNCIÓN Y DEL DEPARTAMENTO DE CAAGUAZÚ DURANTE EL
2019”**

ROQUE LUIS MOREL DUARTE

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Mayo, 2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE
LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE *RUMINOCOCCUS* SPP., Y DE IGA
ANTI-ROTAVIRUS EN MUESTRAS FECALES DE NIÑOS CON
GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS DE DIFERENTES GRADOS DE
SEVERIDAD: ESTUDIO PILOTO EN POBLACIONES DE GRAN
ASUNCIÓN Y DEL DEPARTAMENTO DE CAAGUAZÚ DURANTE EL
2019”**

ROQUE LUIS MOREL DUARTE

Tutora: Biol. Iara Magaly Martínez, Ph.D.

Co-tutora: Biol. María Eugenia Galeano, M.Sc.

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Mayo, 2022



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEET”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA **DRA. IARA MAGALY MARTÍNEZ PEREIRA**, DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE *RUMINOCOCCUS SPP.*, Y DE IGA ANTI-ROTAVIRUS EN MUESTRAS FECALES DE NIÑOS CON GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS DE DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD: ESTUDIO PILOTO EN POBLACIONES DE GRAN ASUNCIÓN Y DEL DEPARTAMENTO DE CAAGUAZÚ DURANTE EL 2019**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **ROQUE LUIS MOREL DUARTE** optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los ____ días del mes de ____ de 2022.

Tutora: Dra. Iara Magaly Martínez Pereira



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA PROF. LIC. MARÍA EUGENIA GALEANO, COTUTORA, DOCENTE INVESTIGADOR DE LA FACULTAD POLITECNICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE *RUMINOCOCCUS* SPP., Y DE IGA ANTI-ROTAVIRUS EN MUESTRAS FECALES DE NIÑOS CON GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS DE DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD: ESTUDIO PILOTO EN POBLACIONES DE GRAN ASUNCIÓN Y DEL DEPARTAMENTO DE CAAGUAZÚ DURANTE EL 2019**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **ROQUE LUIS MOREL DUARTE** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los ____ días del mes de ____ de 2022.

Co-Tutora: Prof. Lic. María Eugenia Galeano



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc,** COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE *RUMINOCOCCUS* SPP., Y DE IGA ANTI-ROTAVIRUS EN MUESTRAS FECALES DE NIÑOS CON GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS DE DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD: ESTUDIO PILOTO EN POBLACIONES DE GRAN ASUNCIÓN Y DEL DEPARTAMENTO DE CAAGUAZÚ DURANTE EL 2019**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **ROQUE LUIS MOREL DUARTE** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección la docente investigadora **DRA. IARA MAGALY MARTÍNEZ PEREIRA** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los ____ días del mes de ____ de 2022.

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.

Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas

DEDICATORIA

*A mis padres,
A mis hermanos,
por su apoyo y motivación.*

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por apostar en la educación e invertir en la formación profesional de jóvenes en el área científica.

A mi familia; mi papá, mi mamá, mis hermanas, hermano, y a mi sobrino, por el apoyo y la motivación recibida desde el principio.

A mi tutora de tesis, la Dra. Magaly Martínez, por la dedicación, el tiempo y todo el conocimiento y la experiencia valiosa compartida durante todo éste proceso.

A mi co-tutora y a todo el plantel del departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IICS, por haberme recibido como alumno de maestría y también haber aportado a éste trabajo de tesis.

A los departamentos de Producción, Salud Pública y Genética Molecular del IICS, por haber facilitado el uso de equipos y reactivos para el desarrollo de algunos ensayos.

A mis compañeras de laboratorio por la predisposición de ayudar siempre y el apoyo en los momentos difíciles.

A mis compañeros de maestría por haber contribuido a que éste proceso sea más llevadero.

COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE *RUMINOCOCCUS* SPP. Y DE IGA ANTI-ROTAVIRUS EN MUESTRAS FECALES DE NIÑOS CON GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS DE DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD: ESTUDIO PILOTO EN POBLACIONES DE GRAN ASUNCIÓN Y DEL DEPARTAMENTO DE CAAGUAZÚ DURANTE EL 2019

Roque Luis Morel Duarte*, Iara Magaly Martínez Pereira, María Eugenia Galeano****

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

La introducción de las vacunas contra rotavirus (RV) a los programas de inmunización a nivel mundial ha contribuido a un notable descenso en la mortalidad y morbilidad causada por éste patógeno. Sin embargo, pese a la efectividad probada por las vacunas, en la era post-vacunal se han identificado diferencias en el nivel de protección entre países desarrollados y países en vía de desarrollo. La influencia de ciertos comensales bacterianos de la microbiota intestinal en la respuesta a infecciones virales ha sido demostrada. Ésta interacción microbiota-virus también puede afectar la respuesta a las vacunas. Previamente se ha observado en ensayos *in vitro* que *Ruminococcus* spp., un comensal de la microbiota normal, es capaz de unirse a RV e interferir con la infección. Además, la abundancia de *Ruminococcus* spp., ha sido correlacionada negativamente con los títulos de IgA secretoria anti-rotavirus. En el presente estudio piloto se propuso comparar los niveles de *Ruminococcus* spp., y de la IgA anti-rotavirus de acuerdo a la severidad de la gastroenteritis aguda (GEA) en muestras diarreicas de niños vacunados que acudieron a centros de salud en Asunción y el departamento de Caaguazú durante el año 2019. De 171 pacientes elegibles, 50 (29%) fueron positivos para infección por rotavirus A tanto por test inmunocromatográfico como por RT-PCR convencional. La clasificación de la severidad de la GEA aplicando la escala de Vesikari resultó en 6 (12%) casos leves, 24 (48%) moderados y 20 (40%) severos. La cuantificación de la carga bacteriana de *Ruminococcus* spp., se realizó por PCR en tiempo real del gen 16S, donde casos leves de GEA se asociaron significativamente con niveles más altos y los casos severos con niveles más bajos de la bacteria ($p=0,0331$). Además, los casos severos se caracterizaron por presentar una duración más prolongada de los síntomas de diarrea y vómito ($p=0,0003$; $p=0,0020$ respectivamente). Mediante ELISA se cuantificaron los niveles de IgA secretoria en heces, sin encontrarse asociación significativa con la severidad de la GEA ni la carga de *Ruminococcus* spp. Éste trabajo aporta evidencia a favor del posible rol de *Ruminococcus* spp., en la resolución de casos de GEA por rotavirus.

Palabras claves: Rotavirus; Gastroenteritis; Diarrea; Microbiota; *Ruminococcus*; Inmunoglobulina A secretora.

**COMPARISON OF *RUMINOCOCCUS SPP.*, AND IGA ANTI-ROTAVIRUS LEVELS
IN FECAL SAMPLES FROM CHILDREN SUFFERING OF GASTROENTERITIS
BY ROTAVIRUS IN DIFERENT LEVELS OF SEVERITY: PILOT STUDY IN
POPULATIONS FROM GRAN ASUNCIÓN AND DEPARTMENT OF CAAGUAZÚ
DURING THE YEAR 2019**

Roque Luis Morel Duarte*, Iara Magaly Martínez Pereira, María Eugenia
Galeano****

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la
Salud, Universidad Nacional de Asunción

The introduction of vaccines against rotavirus in immunization programs on a global scale has notably contributed to the descent in mortality and morbidity caused by this pathogen. Nonetheless, even though the effectiveness of the vaccines has been proven, in the post-vaccine era the varying levels of protection offered by these have been discovered between developed countries, and developing nations. The influence of certain bacterial species of the gut microbiota in response to viral infections has been proven. This microbiota-virus interaction can also affect the response of some vaccines. It has been previously observed in *in vitro* essays that *Ruminococcus spp.*, a commensal of the normal microbiota, is capable of binding to rotavirus and interfere with the infection. Furthermore, the abundance of *Ruminococcus spp.*, has been negatively correlated with the anti-rotavirus secretory IgA titles. In the present pilot study it is being proposed to compare the levels of *Ruminococcus spp.*, and IgA anti-rotavirus in accordance to the severity of acute gastroenteritis (AGE) in diarrheal sample of vaccinated children who came to clinics in Asunción and the department of Caaguazú during 2019. Of 171 eligible patients, 50 (29%) were positive for rotavirus A infection by both immunochromatographic test and conventional RT-PCR. The classification of the severity of AGE using the Vesikari scale resulted in 6 (12%) mild cases, 24 (48%) moderate and 20 (40%) severe. The quantification of bacterial load of *Ruminococcus spp.*, was done by PCR in real time, where mild cases were significantly associated with highest levels and the most severe cases with the lowest levels of bacteria ($p=0,0331$). In addition, severe cases were characterized by a longer duration of diarrhea and vomiting symptoms ($p=0.0003$; $p=0.0020$, respectively). Through the ELISA, the levels of secretory IgA in feces were quantified, without finding significant association with the severity of the AGE or the load of *Ruminococcus spp.* This work contributes evidence in favor of the possible protective role of the *Ruminococcus spp.*, in the resolution of cases of AGE due to rotavirus.

Keywords: Rotavirus; Gastroenteritis; Diarrhea; Microbiota; *Ruminococcus*; Immunoglobulin A, Secretory.

INDICE

1. MARCO TEÓRICO	18
1.1. Rotavirus. Generalidades	19
1.2. Características clínicas	21
1.3. Parámetros clínicos como medidores de severidad	22
1.4. Inmunidad contra rotavirus	23
1.5. Impacto de la vacunación	25
1.6. El rol de la microbiota intestinal durante infecciones virales	26
1.6.1. Bacterias en la promoción de la patogénesis viral	28
1.6.2. Bacterias en la inhibición de la patogénesis viral	29
1.7. Antecedentes de interacción microbiota-rotavirus	31
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo General	36
2.2. Objetivos específicos	36
3. METODOLOGÍA	37
3.1. Diseño de estudio	38
3.2. Población de estudio	38
3.3. Reclutamiento	38
3.3.1. Criterios de elegibilidad	38
3.3.2. Grupo de controles voluntarios	39
3.4. Detección de rotavirus en materia fecal por test inmunocromatográfico	39
3.5. Fraccionamiento de las muestras y elaboración de base de datos	39
3.6. Clasificación de la severidad de la GEA aplicando el sistema de Puntuación de Vesikari	40
3.7. Extracción de ADN bacteriano de materia fecal	40
3.7.1. Cuantificación de ADN bacteriano	40
3.8. Obtención de plásmido control	40
3.8.1. Amplificación, purificación y clonación de fragmentos de interés	40
3.8.2. Preparación de bacterias químicamente competentes	41
3.8.3. Transformación por choque térmico	42
3.8.4. Comprobación de colonias transformadas mediante PCR de colonias	42
3.8.5. Extracción y purificación de ADN plasmídico	42
3.8.6. Control de calidad de ADN plasmídico y verificación de insertos clonados	43

3.8.7.	Cuantificación de ADN plasmídico y determinación del número de copias	43
3.9.	Generación de curva estándar	43
3.10.	Determinación de la carga bacteriana en muestras de materia fecal	44
3.11.	Preparación de solución fecal al 10%.	44
3.11.1.	Obtención de clarificado proteico	45
3.12.	Cuantificación de IgA total en clarificado fecal como control de calidad	45
3.13.	Detección semi-cuantitativa de anticuerpos IgA secretora anti-rotavirus (sIgA α Rv)	45
3.13.1.	Controles internos de validación	46
3.13.2.	Determinación del rango de diluciones a emplear	46
3.14.	Determinación del punto de corte (<i>Cut off</i>)	46
3.15.	Extracción de ARN viral	46
3.16.	qRT-PCR del gen NSP3 de rotavirus a mu	46
3.17.	Caracterización molecular de rotavirus	47
3.17.1.	Síntesis de ADN complementario	47
3.17.2.	Genotipificación del gen VP7 de rotavirus	47
3.17.3.	Genotipificación del gen VP4 de rotavirus	48
3.17.4.	Electroforesis y visualización de fragmentos esperados	49
3.18.	Análisis estadísticos	49
4.	RESULTADOS	50
4.1.	Características socio-demográficas de la población en estudio	51
4.2.	PCR en tiempo real para cuantificación de carga bacteriana	60
4.2.1.	Control de calidad de ADN plasmídico y verificación de insertos clonados	60
4.2.2.	Determinación del número de copias de plásmidos control	61
4.2.3.	Generación de curva estándar del gen 16S Bacterias totales	61
4.2.4.	Cuantificación de la carga bacteriana por PCR en tiempo real en muestras de materia fecal	63
4.2.5.	Comparación de la carga de Bacterias totales y <i>Ruminococcus spp.</i> , entre grupo de casos y controles sanos	64
4.2.6.	Comparación de la carga de <i>Ruminococcus spp.</i> , según la severidad de la GEA	65
4.3.	Determinación de niveles de IgA anti-rotavirus	66
4.3.1.	Cuantificación de IgA total en clarificado fecal por inmunodifusión radial	66
4.3.2.	Determinación semi-cuantitativa de títulos de sIgA α Rv en muestras de GEA positivos para rotavirus mediante ELISA	66

4.3.3.	Comparación de títulos de sIgA α Rv fecal según la severidad de la GEA	67
4.3.4.	Correlación entre los títulos de sIgA α Rv y niveles de <i>Ruminococcus</i> spp.	68
4.4.	qRT-PCR de casos leves previamente negativos para rotavirus A por test inmunocromatográfico	68
4.5.	Caracterización molecular de rotavirus por PCR convencional	68
4.5.1.	Comparación de la carga de <i>Ruminococcus</i> spp., según genotipo de rotavirus infectante	70
5.	DISCUSIÓN	71
6.	CONCLUSIÓN	79
7.	BIBLIOGRAFÍA	81
8.	ANEXO	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la triple capa proteica de rotavirus.....	20
Figura 2. Modelo de las primeras interacciones RV-célula	21
Figura 3. Eficacia de las vacunas orales contra rotavirus en relación con el PIB per cápita de un país	26
Figura 4. Esquema de reclutamiento y filtro de muestras para el estudio.....	52
Figura 5. Tasa de detección de casos de gastroenteritis por rotavirus	53
Figura 6. Proporción de casos según severidad de la GEA aplicando la escala de Vesikari	57
Figura 7. Presentación clínica de síntomas de GEA evaluados en la escala de Vesikari	59
Figura 8. Correlación de Spearman entre el síntoma de diarrea y la severidad de la GEA según Vesikari.....	60
Figura 9. Correlación de Spearman entre el síntoma de vómito y la severidad de la GEA según Vesikari.....	60
Figura 10. Correlación de Spearman entre tipo de tratamiento, temperatura máxima registrada y la severidad de la GEA según Vesikari	61
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación de clones obtenidos	61
Figura 12. Curva estándar 16S ARNr dominio Bacteria.....	63
Figura 13. Curva estándar 16S ARNr <i>Ruminococcus</i> spp	64
Figura 14. Comparación de niveles de Bacterias totales entre el grupo de GEA positivos para rotavirus y el grupo control.....	65
Figura 15. Comparación de niveles de <i>Ruminococcus</i> spp., entre el grupo de casos de GEA positivos para rotavirus y el grupo control	66
Figura 16. Comparación de niveles de <i>Ruminococcus</i> spp., según la severidad de la GEA	66
Figura 17. Determinación del punto de corte para ELISA semi-cuantitativo de IgA α RV	67
Figura 18. Prueba para determinación de rango de dilución a emplear en ELISA para IgA α RV	68
Figura 19. Títulos de sIgA α Rv según severidad de la GEA	69
Figura 20. Distribución de genotipos de rotavirus detectados	70
Figura 21. Distribución de genotipos de rotavirus detectados según severidad de la GEA	70

Figuras suplementarias

Figura S1. Proporción de casos de GEA positivos para rotavirus de acuerdo al rango etario.....	90
Figura S2A. Comparación de niveles de Bacterias totales entre niños de la población estudiada nacidos por parto normal y por cesárea	90
Figura S2B. Comparación de niveles de <i>Ruminococcus</i> spp., entre niños de la población estudiada nacidos por parto normal y por cesárea.....	91
Figura S3A. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN plasmídico purificado (sin digerir).....	91
Figura S3B. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN plasmídico purificado (sin digerir).....	92
Figura S4. Comparación de niveles de Bacterias totales entre el grupo control y grupos de severidad según Vesikari.....	92
Figura S5. Comparación de niveles de Bacterias totales de acuerdo al número máximo de deposiciones en un día.....	93
Figura S6. Cuantificación de IgA total en clarificado fecal por inmunodifusión radial.....	93
Figura S7. Correlación de Spearman entre los títulos de sIgA α Rv y los niveles de <i>Ruminococcus</i> spp.....	94
Figura S8. Detección del gen NSP3 de rotavirus por qRT-PCR.....	94
Figura S9. Comparación de los niveles de <i>Ruminococcus</i> spp., de acuerdo al genotipo de rotavirus infectante	95

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros y puntuaciones del sistema de puntuación de gravedad clínica de Vesikari	23
Tabla 2. Mecanismos de promoción de la patogénesis viral.....	29
Tabla 3. Mecanismos de inhibición de la patogénesis viral.....	31
Tabla 4. Características socio-demográficas de casos positivos de GEA y controles	54
Tabla 5. Características socio-demográficas según procedencia de casos positivos de GEA por rotavirus	56
Tabla 6. Características socio-demográficas según severidad de la GEA	58
Tabla 7. Lectura del ADN plasmídico purificado y determinación del número de copias	62
Tabla 8. Diluciones de ADN plasmídico empleadas para generación de curva estándar del gen 16S ARNr Bacterias totales.....	63
Tabla 9. Diluciones de ADN plasmídico empleadas para generación de curva estándar del gen 16S ARNr <i>Ruminococcus</i> spp.	64
Tabla 10. Proporción (%) de títulos de sIgA α Rv según severidad de Vesikari.....	68
Tabla 11. Lecturas de razón de pureza y concentración de ADN.....	101
Tabla 12. Valores de puntaje final de Vesikari, ciclo umbral y número de copias de ADN	104
Tabla 13. Valores de ciclo umbral y número de copias de ADN (muestras de grupo control).....	107
Tabla 14. Niveles de IgA total y títulos de IgA específica contra rotavirus en muestras de clarificado fecal	108
Tabla 15. Cebadores empleados para cuantificación de carga bacteriana por qPCR.....	109
Tabla 16. Cebadores empleados para detección del gen NSP3 de rotavirus por RT-qPCR	109
Tabla 17. Cebadores empleados para genotipificación del gen VP7 de rotavirus por RT-PCR Múltiple Semi-Anidada.....	110
Tabla 18. Cebadores empleados para genotipificación del gen VP4 de rotavirus por RT-PCR Múltiple Semi-Anidada.....	111
Tabla 19. Resultados de secuenciación del gen VP7 y VP4 de rotavirus.....	112

ABEVIATURAS

RV: rotavirus

RVA: rotavirus de grupo A

VP: del inglés *viral protein*

NSP: del inglés *non-structural protein*

ARN: ácido ribonucleico

ADN: ácido desoxirribonucleico

HBGA: antígeno de grupo histosanguíneo

GEA: gastroenteritis aguda

IgA: inmunoglobulina A

sIgA α Rv: inmunoglobulina A secretora anti-rotavirus

PAI: Programa Ampliado de Inmunizaciones

OMS: Organización Mundial de la Salud

LPS: lipopolisacárido

MMTV: virus del tumor mamario murino

VEV: virus de la estomatitis vesicular

VHS: virus del herpes simple

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VIS: virus de la inmunodeficiencia simia

IL: interleucina

TLR: receptor de tipo Toll

IFN: interferon

EcN: *Escherichia coli* Nissle

LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG

BFS: bacteria filamentosa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

dPCR: reacción en cadena de la polimerasa digital

Ct: ciclo umbral

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

dNTP: deoxinucleósido trifosfato

EDTA: Etilen diamino tetra acético

TAE: Tris-acetato-EDTA

PBS: tampón fosfato salino

IDR: inmunodifusión radial

DO: densidad óptica

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Rotavirus. Generalidades

Los rotavirus son la causa más frecuente de enfermedad diarreica aguda en niños menores de 5 años en todo el mundo. La carga de la enfermedad actualmente se estima en 215.000 muertes por año, principalmente en países en desarrollo, a pesar de la introducción mundial de la vacunación (1,2).

Son muy contagiosos debido a que durante la fase aguda de la infección se excretan grandes cantidades del virus en materia fecal, sumado al hecho de que es necesario un bajo número de partículas virales para infectar al hospedero y a la gran capacidad del virus de resistir a condiciones extremas del ambiente, como el pH y la temperatura (3).

Los rotavirus son un género perteneciente a la familia *Sedoreoviridae*, orden *Reovirales*. La partícula viral posee una cápside compuesta por tres capas de proteínas concéntricas que encierran al genoma compuesto por 11 segmentos de ARN de doble cadena. Cada gen codifica para 6 proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y 6 no estructurales (NSP1-NSP5 y NSP6) (**Figura 1**). El núcleo está formado por la proteína VP2 y en ella se encuentran las proteínas VP1 y VP3, encargadas de las funciones enzimáticas necesarias para la transcripción de genes virales. El género *Rotavirus* puede clasificarse en 10 especies (A- J) según la reactividad serológica de la proteína de la cápside intermedia VP6. De estos grupos, sólo la especie A (RVA) es responsable del 99% de la enfermedad en humanos. Las proteínas no estructurales están involucradas mayormente en la replicación del genoma viral, el control de la síntesis proteica, la evasión de la respuesta inmune, entre otras funciones. RVA se subclasifica en genotipos, en base a la variación de los genes que codifican las proteínas VP7 y VP4 de la superficie del virión, que permiten clasificar a los rotavirus por medio de un sistema de nomenclatura dual donde la secuencia de nucleótidos de VP7 determina los genotipos G y la secuencia de VP4 los genotipos P (4).

Pese a la diversidad genómica de rotavirus, solo unos pocos genotipos han sido los más prevalentes a nivel mundial en las últimas décadas: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y más recientemente G9P[8] y G12P[8] (3).

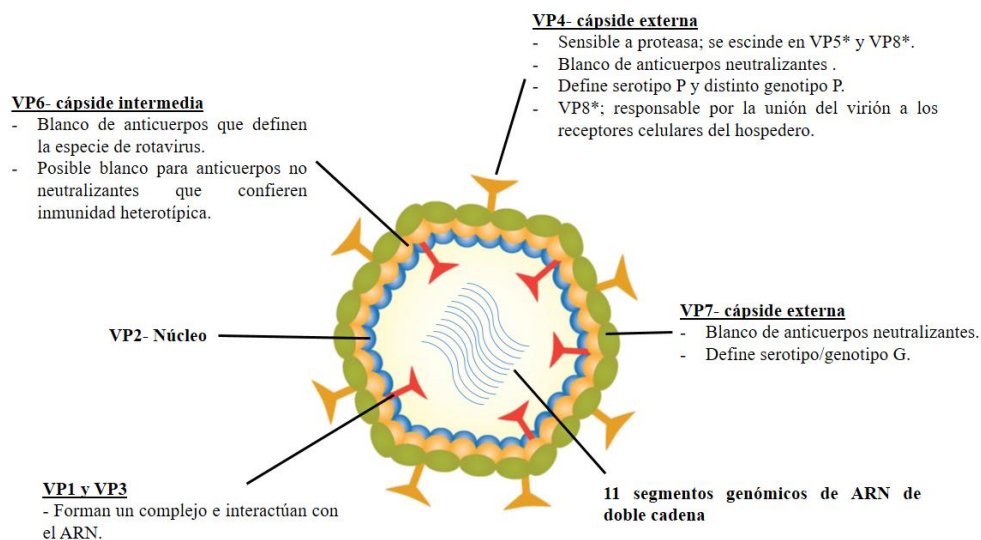


Figura 1. Estructura de la triple capa proteica de rotavirus. Figura adaptada de Clark & Desselberger (5).

En la estructura de rotavirus, las proteínas VP7 y VP4 intervienen en la entrada de rotavirus a la célula y a su vez, inducen anticuerpos neutralizantes por lo que son la base de la protección conferida por la vacunación (5). La entrada de los rotavirus a la célula es un mecanismo complejo que incluye sucesivos pasos como la unión a receptores y la internalización a través de la membrana celular (6). La proteína VP4 es clave en la unión inicial de rotavirus a los receptores, durante el cual se escinde por proteólisis en dos fragmentos, VP5* y VP8* (**Figura 2**). El ingreso a la célula es mediante unión de VP8* a glicanos de superficie, como el ácido siálico en algunas cepas de rotavirus, además de la interacción de VP5* con varios co-receptores en los pasos siguientes. Estudios recientes han identificado que VP4 se une a otro tipo de receptor de una manera cepa-dependiente: el antígeno del grupo histo-sanguíneo (HBGA) (4,7).

Los HBGA son un grupo de carbohidratos complejos (antígenos) presentes en superficies de células epiteliales y en algunos fluidos biológicos. La síntesis de HBGA está dada por la adición secuencial de monosacáridos a precursores iniciales. Ésta reacción está catalizada por glicosiltransferasas codificadas por tres familias principales de genes HBGA: secretor, Lewis y ABO (8). El gen secretor codifica una -1,2 fucosiltransferasa (FUT2), el gen Lewis codifica una -1,3 o -1,4 fucosiltransferasa (FUT3), mientras que la familia ABO codifica dos glicosiltransferasas (enzimas A y

B). El estatus dictado por el polimorfismo de estos genes está relacionado directamente a la susceptibilidad a la infección por RVA según su afinidad a los genotipos P de la VP4. Los HBGA también son marcadores de la susceptibilidad a la infección de otros virus entéricos como los norovirus (9,10). Cabe señalar, que se han observado interacciones de este tipo entre virus entéricos como rotavirus y norovirus con bacterias comensales que poseen estructuras tipo HBGA en su superficie, como *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Citrobacter spp* y otras (9). Múltiples pasos subsecuentes, dependen de la interacción de VP5* y VP7 para continuar el proceso de entrada (6,11).

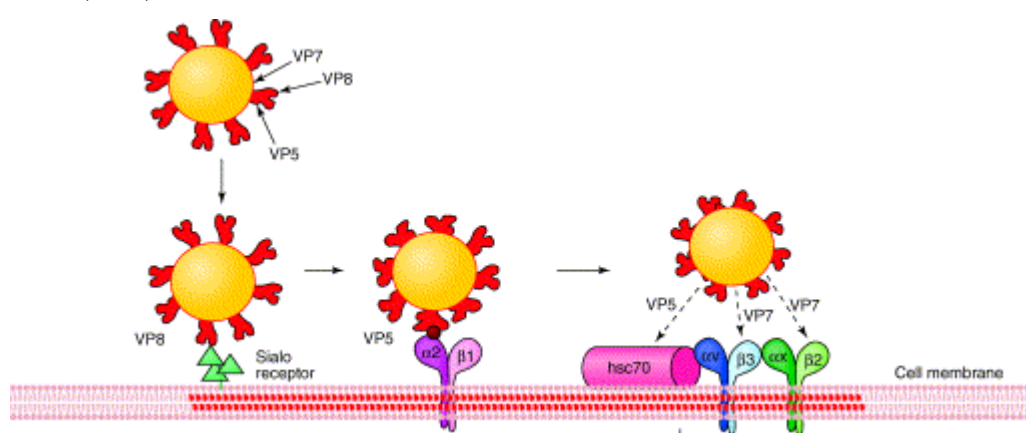


Figura 2. Modelo de las primeras interacciones RV-célula. Figura adaptada de López & Arias (12).

1.2. Características clínicas

Los rotavirus se replican principalmente en el intestino delgado e infectan a enterocitos de las vellosidades intestinales, presentando un periodo de incubación relativamente corto de 1-3 días. La infección en niños puede resultar asintomática o sintomática, caracterizada por la aparición de episodios de diarrea acuosa, durante los cuales se excretan grandes cantidades de partículas virales. La vía fecal-oral es la ruta de transmisión principal, ya sea por contacto directo de persona a persona o a través de fómites contaminados. La diarrea puede estar acompañada de vómito, lo que en ocasiones dificulta los tratamientos de re-hidratación oral, falta de apetito, decaimiento y fiebre. Si los síntomas no son tratados a tiempo y de forma adecuada, pueden agravar el desequilibrio electrolítico generado por la pérdida excesiva de minerales y conducir a un cuadro de deshidratación severa (3,13,14). Las infecciones sintomáticas en neonatos son poco frecuentes debido a la protección mediada por los anticuerpos maternos, al menos durante las primeras semanas de vida. La reducción gradual de

estos anticuerpos coincide con la edad (3-24 meses) en la que la probabilidad de infección asociada a la enfermedad grave por rotavirus es mayor (15). Luego de la introducción de la vacuna, la diarrea acuosa fue el síntoma más frecuente en reportes de algunos países, sin embargo la proporción de manifestaciones clínicas de la diarrea pediátrica tuvo variaciones entre países y regiones, y a pesar de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó el monitoreo de los casos de diarrea acuosa para la vigilancia de la enfermedad causada por RVA, la definición de casos de los cuadros de diarrea debe ser re-analizada en un escenario de cambio de la etiología de la enfermedad en la era post-vacunación de rotavirus (16).

1.3. Parámetros clínicos como medidores de severidad

Los sistemas de puntuación constituyen una herramienta importante para la valoración de la gravedad clínica de la gastroenteritis aguda, las principales son la escala de Vesikari y la de Clark, en las cuales una puntuación más alta indica una mayor severidad de la GEA. Si bien ambas escalas evalúan la magnitud y la duración de los síntomas principales, el sistema de puntuación de Clark evalúa además síntomas conductuales, mientras que la escala de Vesikari tiene en cuenta el grado de deshidratación y el tipo de tratamiento recibido (17).

En la **Tabla 1** se muestra el sistema de puntuación de Vesikari, la más utilizada para la evaluación de la eficacia y efectividad de las vacunas contra rotavirus. Ésta escala toma como parámetros los principales síntomas (diarrea, vómito, fiebre), grado de deshidratación y el tipo de tratamiento recibido, y asignándoles una puntuación que va del 1 al 3, en función a la gravedad, intensidad y duración, permite clasificar el cuadro de gastroenteritis en leve, moderado o severo según el puntaje final acumulado (18,19).

Tabla 1. Parámetros y puntuaciones del sistema de puntuación de gravedad clínica de Vesikari*

PARÁMETRO	PUNTAJE		
	1	2	3
<i>Diarrea</i>			
Nº máximo de deposiciones por día	1-3	4-5	≥6
Duración de la diarrea (días)	1-4	5	≥6
<i>Vómito</i>			
Nº máximo de vómitos por día	1	2-4	≥5
Duración del vómito (días)	1	2	≥3
Temperatura	37,1-38,4	38,5-38,9	≥39,0
Deshidratación	N/A	1-5%	≥6%
Tratamiento	Rehidratación	Hospitalización	N/A

Clasificación de la GEA según puntaje acumulado

<7 puntos: Leve

7-10 puntos: Moderado

≥11 puntos: Severo

*Tabla adaptada de Lewis et al., (19)

1.4. Inmunidad contra rotavirus

Las respuestas inmunitarias innatas del hospedero frente a la infección por rotavirus están mediadas principalmente por la activación de los factores de transcripción que estimulan la producción de interferones (IFNs). Los ensayos *in vitro* e *in vivo* han mostrado que los IFN de tipo I y III son capaces de limitar la infección. Sin embargo, mediante su proteína no estructural NSP1, rotavirus es capaz de evadir éstas respuestas promoviendo la degradación de los factores de transcripción (20).

Los linfocitos B secretores de anticuerpos, y linfocitos T que reconocen epítomos de RV en las superficies de células infectadas vía MHC I y MHC II, median las respuestas inmuno-específicas. Las proteínas de superficie VP7 y VP4 de rotavirus inducen anticuerpos neutralizantes. Se ha visto que posterior a una infección natural o inmunización, se pueden desarrollar anticuerpos contra otras proteínas estructurales como VP2 y VP6, y contra no estructurales como la NSP4 (3,20).

La infección por rotavirus en humanos no genera inmunidad de tipo esterilizante pero puede proteger contra la forma severa de la gastroenteritis en futuras infecciones, independientemente de si la primera infección haya sido sintomática o asintomática. Durante la primera exposición al virus, se induce predominantemente inmunidad

homotípica y tras sucesivas infecciones, incluso con el mismo genotipo, se logra la inmunidad heterotípica (5).

La inmunoglobulina A secretora (sIgA) es la clase de anticuerpo más abundante en el lumen intestinal de los humanos y de otros mamíferos, y se constituye en la primera línea de defensa del epitelio intestinal contra patógenos entéricos como rotavirus, por tanto el nivel de IgA intestinal es considerado importante en la respuesta inmune del hospedero frente a la infección (21).

A diferencia de la IgA monomérica encontrada en suero, en el intestino predomina en su forma dimérica la cual consiste en dos monómeros enlazados por medio de extensiones del dominio Ig terminal de su fracción Fc y una proteína de unión llamada cadena J. La estructura polimérica de IgA es fundamental para su transporte activo en las superficies de la mucosa y su posterior secreción. El transporte es mediado por el receptor para IgA polimérica (pIgR), que además aporta el componente secretor que se une covalentemente a una fracción del anticuerpo y constituye una parte integral del complejo sIgA (22).

Aunque rotavirus infecta el intestino delgado, se ha demostrado que la IgA fecal predice los niveles de IgA en el duodeno, y por lo tanto puede usarse como una medida de la IgA intestinal (4,23,24).

La identificación de los determinantes de protección tras una infección o luego de la vacunación se ha basado mayormente en el estudio de los títulos séricos de IgG, y en especial IgA sérica, pese a que su uso como predictor de protección sigue siendo controversial. En comparación con los anticuerpos séricos, se cree que los producidos localmente en el intestino tengan un papel más preponderante en la protección de la enfermedad (3,25). Por otra parte, los niveles de IgA anti-rotavirus también pueden ser utilizados como un indicador de infecciones previas, constituyendo un marcador de susceptibilidad. Las evidencias apuntan a que individuos con mayores títulos de sIgA (específica) tienen mayor susceptibilidad a la infección por rotavirus y norovirus (y viceversa), y este perfil a su vez se asocia con el fenotipo de HBGA del individuo (26,27). Sumado a ello, se ha visto una correlación entre el perfil susceptibilidad/IgA/HBGA con la proporción de ciertas bacterias presentes en el intestino, como *Akkermansia spp* y *Ruminococcus spp* (26). Sin embargo el rol y la

relevancia de estas interacciones en el desarrollo de la infección todavía quedan por determinarse (9).

1.5. Impacto de la vacunación

Desde el año 2006 se encuentran disponibles en el mercado la vacuna oral monovalente Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Bélgica) desarrollada en base a una cepa humana atenuada G1P1A[8], la cual es administrada en dos dosis orales a las 6 y 10 semanas de edad; RotaTeq® (Merck & Co., Inc., USA) en cambio es una vacuna pentavalente creada a partir de virus recombinantes humanos-bovinos, que contiene los genes que codifican para las proteínas humanas G1-G4 y P1[8], es administrada en tres dosis a las 6, 10 y 14 semanas de edad (5). Actualmente existen más vacunas que cuentan con aprobación, aunque su distribución aún no está muy extendida (28). En el 2009 la OMS recomendó a la población mundial, y en especial a aquellos países con mayor tasa de mortalidad infantil, incluir la vacunación contra rotavirus a sus programas de vacunación (13). En nuestro país, la Rotarix® forma parte del Programa Nacional de Inmunización (PAI) desde el año 2010.

Antes de la introducción de las vacunas, rotavirus era la principal causa de mortalidad infantil asociada a diarrea aguda, ocasionando anualmente más de 500.000 muertes de niños menores de 5 años en todo el mundo. Desde la introducción de ambas vacunas se ha observado un notable descenso de los casos graves de gastroenteritis por rotavirus, así como del número de hospitalizaciones y la tasa de mortalidad, demostrando la eficacia de las mismas. Un efecto adicional observado en países que han implementado la vacunación contra rotavirus es la inmunidad de rebaño, que ha permitido extender la protección conferida por la vacuna a niños que no han sido inmunizados, niños mayores de 5 años e inclusive adultos (13,29,30).

Los programas de inmunización no solo tienen un efecto fundamental en la prevención de la enfermedad o la reducción de la severidad, la carga de la enfermedad tiene también un impacto en los costos en la salud pública debido al aumento del número de consultas y hospitalizaciones, especialmente durante la temporada estacional de rotavirus. Otro factor implicado de forma indirecta son las bajas escolares de los niños durante el transcurso de la infección, y esto a su vez implica faltas laborales de los padres que deben hacerse cargo de los cuidados del niño (31).

Como se observa en la **Figura 3**, la eficacia de las vacunas Rotarix® y RotaTeq®, puede observarse sobre todo en países desarrollados, donde se han reportado niveles de protección por encima del 90%, en contraste con estudios realizados en países en desarrollo en los cuales el rendimiento para las mismas vacunas son inclusive menores al 50% (32–34).

Las causas de las diferencias en el nivel de protección observadas entre países desarrollados y en vía de desarrollo apuntan a varios factores, tales como la transmisión pasiva de anticuerpos maternos, el estado nutricional del niño, co-infección con otros patógenos gastrointestinales, la interferencia con la vacunación contra poliovirus, factores genéticos del hospedero y la composición de la microbiota (35).

En los últimos años ha crecido el interés por el estudio de la microbiota intestinal como factor clave en la patogénesis de virus, y por ende su impacto en la inmunidad del hospedero.

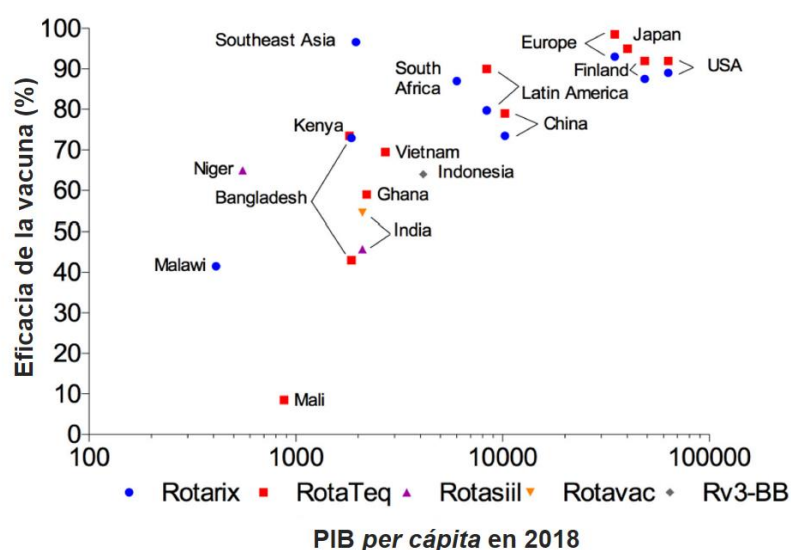


Figura 3. Eficacia de las vacunas orales contra rotavirus en relación con el PIB per cápita de un país. La eficacia de 4 vacunas orales contra rotavirus (Rotarix, RotaTeq, Rotavac y Rotasiil) se muestran en países con diferente producto interno bruto (PIB). Figura adaptada de Cárcamo-Calvo et al., (34).

1.6. El rol de la microbiota intestinal durante infecciones virales

El cuerpo humano se encuentra habitado tanto por dentro como por fuera por millones de microorganismos, entre microbios eucarióticos, arqueas, virus y bacterias que en conjunto conforman el microbioma humano. A lo largo de la evolución, estos microorganismos y el ser humano han establecido una relación de simbiosis en la cual

el hospedero ofrece un nicho nutritivo para el crecimiento y la supervivencia de los comensales, y en cambio éstos participan de procesos fisiológicos como la degradación de alimentos de la dieta para la obtención de nutrientes, regulación de las respuestas del sistema inmune y compitiendo con patógenos para evitar que éstos colonicen (36–38).

De todo el cuerpo, el tracto intestinal humano es el sitio más densamente poblado por éstas comunidades microbianas y el que presenta mayor diversidad. Su colonización se caracteriza por ser un proceso paulatino, dinámico y que ocurre de forma no aleatoria, desde el momento del nacimiento o incluso antes (36). De hecho, el establecimiento de comensales en las primeras etapas de la vida es un determinante para el correcto desarrollo y maduración del sistema inmune (39).

Su composición se puede ver afectada por múltiples factores desde el nacimiento mismo, como el tipo de parto y posteriormente la alimentación con leche materna o de fórmula durante el primer año de vida, y a medida que el individuo se desarrolla, ciertos hábitos como el estilo de vida, el tipo de dieta y el consumo de medicamentos van influyendo. Factores genéticos e inmunológicos del hospedero también tienen un impacto en el establecimiento de la microbiota (40,41).

El mantenimiento de la homeostasis intestinal es el resultado de un delicado balance interactivo entre la microbiota, el epitelio intestinal y el sistema inmune del hospedero, en donde se desarrolla tolerancia inmunitaria contra antígenos extraños que forman parte del microambiente normal del tracto intestinal, pero permanece activa ante la presencia de potenciales patógenos (42).

El advenimiento de la secuenciación de nueva generación y con ello la posibilidad de estudiar la microbiota sin necesidad de cultivo, ha revolucionado el conocimiento sobre la influencia de la misma en la homeostasis intestinal.

Los virus son entidades que obligatoriamente necesitan infectar a un hospedero y utilizar la maquinaria celular para poder replicarse. Su entrada al cuerpo humano ocurre principalmente a través de la piel y las mucosas de la superficie, que se encuentran colonizadas por miles de microorganismos cumpliendo un rol en la regulación del sistema inmune y la defensa del hospedero. Durante el proceso infeccioso, es posible que se establezca una estrecha interacción entre los virus invasores y taxas bacterianas específicas del microbioma intestinal humano, a través

de mecanismos directos o indirectos, que pueden resultar en una inhibición de la patogénesis viral, o contrariamente, un potenciamiento. Los mecanismos directos ocurren por una interacción física virus-microbiota sin intermediarios, mientras que los mecanismos indirectos se dan por una estimulación/regulación de componentes del sistema inmune del hospedero (43,44).

1.6.1. Bacterias en la promoción de la patogénesis viral

Algunos de los mecanismos que potencian la infección viral se describen en la **Tabla 2**. Un mecanismo compartido por varios virus entéricos es a través de la interacción con sustancias presentes en la superficie de ciertas bacterias, que pueden conferir estabilidad a la partícula viral y también estimular la unión a sus células diana. Robinson et al., (45) observaron como la incubación de poliovirus con polisacáridos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS), ayudó a potenciar la unión del virión al receptor de poliovirus expresados por las células. Además, la exposición a LPS contribuyó a incrementar la termoestabilidad. Estudios con reovirus también han mostrado la capacidad de polisacáridos bacterianos de mejorar la estabilidad de la partícula viral (46).

De manera similar, algunos norovirus humano y murino requieren la presencia de bacterias comensales expresando HBGAs en sus superficies para poder infectar linfocitos B. Ratones que fueron tratados con antibióticos presentaron una disminución en la replicación de norovirus, sugiriendo el rol de HBGA bacteriano en facilitar la unión de norovirus a los receptores de celulares (44).

Ciertas bacterias de la microbiota o sus componentes, son capaces de inducir señales a nivel inmune que promueven el establecimiento de un ambiente tolerogénico y por lo tanto la persistencia de la infección. En un estudio con ratones tratados previamente con antibióticos y luego desafiados con norovirus humano, se observó que si bien no hubo un efecto sobre la replicación viral y sobre la infección a nivel tisular, la persistencia de la infección si se vió afectada, mediante la participación de receptores para citocinas y factores de transcripción implicados en la respuesta antiviral de la inmunidad innata (47).

Otra evidencia que soporta la influencia de comensales durante una infección viral se ha reportado con ratones tratados con antibióticos, cuya descendencia no desarrolló respuesta a antígenos del virus del tumor mamario murino (MMTV) cuando fueron

desafiados oralmente. El MMTV se une a LPS que estimula a TLR-4, con la subsiguiente producción de IL-6 que induce a la producción de la citosina inhibitoria IL-10. En ausencia de bacterias expresando LPS, la infección por MMTV fue inhibida, y no pudo transmitirse a la descendencia. Éste hallazgo propone que el MMTV ha evolucionado con la microbiota para inducir la evasión inmune (48).

Otro mecanismo exhibido por las bacterias es la promoción de la recombinación genética de virus de ARN. Se ha observado con poliovirus, que múltiples viriones pueden unirse a la superficie de una única bacteria, lo cual puede aumentar la posibilidad de co-infección en células susceptibles, resultando en una recombinación del genoma viral, cuya progenie podría adquirir una ventaja frente a condiciones restrictivas (49).

Tabla 2. Mecanismos de promoción de la patogénesis viral por bacterias

Mecanismo directo	Interacción	
	Virus	Bacteria
Potenciamiento de la estabilidad de la partícula viral	Poliovirus Reovirus	LPS, Peptidoglicanos ^a
Incremento de la afinidad de unión a receptores de poliovirus	Poliovirus	LPS, Peptidoglicanos ^a
Control de la replicación viral	Norovirus	<i>Enterobacter cloacae</i>
Mecanismo indirecto	Interacción	
	Virus	Bacteria
Inducción de tolerancia inmune a antígenos virales	Norovirus	En ausencia de microbiota
Inducción de síntesis de citocinas inhibitoras	MMTV	LPS
Promoción de recombinación genética	Poliovirus	<i>Lactobacillus johnsonii</i>

LPS: lipopolisacárido; **MMTV:** virus del tumor mamario murino

^a Componentes de pared bacteriana

1.6.2. Bacterias en la inhibición de la patogénesis viral

Por otro lado, la microbiota también alberga bacterias que actúan a favor del hospedero limitando la infección viral por diferentes mecanismos, como se resume en la **Tabla 3**.

Algunas bacterias lácticas como las del género *Lactobacillus*, han demostrado su capacidad de reducir la infectividad del virus de la estomatitis vesicular (VEV) en

líneas celulares, a través de una unión directa al virus. Además, durante su crecimiento éstas bacterias fueron capaces de producir metabolitos con actividad antiviral (50).

Los polisacáridos de superficie bacteriana también pueden influir negativamente en la patogénesis viral. Bandoro y Runstadler (51) observaron que la exposición a LPS de aislados bacterianos al virus de la influenza A redujo significativamente la estabilidad de la partícula viral. Además, los ensayos de microscopía electrónica y de unión a receptor, evidenciaron que la interacción virus-bacteria mediada por LPS fue responsable de alterar la morfología de la partícula viral. Un mecanismo de inhibición similar fue visto con fragmentos de pared celular de *Lactobacillus brevis* y el virus del herpes simple 2 (VHS-2) (52).

Chen et al., (53) lograron identificar a una proteína de unión a matriz extracelular presente en la pared de *Staphylococcus epidermis* (*S. epidermis*) con actividad contra el virus de la influenza. Los ensayos *in vitro* con sobrenadante de cultivos de *S. epidermis* mostraron una significativa supresión de la infectividad viral. Cuando los pollos fueron inoculados con la proteína identificada antes del desafío con el virus de la influenza, se observó una disminución de los títulos virales, así como una inducción para la expresión de citocinas con actividad antiviral en los tejidos nasales.

Sustancias secretadas por ciertas bacterias también pueden ser responsables de la actividad antiviral observada. Se ha asociado la abundancia de Lactobacilos en la microbiota vaginal de mujeres en edad reproductiva, con un estado de salud y protección contra enfermedades de transmisión sexual como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Ensayos con cultivo de tejido cérvico vaginal han mostrado la capacidad de *Lactobacillus* de inhibir la replicación del VIH-1 a través de la liberación de ácido láctico con poder virucida y acidificación del medio. Además *Lactobacillus* es capaz de adsorber al VIH-1, y disminuir de ésta forma la cantidad de viriones libres (54).

El impacto de la microbiota intestinal también fue evaluado en un modelo de infección por el virus de la inmunodeficiencia simia (VIS) en macacus rhesus que fueron tratados primeramente con antibióticos y posteriormente recibieron un trasplante de microbiota. La reposición de la microbiota intestinal resultó en un potenciamiento de la inmunidad antiviral con la producción de células Th17 y Th2 periféricas, además de una disminución de la activación de linfocitos CD4+ en tejidos gastrointestinales (55).

La actuación de bacterias intestinales también puede tener un efecto a nivel sistémico. El suministro de *Lactobacillus plantarum* DK119 como terapia probiótica ha mostrado resultados beneficios en las infecciones por el virus de la influenza. Además de inducir un aumento en la producción de IL-12 e IFN y disminuir la carga viral en los pulmones, se ha visto que un aumento en el número de células inmunitarias en los pulmones a través de la secreción de metabolitos que estimulan el desplazamiento de macrófagos, células NK y células dendríticas, al lugar de infección (56).

Tabla 3. Mecanismos de inhibición de la patogénesis viral por bacterias

Mecanismo directo	Interacción	
	Virus	Bacteria
Unión a partícula viral y bloqueo de la infección	VEV	<i>Lactobacillus</i>
Unión a partícula viral y desestabilización morfológica	VHS-2 Influenzavirus	LPS ^a
Adsorción de virión libre y liberación de metabolito virucida	VIH-1	<i>Lactobacillus</i>
Mecanismo indirecto	Interacción	
	Virus	Bacteria
Inducción de citocinas con actividad anti-viral	Influenza virus	<i>S. epidermis</i>
Potenciamiento de la inmunidad innata local	VIS	Microbiota total
Estimulación de respuesta inmune a nivel sistémico	Influenza virus	<i>L. plantarum</i>

LPS: lipopolisacárido; **VEV:** Virus de la estomatitis vesicular; **VHS-2:** Virus del herpes simple tipo 2; **VIH-1:** Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1; ***S. epidermis:*** *Staphylococcus epidermis*; **VIS:** Virus de inmunodeficiencia simia; ***L. plantarum:*** *Lactobacillus plantarum*.

^a Componentes de pared bacteriana

1.7. Antecedentes de interacción microbiota-rotavirus

Al igual que otros virus entéricos, la interacción entre rotavirus y miembros comensales del tracto gastrointestinal es inevitable, por lo que es lógico pensar sobre la influencia que podrían tener las bacterias sobre la patogénesis viral. Pese a ser un área de estudio relativamente nueva, los hallazgos en los últimos años sustentan ésta hipótesis, y de a poco los mecanismos de interacción comienzan a ser dilucidados. Se ha propuesto que la composición de la microbiota intestinal es uno de los factores asociados a diferencias en la eficacia de las vacunas. El perfil microbiano de niños provenientes de países en dónde se ha reportado una elevada efectividad de las vacunas se ha asociado a grupos bacterianos característicos, distintos al microbioma intestinal

de niños de países en dónde contrariamente la vacuna ha resultado ser menos efectiva (57,58).

Los modelos experimentales basados en la administración de antibióticos antes del desafío con rotavirus han demostrado como la ausencia de grupos bacterianos específicos puede afectar el curso de la infección. En uno de estos trabajos, Uchiyama et al., observaron que la depleción de la microbiota intestinal en ratones previo al desafío con una cepa vacunal de rotavirus, resultó en una reducción de la infectividad y de la duración de la diarrea (59). En otro estudio sin embargo, el tratamiento con antibióticos permitió el establecimiento de un micro-ambiente favorable para la replicación de rotavirus (60). La discrepancia en los resultados evidencia el rol dual de la microbiota, y destacan la importancia en la identificación específica de taxones bacterianos de la microbiota normal, y su caracterización funcional durante un proceso infectivo.

El rol de bacterias probióticas, en especial las del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, como terapia de apoyo para el tratamiento de la gastroenteritis por rotavirus, ha resultado ser efectiva en la reducción de los síntomas y de la duración de la diarrea (61,62). La colonización de lechones gnobióticos con la cepa probiótica *Eschericia coli* Nissle (EcN) ha mostrado ser protectora frente a la infección por rotavirus, observándose una disminución del *shedding* viral que a su vez se correlacionó con títulos bajos de IgA anti rotavirus a nivel intestinal. Además, los ensayos *in vitro* han mostrado la capacidad de EcN de interactuar físicamente con rotavirus, uniéndose directamente a la partícula viral (63).

De manera similar a EcN, bacterias filamentosas segmentadas (BFS) también fueron capaces de reducir la infectividad por una unión directa a rotavirus en ensayos *in vitro*. Además de bloquear la unión de la partícula viral a los receptores celulares, las BFS pueden contribuir con el hospedero a través de mecanismos independientes de células inmunitarias, induciendo cambios en la expresión de genes para la aceleración del recambio de células epiteliales (64).

El tratamiento a ratones con flagelina, una proteína componente del flagelo bacteriano, ha demostrado ser protectoro contra la infección por rotavirus, al ser capaz de activar receptores de la inmunidad innata para la inducción de interleucinas que median la

eliminación de células infectadas y promueven una mayor resistencia de las células epiteliales por medio de una reprogramación de la expresión de genes (65).

A pesar de la importancia de éste nuevo concepto de interacción entre microbiota y patógenos virales, la evidencia respecto al rol de bacterias intestinales en la infectividad de rotavirus es aún escasa y gran parte de los datos provienen de modelos animales e *in vitro*, o ensayos que involucran terapias con antibióticos. Los datos en población humana adulta y en niños (grupo vulnerable), son escasos y los mismos corresponden a estudios de seroconversión luego de la vacunación. Además, hasta la fecha los estudios en humanos, publicados en revistas indexadas, se basan mayormente en resultados con un bajo número de tamaño muestral debido a la naturaleza misma de los datos.

Sin embargo, ciertas líneas de estudio han logrado acumular evidencia específica que sugieren un rol para algunas taxas bacterianas. Un ejemplo concreto corresponde al trabajo realizado por Rodríguez-Díaz et al., (26) quienes estudiando a una población de 23 adultos voluntarios, demostraron una correlación entre ciertos comensales de la microbiota intestinal, el estatus secretor y la susceptibilidad a la infección por virus entéricos. Los títulos de IgA secretora anti-rotavirus en muestras de saliva fueron utilizados como un indicador de infecciones previas y analizando la susceptibilidad a la infección por rotavirus en función a la expresión diferencial de HBGA, éste grupo observó en coincidencia con otros trabajos, que los individuos con estatus secretor fueron más susceptibles a la infección por rotavirus. En éste mismo trabajo evaluaron el microbioma fecal e identificaron una correlación negativa entre los títulos de IgA secretora anti rotavirus y la abundancia de *Ruminococcus spp.*

Continuando con ésta línea de investigación, buscaron identificar bacterias de la microbiota intestinal con capacidad de interactuar con rotavirus. El análisis de muestras fecales de 5 niños con gastroenteritis por rotavirus encontró que *Ruminococcus spp.*, destacaba de los demás miembros comensales por su actividad diferencial para unirse a la partícula viral. Este mismo estudio demostró que al incubar muestras de rotavirus junto con *Ruminococcus* e infectar monocapas celulares, el título viral disminuía tres veces. Se ha sugerido que esta interacción podría ser similar a la descrita entre la VP4 de ciertos genotipos de rotavirus y los receptores de HBGA (66).

Ruminococcus spp., son bacterias anaerobias estrictas, Gram-positivas, pertenecientes al filo *Firmicutes*, uno de los miembros comensales comunes de la microbiota intestinal de mamíferos y cuya abundancia se asocia a un estado de salud. En la actualidad es considerado un género polifilético, con especies distribuidas entre las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*. A diferencia de la mayoría de las bacterias comensales que residen principalmente en el colon, los *Ruminococcus* de la familia *Lachnospiraceae* también colonizan el intestino delgado (67). Cumplen funciones asociadas a la degradación y conversión de polisacáridos complejos de la dieta, el mantenimiento de la integridad del tejido epitelial colónico y de la homeostasis intestinal (68,69).

Pese a que hasta la fecha no se tiene certeza si el rol de *Ruminococcus* frente a la infección por RVA en niños es protector, el hecho de que fuera encontrado en el intestino delgado, que es el sitio de replicación de rotavirus, sugiere de que la interacción con la partícula viral observada en ensayos *in vitro*, podría estar ocurriendo *in vivo*, y de que los niveles de estas bacterias se hayan correlacionado negativamente con los títulos de IgA secretora anti-rotavirus puede sugerir que esto ocurra.

Si bien existe evidencia de la interacción bacteria-virus, son pocos los datos que se tienen de la influencia de esta interacción en el desarrollo de la enfermedad. En base a los datos descritos, es posible que la severidad del cuadro de diarrea se vea influenciada por la proporción de bacterias capaces de unirse y bloquear la infección en el lumen intestinal luego de iniciada la infección. El objetivo de este estudio piloto es analizar la proporción de niveles de severidad (leve/moderada/severo) de la diarrea causada por RVA en una población infantil y compararla con la carga bacteriana de *Ruminococcus* en los individuos de cada nivel, con el fin de aportar datos “en la vida real” de la relevancia de esta interacción en el desarrollo de la enfermedad, de manera a ayudar a direccionar estudios que apunten a estrategias de prevención y tratamiento de la infección por virus entéricos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Comparar la carga bacteriana de *Ruminococcus spp.*, y los niveles de IgA secretora anti-rotavirus respecto al grado de severidad de la gastroenteritis según escala de Vesikari, en muestras de diarrea positivas para rotavirus de niños vacunados del área de Gran Asunción y del departamento de Caaguazú, durante el año 2019.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el grado de severidad según escala de Vesikari de la gastroenteritis producida por rotavirus en población pediátrica.
- Determinar la carga bacteriana de *Ruminococcus spp.*, presentes en muestras de microbiota fecal positivas para rotavirus de la población estudiada, mediante cuantificación por PCR en tiempo real.
- Cuantificar el nivel de IgA secretora anti-rotavirus en muestras fecales positivas para rotavirus de la población estudiada mediante ELISA.
- Caracterizar molecularmente los rotavirus presentes en muestras fecales mediante RT-PCR.

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño de estudio

Se llevó a cabo un estudio piloto, de tipo observacional descriptivo, de corte transversal, con muestreo no probabilístico, por conveniencia.

3.2. Población de estudio

Se colectaron muestras diarreicas de niños, de ambos sexos, con edad comprendida entre 4 a 72 meses, que acudieron al Hospital General de Barrio Obrero en la ciudad de Asunción; el Hospital Regional de Coronel Oviedo, el Instituto de Previsión Social de Coronel Oviedo y cuatro centros de salud privados más, localizados en el departamento de Caaguazú, durante el periodo de julio a noviembre del año 2019.

3.3. Reclutamiento

El reclutamiento se realizó con pacientes pediátricos que acudieron a los laboratorios de cada hospital en compañía de la madre, el padre o el tutor legal, con una orden médica para análisis de materia fecal por sospecha de infección gastrointestinal. Se socializó de forma verbal y mediante la entrega de un documento informativo (**Anexo 2**) sobre los objetivos y el alcance del proyecto, y una vez aclaradas todas las dudas, se solicitó la firma de un consentimiento informado (**Anexo 3**) a quienes accedieron participar del estudio.

Se aplicó un cuestionario de investigación (**Anexo 4**) y de seguimiento al paciente a través de llamadas telefónicas y hasta completar 6 días desde el inicio de síntomas, con el objetivo de recolectar datos sobre la evolución del cuadro de gastroenteritis.

3.3.1. Criterios de elegibilidad

Los criterios tenidos en cuenta en el reclutamiento de casos de gastroenteritis aguda por RVA fueron:

Criterios de inclusión

- Niños cuyos padres o tutores legales hayan aceptado participar del estudio y firmado el consentimiento informado.
- Niños vacunados con ambas dosis de la vacuna Rotarix® (corroborado mediante certificado de vacunación).
- Niños con resultado positivo para rotavirus por test inmunocromatográfico y posteriormente confirmado por RT-PCR.
- Niños que cuenten con todos los datos del cuestionario de seguimiento.

Criterios de exclusión

- Niños que hayan estado recibiendo terapia con antibióticos hasta al menos 2 semanas antes de la aplicación del estudio.
- Niños que no cuenten con ambas dosis o que cuenten solo con la primera dosis de la vacuna Rotarix®.
- Muestra fecal en cantidad insuficiente o contaminada.

3.3.2. Grupo de controles voluntarios

Para el grupo control, se realizó la colecta de muestras de materia fecal de niños voluntarios que cumplieran con los siguientes criterios:

- Niños cuyos padres o tutores legales hayan aceptado participar del estudio y firmado el consentimiento informado.
- Niños de ambos sexos, con edad comprendida entre 4-72 meses.
- Niños sin de síntomas de gastroenteritis en el momento del reclutamiento.
- Niños que no hayan estado recibiendo terapia con antibióticos hasta al menos 2 semanas antes de la toma de muestra.
- Niños inmunizados con ambas dosis de la vacuna contra rotavirus.

3.4. Detección de rotavirus en materia fecal por test inmunocromatográfico

En el laboratorio de cada centro de salud, se tomó una alícuota de muestra para la detección de rotavirus mediante el test inmunocromatográfico *Right Sign*®, *Biotest*, siguiendo las indicaciones especificadas por el fabricante. El remanente de muestra fue almacenado a 4° C hasta su traslado al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) de la Universidad Nacional de Asunción dentro de las 48 horas desde la toma de muestra.

3.5. Fraccionamiento de las muestras y elaboración de base de datos

El remanente de materia fecal fue remitido en cadena de frío hasta el IICS. Se elaboró una base datos en una planilla de Excel (Microsoft), con toda la información clínica y sociodemográfica recabada mediante el cuestionario aplicado. A cada muestra se le asignó un código y se procedió a su fraccionamiento.

3.6. Clasificación de la severidad de la GEA aplicando el sistema de Puntuación de Vesikari

En base a los datos clínicos recabados durante los 6 días de seguimiento, se determinó el grado de severidad de la GEA de acuerdo al puntaje final obtenido en la escala de Vesikari.

3.7. Extracción de ADN bacteriano de materia fecal

El aislamiento del ADN bacteriano fue realizado por el método de Chelex, según lo descrito previamente (70,71), con leves modificaciones que se describen a continuación. Se preparó una solución fecal al 10% (p/v) con PBS [1X] y azida de sodio al [0,01%]. Se centrifugó a 100 g por 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 13.000 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, el pellet fecal se resuspendido en 1 mL de acetona y fue centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C (dos veces). Se descartó el sobrenadante y se añadió al pellet 200 µL de Chelex-5% (Sigma) y 10 µL de Proteinasa K [10 mg/mL] (Promega). Se incubó a 65°C x 2 horas en baño (de) María. Se homogenizó brevemente en vórtex, se incubó a 100°C por 8 minutos y luego se centrifugó a 13.000 g por 10 minutos. Se tomó 100 µL del sobrenadante y transfirió a un tubo nuevo. Se almacenó el aislado de ADN a -20°C.

3.7.1. Cuantificación de ADN bacteriano

Las muestras de ADN extraídas fueron cuantificadas mediante espectrofotómetro de microvolumen (MaestroGen) (**Anexo 5**), y la concentración fue normalizada a 50 ng/µL mediante dilución con agua ultra pura.

3.8. Obtención de plásmido control

3.8.1. Amplificación, purificación y clonación de fragmentos de interés

Para la amplificación de Bacterias totales se utilizó un par de cebadores previamente reportado por Nadkarni et al., (72) que van dirigidos a una región conservada que específicamente detecta 16S ARNr del dominio Bacteria. Para *Ruminococcus spp.*, [familia *Lachnospiraceae*] se amplificó el gen 16S ARNr utilizando cebadores descritos por Kurina et al., (73), que van dirigidos a una región altamente conservada dentro del taxón, pero a la vez suficientemente variable para separarlo de otros miembros del microbioma intestinal. Cada reacción se llevó a cabo empleando el kit LongAmp™ Taq 2X Master Mix (Sigma); se añadió 25 µL de máster mix, 2 µL de

cada cebador [10 μ M], 1 μ L ADN bacteriano aislado de heces humanas [50 ng] y 20 μ L de agua libre de nucleasas, completando un volumen final de 50 μ L. Las condiciones de ciclado fueron; 94°C por 30 segundos de desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos a 94°C por 10 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos y 72°C por 7 minutos de extensión final. Los productos de amplificación fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% a 90 voltios durante 45 minutos en tampón TAE [1X], y posteriormente teñidos con bromuro de etidio (Promega).

Una vez confirmada la presencia de los fragmentos esperados (amplicón de 466 pb para Bacterias totales y de 157 pb para *Ruminococcus* spp), los productos fueron purificados empleando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fischer), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se corroboró la eficiencia de la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. La clonación de los fragmentos de interés se realizó en el vector pJET/1.2 blunt, siguiendo las instrucciones del kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Fischer). El plásmido conteniendo el fragmento para Bacterias totales fue denominado pJET*AllBac*, y el correspondiente a *Ruminococcus* spp., pJET*Rum*.

3.8.2. Preparación de bacterias químicamente competentes

Para la obtención de bacterias competentes se utilizó el protocolo previamente descrito por Sambrook y Russell (74), con leves modificaciones que se describen a continuación. Primeramente se realizó el cultivo de iniciación inoculando 3 mL de medio Luria-Bertani (LB) con *Escherichia coli* cepa *DH5 α* y se incubó a 37°C con agitación continua durante toda la noche. Se transfirió 1 mL del cultivo crecido a un matraz conteniendo 100 mL de medio fresco y se dejó incubando a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una DO (densidad óptica) de 0,450 leído a 600 nm en un espectrofotómetro. Una vez llegada a la DO deseada, el matraz fue puesto en hielo, se traspasó todo el volumen a dos tubos de 50 mL y se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos a 4°C. Cada pellet fue resuspendido suavemente añadiendo 1 mL de cloruro de calcio [75 mM], luego se completó hasta un volumen final de 45 mL y se incubó en hielo por 30 minutos. Se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C, y cada pellet fue resuspendido suavemente en 500 μ L cloruro de calcio [75 mM] e incubado en hielo hasta el día siguiente. Posteriormente se agregó 120 μ L de glicerol puro a cada tubo,

se mezcló suavemente, se alicuotaron 100 μ L en criotubos y fueron almacenados a -80°C.

3.8.3. Transformación por choque térmico

Las bacterias *E. coli* cepa *DH5 α* fueron transformadas con los plásmidos pJETAllBac y pJETRum. Se incubó 100 μ L de bacterias competentes con 5 μ L de plásmido por 30 minutos en hielo, seguido de una incubación por 40 segundos a 42°C e inmediatamente de nuevo en hielo por 5 minutos. Se agregó 950 μ L de medio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) y se incubó a 37°C en agitación continua por 1 hora. Se plaqueó 200 μ L del medio transformado en placas LB-agar con ampicilina [0,1 mg/mL], se incubó a 37°C hasta el día siguiente.

3.8.4. Comprobación de colonias transformadas mediante PCR de colonias

En base a la resistencia a ampicilina, se seleccionaron 13 colonias de la placa transformadas con el plásmido pJETAllBac y 17 de la placa del plásmido pJETRum, y éstas fueron sometidas a una PCR de colonias para corroborar el éxito de la transformación. La mix fue preparada con 2 μ L de tampón de reacción [10X], 0,6 μ L de cloruro de magnesio [50 mM], 0,4 μ L de mezcla de cada dNTP [10 mM], 0,4 μ L [10 μ M] de cada par de cebadores que flanquean el sitio de multiclonación, 0,1 μ L de enzima Taq polimerasa y 16,1 μ L de agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 20 μ L. Las condiciones de ciclado fueron; desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos de amplificación fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% a 90 voltios constantes en tampón TAE [1X] durante 45 minutos. El gel fue teñido con bromuro de etidio [5e-4 mg/mL] (Promega) y visualizado en una transiluminador de luz UV.

3.8.5. Extracción y purificación de ADN plasmídico

Se seleccionaron las colonias que fueron positivas por PCR, e inocularon nuevamente tubos individuales conteniendo 3 mL de medio fresco LB con ampicilina [0.1 mg/mL] (Lasca), se dejó incubando a 37°C en agitación continua hasta el día siguiente. Finalmente se realizó la extracción del ADN plasmídico siguiendo las indicaciones del kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega).

3.8.6. Control de calidad de ADN plasmídico y verificación de insertos clonados

La calidad del ADN plasmídico purificado se corroboró por análisis de electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 100 voltios constantes en tampón TAE [1X] durante 50 minutos. El gel fue teñido con bromuro de etidio (Promega) y visualizado en una transiluminador de luz UV.

Se realizó una PCR de los extractos de ADN plasmídicos purificados para corroborar la inserción correcta de los fragmentos de interés, para lo cual se utilizaron los cebadores específicos dirigidos a cada blanco (**Anexo 8**). Las condiciones de amplificación fueron las mismas descritas en el ítem 3.8.1.

3.8.7. Cuantificación de ADN plasmídico y determinación del número de copias

Se determinó la concentración de ADN plasmídico por espectrofotómetro de microvolumen (MaestroGen). Con los datos obtenidos se calculó el número de copias para cada plásmido utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Cantidad de ADN} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{Longitud de ADN} \times 1 \times 10^9 \times 660}$$

Donde,

Cantidad de ADN (ng) = concentración de ADN plasmídico

$6,022 \times 10^{23}$ (número/mol) = valor de la constante de Avogadro

Longitud de ADN (pares de bases) = longitud del inserto.

660 (g/mol) = masa promedio de 1 pb de ADN de doble cadena

1×10^9 (ng/g) = factor de conversión

3.9. Generación de curva estándar

Primeramente se preparó una dilución seriada de factor 10 transfiriendo 5 μ L de ADN plasmídico puro en 45 μ L de diluyente (agua ultra pura), se homogenizó en vórtex, luego se repitió el mismo procedimiento para el siguiente orden de dilución, y así de forma sucesiva hasta obtener 11 diluciones en serie.

Para el ensayo de PCR en tiempo real, cada placa incluyó las diluciones del ADN plasmídico por duplicado, más 4 controles negativos (ADN reemplazado por agua libre de nucleasas). La mezcla de reacción para la detección del dominio Bacteria fue preparada con 10 μ L de Premix Ex Taq TM (Takara), 0,4 μ L de cada cebador [10 mM],

0,2 µL de sonda marcada con FAM [10 mM], 1 µL de templado y 8 µL de agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 20 µL. La mezcla de reacción para la detección del gen 16S ARNr de *Ruminococcus spp.*, fue similar, salvo que se empleó 0,6 µL de cada cebador [10 mM] y 0,2 µL de sonda marcada con HEX [10 mM]. Las condiciones de ciclado para ambas reacciones fue la misma, 95°C por 30 segundos de desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto.

Se emplearon los valores del umbral de ciclo (Ct) obtenidos para realizar un análisis de regresión lineal simple, graficando el promedio de los Cts de cada dilución en el eje y, versus el logaritmo del número inicial de copias en el eje x. Se obtuvo el valor del coeficiente de determinación R^2 para evaluar la linealidad del ensayo, y la ecuación de regresión $y = ax + b$, donde x corresponde al valor de la pendiente que fue utilizado para calcular la eficiencia de la amplificación mediante la fórmula $E = 10^{(-1/x)} - 1$.

3.10. Determinación de la carga bacteriana en muestras de materia fecal

Se realizó el ensayo de PCR en tiempo real para las muestras de concentración desconocida, bajo las mismas condiciones de reacción descritas en el ítem anterior. Cada muestra fue ensayada por duplicado y el promedio del valor de Ct obtenido fue utilizado para calcular el número de copias aplicando la fórmula;

$$\text{Número de copias} = 10^{[(Ct - b) / x]},$$

dónde b corresponde al valor del intercepto y x el valor de la pendiente.

El número de copias / uL fue normalizado a número de copias / ng de ADN total;

$$\frac{N^{\circ} \text{ de copias}}{uL} \times \frac{1 uL}{50 ng \text{ ADN total}} = \frac{N^{\circ} \text{ de copias}}{ng \text{ de ADN total}}$$

En el **Anexo 6** se encuentra la tabla con los valores resultantes para cada muestra.

3.11. Preparación de solución fecal al 10%.

Se preparó una suspensión fecal al 10% (peso/volumen) diluyendo la muestra en una solución de PBS [1X] y azida de sodio [0,01%] (Sigma). Se homogenizó en vórtex durante 20 minutos a 4°C y luego se separó la fracción sólida por centrifugación a 16.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se transfirió con cuidado todo el sobrenadante a un tubo nuevo.

3.11.1. Obtención de clarificado proteico

Se tomó 490 μ L de la solución fecal y se transfirió a un tubo nuevo conteniendo 10 μ L de inhibidor de proteasas (50X), se homogenizó la mezcla por pipeteo y luego se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.12. Cuantificación de IgA total en clarificado fecal como control de calidad

Antes de medir los niveles de sIgA α Rv anti-rotavirus, se verificó que los niveles de IgA total estén dentro de los parámetros esperados, para descartar que los resultados no estén influidos por una deficiencia en la producción de IgA del individuo o por problemas de la muestra. La cuantificación se realizó por la técnica de inmunodifusión radial utilizando el kit DIFFU-PLATE (Biocientífica S.A.) siguiendo los pasos indicados por el fabricante.

Durante el ensayo las muestras de clarificado proteico fueron mantenidas en frío. Se realizó una homogenización breve en vórtex, se sembró por duplicado 5 μ L de muestra en cada pocillo del gel. Se ubicó un algodón humedecido en el centro de la placa y se cerró firmemente. Se incubó en posición invertida en cámara húmeda por 72 horas a temperatura ambiente. Se realizó la lectura una vez alcanzado el tiempo de incubación que está indicado por la aparición de un anillo de bordes netos. En todos los ensayos se incluyó como control una muestra de concentración conocida. En el **Anexo 7** se encuentra la tabla con los valores obtenidos para cada muestra.

3.13. Detección semi-cuantitativa de anticuerpos IgA secretora anti-rotavirus (sIgA α Rv)

La determinación de los títulos de sIgA específicos contra rotavirus se realizó mediante un ELISA *in house*, siguiendo la metodología descrita previamente (75,76), con leves modificaciones que se describen a continuación. Primeramente, micro-placas de 96 pocillos (Nunc) fueron sensibilizadas con la vacuna RotaTeq® (Lote T030453, Merck) diluida 1:100 en tampón carbonato-bicarbonato [0,1 M] (pH 9,6) e incubada a 4°C *overnight*. Las placas se lavaron 3 veces con 300 μ L de tampón PBS [1X] + Tween20 [0,05%] para eliminar el excedente de antígeno no unido. La placa fue incubada con tampón de bloqueo, PBS [1X] + leche descremada [0,1%], durante 2 horas a 37°C en estufa con CO_2 [5%]. Luego de los lavados, se incubó por duplicado 100 μ L de clarificado fecal (10%) en dilución en serie (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) durante 1 hora (37°C ,

CO₂ 5%). Posterior a los lavados, la placa fue incubada con IgA anti-humana conjugada con peroxidasa (Lote N°127, Dakopatts) diluida 1:2000 en tampón PBS [1X]+Tween20 [0,05%] por 1 hora (37°C, CO₂ 5%). Luego de los lavados, la reacción fue desarrollada añadiendo 100 µL de tetramethylbenzidine (Vircell) por 10 minutos y luego detenida con la adición de 50 µL de H₂SO₄ [1N]. La DO fue determinada a una longitud de onda de 450 nm, con 630 nm de filtro diferencial. Todos los ensayos incluyeron control positivo y negativo. En el **Anexo 7** se encuentra la tabla con los valores obtenidos para cada muestra.

3.13.1. Controles internos de validación

Como control negativo se empleó el diluyente de muestra (PBS [1X] + azida de sodio [0,01%]). Como control positivo se empleó clarificado fecal de un niño vacunado y con resultado positivo para rotavirus, cuyo valor de absorbancia (0,850) resultó alto y permaneció constante en sucesivas repeticiones.

3.13.2. Determinación del rango de diluciones a emplear

El rango de diluciones empleadas se estableció testando 11 muestras de clarificado fecal de niños vacunados y con resultado positivo para rotavirus, seleccionadas aleatoriamente, las cuales fueron ensayadas por duplicado en una serie de diluciones con base 2, hasta la dilución 1:2048.

3.14. Determinación del punto de corte (*Cut off*)

El *cut off* del ELISA *in-house* se determinó a partir de ensayos sucesivos empleando el diluyente de muestras (control negativo) por quintuplicado. Se estableció como punto de corte el promedio de la DO + 3 desviaciones estándar.

3.15. Extracción de ARN viral

Se tomó 400 µL de la solución fecal al 10% descrita en el ítem 3.7. para la extracción del ARN de rotavirus por el método de sílica/tiociano de guanidina, siguiendo la metodología previamente descrita (77).

3.16. qRT-PCR del gen NSP3 de rotavirus a mu

Se realizó una amplificación de una región parcial del gen de la proteína no estructural 3 (NSP3) de rotavirus mediante qRT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa inversa en tiempo real) al 75% del total de casos de gastroenteritis clasificados como leves según Vesikari que previamente resultaron negativos para rotavirus A por inmunocromatografía.

La reacción fue llevada a cabo según lo descrito previamente (78); se empleó el kit *SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR* (Thermo Fischer), añadiendo 25 µL de tampón de reacción [2X], 1 µL de enzima, 2 µL de cada cebador [10 µM] (**Tabla 16**), 1 µL de sonda marcada con FAM, 5 µL de ARN viral y agua libre de nucleasas hasta completar 50 µL de volumen final de reacción. Las condiciones de ciclado fueron retro-transcripción a 50°C por 15 minutos, desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto. Fueron incluidos controles negativos (agua de reacción) y como control positivo ARN del biobanco.

3.17. Caracterización molecular de rotavirus

Las muestras positivas por inmunocromatografía fueron sometidas a una RT-PCR Múltiple Semi-anidada, para la genotipificación de los genes VP7 y VP4 de rotavirus.

3.17.1. Síntesis de ADN complementario

Para la desnaturalización del ARN de doble cadena se procedió como sigue; se preparó un primer mix conteniendo 5 µL de mezcla de cada dNTP [2,5 mM], 2,5 µL de cebadores aleatorios [50 ng/µL] y 10 µL de ARN. Se incubó por 7 minutos a 97°C y luego inmediatamente en hielo por 5 minutos más.

Para la retrotranscripción, se añadió a la mezcla 10 µL de tampón de reacción M-MLV (Promega) [5X], 2,5 µL de DTT, 0,3 µL de Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega) y agua ultra pura hasta completar un volumen final de 50 µL. La mezcla fue incubada en un equipo termociclador a 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos y 85°C por 5 minutos. El producto fue almacenado a -40°C hasta su uso.

3.17.2. Genotipificación del gen VP7 de rotavirus

Para la primera ronda de amplificación del gen VP7, se preparó la reacción con 2,5 µL de tampón de reacción (Invitrogen) [10X], 0,5 µL de MgCl₂ [50 mM], 1 µL de DMSO, 0,75 µL de mezcla de cada dNTP [10 mM], 0,5 µL de cada par de cebador [10 µM], 0,3 µL de enzima Taq ADN Polimerasa (Invitrogen) [5 U/µL], 2 µL de ADNc y agua libre de nucleasas hasta completar 25 µL de volumen final de reacción. El protocolo de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 47°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

A partir del producto obtenido en la primera ronda de amplificación se llevó a cabo una PCR múltiple hemi-anidada utilizando cebadores internos para la detección de los genotipos G1, G2, G3, G4, G6, G9 y G12. Se preparó la reacción tomando 2 µL de producto de la primera ronda de amplificación, 2,5 µL de tampón de reacción (Invitrogen) [10X], 2 µL MgCl₂ [50 mM], 0,5 µL mezcla de cada dNTP [10 mM], 0,5 µL de cada cebador [10 µM], 0,15 µL de enzima Taq ADN Polimerasa (Invitrogen) [0,5 U/µL] y agua libre nucleasas hasta completar 25 µL de volumen final de reacción. El protocolo de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 47°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

En cada ensayo de amplificación se incluyeron agua ultra pura como control negativo de reacción y ADNc de una muestra positiva para rotavirus.

3.17.3. Genotipificación del gen VP4 de rotavirus

Para la primera ronda de amplificación del gen VP4, se preparó la reacción con 2.5 µL de tampón de reacción (Invitrogen) [10X], 0,5 µL de MgCl₂ [50 mM], 1 µL de DMSO, 0,75 µL de mezcla de cada dNTP [10 mM], 0,5 µL de cada par de cebador [10 µM], 0,3 µL de enzima Taq ADN Polimerasa (Invitrogen) [0,5 U/µL], 2 µL de ADNc y agua libre de nucleasas hasta completar 25 µL de volumen final de reacción. El protocolo de ciclado fue el mismo utilizado para la primera ronda de amplificación de VP7.

A partir del producto obtenido en la primera ronda de amplificación se llevó a cabo una PCR multiplex hemi-anidada utilizando cebadores internos para la detección de los genotipos P4, P6, P8 y P9. Se preparó la reacción tomando 2 µL de producto de VP4, 2,5 µL de tampón de reacción (Invitrogen) [10X], 2 µL MgCl₂ [50 mM], 0,5 µL mezcla de cada dNTP [10 mM], 0,5 µL de cada cebador [10 µM], 0,15 µL de enzima Taq ADN Polimerasa (Invitrogen) [0,5 U/µL] y agua libre nucleasas hasta completar 25 µL de volumen final. El protocolo de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

En cada ensayo de amplificación se utilizó como control positivo una muestra de Biobanco y como control negativo agua ultra pura.

Los cebadores empleados se describen en las **Tabla 17 y 18 del Anexo 8**.

3.17.4. Electroforesis y visualización de fragmentos esperados

Todos los productos obtenidos para los genes VP7 y VP4 fueron analizados mediante una corrida electroforética. Se sembraron 7 μ L de producto de PCR de la primera ronda de amplificación mezclado con 2 μ L de *loading buffer* y se corrió en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE [1X], durante 30 minutos a 100 voltios constantes.

Los productos de la segunda ronda se corrieron en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE [1X], durante 45 minutos a 100 voltios constantes.

Se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb runSAFE (Cleaver Scientific) para la comparación de tamaños de los amplicones obtenidos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un trans-iluminador de luz UV.

Para confirmar los genotipos obtenidos por PCR, los productos de la primera ronda de amplificación de los genes VP7 y VP4 fueron purificados desde el gel de agarosa siguiendo las indicaciones del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), y enviados a la empresa MacroGen para su secuenciación (**Tabla 19**).

3.18. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron ingresados en una gran base de datos utilizando planillas del programa Excel (Microsoft). Los análisis y sus gráficos se realizaron mediante el programa Prism (GraphPad V8.0.1); el test de Chi cuadrado se utilizó para determinar diferencias estadísticamente significativas entre grupos en base a variables cualitativas; las variables cuantitativas fueron analizadas aplicando el test de Mann-Whitney o Kruskal Wallis según correspondiera. Las diferencias fueron declaradas significancias a valores $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características socio-demográficas de la población en estudio

Fueron colectadas un total de 354 muestras diarreicas de pacientes pediátricos, de las cuales 183 fueron excluidas; 35 por estar por encima del rango etario establecido o carecer de ficha, 71 que habían declarado estar consumiendo antibiótico en el momento de la aplicación de la encuesta, 77 que abandonaron el estudio y por lo tanto no completaron el seguimiento (**Figura 4**). De 171 pacientes elegibles, 50 (29%) fueron positivos para infección por rotavirus tanto por test inmunocromatográfico y como por RT-PCR convencional (**Figura 5**).

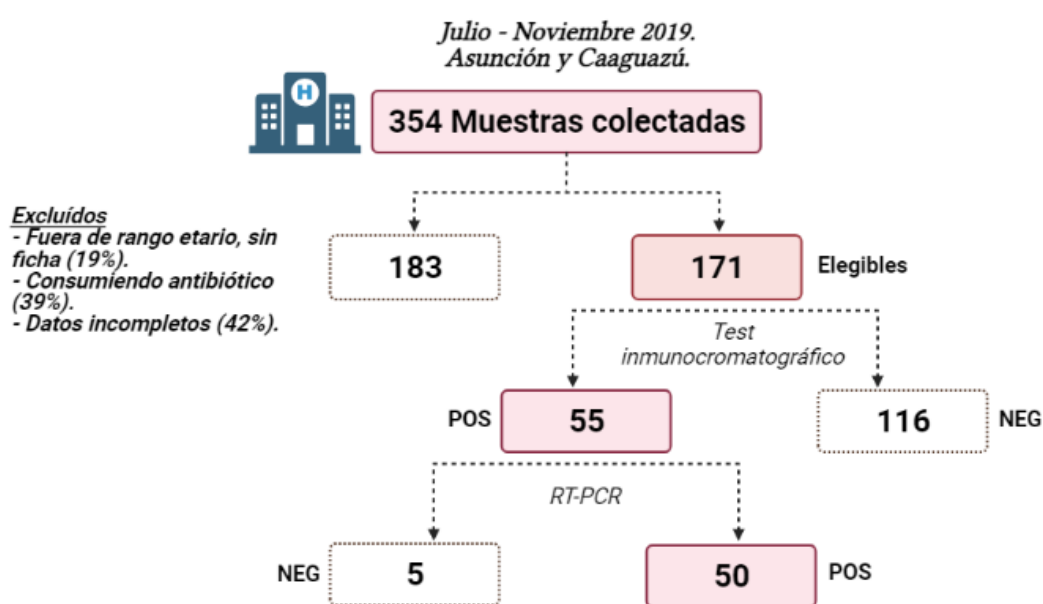


Figura 4. Esquema de reclutamiento y filtro de muestras para el estudio. En rojo se observan las muestras que cumplen las sucesivas etapas de clasificación, en blanco se muestran las muestras eliminadas. POS: positivo; NEG: negativo.

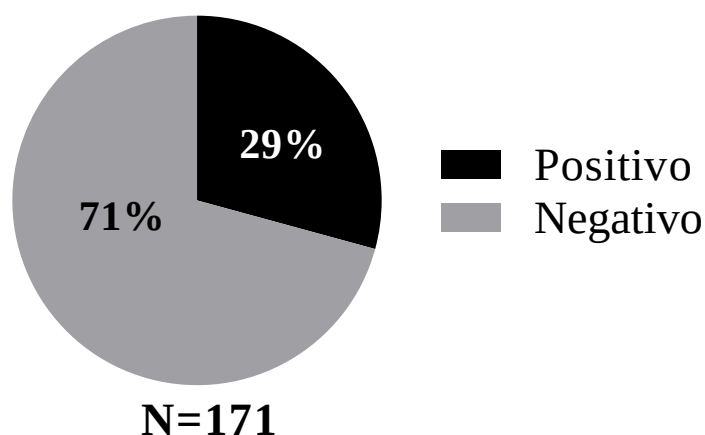


Figura 5. Tasa de detección de casos de gastroenteritis por rotavirus. Proporción de muestras de rotavirus positivas para RVA por RT-PCR. La proporción del 29% (n=50) es relativa al total de las muestras colectadas que pasaron el filtro de clasificación (N=171)

Para caracterizar a la población, se describió brevemente las principales características socio-demográfica de los 50 pacientes incluidos en el presente estudio: el 54% resultó ser del sexo masculino y el 46% del sexo femenino, con una mediana de edad de 27,5 meses RIQ [16,75-48,25]. El 58% de las muestras correspondían a Asunción y 42% al departamento de Caaguazú. El 92% de los pacientes fueron de la etnia latina y el 8% restante de otra etnia. El 96% de los pacientes habían recibido lactancia materna, con una mediana de duración de 12 meses RIQ [7-24]. Con respecto a la gestación, 86% de los mismos fueron de término completo y 14% de término temprano; no se pudo determinar el dato de ésta variable en un paciente. El tipo de parto predominante fue la cesárea con un 64%, y 36% de los pacientes habían nacido por parto normal; no se pudo obtener el dato de ésta variable en tres pacientes. En cuanto al día de síntomas en la que fue realizada la toma de muestra, se observó que la colecta fue mayoritariamente entre el día 2 y 3 de síntomas. Como se observa en la **Tabla 4**, no se detectaron diferencias significativas entre los casos de GEA y el grupo control. Se registró una mayor proporción de casos positivos de GEA por rotavirus en pacientes con edad >24 meses (60%), aunque sin significancia estadística (**Figura S1, Anexo 1**).

Tabla 4. Características socio-demográficas de casos positivos de GEA y controles

	Casos de GEA (N=50)	Controles (N=13)	p-valor^a
<i>Promedio de día síntoma en que fue colectada la muestra</i>	2,7	N/A	
<i>Edad (en meses)</i>	27,5 [16,75-48,25]	18 [9,5-32]	0,09
<i>Sexo</i>			
Masculino	54%	54%	>0,99
Femenino	46%	46%	
<i>Procedencia</i>			0,12
Capital	58%	31%	
Caaguazú	42%	69%	
<i>Etnia</i>			0,57
Latina	92%	100%	
Otra	8%	0%	
<i>Lactancia Materna</i>			0,27
Sí	94%	85%	
<i>Tiempo de lactancia materna (en meses)</i>	12 [7-24]	9,5 [6-17,25]	0,40
<i>Gestación de término^b</i>			>0,99
Sí	86%	85%	
No	14%	15%	
<i>Tipo de parto^c</i>			0,08
Normal	36%	8%	
Cesárea	64%	92%	

Datos continuos informados en término de Mediana [RIQ]

Datos nominales informados en términos de porcentaje.

^a Para el análisis de variables cualitativas se empleó el test de Chi cuadrado; para el análisis de variables cuantitativas el test de Mann-Wihtney.

^b Un dato no determinado; ^c Tres datos no determinados.

N/A, No Aplica ; GEA, Gastroenteritis aguda; RV, rotavirus

Debido a que el muestreo fue realizado en dos poblaciones geográficamente distantes, también se analizaron las características socio-demográfica según la procedencia de los casos de GEA, con el fin de detectar alguna diferencia poblacional que pudiera interferir en los análisis. Se observó una mayor proporción de niños nacidos por cesárea. En el departamento de Caaguazú esta diferencia fue significativa. Existen reportes en la literatura que describen que la composición de la microbiota intestinal puede diferir de acuerdo al tipo de parto; los individuos nacidos por vía vaginal presentan un perfil microbiano similar a la microbiota vaginal de la madre, con *Bifidobacterias* y *Lactobacilos* como comensales característicos, mientras que *Estafilococos* y *Streptococos* son propios de los nacidos por cesárea que adquieren una microbiota derivada de la piel de la madre y del ambiente hospitalario, además es menos diversa y se los asocia a un mayor riesgo de padecer trastornos inmunitarios durante la infancia (79,80). Con respecto a *Ruminococcus* spp., no existen datos en la literatura que asocien específicamente su abundancia con el tipo de parto (81). En éste estudio los niveles de bacterias totales y *Ruminococcus* spp., no difirieron entre niños nacidos por cesárea y los nacidos por parto vaginal (**Figura S2 A-B, Anexo 1**). Las demás variables analizadas no mostraron diferencias significativas entre ambas localidades (**Tabla 5**).

Tabla 5. Características socio-demográficas según procedencia de casos positivos de GEA por rotavirus (N=50)

	Asunción (N=29)	Caaguazú (N=21)	p-valor^a
<i>Promedio de día de síntoma de muestreo</i>	2,6	2,9	0,22
<i>Edad (en meses)</i>	29 [17-44,5]	26 [14-53]	0,82
<i>Sexo</i>			>0,99
Masculino	55%	52%	
Femenino	45%	48%	
<i>Etnia</i>			>0,99
Latina	93%	90%	
Otra	7%	10%	
<i>Lactancia materna</i>	97%	90%	0,57
<i>Tiempo de lactancia materna (en meses)</i>	14,5 [7,25-24]	11 [6-19]	0,45
<i>Gestación de término^b</i>			0,68
Completo	83%	90%	
Incompleto	17%	10%	
<i>Tipo de parto^c</i>			0,04
Normal	45%	22%	
Cesárea	55%	78%	

Datos continuos informados en término de Mediana [RIQ].

Datos nominales informados en términos de porcentaje.

^a Para el análisis de variables cualitativas se empleó el test de Chi cuadrado; para el análisis de variables cuantitativas el test de Mann-Wihtney.

^b Un dato no determinado; ^c Tres datos no determinados.

Para responder al primer objetivo, se aplicó el sistema de puntuación de Vesikari a los 50 casos de GEA positivos para rotavirus, detectándose un 12% de casos leves, 48% de moderados y 40% de casos severos (**Figura 6**). El análisis entre los grupos de severidad de la GEA no arrojó diferencias significativas para ninguna variable sociodemográfica evaluada, si bien se puede mencionar una tendencia, ya que el 83% de casos leves provienen del departamento de Caaguazú (**Tabla 6**). Como complemento a estos análisis, se evaluó la frecuencia en la presentación clínica de los síntomas de GEA. Como se observa en la **Figura 7**, la diarrea estuvo presente en el 100% de los casos. La combinación de síntomas más frecuente fue diarrea, vómito y fiebre (58%), seguida de la combinación de diarrea y vómito (36%).

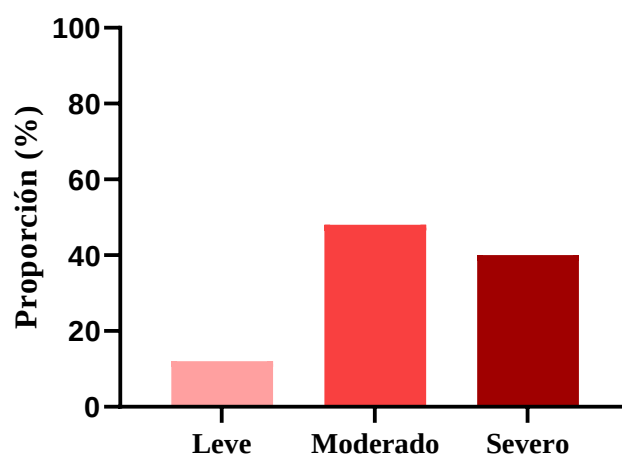


Figura 6. Proporción de casos según severidad de la GEA aplicando la escala de Vesikari. La clasificación está basada en el puntaje final obtenido al sumar cada parámetro evaluado. Un puntaje <7 corresponde a casos leves, 7-10 a moderados y ≥ 11 casos severos. Leve (n=6); Moderado (n=24); Severo (n=20).

Tabla 6. Características socio-demográficas según severidad de la GEA (N=50)

	Leve (n=6)	Moderado (n=24)	Severo (n=20)	p-valor^a
<i>Promedio de día síntoma en que fue colectada la muestra</i>	3	2,5	2,9	0,52
<i>Edad (meses)</i>	13 [20-46,3]	17,25 [29-48,8]	11,75 [28-50,5]	0,66
<i>Sexo</i>				0,79
Masculino	50%	50%	60%	
Femenino	50%	50%	40%	
<i>Procedencia</i>				0,08
Asunción	17%	67%	60%	
Caaguazú	83%	33%	40%	
<i>Etnia</i>				0,31
Latina	100%	96%	85%	
Otra	0%	4%	15%	
<i>Lactancia materna</i>	100%	96%	90%	0,58
<i>Tiempo de lactancia materna (meses)</i>	10,5 [7,5-31,5]	15 [7-24]	12 [6-20,3]	0,89
<i>Gestación de término^b</i>				0,62
Completo	100%	83%	85%	
Incompleto	0%	17%	15%	
<i>Tipo de parto^c</i>				0,89
Normal	25%	38%	37%	
Cesárea	75%	63%	63%	

Datos continuos informados en término de Mediana [RIQ].

Datos nominales informados en términos de porcentaje.

^a Para el análisis de diferencias entre los grupos de las variables cualitativas se empleó el test de Chi cuadrado; para el análisis de variables cuantitativas el test de Mann-Wihtney.

^b Un dato no determinado; ^c Tres datos no determinados.

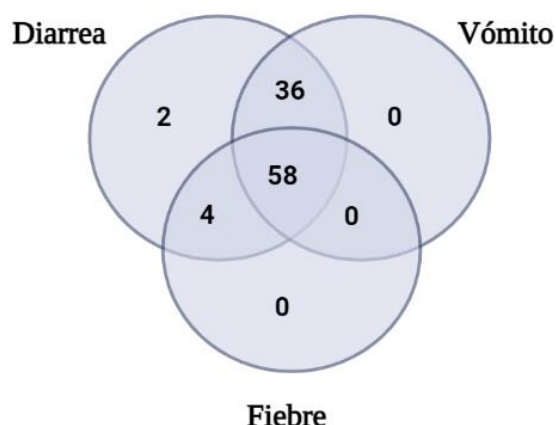


Figura 7. Presentación clínica de síntomas de GEA evaluados en la escala de Vesikari. Los círculos superpuestos representan la proporción de niños con GEA que desarrollaron 2 o 3 síntomas de forma combinada. El 58% de los casos desarrolló diarrea, vómito y fiebre; seguido del 36% que desarrollo diarrea y vómito.

Siguiendo con éste análisis y teniendo en cuenta la dificultad de ciertos parámetros empleados para evaluar la severidad de la GEA, se evaluó el impacto de cada uno de los ellos en la puntuación final de Vesikari mediante un análisis de correlación.

Como se observa en la **Figura 8A**, la duración de la diarrea se correlacionó significativamente con la severidad, ya que el máximo puntaje asignado para éste parámetro (puntaje 3) estuvo mayormente presente en casos cuyo score de Vesikari fueron los más altos y por lo tanto clasificados como severos, es decir, los cuadros de diarrea más prolongados (≥ 6 días) fueron característicos de casos con una puntuación ≥ 11 (severo). Sin embargo, el número de episodios de diarrea por día no resultó tener un impacto significativo en la severidad y tal como se observa en la **Figura 8B** un menor o mayor número de eventos por día no se asoció significativamente a ningún grado de severidad. Con respecto al síntoma de vómito se observó un comportamiento similar, resultando en una correlación significativa solo para la duración del síntoma y la severidad de la GEA, no así para el número máximo de episodios por día (**Figura 9**). Por otro lado, el máximo puntaje posible para el tipo de tratamiento recibido y la temperatura máxima registrada se correlacionaron significativamente con la severidad de la GEA (**Figura 10**).

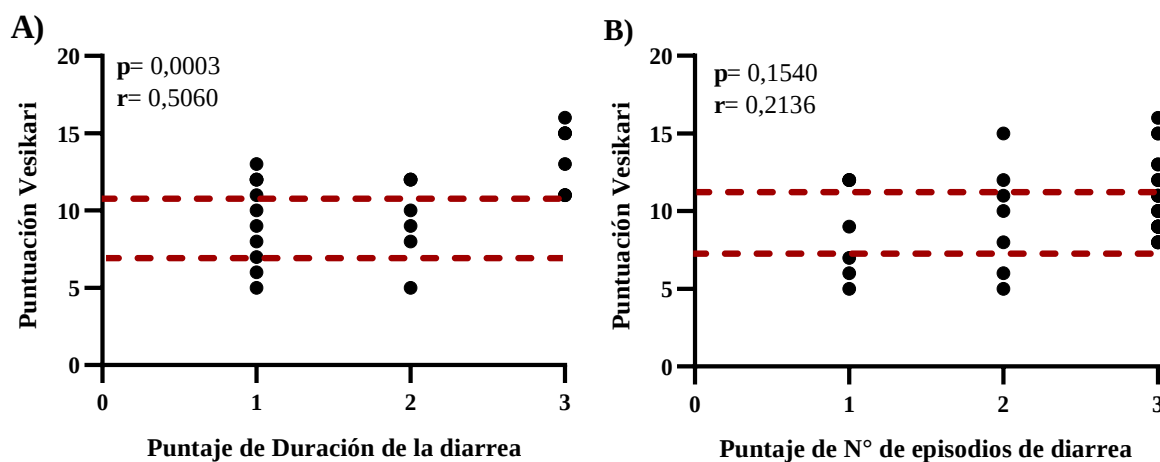


Figura 8. Correlación de Spearman entre el síntoma de diarrea y la severidad de la GEA según Vesikari. **A)** Se observó correlación entre la duración de la diarrea y la severidad (puntaje 1= 1-4 días; puntaje 2= 5 días; puntaje 3= ≥ 6 días). **B)** No se observó correlación entre el número máximo de episodios de diarrea y la severidad (puntaje 1= 1-3 ep; puntaje 2= 4-5 ep; puntaje 3= ≥ 6 ep). Las líneas continuas rojas corresponden al punto de corte para cada grupo de severidad según la escala de Vesikari, <7 = leve, 7-10 = moderado, ≥ 11 severo.

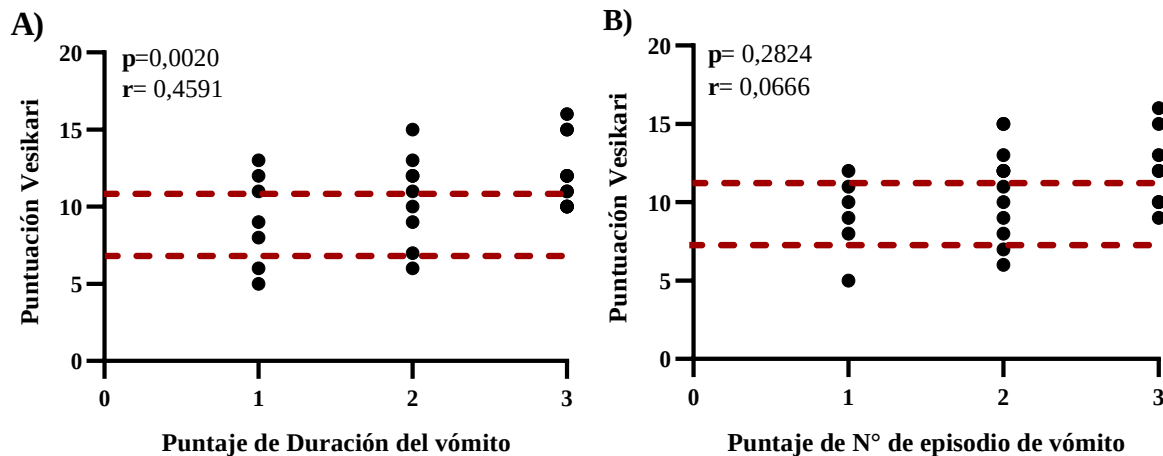


Figura 9. Correlación de Spearman entre el síntoma de vómito y la severidad de la GEA según Vesikari. **A)** Se observó correlación entre la duración del vómito y la severidad (puntaje 1= 1 día; puntaje 2= 2 días; puntaje 3= ≥ 3 días). **B)** No se observó correlación entre el número máximo de episodios de vómito y la severidad (puntaje 1= 1 ep; puntaje 2= 2 ep; puntaje 3= 3 ep). Las líneas continuas rojas corresponden al punto de corte para cada grupo de severidad según la escala de Vesikari, <7 = leve, 7-10 = moderado, ≥ 11 severo.

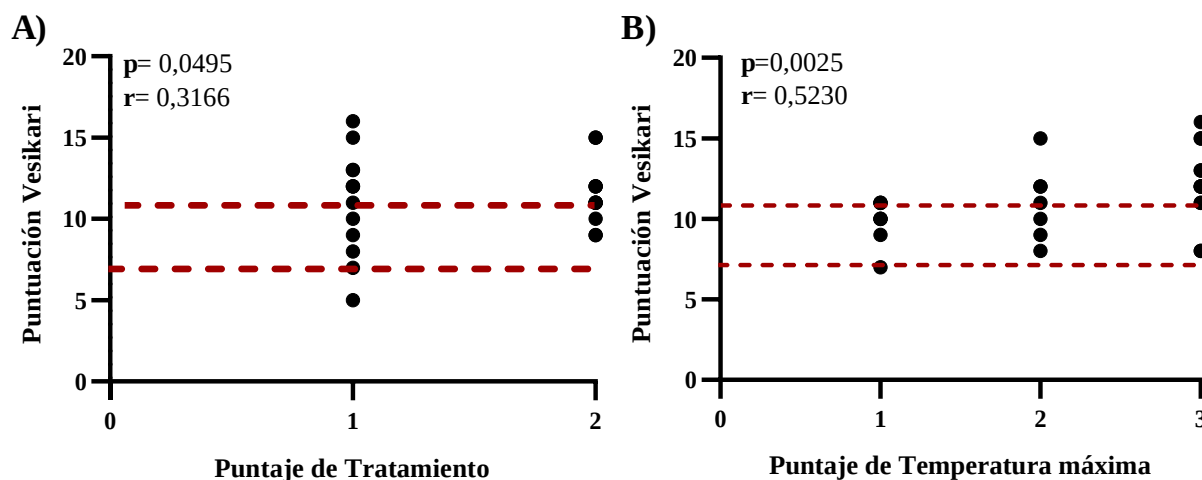


Figura 10. Correlación de Spearman entre tipo de tratamiento, temperatura máxima registrada y la severidad de la GEA según Vesikari. **A)** Se observó correlación entre el tipo de tratamiento recibido y la severidad (puntaje 1= rehidratación vía oral; puntaje 2= rehidratación vía intravenosa). **B)** Se observó correlación entre la temperatura corporal máxima registrada y la severidad (puntaje 1= 37,1-38,4 °C; puntaje 2=38,5-38,9 °C; puntaje 3= $\geq 39,0$ °C). Las líneas continuas rojas corresponden al punto de corte para cada grupo de severidad según la escala de Vesikari, <7 = leve, 7-10 = moderado, ≥ 11 severo.

4.2. PCR en tiempo real para cuantificación de carga bacteriana

4.2.1. Control de calidad de ADN plasmídico y verificación de insertos clonados

En las **Figuras S3 A-B (Anexo 1)** se muestran los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN plasmídico purificado (sin digerir) de colonias transformadas con el vector pJET/1.2 blunt que fueron seleccionadas. La **Figura S3A** corresponde a clones de *Ruminococcus spp.*, y la **Figura S3B** a clones de Bacterias totales.

La **Figuras 11** corresponde al resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados a partir de los clones obtenidos. Los patrones de bandeo obtenidos corresponde a los tamaños esperados de 157 pares de bases (pb) para *Ruminococcus spp.*, y 466 pb para Bacterias totales.

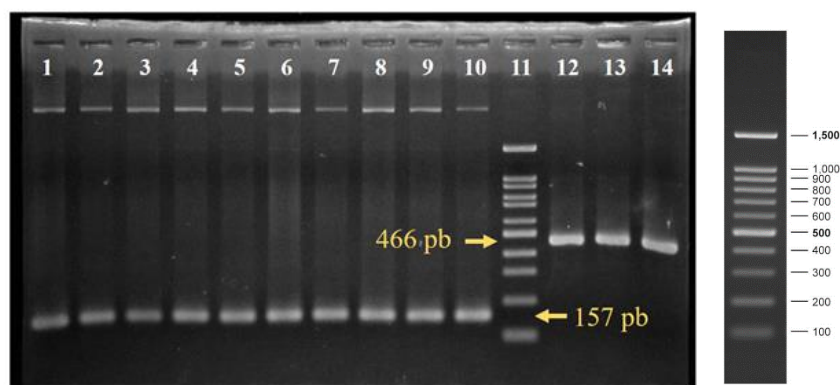


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación de clones obtenidos. Carril 1-10) Clones 16S *Ruminococcus spp.* Carril 11) Marcador de peso molecular (100 pb), Carril 12-14) Clones 16S Bacterias totales.

4.2.2. Determinación del número de copias de plásmidos control

En la **Tabla 7** se muestran los valores de lectura por espectrofotometría de la concentración de ADN plasmídico de los clones seleccionados para la generación de la curva estándar. A partir de los datos de concentración, se determinó la cantidad de copias del inserto aplicando la fórmula descrita en el ítem 3.8.7.

Tabla 7. Lectura de absorbancia de ADN plasmídico purificado (por duplicado) y determinación del número de copias

Muestra	Concentración de ADN [ng/μL]			Relación 260/280			Relación 260/230			Número de copias de ADN inserto/μL
	X ₁	X ₂	$\bar{X}$	X ₁	X ₂	$\bar{X}$	X ₁	X ₂	$\bar{X}$	
Clon 1 16S Bacterias totales	60,45	61,98	61,22	2,02	1,99	2,01	0,67	0,74	0,71	1,22E+11
Clon 6 16S <i>Ruminococcus spp.</i>	42,04	38,80	40,42	1,84	1,88	1,86	1,66	1,76	1,71	2,39E+11

X₁: primera lectura; X₂: segunda lectura; $\bar{X}$: promedio entre réplicas

4.2.3. Generación de curva estándar del gen 16S Bacterias totales

En las **Tablas 8 y 9** se detallan las diluciones de ADN plasmídico empleadas en el ensayo de PCR en tiempo real, con sus respectivos valores promedios de Ct obtenidos en cada reacción. La curva estándar para cada ensayo se representó graficando el logaritmo en base 10 del número de copias frente al valor del umbral de ciclo **Figuras 12 y 13**. Los valores de eficiencia (**E**), coeficiente de determinación (**R²**) y valor de la pendiente obtenidos para ambas reacciones estuvieron dentro del rango aceptable.

Tabla 8. Diluciones de ADN plasmídico empleadas para generación de curva estándar del gen 16S ARNr Bacterias totales

Dilución	Número de copias de ADN inserto/ μL	Ct ₁	Ct ₂	Ct ($\bar{X}$)	log [copias DNA/ μL]
10^{-1}	1,22E+10	15,72	15,59	15,66	10
10^{-2}	1,22E+9	19,42	19,15	19,29	9
10^{-3}	1,22E+8	23,27	23,09	23,18	8
10^{-4}	1,22E+7	27,35	27,47	27,41	7
10^{-5}	1,22E+6	31,22	30,75	30,99	6
10^{-6}	1,22E+5	32,83	32,73	32,78	5

Ct₁: valor de umbral de ciclo; Ct₂: valor de umbral de ciclo de réplica; Ct ($\bar{X}$): promedio entre réplicas

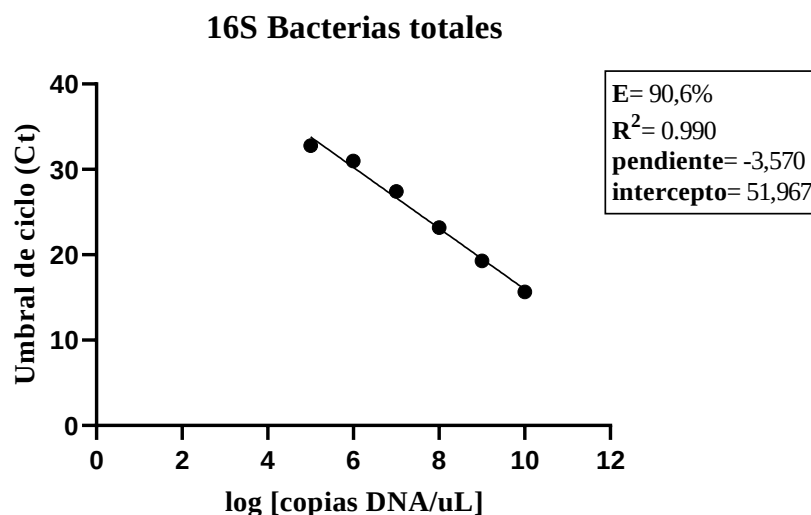


Figura 12. Curva estándar 16S ARNr dominio Bacteria. Regresión lineal de valores promediados de Ct de la serie de diluciones (10^{-1} a 10^{-6}) de ADN plasmídico correspondiente al clon de Bacterias totales. E: Eficiencia de la reacción; R^2 : coeficiente de determinación.

Tabla 9. Diluciones de ADN plasmídico empleadas para generación de curva estándar del gen 16S ARNr *Ruminococcus spp.*

Dilución	Número de copias de ADN inserto/ μL	Ct ₁	Ct ₂	Ct ($\bar{X}$)	log [copias DNA/ μL]
10 ⁻²	2,39E+09	12,81	12,65	12,73	9
10 ⁻³	2,39E+08	16,41	16,16	16,29	8
10 ⁻⁴	2,39E+07	18,46	18,32	18,39	7
10 ⁻⁵	2,39E+06	22,52	23,33	22,93	6
10 ⁻⁶	2,39E+05	26,88	26,69	26,79	5
10 ⁻⁷	2,39E+04	29,27	28,87	29,07	4
10 ⁻⁸	2,39E+03	34,31	34,45	34,38	3

Ct₁: valor de umbral de ciclo; Ct₂: valor de umbral de ciclo de réplica; Ct ($\bar{X}$): promedio entre réplicas

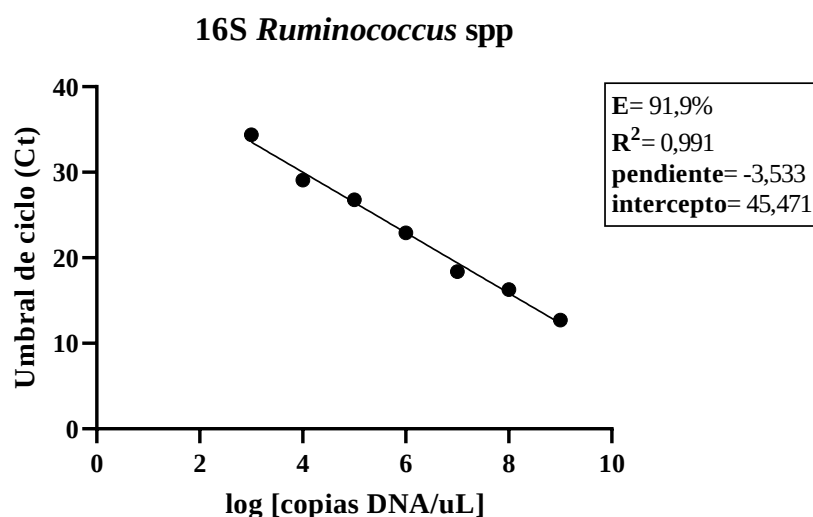


Figura 13. Curva estándar 16S ARNr *Ruminococcus spp.* Regresión lineal de valores promediados de Ct de diluciones en serie (10⁻² a 10⁻⁸) de ADN plasmídico correspondiente al clon de *Ruminococcus spp.* E: Eficiencia de la reacción; R²: coeficiente de determinación.

4.2.4. Cuantificación de la carga bacteriana por PCR en tiempo real en muestras de materia fecal

La curva estándar fue utilizada para determinar el número de copias de bacterias totales y de *Ruminococcus spp.*, mediante interpolación de los valores de Ct promedios que se obtuvieron para cada muestra problema. El valor de la carga bacteriana fue

normalizado a **copias/ng de ADN total** mediante el factor de conversión descrito en el ítem 3.10. (Tabla 12 y 13 del Anexo 6).

4.2.5. Comparación de la carga de Bacterias totales y *Ruminococcus spp.*, entre grupo de casos y controles sanos

Se comparó la carga de bacterias totales entre los casos de GEA positivos para rotavirus y el grupo control, sin observarse diferencias significativas (**Figura 14**). Al extender el mismo análisis entre el grupo control y los grupos según severidad de la GEA tampoco se encontró diferencias significativas (**Figura S4, Anexo 1**). Con el fin de evaluar la posible influencia del número de deposiciones en la carga microbiana, también se comparó la carga de bacterias totales de acuerdo al número máximo de deposiciones, sin encontrar diferencias significativas (**Figura S5, Anexo 1**).

La carga de *Ruminococcus spp.*, tampoco arrojó diferencias significativas entre controles y casos de RVA positivos (**Figura 15**).

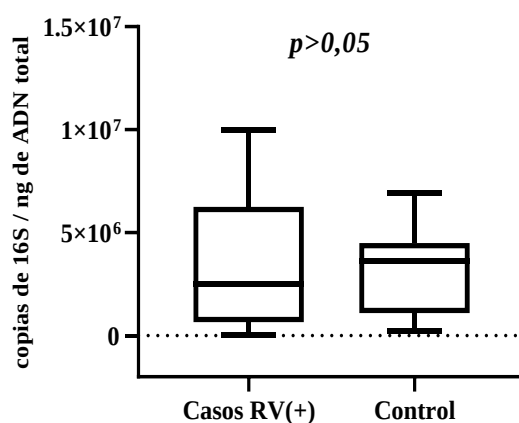


Figura 14. Comparación de niveles de Bacterias totales entre el grupo de GEA positivos para rotavirus y el grupo control. Carga bacteriana normalizada y expresada como copias/ng de ADN total. Empleando el test de Mann-Whitney para la comparación entre grupos; no se observó diferencias significativas ($p=0,8361$). Casos RV (n=50); Control (n=13).

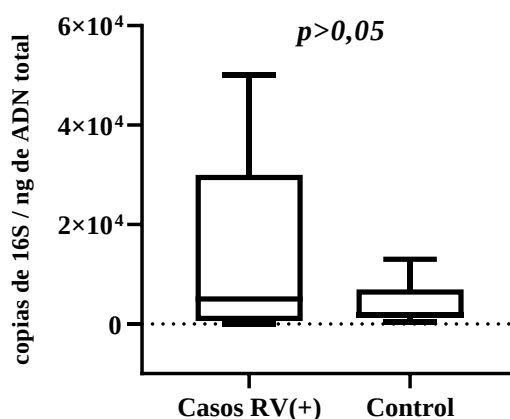


Figura 15. Comparación de niveles de *Ruminococcus spp.*, entre el grupo de casos de GEA positivos para rotavirus y el grupo control. Carga bacteriana normalizada y expresada como copias/ng de ADN total. Empleando el test de Mann-Whitney para la comparación entre grupos; no se observó diferencias significativas ($p=0,5214$). Casos RV (n=50); Control (n=13).

4.2.6. Comparación de la carga de *Ruminococcus spp.*, según la severidad de la GEA

El análisis entre grupos según la severidad de la GEA arrojó diferencia significativa ($p=0,0331$) entre los casos leves que se asociaron a una mayor carga de *Ruminococcus spp.*, y los casos severos que en cambio presentaron los niveles más bajos (**Figura 16**).

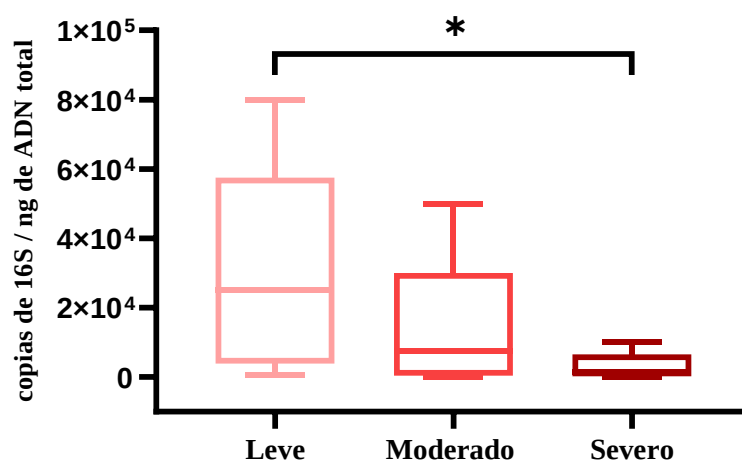


Figura 16. Comparación de niveles de *Ruminococcus spp.*, según la severidad de la GEA. Carga bacteriana normalizada y expresada como copias/ng de ADN total. Empleando el test de Kruskal-Wallis para la comparación entre grupos, se observó diferencias significativas entre el grupo leve y severo ($p=0,0331$). Leve (n=6), Moderado (n=24), Severo (n=20).

4.3. Determinación de niveles de IgA anti-rotavirus

4.3.1. Cuantificación de IgA total en clarificado fecal por inmunodifusión radial

Se evaluaron los niveles de IgA total como un indicador de calidad de las muestras de clarificado proteico, obteniéndose un valor de mediana de 33,00 mg/dL, RIQ [13,00-64.50]; 9 muestras presentaron niveles de IgA total inferior al límite de detección de la técnica empleada (**Figura S6, Anexo 1**).

4.3.2. Determinación semi-cuantitativa de títulos de sIgA α Rv en muestras de GEA positivos para rotavirus mediante ELISA

El punto de corte se calculó a partir de los valores obtenidos en ensayos con el control negativo, sumando el promedio de la DO (0,06) + 3 desviaciones estándar (0,01) se tuvo como resultado 0,09. Por tanto, se consideraron como positivas muestras con una DO superior a 0,1 (**Figura 17**).

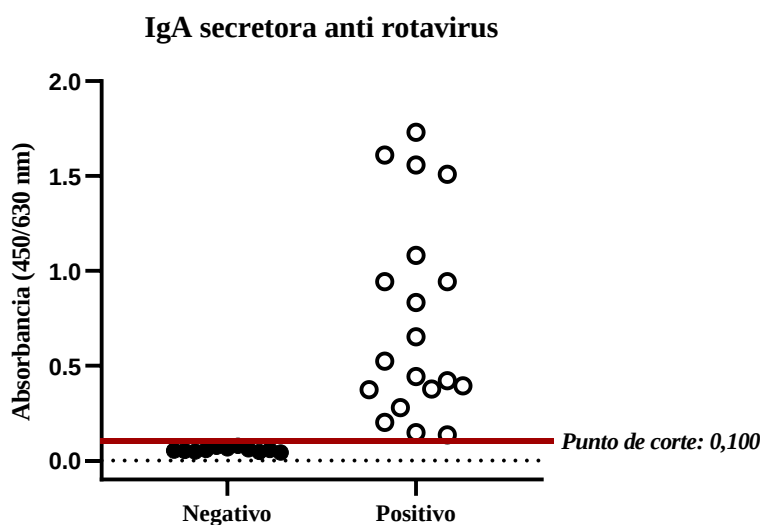


Figura 17. Determinación del punto de corte para ELISA semi-cuantitativo de IgA α RV. Se utilizó el valor promedio de la DO de controles negativos más 3 desviaciones estándar para establecer el punto de corte. Muestras con valores de DO > 0,100 se consideraron positivas para anticuerpos específicos contra rotavirus; valores de DO < 0,100 se consideraron negativos.

Para la determinación semi-cuantitativa de los títulos de IgA secretora anti rotavirus se consideró la dilución más alta que aun diera señal por encima del punto de corte. Se observó que 1:64 corresponde a la última dilución donde aún se desarrolló señal por encima de 0,1 (**Figura 18**).

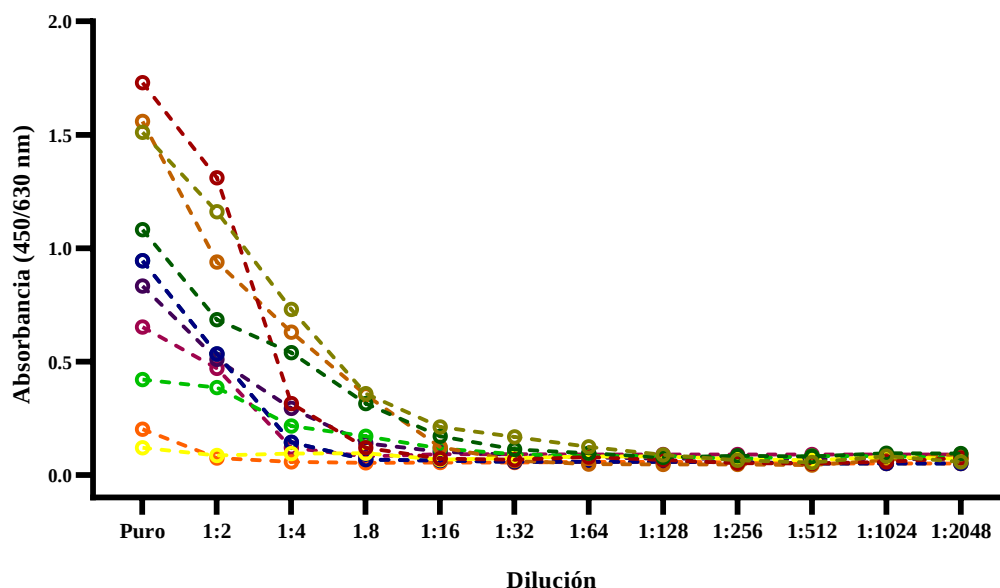


Figura 18. Prueba para determinación de rango de dilución a emplear en ELISA para IgAαRV. El 90% de las muestras testadas desarrollaron señal por encima del punto de corte (0,100) hasta la dilución 1:64. Los valores señalados corresponden al promedio de la prueba por duplicado de cada muestra.

4.3.3. Comparación de títulos de sIgAαRv fecal según la severidad de la GEA

Al analizar la distribución de los niveles de sIgA por dentro de cada nivel de severidad según Vesikari, se observó que el 67% de los casos leves tenían títulos por encima de 32, mientras que el 60% de los casos severos tenía títulos por debajo de 16, mostrando una leve tendencia a que los casos leves se asocien con mayores títulos y viceversa. Por el contrario la mayor cantidad de negativos se dio en el grupo leve y la menor cantidad en el grupo severo, por lo que la tendencia no es clara (**Tabla 10**). Al comparar los valores totales de sIgAαRv en cada nivel de severidad de la GEA, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (**Figura 19**).

Tabla 10. Proporción (%) de títulos de sIgAαRv según severidad de Vesikari

Título	Leve (n=6)	Moderado (n=23)	Severo (n=20)
64	16,7	21,7	20,0
32	50,0	21,7	15,0
16	0,0	17,4	10,0
<16	16,7	26,1	50,0
Negativo	16,7	13,0	5,0

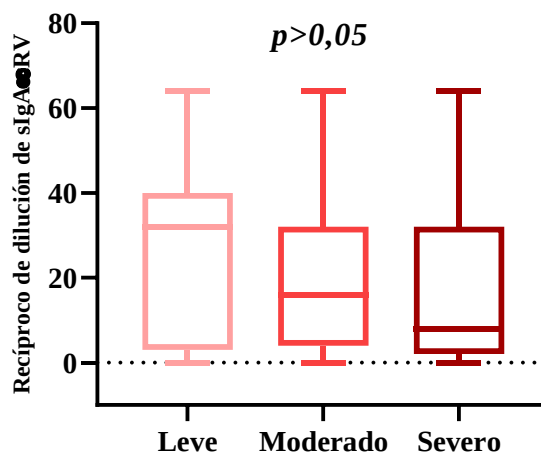


Figura 19. Títulos de sIgAαRV según severidad de la GEA. Empleando el test de Kruskal-Wallis para la comparación entre grupos, no se observó diferencias significativas ($p=0,7381$). Título de la muestra considerando el recíproco de la dilución de clarificado fecal más alto con $DO > 0,100$. Leve ($n=6$), Moderado ($n=23$), Severo ($n=20$).

4.3.4. Correlación entre los títulos de sIgAαRV y niveles de *Ruminococcus* spp.

De manera a evaluar una potencial correlación entre los niveles de *Ruminococcus* spp., y los títulos de sIgAαRV fecal, se realizó un análisis de correlación de Spearman. No se detectó correlación significativa (**Figura S7, Anexo 1**).

4.4. qRT-PCR de casos leves previamente negativos para rotavirus A por test inmunocromatográfico

Tal como se observa en la **Figura S8 (Anexo 1)**, las 15 muestras testadas por qRT-PCR no mostraron señal de amplificación para el gen NSP3, con lo cual se descartó que los casos de GEA leves y con resultado negativo para rotavirus A por test inmunocromatográfico, se tratasen de casos falsos negativos.

4.5. Caracterización molecular de rotavirus por PCR convencional

Se realizó la caracterización molecular de las cepas de rotavirus infectantes, para posteriormente evaluar su posible relación con la severidad de la GEA. Se logró la amplificación del gen VP4 en las 50 muestras (100%) analizadas, mientras que la determinación del G-tipo fue posible en 44 (88%) de las mismas. La combinación de genotipo G6P[8] fue predominante, siendo detectado en 28 muestras (56%), 13 casos (26%) de GEA fueron causados por el genotipo G3P[8], en menor proporción por G12P[6], detectado solo en 2 muestras (4%), y 1 caso (2%) de infección mixta con

G6/G3P[8] (**Figura 20**). La **Figura 21** muestra la frecuencia de genotipos según la severidad de la GEA, se puede observar una tendencia similar en la distribución de G3P[8] y G6P[8] en los grupos moderado y severo. Casos de co-infección y detección de G12P[6] solo se observó en el grupo severo.

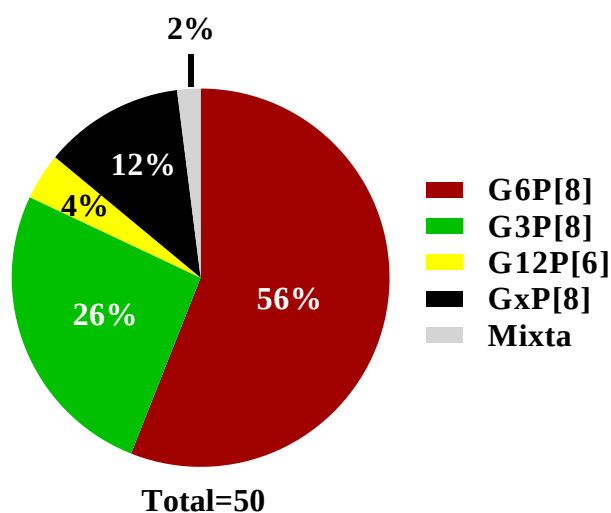


Figura 20. Distribución de genotipos de rotavirus detectados. 96% de las cepas de rotavirus detectadas corresponden al genotipo P[8], siendo la combinación G6P[8] la más frecuente (56%). Mixta: co-infección con G3/G6 P[8].

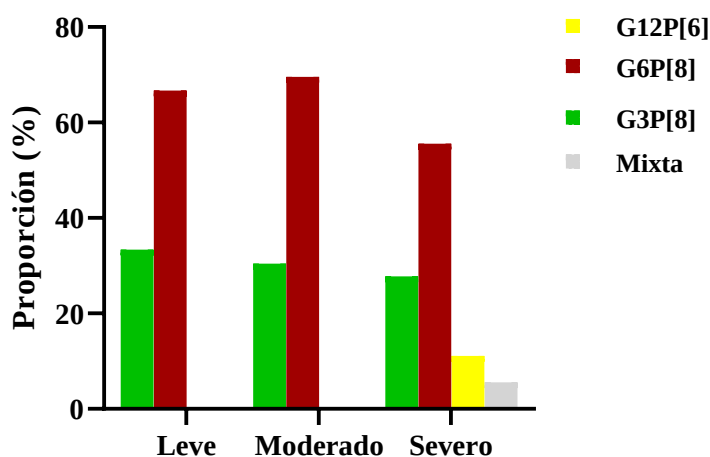


Figura 21. Distribución de genotipos de rotavirus detectados según severidad de la GEA. La frecuencia de los genotipos G6P[8] y G3P[8] fue similar en los grupos moderado y severo. Casos de co-infección y detección de G12P[6] solo se observó en el grupo severo.

4.5.1. Comparación de la carga de *Ruminococcus spp.*, según genotipo de rotavirus infectante

Los casos de GEA fueron agrupados de acuerdo al genotipo de rotavirus infectante para evaluar la variación en los niveles de *Ruminococcus spp.*, sin embargo no se encontró diferencias significativas (**Figura S9, Anexo 1**).

5. DISCUSIÓN

La introducción de las vacunas contra rotavirus a los programas de inmunización a nivel mundial ha sido clave para la reducción de la morbilidad y mortalidad de la enfermedad, sin embargo, los análisis en la era post-vacunal han evidenciado la existencia de diferencias en el nivel de protección entre países desarrollados y aquellos en vía de desarrollo. La influencia de la microbiota intestinal durante las infecciones virales ha venido siendo estudiada en los últimos años como posible factor involucrado en la regulación de la respuesta inmune del hospedero, y ya se han identificado a determinadas bacterias con potencial de inhibir la infección, o por el contrario potenciarla (43,82). Hallazgos previos con *Ruminococcus spp.*, un género bacteriano constituyente normal de la microbiota humana y con funciones benéficas para el hospedero, han sugerido su posible rol protector durante las infecciones por rotavirus (26,66). Con el objetivo de aportar evidencia de la relevancia de las interacciones de rotavirus y bacterias comensales “en la vida real”, el presente trabajo realizó por primera vez en Paraguay un estudio de la proporción de los niveles de severidad de la gastroenteritis por rotavirus en una población de niños vacunados, creando un registro con los datos clínicos y demográficos.

En cuanto a la distribución de la severidad de los casos de GEA según Vesikari, los casos se repartieron mayormente entre moderado (48%) y severo (40%), mientras que los leves representaron solo el 12% del total. La baja proporción de casos leves podría deberse a que corresponden a cuadros que logran una resolución rápida de la infección que no llegan a requerir de atención médica. La presencia de diarrea acuosa fue la presentación clínica presente en el 100% de los casos acompañada el 94% de las veces de vómito. Sin embargo dentro del esquema de evaluación de Vesikari, el número de eventos/día no fue un parámetro de peso en la asignación del nivel de severidad. Por el contrario, los valores referentes a la duración de los síntomas influyeron significativamente en la definición de la severidad. En concordancia con estos datos, la necesidad de una terapia para tratar la deshidratación también se correlacionó significativamente con la gravedad de la GEA, especialmente con respecto a los casos que requirieron de rehidratación por vía intravenosa. Aunque la correlación entre la gravedad de la GEA y el desarrollo de una mayor temperatura corporal resultó significativa, se debe mencionar la dificultad para la evaluación de este parámetro debido a que en algunos casos la temperatura no fue registrada con un termómetro,

sino como un dato referido por parte del tutor o encargado mediante el tacto directo con el paciente. Previamente ya se ha discutido la dificultad para validar éste parámetro debido a la obtención de datos poco precisos (83). La evaluación de las características que definen un caso de diarrea relacionada a rotavirus, así como los parámetros para cuantificar su severidad están en re-evaluación en el periodo post-vacunal (16). Simplificar esos parámetros para poder obtener datos comparables es lo recomendado. Según lo observado en este trabajo podríamos sugerir que la necesidad de terapia intravenosa, que necesariamente es administrada en un centro de salud por un profesional, podría considerarse como un indicador indirecto de la severidad de la GEA.

La determinación de la carga bacteriana se realizó por el método de PCR en tiempo real. Las muestras fueron colectadas mayormente entre el día 2 y 3 de síntomas para todos los grupos de severidad, asegurando que los análisis no se vieran influenciados por variaciones en la carga microbiana debido al día de síntomas de la infección en la que fueron colectadas las muestras. La reacción para bacterias totales y la dirigida a *Ruminococcus spp.*, mostraron valores de eficiencia por encima del 90%, correspondiente a los valores recomendados para validar la técnica. La PCR en tiempo real, es un método bastante empleado para la determinación de carga bacteriana o viral, resultando rentable y accesible en comparación con otras metodologías (84). Una alternativa a la cuantificación por PCR en tiempo real, es a través de la PCR digital (dPCR), otra variante de la PCR que permite una cuantificación absoluta del número de copias sin necesidad del uso de estándares externos. Otras ventajas de la dPCR sobre la PCR en tiempo real es que es menos sensible a la presencia de inhibidores en las muestras, presenta menor límite de detección y un rango de detección más amplio, y reduce el ruido de fondo en el control negativo. Como desventaja, requiere de un equipamiento y de reactivos costosos, resulta un poco más laboriosa, con un mayor tiempo de procesamiento y muestras con alta concentración de material genético requieren ser diluidas (85,86). Sin embargo, estudios comparativos han demostrado una buena correlación entre los resultados obtenidos por dPCR y PCR en tiempo real, en los cuales el número de copias obtenidos por ambas técnicas son similares (87,88). Con respecto a la carga de *Ruminococcus spp.*, no se observaron diferencias entre los casos de GEA y el grupo control. Algunos factores que afectan la carga de

Ruminococcus spp., son el tipo de dieta y el consumo de antibióticos (89,90). En éste estudio no se ha evaluado el tipo de dieta, pero si el consumo de antibióticos, y se han excluido pacientes que hayan estado consumiendo antibióticos poco antes o durante la ejecución del estudio. Otro factor que también podría influir en la carga bacteriana es la edad, y en éste sentido se debe mencionar que debido a las restricciones por la pandemia del COVID-19, se tuvo dificultad en la obtención de muestras para el grupo de controles sanos. El rango etario de los controles estuvo compuesto mayormente por niños menores de 24 meses, lo cual pudo haber influido en los análisis versus al grupo de casos de RVA positivos que incluyó un rango de 4-72 meses.

Al analizar los niveles de *Ruminococcus* spp., de acuerdo a la severidad de la GEA, se observó una correlación negativa entre el nivel de *Ruminococcus* y la severidad; es decir, según nuestros resultados los individuos que resolvieron más rápido el cuadro de GEA (leves) presentaron mayor carga de *Ruminococcus* spp., mientras que los casos que se caracterizaron por una duración más prolongada de los síntomas (severos) mostraron niveles bajos de *Ruminococcus* spp. Éste resultado va en concordancia con lo propuesto previamente acerca de su posible rol protector durante infecciones por rotavirus. Éste rol protector fue propuesto en base a la correlación negativa de los niveles de *Ruminococcus* spp., y los títulos menores de sIgA, lo que sugería una menor susceptibilidad a la infección por RVA (26). Esto fue reforzado mediante el análisis de interacción entre la partícula viral y estas bacterias (66). El posible papel protector de *Ruminococcus* spp., no implicaría neutralización de la infección, de hecho las muestras analizadas corresponden a infecciones activas por RVA.

En base a los resultados *in vitro* que han demostrado la capacidad diferencial de *Ruminococcus* spp., de unirse a rotavirus y reducir la infectividad (66), se ha propuesto como mecanismo de inhibición la interacción directa de *Ruminococcus* spp., con la partícula viral, interfiriendo con la unión a los receptores celulares. Al igual que *Ruminococcus* spp., otras bacterias también utilizan un mecanismo similar, como *Bifidobacterium thermophilum* RBL67, que exhibe una elevada capacidad para adherirse a líneas celulares intestinales e inhibir la unión de rotavirus. Además, los ensayos *in vivo* con ratones lactantes que recibieron *B. thermophilum* RBL67 como terapia probiótica, mostraron un mejor pronóstico de la infección, a través de la disminución en la duración de la diarrea, menor lesión epitelial y reducción de la replicación viral (91). Cepas probióticas como *Escherichia coli* Nissle (EcN) y

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) también son conocidas por exhibir protección contra la infección por rotavirus y norovirus mediante unión directa a la partícula viral, contribuyendo a una duración media más corta del *shedding* viral y de la diarrea (63,92). Éste tipo de mecanismo no es exclusivo de virus entéricos, por ejemplo se ha reportado que *Enterococcus faecium*, una bacteria con características probióticas, es capaz de atrapar por adsorción directa al virus de la influenza porcina e interferir de forma negativa con su replicación (93).

Contrario a nuestros resultados, en un estudio en el cual se analizó la diversidad y riqueza de la microbiota intestinal en niños con cuadros de GEA clasificados por la escala de Vesikari, no se observó diferencias significativas en la abundancia de algún taxón bacteriano entre los grupos de severidad (94). En otro estudio, en el cual se evaluaron dos cohortes de niños con infecciones gastrointestinales por rotavirus y norovirus, se observó una abundancia relativa incrementada en el grupo de niños infectados por rotavirus, en comparación con norovirus, aunque ambas cohortes no mostraron diferencias en la gravedad de la GEA (95). El estudio de la microbiota intestinal es complejo y por sobre todo multifactorial, por tanto la discrepancia de resultados entre diferentes trabajos pueden deberse a diferencias en el modelo metodológico, desde la técnica de recolección de la muestra hasta la plataforma de secuenciación empleada; también la exclusión de ciertas variables que tienen una influencia en la composición de la microbiota y que pudiera generar sesgos en la interpretación de los resultados. Además, como ocurre en el estudio de bacterias con potencial probiótico, una identificación taxonómica a nivel especie o incluso cepa, es lo ideal, teniendo en cuenta que las propiedades exhibidas por ciertas bacterias pueden ser únicas o variar entre una u otra especie.

Tres aspectos importantes a mencionar con respecto a *Ruminococcus*; **i)** la abundancia de la familia *Lachnospiraceae* se ha asociado con funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y con una microbiota no perturbada (96,97). Sin embargo, el incremento de *Ruminococcus gnavus* también miembro de la familia *Lachnospiraceae*, se ha relacionado con la patogénesis de la enfermedad de Crohn, trastornos a nivel de las arterias coronarias y alergias en niños (98,99). Por tanto, los hallazgos del presente estudio deben interpretarse como un aspecto dentro del contexto específico de la infección por rotavirus. Además se debe considerar que

el estudio realizado es con respecto a un género comensal en particular (*Ruminococcus* spp) y no se debe descartar las interacciones que pudieran darse con otros comensales bacterianos y el efecto de los mismos sobre el curso de la infección; **ii)** el estudio de la interacción microbiota-virus está condicionada por factores relacionados al hospedero (genética, estatus inmunológico), al ambiente (estilo de vida) y al virus (características propias) y no siempre es posible abarcar todas las variables. Por tanto, debido a la complejidad del análisis los datos se van estudiando en etapas; **iii)** el hecho de que *Ruminococcus* spp., haya sido aislado del intestino delgado, región donde ocurre la replicación de rotavirus, sugiere que la interacción observada en los ensayos *in vitro*, podría estar ocurriendo *in vivo* (67).

Si bien los resultados obtenidos corresponden a un estudio piloto, el tamaño muestral con el cual se trabajó es similar y en algunos casos superior a lo reportado en la literatura con respecto a estudios que evalúan el rol de la microbiota durante las infecciones por virus entéricos.

En cuanto al análisis de los títulos de sIgA anti-rotavirus, no se encontró correlación entre los niveles de anticuerpos y la severidad de la GEA. Si bien se observó una tendencia de niveles más altos de sIgA anti-rotavirus en los casos leves de GEA, y niveles más bajos en cuadros severos, no fue significativo entre los grupos.

La inmunidad mediada por anticuerpos séricos y de mucosa, en especial del tipo IgA, es utilizada como determinante de protección contra rotavirus, aunque no haya un consenso claro al respecto (5). La importancia de la IgA en la resolución de la infección ya ha sido demostrada en ensayos en modelos animales deficientes de IgA, en los cuales se observó un retroceso significativo y sustancial en la eliminación de la infección o protección contra reinfección (100). En humanos, títulos altos de IgA α Rv se han asociado con protección contra la infección y la enfermedad en su forma sintomática (24,101,102). En contraste, también hay estudios que han reportado la falta de correlación entre los títulos de IgA y la protección (76,103). Por consiguiente, niveles elevados de anticuerpos no aseguran que el individuo esté protegido de la infección o curse con la enfermedad en su forma asintomática, y de igual manera, títulos bajos no necesariamente indican que la enfermedad se desarrolle de forma sintomática. Ésta discrepancia entre estudios dificulta el establecimiento de una correlación clara con respecto a la IgA como marcador de protección.

Por otra parte, también se propone considerar los niveles de IgA como marcador de susceptibilidad, donde títulos altos se asocian con un mayor número de infecciones, y por consiguiente mayor vulnerabilidad. El concepto de IgA como marcador de susceptibilidad se relaciona estrechamente con la expresión diferencial de genes de HBGA en el hospedero. Específicamente se ha observado una correlación entre títulos altos de IgA en saliva y el fenotipo secretor (gen FUT2 funcional) en adultos desafiados con rotavirus. A su vez los títulos de IgA se correlacionaron negativamente con la abundancia de *Ruminococcus spp.* (26). Por consiguiente, considerando la capacidad de *Ruminococcus spp.*, de interferir en la infección por rotavirus y su correlación inversa con los niveles de anticuerpos, se esperaría observar casos leves de GEA asociados con niveles bajos de IgA, sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de severidad con respecto a los títulos de anticuerpos. Si bien, la detección de copro-IgA es un excelente indicador del contenido intestinal, la sensibilidad de la técnica utilizada puede ser menor en comparación a otras muestras como la saliva, por lo que esto podría ser una limitante de éste trabajo. En éste estudio no se ha evaluado el perfil de HBGA de los individuos, lo cual también limita un análisis completo sobre el rol de la IgA como marcador de susceptibilidad.

Respecto a la identificación de los genotipos circulantes, si bien, como mencionamos, en este trabajo no se analizó el perfil de HBGA de los individuos, la comparación de la distribución de genotipos en los diferentes grupos de severidad y/o con los niveles de *Ruminococcus spp.*, podría dar una idea de la asociación de los genotipos a esos parámetros. Ya se tiene evidencia que las cepas del tipo P[8] y P[4] de rotavirus infectan preferentemente individuos secretores, mientras que los no secretores son menos vulnerables a estos genotipos. También se ha descrito que individuos Lewis negativos son más susceptibles a la infección por P[6], independientemente sean de estatus secretor o no secretor (7,104,105).

En éste estudio comparamos los niveles de *Ruminococcus spp.*, según el genotipo infectante considerando que la unión de HBGA a rotavirus es genotipo dependiente, sin embargo no encontramos diferencias significativas. Algunas limitaciones con respecto a éste análisis son; **i)** el 96% de genotipos detectados corresponden al tipo P[8] combinado con G3 o G6, por lo que no se esperaría encontrar diferencias de

afinidad a *Ruminococcus spp.*, entre ambos genotipos, **ii)** no todas las especies de un mismo género bacteriano presentaran igual grado de afinidad, y en éste análisis hemos evaluado a *Ruminococcus* a nivel género. Un aspecto interesante es que los dos únicos niños que presentaron el genotipo P[6] pertenecen a una etnia distinta al resto de los casos incluidos en el estudio y correspondieron a casos severos.

A partir de los resultados de éste estudio piloto, se tiene como perspectiva llevar a cabo un proyecto mayor en donde se tendrá en cuenta; **i)** diseño de una estrategia óptima de muestreo de casos y controles; **ii)** ampliación de los estudios de composición de microbiota mediante metagenómica; **iii)** caracterización del perfil de HBGA; **iv)** optimización del sistema de puntuación para la clasificación de la severidad de la GEA; **v)** recolección de más datos sociodemográficos y clínicos que pudieran influir en la carga microbiana y la severidad de la GEA .

6. CONCLUSIÓN

Como conclusión principal proponemos que:

- i) En vista a que la característica clínica principal de los casos severos fue la duración más prolongada de la diarrea y el vómito y a su vez, los casos severos se asociaron a una carga menor de *Ruminococcus* spp., respecto a los casos leves (y viceversa); **este trabajo sugiere el posible rol de *Ruminococcus* spp., en la resolución temprana de la gastroenteritis causada por RVA.**
- ii) La evidencia con respecto a la interacción microbiota-rotavirus se limitan mayormente a estudios in vitro o en modelos animales, y los estudios en niños que corresponden al grupo de riesgo, son escasos. **Este trabajo aporta un nuevo aspecto (el rol de *Ruminococcus* spp., en el desarrollo de la GEA) a un conjunto de evidencias recabadas sobre un género bacteriano en particular.** No se deben descartar las interacciones que pudieran darse con otros comensales bacterianos y el efecto de los mismos sobre el curso de la infección.
- iii) La duración de los síntomas de diarrea y vómito y el tipo de tratamiento para la rehidratación, **fueron los parámetros más importantes para determinar el grado de severidad** aplicando la metodología de encuesta de seguimiento utilizando la escala de Vesikari.

Con respecto a la relación de los títulos de sIgA α Rv en materia fecal con la gravedad de la GEA, nuestro resultado no fue concluyente para determinar su rol protector ni como marcador de susceptibilidad. Se requieren de más estudios para definir de forma clara el rol de la IgA en las infecciones por rotavirus, y su relación con otros componentes del ambiente intestinal.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Severe Childhood Diarrhea. 2006;12(2):304-6.
2. Burnett E, Jonesteller CL, Tate JE, Yen C, Parashar UD. Global Impact of Rotavirus Vaccination on Childhood Hospitalizations and Mortality from Diarrhea Eleanor. 2017;215(24):1666-72.
3. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res.* 2014;190:75-96.
4. Clarke E, Desselberger U. Correlates of protection against human rotavirus disease and the factors influencing protection in low-income settings. *Mucosal Immunol [Internet]*. 2015;8(1):1-17.
5. Clarke E, Desselberger U. Correlates of protection against human rotavirus disease and the factors influencing protection in low-income settings. *Mucosal Immunol [Internet]*. 2015;8(1):1-17.
6. Arias CF, López S. Rotavirus cell entry: not so simple after all. *Curr Opin Virol.* 2021;48:42-8.
7. Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, et al. Spike Protein VP8* of Human Rotavirus Recognizes Histo-Blood Group Antigens in a Type-Specific Manner. *J Virol.* 2012;86(9):4833-43.
8. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoën N, Clément M, et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie.* 2001;83(7):565-73.
9. Peña-gil N, Santiso-bellón C, Gozalbo-rovira R, Buesa J, Monedero V, Rodríguez-díaz J. The role of host glycobiology and gut microbiota in rotavirus and norovirus infection, an update. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24).
10. Schrotten H, Hanisch F-G, Hansman GS. Human Norovirus Interactions with Histo-Blood Group Antigens and Human Milk Oligosaccharides. *J Virol.* 2016;90(13):5855-9.
11. Aoki ST, Trask SD, Coulson BS, Greenberg HB, Dormitzer PR, Harrison SC. Cross-Linking of Rotavirus Outer Capsid Protein VP7 by Antibodies or Disulfides Inhibits Viral Entry. *J Virol.* 2011;85(20):10509-17.
12. López S, Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells: A Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 2004;12(6):271-8.
13. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3.
14. Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet.* 2006;368(9532):323-32.
15. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology [Internet]*. 2009;136(6):1939-51.
16. Murray J, Soenarto SY, Mulyani NS, Wijesinghe PS, Mpabalwani EM, Simwaka JC, et al. Multicountry Analysis of Spectrum of Clinical Manifestations of Children <5 Years of Age Hospitalized with Diarrhea. *Emerg Infect Dis [Internet]*. diciembre de 2019;25(12):2253-6.
17. Aslan A, Kurugol Z, Cetin H, Karakaşlılar S, Koturoğlu G. Comparison of Vesikari and Clark scales regarding the definition of severe rotavirus gastroenteritis in children. *Infect Dis (Auckl).* 2015;47(5):332-7.
18. Shim DH, Kim DY, Cho KY. Diagnostic value of the Vesikari Scoring System for predicting the viral or bacterial pathogens in pediatric gastroenteritis.

- Korean J Pediatr. 2016;59(3):126-31.
19. Lewis K. Vesikari Clinical Severity Scoring System Manual. Path [Internet]. 2011;(May):1-50.
 20. Desselberger U. Differences of rotavirus vaccine effectiveness by country: Likely causes and contributing factors. *Pathogens*. 2017;6(4):1-13.
 21. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2011;4(6):603-11.
 22. Pabst O, Slack E. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific. *Mucosal Immunol*. 2020;13(1):12-21.
 23. Grimwood K, Lund JCS, Coulson BS, Hudson IL, Bishop RF, Barnes GL. Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children. *J Clin Microbiol*. 1988;26(4):732-8.
 24. Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol*. 1992;30(7):1678-84.
 25. Ward R. Mechanisms of protection against rotavirus infection and disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(SUPPL. 3):57-9.
 26. Rodríguez-Díaz J, García-Mantrana I, Vila-Vicent S, Gozalbo-Rovira R, Buesa J, Monedero V, et al. Relevance of secretor status genotype and microbiota composition in susceptibility to rotavirus and norovirus infections in humans. *Sci Rep [Internet]*. 2017;7(December 2016):1-10.
 27. Günaydin G, Nordgren J, Sharma S, Hammarstrom L. Association of elevated rotavirus-specific antibody titers with HBGA secretor status in Swedish individuals: The FUT2 gene as a putative susceptibility determinant for infection. *Virus Res*. 2016;211:64-8.
 28. Kanai Y, Onishi M, Kawagishi T, Pannacha P, Nurdin JA, Nouda R, et al. Reverse Genetics Approach for Developing Rotavirus Vaccine Candidates Carrying VP4 and VP7 Genes Cloned from Clinical Isolates of Human Rotavirus. *J Virol*. 2020;95(2).
 29. Shioda K, de Oliveira LH, Sanwogou J, Rey-Benito G, Nuñez Azzad D, Castillo RE, et al. Identifying signatures of the impact of rotavirus vaccines on hospitalizations using sentinel surveillance data from Latin American countries. *Vaccine [Internet]*. 2020;38(2):323-9.
 30. Degiuseppe JJ, Stupka JA. Genotype distribution of Group A rotavirus in children before and after massive vaccination in Latin America and the Caribbean: Systematic review. *Vaccine [Internet]*. 2020;38(4):733-40.
 31. Lamberti LM, Ashraf S, Walker CLF, Black RE. A systematic review of the effect of rotavirus vaccination on diarrhea outcomes among children younger than 5 years. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(9):992-8.
 32. Santos VS, Marques DP, Martins-Filho PRS, Cuevas LE, Gurgel RQ. Effectiveness of rotavirus vaccines against rotavirus infection and hospitalization in Latin America: Systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty [Internet]*. 2016;5(1).
 33. Burnett E, Yen C, Tate JE, Parashar UD. Rotavirus vaccines: Current global impact and future perspectives. *Future Virol*. 2016;11(10):699-708.
 34. Cárcamo-Calvo R, Muñoz C, Buesa J, Rodríguez-Díaz J, Gozalbo-Rovira R. The rotavirus vaccine landscape, an update. *Pathogens*. 2021;10(5):1-15.
 35. Parker EPK, Ramani S, Lopman BA, Church JA, Iturriza-Gómara M,

- Prendergast AJ, et al. Causes of impaired oral vaccine efficacy in developing countries. *Future Microbiol.* 2018;13(1):97-118.
36. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81(4):1-67.
 37. Shreiner A.B., Kao J.Y. and YVB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2016;31(1):69-75.
 38. Magwira CA, Taylor MB. Composition of gut microbiota and its influence on the immunogenicity of oral rotavirus vaccines. *Vaccine [Internet].* 2018;36(24):3427-33.
 39. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. system. 2016;352(6285):539-44.
 40. Hasan N, Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ.* 2019;2019(8):1-31.
 41. Vandenplas Y, Carnielli VP, Ksiazek J, Luna MS, Migacheva N, Mosselmans JM, et al. Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutrition [Internet].* 2020;78:110812.
 42. Mowat AMI. To respond or not to respond - A personal perspective of intestinal tolerance. *Nat Rev Immunol [Internet].* 2018;18(6):405-15.
 43. Li N, Ma WT, Pang M, Fan QL, Hua JL. The commensal microbiota and viral infection: A comprehensive review. *Front Immunol.* 2019;10(JULY):1-16.
 44. Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science (80-)*. 2014;346(6210):755-9.
 45. Robinson CM, Jesudhasan PR, Pfeiffer JK. Bacterial Lipopolysaccharide Binding Enhances Virion Stability and Promotes Environmental Fitness of an Enteric Virus. *Cell Host Microbe [Internet].* enero de 2014;15(1):36-46.
 46. Berger AK, Yi H, Kearns DB, Mainou BA. Bacteria and bacterial envelope components enhance mammalian reovirus thermostability. *PLoS Pathog.* 2017;13(12):1-30.
 47. Baldridge MT, Nice TJ, McCune BT, Yokoyama CC, Kambal A, Wheadon M, et al. Commensal microbes and interferon- λ determine persistence of enteric murine norovirus infection. *Science (80-) [Internet].* 16 de enero de 2015;347(6219):266-9.
 48. Kane M, Case LK, Kopaskie K, Kozlova A, MacDearmid C, Chervonsky A V, et al. Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. *Science (80-)*. 2011;334(6053):245-9.
 49. Erickson AK, Jesudhasan PR, Mayer MJ, Narbad A, Winter SE, Pfeiffer JK. Bacteria Facilitate Enteric Virus Co-infection of Mammalian Cells and Promote Genetic Recombination. *Cell Host Microbe.* 2018;23(1):77-88.e5.
 50. Botić T, Klingberg TD., Weingartl H, Cencić A. A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2007;115(2):227-34.
 51. Bandoro C, Runstadler JA. Bacterial Lipopolysaccharide Destabilizes Influenza Viruses. Lowen AC, editor. *mSphere [Internet].* 25 de octubre de 2017;2(5):1-12.
 52. Mastromarino P, Cacciotti F, Masci A, Mosca L. Antiviral activity of

- Lactobacillus brevis* towards herpes simplex virus type 2: Role of cell wall associated components. *Anaerobe* [Internet]. 2011;17(6):334-6.
53. Chen H-W, Liu P-F, Liu Y-T, Kuo S, Zhang X-Q, Schooley RT, et al. Nasal commensal *Staphylococcus epidermidis* counteracts influenza virus. *Sci Rep* [Internet]. 16 de septiembre de 2016;6(1):27870.
 54. ñahui Palomino RA, Zicari S, Vanpouille C, Vitali B, Margolis L. Vaginal *Lactobacillus* inhibits HIV-1 replication in human tissues ex vivo. *Front Microbiol*. 2017;8(MAY):1-11.
 55. Hensley-McBain T, Zevin AS, Manuzak J, Smith E, Gile J, Miller C, et al. Effects of Fecal Microbial Transplantation on Microbiome and Immunity in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques. *J Virol*. 2016;90(10):4981-9.
 56. Park MK, NGO V, Kwon YM, Lee YT, Yoo S, Cho YH, et al. *Lactobacillus plantarum* DK119 as a Probiotic Confers Protection against Influenza Virus by Modulating Innate Immunity. *PLoS One*. 2013;8(10):26-9.
 57. Harris VC, Armah G, Fuentes S, Korpela KE, Parashar U, Victor JC, et al. Significant Correlation Between the Infant Gut Microbiome and Rotavirus Vaccine Response in Rural Ghana. *J Infect Dis*. 2017;215(1):34-41.
 58. Harris V, Ali A, Fuentes S, Korpela K, Kazi M, Tate J, et al. Rotavirus vaccine response correlates with the infant gut microbiota composition in Pakistan. *Gut Microbes* [Internet]. 2018;9(2):93-101.
 59. Uchiyama R, Chassaing B, Zhang B, Gewirtz AT. Antibiotic treatment suppresses rotavirus infection and enhances specific humoral immunity. *J Infect Dis*. 2014;210(2):171-82.
 60. Gozalbo-Rovira R, Santiso-Bellón C, Buesa J, Rubio-Del-campo A, Vila-Vicent S, Muñoz C, et al. Microbiota depletion promotes human rotavirus replication in an adult mouse model. *Biomedicines*. 2021;9(7).
 61. Lee DK, Park JE, Kim MJ, Seo JG, Lee JH, Ha NJ. Probiotic bacteria, *B.longum* and *L.acidophilus* inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39(2):237-44.
 62. Grandy G, Medina M, Soria R, Terán CG, Araya M. Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. *BMC Infect Dis*. 2010;10:1-7.
 63. Saif L, Kandasamy S, Vlasova A, Fischer D, Kumar A, Chattha K, et al. Differential effects of *Escherichia coli* Nissle and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG on human rotavirus binding, infection, and B cell immunity. *J Immunol*. 2017;176(12):139-48.
 64. Shi Z, Zou J, Zhang Z, Zhao X, Noriega J, Zhang B, et al. Segmented Filamentous Bacteria Prevent and Cure Rotavirus Infection. *Cell* [Internet]. 2019;179(3):644-658.e13.
 65. Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, et al. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science* (80-). 2014;346(6211):861-5.
 66. Gozalbo-Rovira R, Rubio-del-Campo A, Santiso-Bellón C, Vila-Vicent S, Buesa J, Delgado S, et al. Interaction of Intestinal Bacteria with Human Rotavirus during Infection in Children. *Int J Mol Sci* [Internet]. 20 de enero de

- 2021;22(3):1010.
67. Molinero N, Ruiz L, Milani C, Gutiérrez-Díaz I, Sánchez B, Mangifesta M, et al. The human gallbladder microbiome is related to the physiological state and the biliary metabolic profile. *Microbiome*. 2019;7(1):1-17.
 68. La Reau AJ, Meier-Kolthoff JP, Suen G. Sequence-based analysis of the genus *Ruminococcus* resolves its phylogeny and reveals strong host association. *Microb genomics*. 2016;2(12):e000099.
 69. La Reau AJ, Suen G. The *Ruminococci*: key symbionts of the gut ecosystem. *J Microbiol*. 2018;56(3):199-208.
 70. Suenaga E, Nakamura H. Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2005;820(1):137-41.
 71. Yang JL, Wang MS, Cheng AC, Pan KC, Li CF, Deng SX. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World J Gastroenterol*. 2008;14(18):2872-6.
 72. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002;148(1):257-66.
 73. Kurina I, Popenko A, Klimenko N, Koshechkin S, Chuprikova L, Filipenko M, et al. Development of qPCR platform with probes for quantifying prevalent and biomedically relevant human gut microbial taxa. *Mol Cell Probes* [Internet]. agosto de 2020;52(January):101570.
 74. Sambrook J, Russell DW. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. Sambrook J, Russell D, editores. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. junio de 2006;2006(1):pdb.prot3932.
 75. Becker-Dreps S, Vilchez S, Bucardo F, Twitchell E, Choi WS, Hudgens MG, et al. The Association Between Fecal Biomarkers of Environmental Enteropathy and Rotavirus Vaccine Response in Nicaraguan Infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(4):412-6.
 76. Bucardo F, Mercado J, Reyes Y, González F, Balmaseda A, Nordgren J. Large increase of rotavirus diarrhoea in the hospital setting associated with emergence of G12 genotype in a highly vaccinated population in Nicaragua. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(6):603.e1-603.e7.
 77. Boom R, de Boer E, Sol MJM, Salimans C, Jansen P, Wertheim-Van Dillen J, et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J Clin Microbiol*. 1990;28:495-503.
 78. Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods*. 2008;153(2):238-40.
 79. Sevelsted A, Stokholm J, Bønnelykke K, Bisgaard H. Cesarean Section and Chronic Immune Disorders. *Pediatrics* [Internet]. 1 de enero de 2015;135(1):e92-8.
 80. Pinto Coelho GD, Arial Ayres LF, Barreto DS, Henriques BD, Cardoso Prado MRM, Dos Passos CM. Acquisition of microbiota according to the type of birth: An integrative review. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2021;29.
 81. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Migliano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 2019;7(1).

82. Kim AHJ, Hogarty MP, Harris VC, Baldridge MT. The Complex Interactions Between Rotavirus and the Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;10(January).
83. Sowmyanarayanan T V., Ramani S, Sarkar R, Arumugam R, Warier JP, Moses PD, et al. Severity of rotavirus gastroenteritis in Indian children requiring hospitalization. *Vaccine*. 2012;30(SUPPL. 1).
84. Jian C, Luukkonen P, Yki-Järvinen H, Salonen A, Korpela K. Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. *PLoS One*. 2020;15(1):1-10.
85. Ricchi M, Bertasio C, Boniotti MB, Vicari N, Russo S, Tilola M, et al. Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods. *Front Microbiol*. 2017;8(JUN):1-15.
86. Wang X, Howe S, Deng F, Zhao J. Current Applications of Absolute Bacterial Quantification in Microbiome Studies and Decision-Making Regarding Different Biological Questions. *Microorganisms* [Internet]. 24 de agosto de 2021;9(9):1797.
87. Sze MA, Abbasi M, Hogg JC, Sin DD. A comparison between droplet digital and quantitative PCR in the analysis of bacterial 16S load in lung tissue samples from control and COPD GOLD 2. *PLoS One*. 2014;9(10).
88. Wang D, Yamahara KM, Cao Y, Boehm AB. Absolute Quantification of Enterococcal 23S rRNA Gene Using Digital PCR. *Environ Sci Technol*. 2016;50(7):3399-408.
89. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Storia A, Laghi L, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* [Internet]. noviembre de 2016;65(11):1812-21.
90. Stewardson AJ, Gaia N, François P, Malhotra-Kumar S, Delémont C, Martinez de Tejada B, et al. Collateral damage from oral ciprofloxacin versus nitrofurantoin in outpatients with urinary tract infections: A culture-free analysis of gut microbiota. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2015;21(4):344.e1-344.e11.
91. Gagnon M, Vimont A, Darveau A, Fliss I, Jean J. Study of the ability of bifidobacteria of human origin to prevent and treat rotavirus infection using colonic cell and mouse models. *PLoS One*. 2016;11(10):1-18.
92. Lei S, Ramesh A, Twitchell E, Wen K, Bui T, Weiss M, et al. High protective efficacy of probiotics and rice bran against human norovirus infection and diarrhea in gnotobiotic pigs. *Front Microbiol*. 2016;7(NOV):1-12.
93. Wang Z, Chai W, Burwinkel M, Twardziok S, Wrede P, Palissa C, et al. Inhibitory Influence of *Enterococcus faecium* on the Propagation of Swine Influenza A Virus In Vitro. *PLoS One*. 2013;8(1):2-9.
94. Sohail MU, Al Khatib HA, Al Thani AA, Al Ansari K, Yassine HM, Al-Asmakh M. Microbiome profiling of rotavirus infected children suffering from acute gastroenteritis. *Gut Pathog*. 2021;13(1):1-9.
95. Mathew S, Smatti MK, Al Ansari K, Nasrallah GK, Al Thani AA, Yassine HM. Mixed Viral-Bacterial Infections and Their Effects on Gut Microbiota and Clinical Illnesses in Children. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1-12.
96. Sorbara MT, Littmann ER, Fontana E, Moody TU, Kohout CE, Gjonbalaj M, et al. Functional and Genomic Variation between Human-Derived Isolates of

- Lachnospiraceae Reveals Inter- and Intra-Species Diversity. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2020;28(1):134-146.e4.
97. Dinleyici EC, Martínez-Martínez D, Kara A, Karbuz A, Dalgic N, Metin O, et al. Time series analysis of the microbiota of children suffering from acute infectious diarrhea and their recovery after treatment. *Front Microbiol.* 2018;9(JUN):1-11.
 98. Henke MT, Kenny DJ, Cassilly CD, Vlamakis H, Xavier RJ, Clardy J. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(26):12672-7.
 99. Toya T, Corban MT, Marrietta E, Horwath IE, Lerman LO, Murray JA, et al. Coronary artery disease is associated with an altered gut microbiome composition. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(1):1-13.
 100. Blutt SE, Miller AD, Salmon SL, Metzger DW, Conner ME. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2012;5(6):712-9.
 101. Ward RL, Bernstein DI, Shukla R, McNeal MM, Sherwood JR, Young EC, et al. Protection of adults rechallenged with a human rotavirus. *J Infect Dis.* 1990;161(3):440-5.
 102. Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis.* 1993;167(3):577-83.
 103. Ward RL, Bernstein DI, Shukla R, Young EC, Sherwood JR, McNeal MM, et al. Effects of Antibody to Rotavirus on Protection of Adults Challenged with a Human Rotavirus. *J Infect Dis* [Internet]. 1 de enero de 1989;159(1):79-88.
 104. Zhang XF, Long Y, Tan M, Zhang T, Huang Q, Jiang X, et al. P[8] and P[4] Rotavirus Infection Associated with Secretor Phenotypes among Children in South China. *Sci Rep.* 2016;6(June):1-7.
 105. Ma X, Li D Di, Sun XM, Guo YQ, Xiang JY, Wang WH, et al. Binding patterns of rotavirus genotypes P[4], P[6], and P[8] in China with histo-blood group antigens. *PLoS One.* 2015;10(8):1-10.

8. ANEXO

Anexo 1
Figuras suplementarias

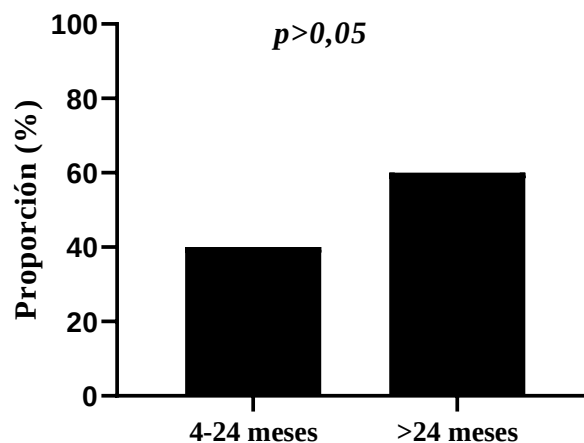


Figura S1. Proporción de casos de GEA positivos para rotavirus de acuerdo al rango etario. Pacientes con edad comprendida de 4-24 meses (n=20); Pacientes con edad >24 meses (n=30).

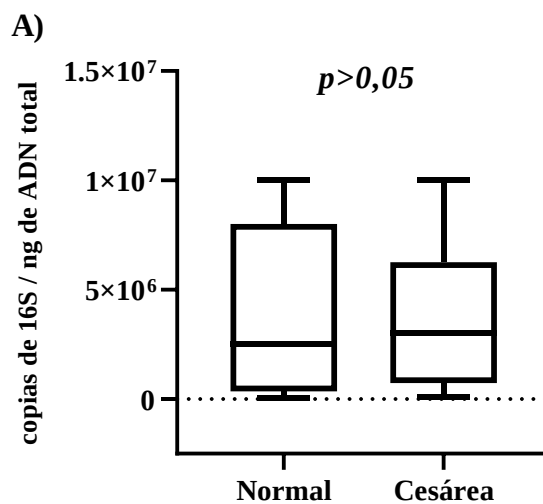


Figura S2A. Comparación de niveles de Bacterias totales entre niños de la población estudiada nacidos por parto normal y por cesárea. Normal (n=17); Cesárea (n=29).

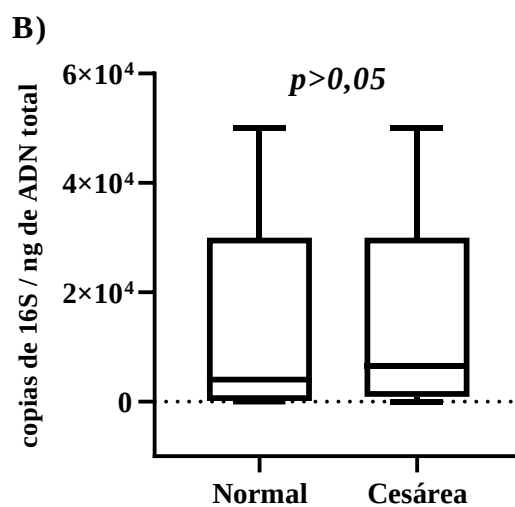


Figura S2B. Comparación de niveles de *Ruminococcus* spp., entre niños de la población estudiada nacidos por parto normal y por cesárea. Normal (n=17); Cesárea (n=29).

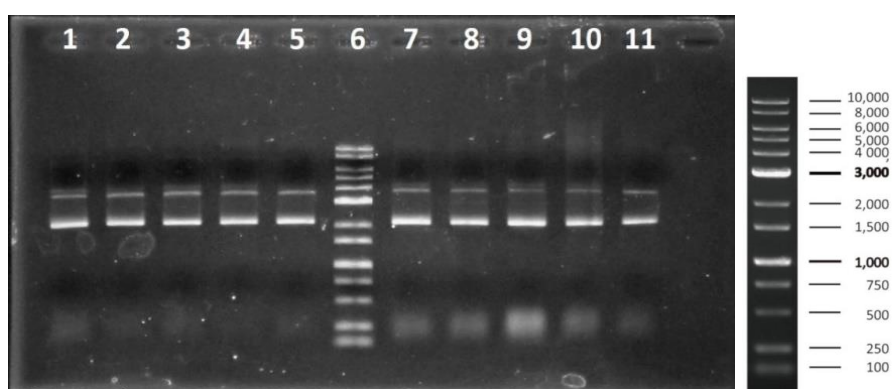


Figura S3A. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN plasmídico purificado (sin digerir). Carril 1-5) Clones 16S *Ruminococcus* spp. Carril 6) Marcador de peso molecular (1 kb), Carril 7-11) Clones 16S *Ruminococcus* spp.

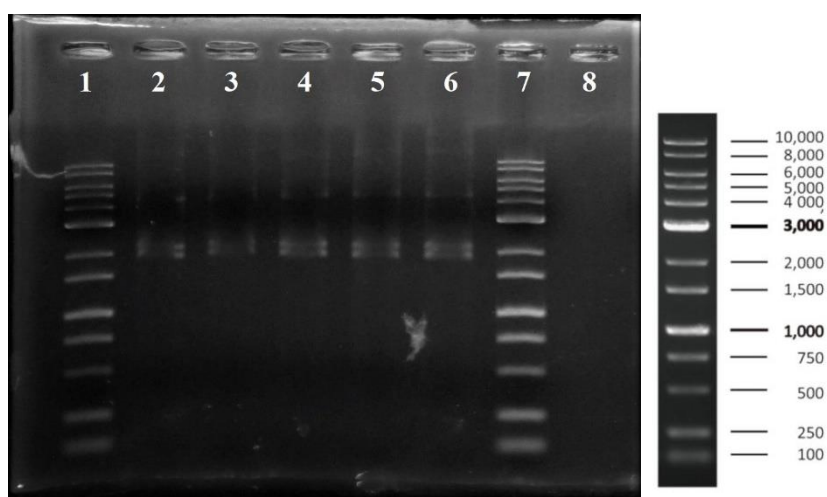


Figura S3B. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN plasmídico purificado (sin digerir). Carril 1 y 7) Marcador de peso molecular (1 kb), Carril 2-6) Clones 16S Bacterias totales.

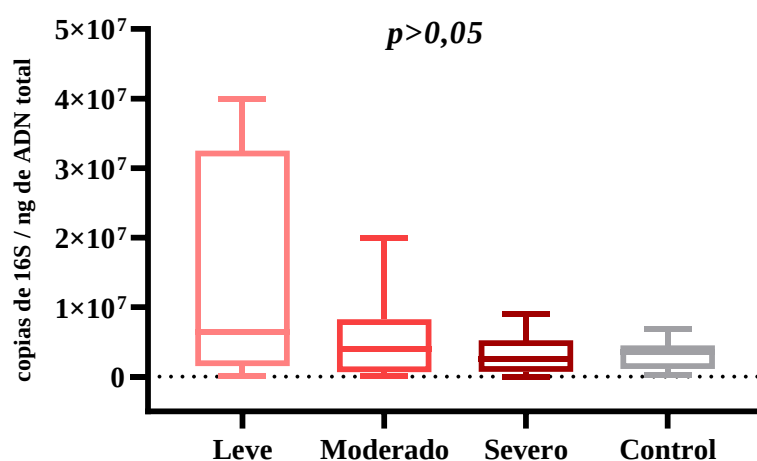


Figura S4. Comparación de niveles de Bacterias totales entre el grupo control y grupos de severidad según Vesikari. Leve (n=6); Moderado (n=24); Severo (n=20); Control (n=13).

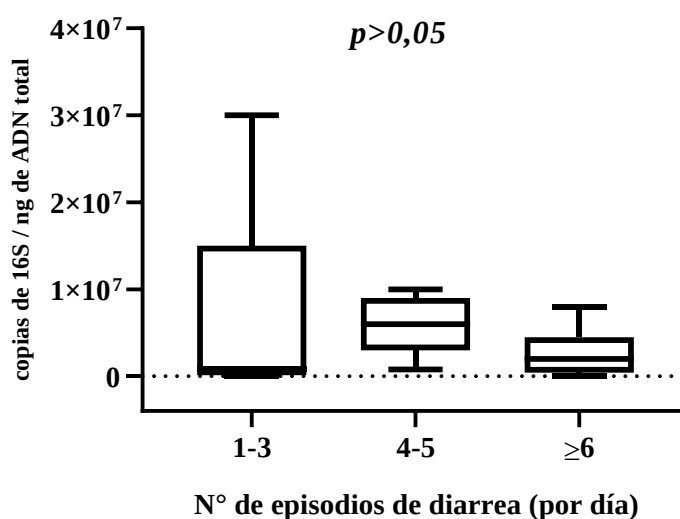


Figura S5. Comparación de niveles de Bacterias totales de acuerdo al número máximo de deposiciones en un día. 1-3 episodios (n=10); 4-5 episodios (n=14); ≥ 6 episodios (n=25).

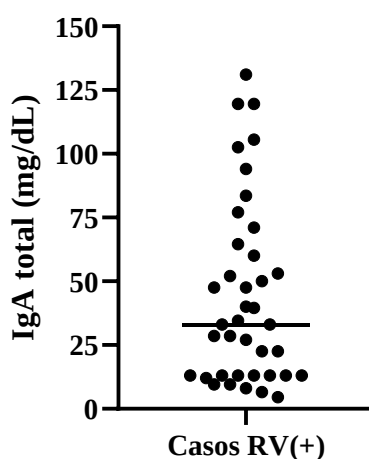


Figura S6. Cuantificación de IgA total en clarificado fecal por inmunodifusión radial. El gráfico representa los valores de IgA total obtenidos a partir de muestras de casos de GEA positivas para RVA. Valor de mediana 33,00, RIQ [13,00-64,50].

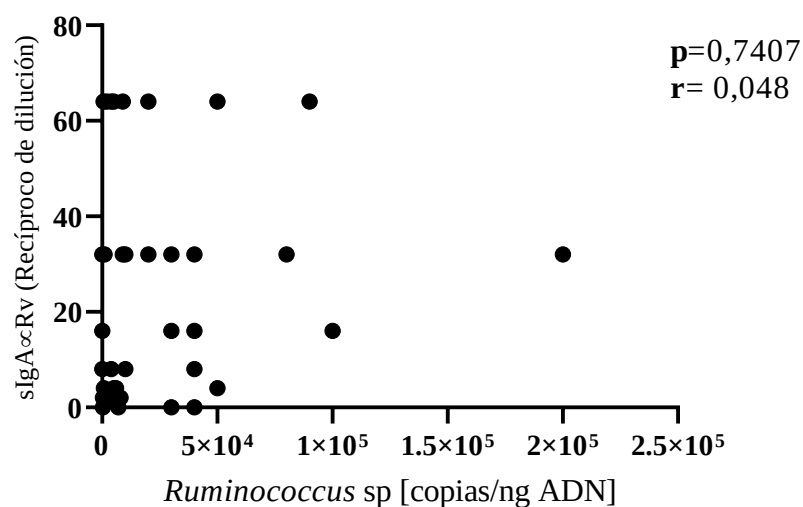


Figura S7. Correlación de Spearman entre los títulos de sIgAαRv y los niveles de *Ruminococcus* spp. Se muestra un diagrama de dispersión que representa el número de copias del gen 16S ARNr de *Ruminococcus* spp., (eje x) versus los títulos de IgAαRv (eje y).

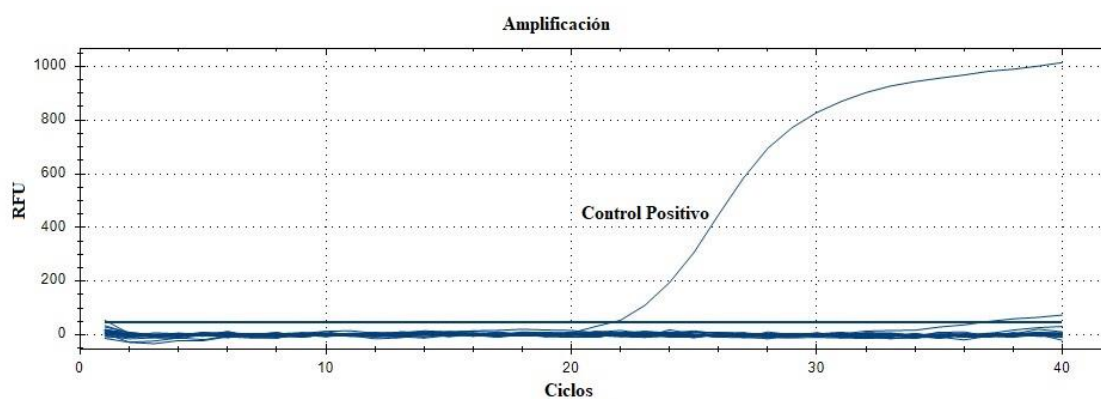


Figura S8. Detección del gen NSP3 de rotavirus por qRT-PCR. Curva de amplificación (señal de fluorescencia FAM) de muestras de casos leves negativas para rotavirus por test inmunocromatográfico. Control positivo con Ct igual a 21,56. RFU: Unidades relativas de fluorescencia.

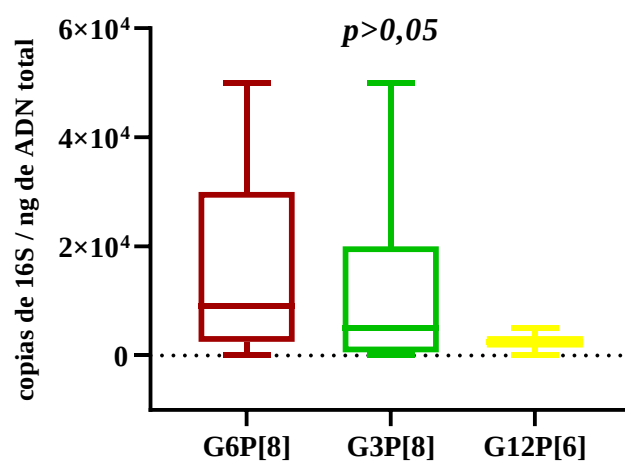


Figura S9. Comparación de los niveles de *Ruminococcus* spp., de acuerdo al genotipo de rotavirus infectante. Empleando el test de Kruskal-Wallis, no se observó diferencias significativas ($p=0,2254$) entre la carga bacteriana y el genotipo causante de la infección. G6P[8] (n=28), G3P[8] (n=13), G12P[6] (n=2).

Anexo 2

PROYECTOS:

“Epidemiología y caracterización molecular de rotavirus aislados en niños menores de 5 años en el Departamento de Caaguazú, Paraguay, durante los años 2019 a 2020”

“Comparación de los niveles de *Ruminococcus spp.*, y de IgA anti-rotavirus en muestras fecales de niños con gastroenteritis por rotavirus de diferentes grados de severidad, de Gran Asunción y del departamento de Caaguazú durante el 2019”

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Estimado padre/madre o tutor/a responsable:

Mi nombre es, trabajo en un proyecto conjunto del Instituto Regional de Investigación en Salud (IRIS) de la Universidad Nacional de Caaguazú (UNCA) y el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA) y quiero pedir tu colaboración voluntaria para un estudio que estamos realizando.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Lo que queremos saber es: 1) cuántos niños de Gran Asunción y del departamento de Caaguazú se han vacunado contra el rotavirus, y para ello te pediremos la tarjeta de vacunación de tu hijo/a; 2) el efecto de la implementación de esta vacuna en la salud de nuestra población; 3) si existen otros factores que influyan a la eficiencia de la vacuna y puedan ayudar a mejorarla para los niños; 4) cuales son los tipos de rotavirus que están presentes en los casos de diarrea positivas para rotavirus; 5) la proporción de componentes de microbiota intestinal.

PROCEDIMIENTO

Si aceptás participar del estudio, te pediríamos dos cosas:

1- Que completes un formulario donde solicitamos tus datos y los de tu hijo/a.

Antes de aceptar participar, podés leer el formulario y decidir si querés participar o no.

Es totalmente voluntario. Todas las preguntas o dudas que tengas sobre el estudio, procedimiento, alcance, serán respondidas hasta que quedés conforme con la información.

2- Que nos autorices a utilizar lo que sobra de la muestra de heces que vas a dejar en el hospital.

Éste estudio no implica riesgo para tu hijo/a, ya que no será necesario tomar ninguna muestra extra, vamos a utilizar sólo lo que sobra de la muestra que vas a dejar para el diagnóstico de diarrea; pero si en algún momento decidís que ya no querés participar, podés manifestarlo al teléfono de contacto que vamos a darte y podrás retirarte del estudio sin que perjudique el tratamiento de tu hijo/a.

CONFIDENCIALIDAD

Toda la información recabada para este estudio será manejada confidencialmente por los investigadores responsables; la identidad de tu hijo/a y la tuya será salvaguardada en todo momento. Esta información será guardada bajo llave en el Instituto Regional de Investigación en Salud (IRIS). Cada muestra será codificada (el nombre del paciente se manejará con códigos, para todos los estudios que se realicen con la misma).

BENEFICIO

No recibirás beneficio económico. Al participar del estudio, te beneficiarás con el informe diagnóstico de presencia/ausencia de rotavirus de manera gratuita.

Investigadores responsables:

Dra. Magaly Martínez
Contacto: 0985- 335 824

Bioq. Analía Ortíz
Contacto: 0971- 411 464

Biotec. Roque Morel
Contacto: 0971- 764 372

Anexo 3

PROYECTOS:

“Epidemiología y caracterización molecular de rotavirus aislados en niños menores de 5 años en el Departamento de Caaguazú, Paraguay, durante los años 2019 a 2020”

“Comparación de los niveles de *Ruminococcus spp.*, y de IgA anti-rotavirus en muestras fecales de niños con gastroenteritis por rotavirus de diferentes grados de severidad, de Gran Asunción y del departamento de Caaguazú durante el 2019”

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído este documento y entiendo el propósito del estudio y los procedimientos involucrados. Así también, entiendo que mi participación es voluntaria y tengo derecho a no participar del estudio, o a salir del mismo en el momento que crea conveniente, sin ningún tipo de perjuicio para mí o para mi hijo/a.

Declaro que todas mis preguntas referentes al estudio han sido respondidas. Por lo tanto, doy mi autorización para que estos datos se utilicen en los proyectos mencionados con fines científicos, sin revelar mi identidad ni la de mi hija/o.

Además del presente estudio, ¿autoriza UD. a que luego podamos utilizar la misma muestra (codificada) para otros estudios? SÍ ____ NO ____

Nombre: _____

Firma: _____

C. I. N°: _____

Nro. de tel/cel: _____

Investigadores responsables:

Bioq. Analía Ortíz Rolón.
Contacto: 0971- 411 464

Biotec. Roque Morel
Contacto: 0971- 764 372

Dra. Magaly Martínez
Contacto: 0985- 335 824

Anexo 4

Encuesta de seguimiento



SECCIÓN I. DATOS DEL NIÑO

N° de encuesta: _____ Fecha de encuesta: ____/____/____

Nombre y apellido del entrevistador: _____

1. Localidad de encuesta: HBO _____ 2. Procedencia: Urg__ Amb__ Inter__

3. Nombre y apellido del paciente: _____

4. Fecha de nacimiento: ____/____/____

5. Lugar de Nacimiento: _____ País: _____

6. Domicilio actual: _____ 7. Telef./Contacto: _____

8. Sexo: Fem__ Masc__ 9. Etnia: Latino__ Nativo__ Otro(especificar) _____

10. Lactancia materna: No__ Si__ (En caso que Si) Tiempo: _____

11. Consumo actual de leche: No__ Si__ (En caso que Si) Tipo de leche: _____

12. Cuenta con la vacuna contra Rotavirus (revisar libreta de vacunación): No__ Si__
Fecha 1ra dosis: ____/____/____ Fecha 2da dosis: ____/____/____

13. Cuenta con la vacuna contra Poliovirus (revisar libreta de vacunación): No__ Si__
Fecha 1ra dosis: ____/____/____ Fecha 2da dosis: ____/____/____

14. ¿Estuvo consumiendo antibiótico en las últimas semanas? Si__ No__

15. En caso que SÍ. Última dosis administrada:
Menos de 5 días__ 5 a 10 días__ 10 a 15 días__ Mayor a 15 días__

16. Inicio de síntomas: Vómito__ Diarrea__ Fiebre__

17. ¿Podemos llamarle para tomar datos desde el 2do al 6to día? Si__ No__

18. Resultado Rotatest: Neg__ Pos__

19. Nacimiento de término: Completo__ Incompleto__

20. Tipo de parto: Normal__ Cesárea__

OBS:

II. DATOS DE SÍNTOMAS - VESIKARI				
21. Número máximo de deposiciones en 24 horas:				
	1-3	4-5	≥ 6	Duración de la diarrea en días: 1-4 días__ 5 días__ ≥ 6 días__
Día 1				
Día 2				
Día 3				
Día 4				
Día 5				
Día 6				
22. Número máximo de vómitos en 24 horas:				
	1	2-4	≥ 5	Duración de los vómitos en días: 1 día__ 2 días__ ≥ 3 días__
Día 1				
Día 2				
Día 3				
23. Fiebre máxima registrada por día (°C):				
	37,1-38,4	38,5-38,9	$\geq 39,0$	
Día 1				
Día 2				
Día 3				
24. Tratamiento para deshidratación				
Ninguna__ Hidratación oral (H.O.)__ Rehidratación intravenosa (R.I.)__				
OBS.:				

Anexo 5

Tabla 11. Lecturas de razón de pureza y concentración de ADN

Muestra	1ra Lectura			2da Lectura			Promedio		
	[ADN]	260/230	260/280	[ADN]	260/230	260/280	[ADN]	260/230	260/280
HBO340	1171,32	1,69	1,47	1127,84	1,63	1,41	1149,58	1,7	1,44
HBO343	448,72	1,79	1,48	436,95	1,75	1,43	442,835	1,8	1,46
HBO344	1259,84	1,48	1,38	1268,23	1,49	1,34	1264,035	1,5	1,36
HBO345	636,86	1,77	1,59	619,1	1,7	1,54	627,98	1,7	1,57
HBO348	2011,52	7,23	-0,5	1974,6	11,29	-0,49	1993,06	9,3	-0,50
HBO356	1075,58	1,66	1,33	1257,11	1,65	1,42	1166,345	1,7	1,38
HBO369	1128,15	1,81	1,53	1093,23	1,76	1,52	1110,69	1,8	1,53
HBO377	445,4	1,26	1,48	436,35	1,26	1,5	440,875	1,3	1,49
HBO390	487,66	1,17	1,3	465,94	1,13	1,27	476,8	1,2	1,29
HBO395	1170,81	1,97	1,69	1162,46	1,98	1,68	1166,635	2,0	1,69
HBO400	471,47	1,29	1,44	456,47	1,26	1,32	463,97	1,3	1,38
HBO407	612,22	1,43	1,6	599,87	1,41	1,61	606,045	1,4	1,61
HBO416	1696,41	1,68	1,56	1605,13	1,64	1,52	1650,77	1,7	1,54
HBO420	604,34	1,39	1,56	520,13	1,32	1,55	562,235	1,4	1,56
HBO427	871,88	1,54	1,7	889,19	1,55	1,35	880,535	1,5	1,53
HBO442	492	1,38	1,36	500,11	1,44	1,37	496,055	1,4	1,37
HBO449	443,38	1,36	1,57	452,49	1,38	1,58	447,935	1,4	1,58
HBO450	828,79	1,42	1,52	822,91	1,36	1,52	825,85	1,4	1,52
HBO453	1090,89	1,77	1,53	1015,64	1,68	1,51	1053,265	1,7	1,52
HBO460	1048,42	1,68	1,52	1027,8	1,66	1,5	1038,11	1,7	1,51
HBO469	733,27	1,7	1,44	716,48	1,69	1,52	724,875	1,7	1,48

Muestra	1ra Lectura			2da Lectura			Promedio		
	[ADN]	260/230	260/280	[ADN]	260/230	260/280	[ADN]	260/230	260/280
HBO476	749,12	1,6	1,48	716,69	1,55	1,49	732,905	1,6	1,49
HBO477	846,95	1,49	1,61	849,02	1,49	1,52	847,985	1,5	1,57
HBO479	482,42	1,73	1,63	510,57	1,77	1,49	496,495	1,8	1,56
HBO498	1159,72	1,81	1,64	1166,31	1,8	1,6	1163,015	1,8	1,62
HBO500	1115,29	1,67	1,52	1113,5	1,65	1,54	1114,395	1,7	1,53
HBO516	1944,6	2,13	2,15	1967,13	2,19	2,16	1955,865	2,2	2,16
HBO520	2108,1	2,37	2,85	2046,56	2,23	2,19	2077,33	2,3	2,52
HRCO26	421,09	1,65	1,36	400,39	1,72	1,45	410,74	1,7	1,41
HRCO28	119,3	0,47	1,3	127,2	0,47	1,34	123,25	0,5	1,32
HRCO32	767,05	1,42	1,42	782,46	1,47	1,31	774,755	1,4	1,37
HRCO36	414,4	0,63	1,23	498,9	0,75	1,26	456,65	0,7	1,25
HRCO41	235,51	0,8	1,128	221,91	0,77	1,3	228,71	0,8	1,21
HRCO47	565,63	1,74	1,36	441,71	1,49	1,29	503,67	1,6	1,33
HRCO48	894,88	1,34	1,5	830,48	1,26	1,5	862,68	1,3	1,50
HRCO74	453,65	1,84	1,45	392	1,8	1,34	422,825	1,8	1,40
LV10	802,41	1,67	1,43	709,06	1,54	1,4	755,735	1,6	1,42
LV13	79,99	0,28	0,95	79,46	0,28	0,99	79,725	0,3	0,97
LV14	638,74	1,59	1,32	598,28	1,53	1,41	618,51	1,6	1,37
LV19	959,3	1,62	1,45	765,47	1,37	1,28	862,385	1,5	1,37
LV20	906,75	1,42	1,3	816,49	1,3	1,23	861,62	1,4	1,27
LV22	672,2	0,78	1,33	445,2	0,75	1,35	558,7	0,8	1,34
LV24	101,3	0,33	1,07	245,8	0,45	1,11	173,55	0,4	1,09
LV26	282,4	0,43	0,84	288,7	0,44	0,85	285,55	0,4	0,85
LV3	645,67	1,73	1,4	493,93	1,54	1,35	569,8	1,6	1,38

Muestra	1ra Lectura			2da Lectura			Promedio		
	[ADN]	260/230	260/280	[ADN]	260/230	260/280	[ADN]	260/230	260/280
LV4	549,85	1,7	1,36	513,57	1,66	1,43	531,71	1,7	1,40
LV6	1136,34	1,91	1,57	1067,03	1,84	1,52	1101,685	1,9	1,55
LV7	370,33	1,11	1,31	349,36	1,05	1,34	359,845	1,1	1,33
LV8	342,1	1,39	1,36	316,88	1,33	1,33	329,49	1,4	1,35
CS10	1510	0,64	1,33	1509	0,63	1,34	1509,5	0,635	1,34
CS11	1128	0,7	1,41	1241	0,76	1,43	1184,5	0,73	1,42
CS12	997,7	0,45	1,08	916,8	0,44	1,08	957,25	0,445	1,08
CS13	519,8	0,81	1,52	647,2	0,89	1,41	583,5	0,85	1,47
CS15	1090	0,57	1,35	1008	0,57	1,35	1049	0,57	1,35
CS16	1039	0,59	1,37	967,9	0,64	1,33	1003,45	0,615	1,35
CS18	842,2	0,44	1,26	760	0,43	1,24	801,1	0,435	1,25
CS19	277,9	0,57	1,44	253,3	0,53	1,22	265,6	0,55	1,33
CS2	815,1	0,74	1,46	772	0,69	1,5	793,55	0,715	1,48
CS3	1658	1,04	1,61	1616	1	1,6	1637	1,02	1,61
CS4	699,5	0,87	1,33	793,3	0,96	1,39	746,4	0,915	1,36
CS5	1565	0,74	1,46	1839	0,77	1,47	1702	0,755	1,47
CS7	411,6	0,61	1,13	467,1	0,73	1,13	439,35	0,67	1,13

Anexo 6

Tabla 12. Valores de puntaje final de Vesikari, ciclo umbral y número de copias de ADN

Muestra	Puntaje final Vesikari	Bacterias totales				<i>Ruminococcus spp.</i>			
		Ct ₁	Ct ₂	Ct $\bar{x}$	[copias 16S / ng ADN total]	Ct ₁	Ct ₂	Ct $\bar{x}$	[copias 16S / ng ADN total]
HBO340	8	20,7	20,38	20,54	1,3,E+07	21,58	22,11	21,85	9,7,E+04
HBO343	12	30,08	29,85	29,97	2,9,E+04	33,04	33,15	33,10	6,4,E+01
HBO344	8	24,02	24,06	24,04	1,3,E+06	25,46	25,38	25,42	9,5,E+03
HBO345	10	20,14	20,2	20,17	1,6,E+07	21,88	22,01	21,95	9,1,E+04
HBO348	5	20,35	20,6	20,48	1,3,E+07	22,84	23,39	23,12	4,3,E+04
HBO356	15	23,55	23,27	23,41	2,0,E+06	24,62	24,78	24,70	1,5,E+04
HBO369	9	21,7	21,85	21,78	5,7,E+06	26,67	26,91	26,79	3,9,E+03
HBO377	11	21,92	21,69	21,81	5,6,E+06	23,30	23,74	23,52	3,3,E+04
HBO390	8	21,16	21,26	21,21	8,2,E+06	23,76	23,80	23,78	2,8,E+04
HBO395	15	22,07	22,18	22,13	4,6,E+06	N/A	N/A	N/A	0,0,E+00
HBO400	12	19,2	19,1	19,15	3,1,E+07	26,29	26,52	26,41	5,0,E+03
HBO407	10	19,59	19,22	19,41	2,6,E+07	26,77	26,49	26,63	4,3,E+03
HBO416	12	21,06	21,18	21,12	8,7,E+06	24,82	25,05	24,94	1,3,E+04
HBO420	9	20,25	20,17	20,21	1,6,E+07	23,28	23,21	23,25	3,9,E+04
HBO427	11	22,79	22,29	22,54	3,5,E+06	27,51	27,56	27,54	2,4,E+03
HBO442	9	22,7	23,42	23,06	2,5,E+06	29,60	29,24	29,42	7,0,E+02
HBO449	9	21,61	21,31	21,46	7,0,E+06	N/A	N/A	N/A	0,0,E+00
HBO450	10	21,03	21,22	21,13	8,7,E+06	22,88	22,99	22,94	4,8,E+04
HBO453	11	21,18	21,53	21,36	7,5,E+06	26,11	25,75	25,93	6,8,E+03
HBO460	10	21,88	22,15	22,02	4,9,E+06	25,45	25,50	25,48	9,1,E+03

Muestra	Puntaje final Vesikari	Bacterias totales				<i>Ruminococcus spp.</i>			
		Ct ₁	Ct ₂	Ct $\bar{x}$	[copias 16S / ng ADN total] ^a	Ct ₁	Ct ₂	Ct $\bar{x}$	[copias 16S / ng ADN total] ^a
HBO469	13	23,74	23,89	23,82	1,5,E+06	30,75	30,79	30,77	2,9,E+02
HBO476	9	19,01	18,57	18,79	3,9,E+07	22,83	23,39	23,11	4,3,E+04
HBO477	10	18,96	18,96	18,96	3,5,E+07	23,76	23,51	23,64	3,0,E+04
HBO479	7	25,09	24,98	25,04	7,0,E+05	30,50	30,54	30,52	3,4,E+02
HBO498	13	21,99	22,15	22,07	4,7,E+06	25,48	26,31	25,90	6,9,E+03
HBO500	15	21,29	21,28	21,29	7,9,E+06	23,31	23,33	23,32	3,7,E+04
HBO516	12	18,6	18,29	18,45	4,9,E+07	23,87	23,29	23,58	3,1,E+04
HBO520	10	21,5	21,43	21,47	7,0,E+06	23,97	23,53	23,75	2,8,E+04
HRCO26	16	27,7	28,37	28,04	1,3,E+05	31,18	31,55	31,37	2,0,E+02
HRCO28	6	18,95	18,74	18,85	3,8,E+07	22,81	22,77	22,79	5,3,E+04
HRCO32	12	24,72	24,53	24,63	9,1,E+05	29,65	29,62	29,64	6,1,E+02
HRCO36	11	26,04	26,06	26,05	3,6,E+05	N/A	N/A	N/A	0,0,E+00
HRCO41	8	23,7	23,44	23,57	1,8,E+06	33,12	33,64	33,38	5,3,E+01
HRCO47	5	23,65	23,78	23,72	1,6,E+06	25,22	24,55	24,89	1,3,E+04
HRCO48	6	22,78	22,53	22,66	3,2,E+06	26,20	26,38	26,29	5,4,E+03
HRCO74	9	27,27	27,17	27,22	1,7,E+05	31,04	31,31	31,18	2,2,E+02
LV3	6	28,34	28,37	28,36	8,2,E+04	29,37	30,13	29,75	5,6,E+02
LV4	7	26,55	27,18	26,87	2,1,E+05	29,52	29,61	29,57	6,4,E+02
LV6	9	19,21	18,77	18,99	3,5,E+07	24,04	23,52	23,78	2,8,E+04
LV7	8	28,74	28,49	28,62	6,4,E+04	33,92	34,08	34,00	3,5,E+01
LV8	10	24,12	23,79	23,96	1,4,E+06	24,20	23,78	23,99	2,4,E+04
LV10	11	25,02	24,82	24,92	7,5,E+05	27,01	26,39	26,70	4,1,E+03
LV13	7	17,92	18,18	18,05	6,3,E+07	20,64	20,40	20,52	2,3,E+05

Muestra	Puntaje final Vesikari	Bacterias totales				<i>Ruminococcus spp.</i>			
		Ct ₁	Ct ₂	Ct $\bar{x}$	[copias 16S / ng ADN total]	Ct ₁	Ct ₂	Ct $\bar{x}$	[copias 16S / ng ADN total]
LV14	11	27,41	28,27	27,84	1,5,E+05	28,41	29,01	28,71	1,1,E+03
LV19	12	24,8	24,96	24,88	8,1,E+05	26,11	26,66	26,39	5,0,E+03
LV20	9	25,48	25,29	25,39	5,2,E+05	26,13	25,87	26,00	6,5,E+03
LV22	6	19,28	19,15	19,22	3,0,E+07	22,18	22,20	22,19	7,8,E+04
LV24	11	22,59	22,53	22,56	3,5,E+06	25,61	25,72	25,67	8,1,E+03
LV26	11	22,76	22,89	22,83	2,9,E+06	28,61	28,86	28,74	1,1,E+03

^a Número de copias normalizadas aplicando la fórmula descrita en el ítem 3.10.

Ct $\bar{x}$: Ciclo umbral promedio; N/A: no amplifica

Tabla 13. Valores de ciclo umbral y número de copias de ADN (muestras de grupo control)

Muestra	Bacterias totals				<i>Ruminococcus spp.</i>			
	Ct ₁	Ct ₂	Ct $\bar{x}$	[copias 16S / ng ADN total]	Ct ₁	Ct ₂	Ct $\bar{x}$	[copias 16S / ng ADN total]
CS2	21,67	21,66	21,665	6,1E+06	25,47	25,82	25,65	8,2E+03
CS3	24,48	24,23	24,355	1,1E+06	28,53	28,49	28,51	1,3E+03
CS4	22,12	22,15	22,135	4,5E+06	27,89	28,14	28,02	1,7E+03
CS5	24,81	24,79	24,8	8,1E+05	27,87	29,03	28,45	1,3E+03
CS7	22,53	22,45	22,49	3,6E+06	23,24	23,44	23,34	3,7E+04
CS10	24,09	24,08	24,085	1,3E+06	28,08	27,63	27,86	1,9E+03
CS11	26,78	27,01	26,895	2,1E+05	30,25	30,39	30,32	3,9E+02
CS12	21,99	22,33	22,16	4,5E+06	26,21	26,41	26,31	5,3E+03
CS13	18,93	18,85	18,89	3,7E+07	25,89	26,12	26,01	6,5E+03
CS15	23,72	23,85	23,785	1,6E+06	27,76	28,24	28,00	1,8E+03
CS16	22,57	22,44	22,505	3,6E+06	23,03	23,42	23,23	4,0E+04
CS18	18,2	18,46	18,33	5,3E+07	21,35	21,29	21,32	1,4E+05
CS19	21,53	21,45	21,49	6,9E+06	25,27	24,7	24,99	1,3E+04

Anexo 7

Tabla 14. Niveles de IgA total y títulos de sIgA específica contra rotavirus en muestras de clarificado fecal

Muestra	IgA total (mg/dL)	IgA α RV ^a	Muestra	IgA total (mg/dL)	sIgA α RV ^a
HBO340	10,25	16	HBO498	0,45	0
HBO343	5,2	8	HBO500	13,1	32
HBO344	11,95	32	HBO516	16,1	32
HBO345	2,85	64	HBO520	NC	0
HBO348	1,3	0	HRCO26	NC	8
HBO356	2,25	64	HRCO28	NC	4
HBO357	2,85	16	HRCO32	16,1	64
HBO369	1,3	8	HRCO36	2,25	64
HBO377	7,1	16	HRCO41	9,4	32
HBO390	6	32	HRCO47	5,3	32
HBO395	0,95	16	HRCO48	6,45	64
HBO400	NC	2	HRCO74	NC	4
HBO407	3,3	64	LV3	4,75	32
HBO416	0,95	8	LV4	3,95	16
HBO420	4	16	LV6	5	16
HBO427	3,3	64	LV7	8,35	64
HBO442	1,3	4	LV8	NC	32
HBO449	0,65	8	LV10	0,8	8
HBO450	10,55	64	LV13	4,75	32
HBO453	1,3	2	LV14	3,45	32
HBO460	11,95	64	LV19	2,7	4
HBO469	NC	2	LV20	1,2	4
HBO476	1,3	8	LV22	7,7	32
HBO477	1,3	0	LV24	NC	2
HBO479	1,3	0	LV26	NC	2

^a Títulos de IgA expresados como el recíproco de la dilución fecal más alta con DO> 0,100.

NC: No cuantificable

Anexo 8

Tabla 15. Cebadores empleados para cuantificación de carga bacteriana por qPCR

Cebador/Sonda	Secuencia (5'---->3')	Tamaño de producto (pb)	Referencia
16S ARNr dominio Bacteria			
For	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466	Nadkarni et al. 2002
Rev	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Taqman	(FAM) CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC AC		
16S ARNr <i>Ruminococcus</i> spp. [<i>Lachnospiraceae</i>]			
For	AGA ACC TTA CCT GST CTT GAC ATC CC	157	Kurina et al. 2020
Rev	CTG GCT ACT RAA GAT AGG GGT TGC G		
Taqman	(HEX) TGC ACC ACC TGT CTC CKC TGY CCC GAA G		

Tabla 16. Cebadores empleados para detección del gen NSP3 de rotavirus por RT-qPCR

Cebador/Sonda	Secuencia (5'---->3')	Tamaño de producto (pb)	Referencia
Gen NSP3			
For	ACC ATC TWC ACR TRA CCC TCT ATG AG	87	Zeng et al. 2008
Rev	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TAG C		
Taqman	(FAM) AGT TAA AAG CTA ACA CTG TCA AA		

Tabla 17. Cebadores empleados para genotipificación del gen VP7 de rotavirus por RT-PCR Múltiple Semi-Anidada

Cebador		Secuencia (5'---->3')	Tamaño de producto (pb)	Referencia
Primera ronda de amplificación del gen VP7				
	Beg 9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1062	Gouvea et al. 1990
	End 9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG		
Segunda ronda de amplificación del gen VP7				
	9con1	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	158	Das et al. 1994
G1	9T-1	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG		
G2	9T-2	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT		
G3	9T-3P	GTC CAG TTG CAG TGT AGC		
G4	9T-4	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	403	Gouvea et al. 1990
G6	DT6	CTA GTT CCT GTG TAG AAT C	463	
G9	9T-9B	TAT AAA GTC CAT TGC AC	110	
G12	jrg.227	GTC CAG TCG GGA TCA GTT	308	Castello et al. 2006

Tabla 18. Cebadores empleados para genotipificación del gen VP4 de rotavirus por RT-PCR Múltiple Semi-Anidada

Cebador		Secuencia (5'---->3')	Tamaño de producto (pb)	Referencia	
Primera ronda de amplificación del gen VP4					
	Con-3	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	876	Gentsch et al. 1992	
	Con-2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC			
Segunda ronda de amplificación del gen VP4					
	Con-3	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	483	Gentsch et al. 1992	
P[4]	2T-1	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC			
P[6]	3T-1	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA			267
P[8]	1T-1D	TCT ACT TGG ATA ACG TGC			345
P[9]	4T-1	TGA GAC ATG CAA TTG GAC			392

Anexo 9

Tabla 19. Resultados de secuenciación del gen VP7 y VP4 de rotavirus

Se lograron secuenciar fragmentos del gen VP7 y VP4 en 23 muestras, de manera a confirmar los genotipos detectados por PCR convencional. Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando el programa BioEdit (V7.0.5.3) y comparadas con secuencias de rotavirus almacenadas en el GenBank.

Muestra	PCR		Secuenciación
	VP4_2nd	VP7_2nd	
HBO343	P8	G3	G3P[8]
HBO348	P8	G6	G6
HBO356	P8	G3	G3P[8]
HBO357	P8	G3	G3
HBO369	P8	G6	G6
HBO377	P8	G6	G6
HBO390	P8	G6	G6
HBO395	P6	G12	G12P[6]
HBO400	P6	G12	G12P[6]
HBO453	P8	G6	G6P[8]
HBO460	P8	G6	G6P[8]
HBO469	P8	G6	G6P[8]
HBO476	P8	G6	G6P[8]
HBO516	P8	G6	G6P[8]
HRCO28	P8	G3	G3
HRCO32	P8	G6	G6
HRCO36	P8	G6	G6
LV4	P8	G3	G3
LV7	P8	G3	G3
LV8	P8	G3	G3
LV10	P8	G3	G3
LV19	P8	G3	G3
LV24	P8	G3	G3P[8]