



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Variabilidad de los genes VP7 y VP4 de rotavirus
detectados en heces de niños menores a 5 años con
gastroenteritis, en Asunción y Gran Asunción en los años
2015-2019, posteriores a la introducción de la vacuna a nivel
nacional.**

IVANA PRECIOSA FERNÁNDEZ JARA

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

Variabilidad de los genes VP7 y VP4 de rotavirus detectados en heces de niños menores a 5 años con gastroenteritis, en Asunción y Gran Asunción en los años 2015-2019, posteriores a la introducción de la vacuna a nivel nacional.

IVANA PRECIOSA FERNÁNDEZ JARA

Tutora: Iara Magaly Martínez. Ph.D.

Co-tutoras: María José Fernández. Ph.D.

María Eugenia Galeano. M.Sc.

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Mayo, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA (para el encuadernado final, para entregar en la defensa de tesis)

Fernández Jara, Ivana Preciosa

Variabilidad de los genes VP7 y VP4 de rotavirus detectados en heces de niños menores a 5 años con gastroenteritis, en Asunción y Gran Asunción en los años 2015-2019, posteriores a la introducción de la vacuna a nivel nacional/autora: Ivana Preciosa Fernández Jara; tutora de tesis: Iara Magaly Martínez Pareira. Ph.D.; co tutoras: María José Fernández. Ph.D., María Eugenia Galeano Dinatale. M.Sc.- - San Lorenzo: UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, 2021.

Nro total de páginas que posee la tesis (ejemplo iv, 100); il (si posee imágenes o gráficos);

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) – IICS,FCQ,2021

1. Palabras claves (utilizar descriptores, ej. MeSH) I. Título

CDD: consultar en biblioteca
M298e

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

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

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

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**Variabilidad de los genes VP7 y VP4 de rotavirus detectados en heces de niños menores a 5 años con gastroenteritis, en Asunción y Gran Asunción en los años 2015-2019, posteriores a la introducción de la vacuna a nivel nacional**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Ivana Preciosa Fernández Jara** 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.

Tutora: Dra. Iara Magaly Martínez Pareira



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



LA PROF. DRA. MARÍA JOSÉ FERNÁNDEZ, COTUTORA, DOCENTE INVESTIGADOR DE LA FACULTAD POLITECNICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**Variabilidad de los genes VP7 y VP4 de rotavirus detectados en heces de niños menores a 5 años con gastroenteritis, en Asunción y Gran Asunción en los años 2015-2019, posteriores a la introducción de la vacuna a nivel nacional**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Ivana Preciosa Fernández Jara** 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: Dra. MARÍA JOSÉ FERNÁNDEZ



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 DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**Variabilidad de los genes VP7 y VP4 de rotavirus detectados en heces de niños menores a 5 años con gastroenteritis, en Asunción y Gran Asunción en los años 2015-2019, posteriores a la introducción de la vacuna a nivel nacional**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Ivana Preciosa Fernández Jara** 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: Lic. MARÍA EUGENIA GALEANO. MSc.



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 “**Variabilidad de los genes VP7 y VP4 de rotavirus detectados en heces de niños menores a 5 años con gastroenteritis, en Asunción y Gran Asunción en los años 2015-2019**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Ivana Preciosa Fernández Jara** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección la docente investigadora **PROF. 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

VARIABILIDAD DE LOS GENES VP7 Y VP4 DE ROTAVIRUS DETECTADOS EN HECES DE NIÑOS MENORES A 5 AÑOS CON GASTROENTERITIS, EN ASUNCIÓN Y GRAN ASUNCIÓN EN LOS AÑOS 2015-2019

Ivana Preciosa Fernández Jara*, María José Fernández**, María Eugenia
Galeano***, Iara Magaly Martínez Pereira***

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

** Facultad Politécnica, Universidad Nacional de Asunción

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

RESUMEN

Los rotavirus del grupo A (RVA) son los principales agentes etiológicos de gastroenteritis aguda (GEA) en la población infantil. Desde el 2006 se cuentan con vacunas anti RVA, incluidas en el calendario nacional desde el 2010. La clasificación binaria de los RVA se basa en la secuencia de nucleótidos de los genes VP7 (genotipo G) y VP4 (genotipo P). Con el objetivo de analizar los genotipos G y P circulantes en Asunción y sus alrededores en un periodo posterior a la introducción de la vacuna en el sistema nacional, fueron colectadas 559 muestras fecales de casos de GEA de junio a octubre de los años 2015, 2016, 2018 y 2019. Se determinó el genotipo de las muestras positivas para RVA mediante RT-PCR. Los genotipos predominantes fueron G9P[8] (27.7%), G3P[8] (25.7%) , G6P[8] (13.3%) y G12P[8] (6.43%). Se detectó la circulación esporádica de G2P[4] y G1P[8]. El análisis de las secuencias de ambos genes mostró: i. G6P[8] y G3P[8] poseen una VP7 de origen zoonótico y con variaciones en múltiples sitios antigénicos respecto a genotipos vacunales; ii. Las P[8] de ambas cepas forman un mismo *cluster* filogenético y presentan las mismas variaciones antigénicas respecto a la P[8] vacunal; iii. Ambos genes agrupan con cepas de constelaciones génicas del tipo *DS-1-like*. Los demás genotipos agruparon con cepas humanas sin presentar variaciones significativas. El segundo objetivo fue analizar la estacionalidad y distribución etaria de los casos de rotavirus. Se analizó una base de datos de 10.691 casos de GEA en niños ≤ 5 años del 2011 al 2019. Se observó ausencia de picos estacionales en 5 años analizados y un leve aumento de agosto a octubre en los años con mayor proporción de casos. El grupo etario de ≥ 24 meses fue el de mayor incidencia. A pesar de que todavía no es posible determinar una presión selectiva inducida por la vacunación, la evidencia global y los resultados de este trabajo apuntan a ello. La vacunación ha sido exitosa para reducir la severidad de la enfermedad, sin embargo, el éxito aparente de cepas de RVA que presentan este tipo de constelación génica no común, puede presentar un desafío para los programas de vacunación y enfatiza la necesidad de un monitoreo continuo de los rotavirus circulantes.

Palabras claves: Gastroenteritis, Rotavirus, Genotipos, Vacunas, Evolución.

**VARIABILITY OF THE VP7 AND VP4 GENES OF ROTAVIRUS
DETECTED IN FECES OF CHILDREN UNDER 5 YEARS OF AGE WITH
GASTROENTERITIS, IN ASUNCIÓN AND GRAN ASUNCIÓN IN THE
YEARS 2015-2019**

Ivana Preciosa Fernández Jara*, María José Fernández, María Eugenia
Galeano***, Iara Magaly Martínez Pereira*****

*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

Abstract

Group A rotaviruses (RVA) are the main etiological agents of acute gastroenteritis (AGE) in children. Since 2006 there have been anti-RVA vaccines, included in the national calendar since 2010. The binary classification of RVA is based on the nucleotide sequence of the VP7 (genotype G) and VP4 (genotype P) genes. With the objective of analyzing the circulating G and P genotypes in Asunción and its surroundings after the introduction of the vaccine in the national system, 559 fecal samples of AGE cases were collected from June to October of the years 2015, 2016, 2018 and 2019. The genotype of the RVA-positive samples was determined by RT-PCR. The predominant genotypes were G9P[8] (27.7%), G3P[8] (25.7%), G6P[8] (13.3%) and G12P[8] (6.43%). Sporadic circulation of G2P[4] and G1P[8] was detected. Sequence analysis of both genes showed: i. G6P[8] and G3P[8] have a VP7 of zoonotic origin and with variations in multiple antigenic sites with respect to vaccine genotypes; ii. The P[8] of both strains form the same phylogenetic cluster and present the same antigenic variations with respect to the P[8] vaccine; iii. Both genes cluster with DS-1-like gene constellation strains. The other genotypes grouped with human strains without presenting significant variations. The second objective was to analyze the seasonality and age distribution of rotavirus cases. A database of 10,691 cases of AGE in children ≤ 5 years of age from 2011 to 2019 was analyzed. An absence of seasonal peaks was observed in the 5 years analyzed and a slight increase from August to October in the years with the highest proportion of cases. The age group of ≥ 24 months had the highest incidence. Although it is not yet possible to determine a selective pressure induced by vaccination, the global evidence and the results of this work point to it. Vaccination has been successful in reducing the severity of the disease, however, the apparent success of RVA strains presenting this type of unusual gene constellation may present a challenge for vaccination programs and emphasizes the need for continuous monitoring of circulating rotaviruses.

Keywords: Gastroenteritis, Rotavirus, Genotypes, Vaccines, Evolution

INDICE

1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Gastroenteritis.....	2
1.2. Generalidades de rotavirus	2
1.2.1. Estructura de la partícula viral de rotavirus	3
1.3. Clasificación de especies del género <i>Rotavirus</i>	5
1.3.1 Clasificación de genotipos en la especie <i>Rotavirus A</i>	5
1.3.2 Sistema binario de genotipificación de RVA.....	6
1.3.3 Clasificación del genoma completo de rotavirus (constelaciones de genes)	6
1.4. Epidemiología de RVA	7
1.5. Mecanismos evolutivos y diversidad de rotavirus	8
1.6. Vacunas	11
1.7. Situación de la infección por RVA luego de la introducción de la vacuna contra rotavirus a nivel mundial	13
1.8. Situación de la infección por rotavirus en Paraguay	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo general.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. METODOLOGÍA.....	19
3.1. Diseño, sujeto de estudio y reclutamiento	20
3.2. Muestras a ser analizadas para detección de RVA por RT-PCR en tiempo real y genotipificación de VP7 y VP4 por RT-PCR convencional	20
3.3. Extracción de ARN partir de muestras fecales	21
3.4. Detección de ARN de rotavirus	22
3.5. Caracterización molecular de los genes VP7 y VP4 de rotavirus mediante <i>heminested-multiplex-RT-PCR</i>	22

3.5.1.	Primera Amplificación.....	22
3.5.2	Segunda Amplificación: identificación de genotipos G (VP7) y P (VP4) 23	
3.5.2.	Detección de los genotipos G6 y G8 de rotavirus	24
3.5.3.	Visualización de productos de amplificación.....	24
3.6.	Obtención de productos para secuenciación	25
3.7.	Análisis de secuencias obtenidas	25
3.8.	Análisis filogenético de la secuencia nucleotídica de los genes VP7 y VP4 de rotavirus	25
3.9.	Inferencia de la secuencia de aminoácidos de las proteínas VP7 y VP4 (porción VP8*)	26
3.10.	Mapeo de sustituciones de aminoácidos de las proteínas VP7 y VP4 (porción VP8*)	26
3.11.	Análisis de base de datos por fecha de toma	27
3.12.	Análisis de base de datos por edad.....	27
3.13.	Asuntos éticos	27
4.	RESULTADOS	28
4.1.1.	Detección de rotavirus en muestras fecales de diarrea de niños menores de 5 años provenientes de Asunción y Gran Asunción durante los años 2015-2016 y 2018-2019 mediante RT-PCR en tiempo real.....	29
4.1.1.1	Detección de ARN de rotavirus muestras fecales de los años 2015, 2016, 2018 y 2019	31
4.1.2.	Determinar los genotipos de los genes VP7 (genotipos G) y VP4 (genotipos P) de las muestras positivas para rotavirus detectadas.....	31
4.1.2.1	Genotipos G (VP7) de rotavirus detectados en los años 2015, 2016, 2018 y 2019 en Asunción y Gran Asunción	31
4.1.2.2	Genotipos P (VP4) de rotavirus detectados en los años 2015, 2016, 2018 y 2019 en Asunción y Gran Asunción	33

4.1.2.3. Proporción de genotipos circulantes según la clasificación binaria de RVA	34
4.1.3. Analizar filogenéticamente la secuencia de los genes VP7 y VP4 de las cepas de rotavirus predominantes en Asunción y Gran Asunción durante los años 2015-2016 y 2018-2019.	35
4.1.3.1 Análisis filogenético del gen VP7 de rotavirus, Genotipo G3	35
4.1.3.2 Análisis filogenético del gen VP7 de rotavirus, Genotipo G9	37
4.1.3.3 Análisis filogenético del gen VP7 de rotavirus, Genotipo G6	38
4.1.3.4 Análisis filogenético del gen VP7 de rotavirus, Genotipo G12	39
4.1.3.5 Análisis filogenético del gen VP4 de rotavirus, Genotipo P[8]	40
4.1.4. Analizar los cambios aminoacídicos en sitios antigénicos de las proteínas VP7 y VP4 de rotavirus	41
4.1.4.1 Diferencias en los sitios antigénicos de los genes VP7 de cepas G3P[8]	41
4.1.4.2 Diferencia de aminoácidos en las regiones antigénicas del gen VP7 de RVA G9 circulantes de 2015 a 2018, respecto a las G9 pre-vacunal circulantes en Paraguay	43
4.1.4.3 Diferencias en los sitios antigénicos de los genes VP7 de rotavirus de cepas G6P[8]	45
4.1.4.4 Diferencias en los sitios antigénicos de los genes VP4 de cepas P[8] ...	47
4.2. Resultados del Objetivo general 2: Analizar la estacionalidad y distribución etaria de los casos de rotavirus post introducción de la vacuna (2011-2019) en Asunción y sus alrededores	52
4.2.1. Proporción de casos positivos de rotavirus por año.	52
4.2.1. Estacionalidad de casos de RVA posterior a la introducción de la vacuna	53
4.15. Distribución etaria de rotavirus	54
5. DISCUSIÓN	56

6. CONCLUSIÓN.....	68
7. PERSPECTIVAS.....	70
7. BIBLIOGRAFIA	72
8. ANEXO	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructura y proteínas del rotavirus	4
Figura 2: Regiones antigénicas en las proteínas VP7 y VP4 (VP8*) de rotavirus.....	5
Figura 3: Reordenamiento genético y transmisión interspecies.	10
Figura 4: Mapa de introducción de la vacuna contra el rotavirus en todo el mundo..	12
Figura 5: Mapa de países de América Latina y el Caribe incluidos en revisión sistemática por estratos de mortalidad (66).....	15
Figura 6: Flujograma de Trabajo para análisis moleculares.	21
Figura 7: Curva de amplificación de muestras positivas para rotavirus..	30
Figura 8: Curva de amplificación obtenida mediante RT-qPCR para la detección del gen NSP3 de rotavirus a partir de muestras fecales.....	31
Figura 9: Proporción de genotipos G de rotavirus detectados por RT-PCR en muestras positivas para rotavirus, de los años 2015, 2016, 2018 y 2019.	32
Figura 10: Proporción de genotipos G de rotavirus detectados por RT-PCR en muestras positivas para rotavirus, de los años 2015, 2016, 2018 y 2019..	33
Figura 11: Proporción de genotipos P de rotavirus detectados por RT-PCR en muestras positivas para rotavirus, de los años 2015, 2016, 2018 y 2019.	34
Figura 12: Proporción de genotipos (clasificación binaria) circulantes en 2015, 2016, 2018 y 2019.	35
Figura 13. Árbol filogenético del gen VP7 de rotavirus del genotipo G3.	36
Figura 14: Árbol filogenético del gen VP7 de rotavirus del genotipo G9.	37
Figura 15: Árbol filogenético del gen VP7 de rotavirus del genotipo G6.	38
Figura 16: Árbol filogenético del gen VP7 de rotavirus del genotipo G12..	39
Figura 17: Árbol filogenético de la secuencia nucleótidos del gen VP4 de rotavirus de genotipo P[8].....	40
Figura 18: Substituciones en la proteína VP7 genotipo G3.	41

Figura 19: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP7 de las RVA G3 2015, 2018 y 2019 en comparación a la G3 presente en la vacuna RV5	42
Figura 20: Substituciones en la proteína VP7 genotipo G9 de rotavirus.	43
Figura 21: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP7 de las RVA G9 2016 y 2018 respecto a las G9 circulantes en Paraguay antes de la introducción de la vacuna RV1.	44
Figura 22: Substituciones en la proteína VP7 de rotavirus.	45
Figura 23: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP7 de las RVA G6 2018 y 2019 respecto a las G6 presente en la vacuna RotaTeq.	46
Figura 24: Substituciones en la proteína VP4 de rotavirus del genotipo P[8] que acompañan a diferentes genotipos G (A, B y C), respecto a la P[8] presente en la vacuna Rotarix.	47
Figura 25: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP8* de las RVA P[8] (G3) circulantes en 2015 y 2018 respecto a las P[8] presente en la vacuna RV1.	48
Figura 26: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP8* de las RVA P[8] (G6) circulantes en 2018 y 2019 respecto a las P[8] presente en la vacuna RV1.	49
Figura 27: Substitución de aminoácidos de las regiones antigénicas de VP8* de las RVA P[8] (G12) circulantes en 2015 respecto a las P[8] presente en la vacuna RV1.	50
Figura 28: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP8* de las RVA P[8] (G9) circulantes en 2016 y 2018 respecto a las P[8] presente en la vacuna Rotarix.	51
Figura 29: Frecuencia de casos de rotavirus en niños <5 años pre y post introducción de la vacuna.	52
Figura 30: Frecuencia de casos de RVA en niños menores de 5 años, por mes, de 2011 a 2019.	53
Figura 31: Genoma y <i>heat-map</i> de diseminación de G3P[8] <i>DS-1-like</i>	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genotipos descritos para los genes de rotavirus.	6
Tabla 2. Cebadores empleados para el genotipado de rotavirus grupo A.	24
Tabla 3: Detección del gen NSP3 de RVA por RT-PCR en tiempo real.....	29
Tabla 4. Frecuencia de detección de RVA por franja etaria	54
ANEXO 1: Tabla de numeros de pruebas desde el 2002 al 2019	88
ANEXO 2: Clasificación Binaria de Genotipos Circulantes en 2015, 2016, 2018 y 2019.....	89
ANEXO 3: Lista de secuencias utilizada para realizar los arboles filogenéticos de los diferentes genotipos de rotavirus.	90

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNdc: Ácido ribonucleico de doble cadena

AIC: *Akaike Information Criterion*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

DBMB: Departamento de Biología Molecular y Biotecnología

EuroRotaNet: Red Europea de Vigilancia de Rotavirus

GEA: Gastroenteritis aguda

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

DLP: Partículas de doble capa

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato

NSP: *Non-structural protein* (Proteína No Extracelular)

NIP: Programa Nacional de Inmunización

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

ORF: Marco abierto de lectura

pb: pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT: Transcripción inversa

RV: Rotavirus

RVA: Rotavirus del grupo A

TLP: Partículas de triple capa

UV: Ultravioleta

VLPs: *Virus-like particles*

VP: *Viral protein*

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Gastroenteritis

La enfermedad diarreica es una de las principales causas de mortalidad en niños menores de cinco años en todo el mundo. A nivel mundial, hay casi 1.700 millones de casos de enfermedades diarreicas infantiles cada año, especialmente en los países en desarrollo (1,2). La gastroenteritis aguda (GEA) se presenta principalmente como 3 o más deposiciones de diarrea acuosa en un mismo día. Otros síntomas pueden incluir náuseas, fiebre alta, diarrea con sangre, vómitos prolongados o dolor abdominal (3). Generalmente esta enfermedad afecta a personas de todas las edades, observándose complicaciones potencialmente graves en niños pequeños y ancianos que son vulnerables a la deshidratación (4).

La gastroenteritis puede ser causada por diversos patógenos, entre los casos más graves se encuentran aquellas ocasionadas por virus como: rotavirus (RV), norovirus y adenovirus, entre otros (5). Según los Centros para el Control de Enfermedades (CDC), la gastroenteritis viral puede representar alrededor del 20% y el 40% de los ingresos hospitalarios por diarrea y es la quinta causa principal de muerte en niños (3). Rotavirus es el principal agente etiológico de GEA en niños menores de 5 años en todo el mundo, representando alrededor de 200.000 muertes por año (6,7).

1.2. Generalidades de rotavirus

En el 2018, en base a estudios sobre la ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp) de la familia *Reoviridae*, se propuso el rearreglo de los taxones definidos en este grupo (8) según el ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (9). En base a esto, según la última ratificación del ICTV, se conforma el orden Reovirales compuesto por las familias *Sedoreoviridae* y *Spinareoviridae* (10). Según a esta nueva clasificación, los *Rotavirus* son un género de la familia *Sedoviridae*, perteneciente al orden *Reovirales*. Son patógenos de importancia para la salud pública, causantes de enfermedad diarreica grave en humanos y varias especies de animales de importancia económica como ganado bovino, porcino, equino y caprino, también aves, roedores y animales domésticos (11). Los RV fueron reconocidos como una de las principales causas de GEA en bebés y niños pequeños en 1973 (12), sin embargo, anteriormente ya se habían descubierto RV en muchas especies de mamíferos y durante los últimos 40 años se han realizado varias investigaciones para

el estudio de su estructura, replicación, patogenia y respuesta inmune a la infección (13).

La transmisión de los RV se da principalmente por la ruta fecal-oral, a través del contacto persona a persona o mediante agua y/o superficies contaminadas. Rotavirus es altamente infeccioso, el “*shedding*” de virus infeccioso en materia fecal puede ser en promedio 3×10^{11} PFU (partículas infecciosas) por mL de heces, en contraposición a la dosis infecciosa en humanos, que se calcula en tan solo 10 PFU/mL. Sumado a ello, el virión es altamente resistente en el ambiente y puede permanecer infeccioso durante semanas en superficies y sustratos ambientales como el agua (14,15).

La estacionalidad de la infección por RV en humanos difiere ampliamente en todo el mundo y se vuelve difícil atribuir el comportamiento de rotavirus a ciertas condiciones climáticas, geográficas, económicas y/o sociales (16). Anteriormente, las infecciones por rotavirus y otros virus entéricos, eran asociadas a temperaturas bajas (“diarrea de invierno”) y la diarrea causada por bacterias se asociaba con temperaturas más cálidas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos estudios se basaban principalmente en lugares de clima templado y en gran parte de las Américas (17,18). Estudios epidemiológicos globales posteriores vieron que en países de África y Asia y otras zonas con clima tropical la epidemiología de rotavirus se caracteriza por su presencia en todo el año (4,15,18,19). En Paraguay, un estudio que observó la circulación de rotavirus entre 2003 y 2005, describió la circulación de RV con un marcado pico estacional en los meses más fríos del año (20).

1.2.1. Estructura de la partícula viral de rotavirus

Los RV son virus no envueltos. Poseen una cápside icosaédrica formada por tres capas concéntricas de proteínas (Figura 1a). Su genoma está compuesto por 11 segmentos de ARN de cadena doble (ARNdc). Cada segmento es un gen que codifica una proteína, a excepción del segmento 11 que posee dos marcos de lectura. El genoma codifica seis proteínas estructurales que conforman el virión: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7; y seis proteínas no estructurales: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6, requeridas para la replicación viral (Figura 1c) (21,22).

La capa interna del virión está compuesta por la proteína VP2 que rodea al genoma y a dos proteínas fundamentales para su replicación inicial: la RdRp VP1 y la guanililtransferasa VP3 (Figura 1b) (13,23). La capa intermedia está compuesta en su totalidad por VP6 (Figura 1a-b), proteína conservada, altamente inmunogénica y necesaria para la transcripción de genes virales. La proteína VP6 sólo se expone de manera intracelular y es capaz de inducir altos títulos de anticuerpos IgA e IgG (13,23,24). Las proteínas de la cápside VP7 y VP4, que comprenden la capa más externa de la partícula de rotavirus, participan en la entrada del virus en la célula (Figura 1a) (25). Las mismas contienen múltiples sitios que componen regiones antigénicas identificadas, que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes y por lo tanto son objetivos clave para el desarrollo de vacunas (26–28). La glicoproteína VP7, de 327 aminoácidos, posee 3 regiones antigénicas principales (7-1a, 7-1b, 7-2). Estas regiones comprenden 29 residuos en las posiciones 87-291 (referencia accn: AF295303) (Figura 2a) (29). La proteína VP4 contiene un total de 776 aminoácidos y se activa mediante proteólisis en dos sub-unidades: VP5* y VP8*. Esta última, posee 4 regiones antigénicas (8-1 al 8-4) (Figura 2b), mientras que VP5* contiene 5 regiones antigénicas (5-1 al 5-5), en total ambas comprenden 37 residuos (30).

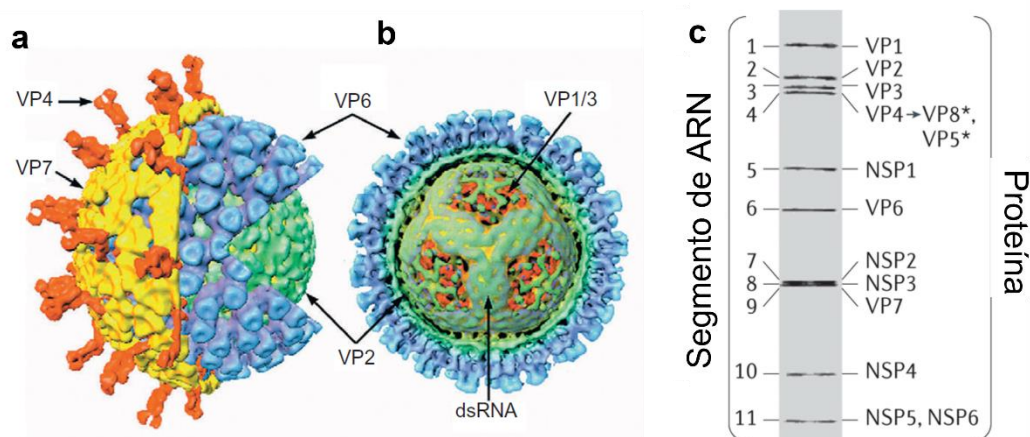


Figura 1: Estructura y proteínas del rotavirus. a) Corte transversal de la partícula viral, mostrando las proteínas de la capa externa de la cápside, VP7 y VP4, la capa intermedia VP6 y la capa interior VP2. b) Sección transversal, se observa la localización del genoma y las proteínas VP1 y VP3 ancladas a VP2, formando el

complejo transcripcional **c)** Segmentos del genoma de rotavirus y proteínas que codifican. VP: *viral protein* (proteínas estructurales); NSP: *no structural protein* (proteína no estructural) Adaptado de Fauquet et al, 2005 (31,32).

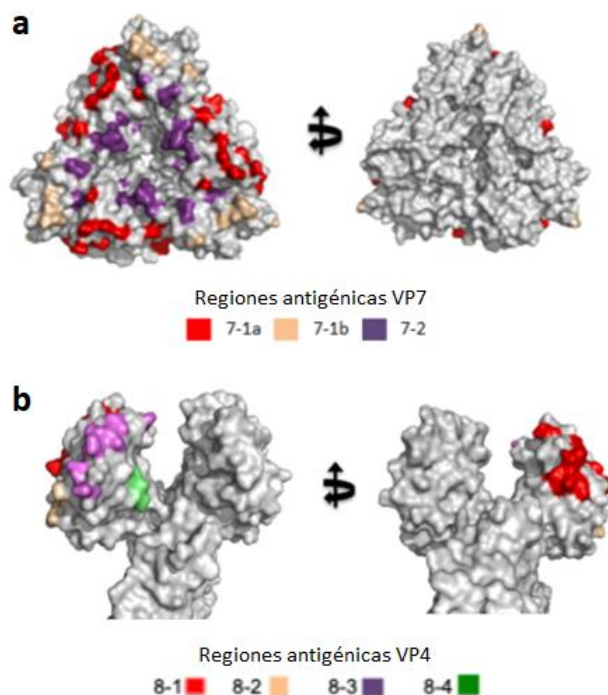


Figura 2: Regiones antigénicas en las proteínas VP7 y VP4 (VP8*) de rotavirus. Estructura basada en 4V7Q-PDB. (29,30,33)

1.3. Clasificación de especies del género *Rotavirus*

El género *Rotavirus* (familia *Sedoreoviridae*) comprende 9 especies (RVA-RVJ) (10) que se diferencian según la reactividad serológica y la variabilidad genética de la proteína VP6 (34,35). Sólo cuatro de ellas: RVA, RVB, RVC y RVH infectan humanos, siendo la especie *Rotavirus A* (RVA) la causa del 99% de las infecciones en humanos (13,36,37).

1.3.1 Clasificación de genotipos en la especie *Rotavirus A*

Actualmente, existen dos formas de clasificar a los RVA. La clasificación más antigua y simple, se basa en la secuencia de los genes que codifican las proteínas VP4 y VP7; sin embargo, este sistema no permite evaluar de manera completa la diversidad y evolución de los rotavirus, por lo que se desarrolló un sistema de clasificación que asigna un genotipo a cada uno de los demás genes que componen el genoma (36,38,39).

1.3.2 Sistema binario de genotipificación de RVA

El sistema binario de clasificación de los RVA se basa en la secuencia de nucleótidos que codifican dos proteínas de la cápside externa: VP7 y VP4. La variabilidad de estos genes define los genotipos G (VP7) y los genotipos P (VP4) (Tabla 1). Actualmente, se han descrito al menos 36 tipos G y 51 tipos P (39–41). Existen protocolos de RT-PCR ampliamente utilizados, que permiten genotipificar a la mayoría de los genotipos de G y P que circulan en humanos y animales (28,34,42).

1.3.3 Clasificación del genoma completo de rotavirus (constelaciones de genes)

La clasificación binaria tradicional fue ampliada y en base a la identidad de nucleótidos de cada segmento, se asignó un genotipo a los 9 genes restantes del genoma (Tabla 1) (36,39,43). En este sistema basado en la secuencia de todos los genes, Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx designan los genotipos para los genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 respectivamente (37,44). Este sistema se actualiza cada cierto tiempo y se utiliza ampliamente para analizar las relaciones evolutivas entre las diferentes cepas de RV (45).

Tabla 1. Genotipos descritos para los genes de rotavirus.

Proteínas codificadas	Número de genotipos	Identidad (nucleótidos) para designar un genotipo (<i>cut-off</i>)
VP1	21 R	83 %
VP2	19 C	84 %
VP3	19 M	81 %
VP4	51 P	80 %
VP6	26 I	85 %
VP7	36 G	80 %
NSP1	30 A	79 %
NSP2	20 N	85 %
NSP3	21 T	85 %
NSP4	26 E	85 %
NSP5	21 H	91 %

Los valores de *cut-off* muestran el porcentaje de identidad de los nucleótidos que definen los genotipos de RVA (40,41).

1.4. Epidemiología de RVA

Los estudios epidemiológicos permitieron estimar que la infección por rotavirus se da prácticamente en todos los niños durante los primeros 5 años de vida. La frecuencia de infección es similar en todo el mundo; sin embargo, en países de bajo nivel socioeconómico es una causa importante de mortalidad. En países de alto nivel económico se asocia a una alta morbilidad, pero baja mortalidad (46,47).

Los genotipos G y P de rotavirus fluctúan año tras año en diferentes sitios geográficos y diferentes genotipos pueden co-circular en un determinado momento. Las razones de esta fluctuación no son bien comprendidas hasta el momento, pero algunos de los factores propuestos son sutiles diferencias en la inmunidad heterotípica así como los efectos de las variaciones genéticas (mutaciones y reordenamientos) (48). RVA engloba hasta el momento 36 genotipos G y 51 genotipos P, de éstos, sólo 11 genotipos G y 13 genotipos P se han descrito en humanos. Si bien durante la replicación, la segregación de cada gen en una nueva partícula viral es independiente, sólo unas pocas combinaciones de tipos G y P como G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] y G12P[8] han predominado en la población humana (48). Estudios anteriores mostraron que G1P[8] representaba el genotipo de RVA más común a nivel mundial antes de la introducción de las vacunas de RV (33,49). Sin embargo, en países de África han sido prevalentes genotipos de RVA menos frecuentes en humanos, como G8P[6] y G8P[8] (22). En Latinoamérica, a diferencia de países como Estados Unidos, se ha observado que los genotipos predominantes cambian de un año a otro sin ningún patrón epidemiológico marcado (50).

Esta misma restricción en las combinaciones de genes ha sido observada a en todo el genoma; en la población humana circulan 3 principales agrupaciones de genes a los cuales se los denomina “genogrupos” o “constelaciones”, las cuales por lo general se mantienen constantes y han sido nombrados de acuerdo con su cepa de referencia *Wa*, *DS-1* y *AU-1*. Las constelaciones que poseen patrones del tipo (G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8] o G12 P[8]) acompañados de I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, son

las cepas “*Wa-like*” más comunes. Las cepas del tipo “*DS-1-like*” presentan un genoma G2P[4] acompañado de I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2. Del mismo modo, las cepas “*AU-1-like*” más frecuentes presentan un genoma G3P[9] acompañado de I3-R3-C3-M3-A3/A12-N3-T3-E3-H3 (48,50). Estas constelaciones de genotipos comunes en rotavirus humanos tienen su origen en distintas especies animales, lo que destaca los vínculos evolutivos entre los rotavirus de diversas especies (38,43). No se sabe con exactitud la causa de dichas restricciones, pero existen evidencias que señalan a la interacción entre las proteínas de la partícula viral y a la interacción virus-hospedero como los principales reguladores (51,52).

1.5. Mecanismos evolutivos y diversidad de rotavirus

La evolución y diversidad de los RVA están dirigidas por la interacción entre los genes virales, la adaptación a hospederos y el escape a la respuesta inmune (48). Los mecanismos encontrados hasta el momento comprenden:

- i) Acumulación de mutaciones puntuales (deriva genética - *genetic drift*): Como resultado de la predisposición de la RdRp a cometer errores. La tasa de mutaciones que se acumulan en el tiempo varía entre los genes. Las regiones que tienen mayor tendencia de acumular mutaciones son los epítomos en las proteínas de superficie, ya que las mismas están implicadas en los cambios de afinidad de los anticuerpos (53).
- ii) Rearreglos génicos: Los rearrreglos de genes abarcan inserciones, deleciones y duplicaciones parciales de un segmento de gen, esto ocurre tanto en regiones codificantes o como no codificantes, principalmente de genes no estructurales. Aunque no hay certeza al respecto, una potencial ventaja conferida por los rearrreglos podría ser el incremento en la capacidad de codificar proteínas de un gen, por ejemplo, la duplicación en el segmento 11 de RVA que es capaz de codificar NSP5 y NSP6 (48).
- iii) Reordenamiento Genético: Debido a la naturaleza segmentada del genoma, los reordenamientos pueden ocurrir durante de la infección simultánea entre diferentes cepas de RVA. El reordenamiento genético de RVA puede ocurrir entre RVA humanos y humanos, RVA humanos y animales o RV animales y animales (Figura 3 A) (11). En base a la predominancia de ciertas combinaciones génicas, se propone

que las posibilidades de combinaciones están restringidas por la afinidad entre las proteínas que formarán el virión. Sin embargo en lugares de alta transmisión del virus, la presión por mantener una constelación preferida puede verse superada por el constante intercambio de genes (36,54).

iv) Transmisión interespecie: La aparición de nuevas cepas emergentes en humanos sugiere que la transmisión interespecie contribuye considerablemente a la diversidad de RVA (Figura 2B) (55,56). Existen dos principales rutas por las cuales los RVA pueden adquirir un nuevo hospedero: i-) la transmisión directa de una cepa de rotavirus desde una especie a una nueva especie hospedera; ii-) el reordenamiento entre cepas de RV de diferentes hospederos, por ejemplo, una cepa humana que reordena con una cepa animal. Esta segunda vía, ha sido hasta el momento la más exitosa, ya que en los casos de zoonosis directa, la transmisibilidad en una nueva especie de hospedero por lo general se ve afectada por los factores genéticos del mismo. Sin embargo, el reordenamiento, podría permitir la introducción de nuevos antígenos desconocidos para el nuevo hospedero, pero mantener los genes virales necesarios para seguir replicando eficientemente en el mismo (48,51,53,57).

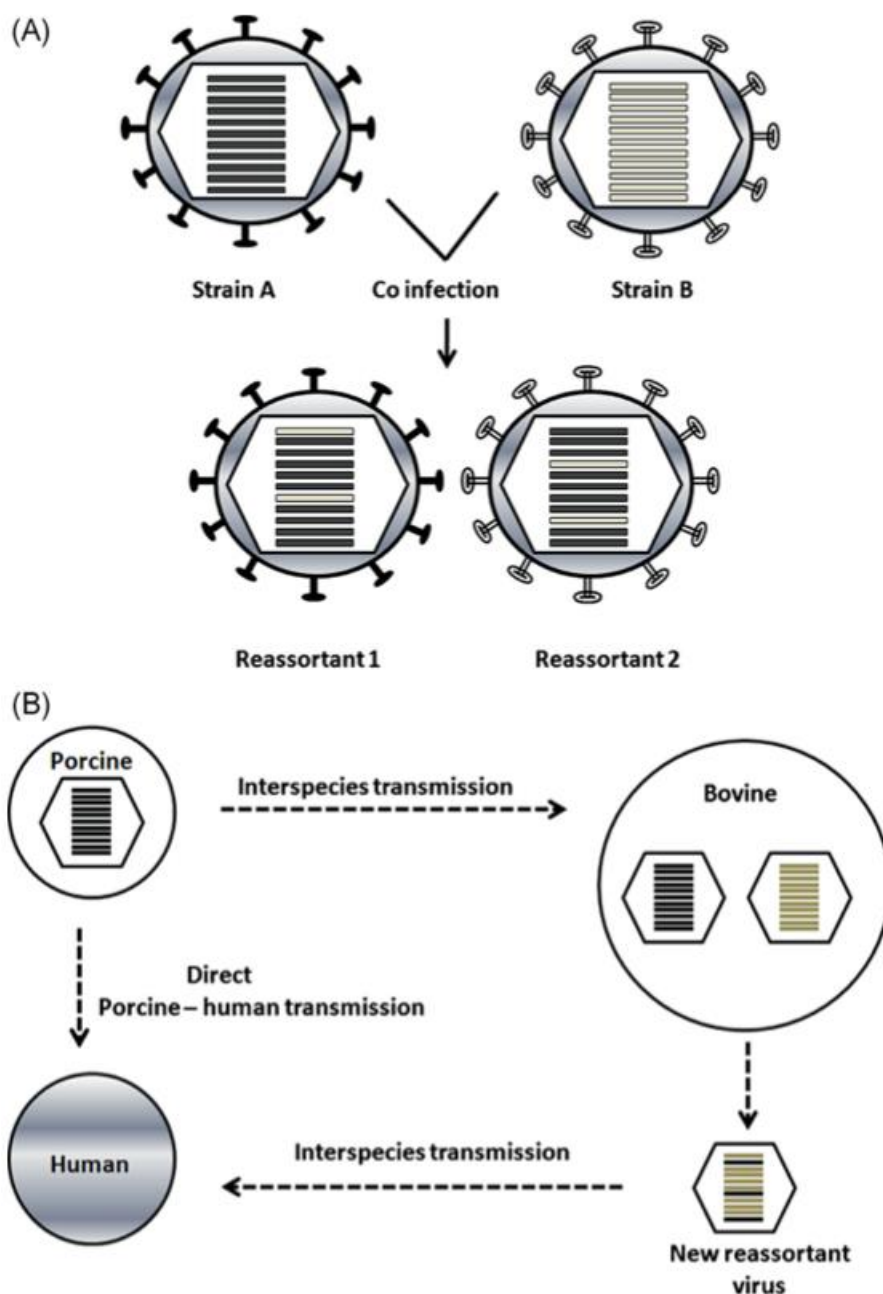


Figura 3: Reordenamiento genético y transmisión interspecies. A) Reordenamiento en rotavirus. La coinfección de dos cepas de rotavirus diferentes (A y B) da como resultado la generación / aparición de reordenamientos debido al intercambio de segmentos génicos. B) Transmisión entre especies. La transmisión de segmentos de genes o virus completos de no humanos da como resultado la evolución y detección de nuevas cepas de rotavirus en humanos. Extraído de Jain *et al*, 2014 (58).

1.6. Vacunas

Desde que se descubrieron los RV como un patógeno entérico importante que afecta principalmente a niños, se han unido esfuerzos para desarrollar una vacuna. El objetivo de producir una vacuna contra el rotavirus desde el principio fue la prevención de la mortalidad mundial (59).

La primera vacuna que se desarrolló contra RV fue desarrollada por Wyeth-Lederle (RotaShield®, Philadelphia, USA). RotaShield®, fue una vacuna reordenante rhesus-humana, que consistía en una VP7 humana con genotipos G1, G2 y G4 reordenada en una cepa de rotavirus rhesus (RRV) G3P[3] (60,61). En 1998 fue aprobado su uso en los Estados Unidos por su alta eficiencia, pero menos de un año después de la licencia, se retiró del mercado debido a que se observó un aumento pequeño pero significativo de casos de invaginación intestinal, asociado a la administración de esta vacuna (62). Sin embargo, se siguieron realizando investigaciones con RotaShield® como alternativa de vacuna contra el rotavirus en países en desarrollo (63).

Actualmente hay cuatro vacunas para rotavirus disponibles, Rotarix® (RV1) (GlaxoSmithKline Biologicals) con licencia desde el 2008, RotaTeq® (RV5) (Merck & Co., Inc.) con licencia desde el 2006, Rotavac® (Bharat Biotech, Hyderabad, India), vacuna monovalente atenuada, la cual recibió la licencia en el año 2014 y ROTASIIL® (Serum Institute of India PVT. LTD., Pune, India) vacuna oral pentavalente reordenante humano-bovino, autorizada en el 2017 (64). Las vacunas Rotavac® y ROTASIIL® son más bien de uso regional, se utilizan actualmente en la India (ambas vacunas) y en Palestina (solo Rotavac) (65). Inicialmente, la protección de las vacunas se basa en los anticuerpos producidos contra los epítopes de neutralización presentes en las proteínas de superficie VP7 y VP4 (Figura 2).

Las vacunas utilizadas ampliamente a nivel mundial son RV1 y RV5. En los ensayos clínicos con estas dos vacunas no se observó un aumento del riesgo de invaginación intestinal, que se había observado previamente con RotaShield® (65,66). RV1 es una vacuna monovalente que consiste en una cepa de rotavirus humano vivo atenuado de genotipo G1P[8], donde el fundamento fue inducir inmunidad específica contra el genotipo más común en humanos e inmunidad heterotípica contra los demás genotipos (59). RV5 es una vacuna pentavalente reordenada humano-bovina que

posee los genotipos humanos G1, G2, G3, G4 y P[8] reordenados en un rotavirus bovino de genotipo G6P[5] (cepa de rotavirus WC3) (47).

En el 2008, la OMS recomendó la introducción de vacunas contra el rotavirus en los programas ampliados de inmunización (PAI) para todos los países, particularmente aquellos con altas tasas de mortalidad por diarrea en los niños menores a 5 años. Para ello se autorizaron las vacunas RV1 y RV5 (67,68).

Hasta octubre del 2018, aproximadamente la mitad de todos los países del mundo han introducido vacunas contra rotavirus en sus programas de inmunización, algunos países habían introducido la vacuna contra el rotavirus de forma gradual o regional (Figura 4). La introducción de las vacunas contra el rotavirus han aumentado especialmente desde 2013, pasando de 53 a 98 países. Y según los últimos reportes del año 2020, 107 países han introducido a su PAI las vacunas contra rotavirus (69).



Figura 4: Mapa de introducción de la vacuna contra el rotavirus en todo el mundo. El estado de la introducción de la vacuna contra el rotavirus se indica por color, con verde oscuro para la introducción universal (nacional) y marrón claro para la introducción aprobada por fases. Los países que no han introducido la vacuna contra el rotavirus en sus calendarios nacionales de inmunización se muestran en gris (69).

La introducción de las vacunas ha demostrado ser eficaz en la inducción de protección contra los genotipos predominantes a nivel mundial, sin embargo la inmunización como una intervención sanitaria puede tener un efecto sobre la diversidad de genotipos. Los segmentos de genes de la cápside externa (VP7 y VP4) son más diversos y se reordenan más fácilmente que los nueve segmentos internos

restantes. Se han demostrado diferencias en los epítomos antigénicos de VP7 y VP4 conocidos entre las cepas vacunales y las cepas circulantes actualmente, donde por ejemplo la VP7 G1 presenta varias sustituciones en sitios antigénicos al compararlas con la VP7 G1 presente en la vacuna monovalente (70,71).

1.7. Situación de la infección por RVA luego de la introducción de la vacuna contra rotavirus a nivel mundial

En varios países del mundo se ha reportado una reducción importante en los casos de GEA asociada al rotavirus (72,73). Los ensayos clínicos demostraron una alta eficacia (85% - 98%) de ambas vacunas en países de ingresos altos y medianos de América, Asia y Europa, muchos países de estas regiones fueron los primeros en implementar programas nacionales de vacunación contra el rotavirus a principios del 2006 (74). Mientras que los ensayos clínicos en países de bajos recursos en África y Asia, mostraron una eficacia moderada (50% - 64%) pero con un alto impacto en la salud pública, dado el índice elevado de enfermedad por rotavirus en estos países (74,75).

En 2015 en Latinoamérica, se estimó que, debido a la introducción de las vacunas, fueron prevenidas 125,000 hospitalizaciones y 800 defunciones por rotavirus en la región. En 2016, se estimó una disminución de muertes por rotavirus de niños menores de 5 años a nivel mundial, pasando de 528.000 muertes (año 2000) a 215.000 muertes (año 2013) (1,76). Mientras que en el 2018, en la Latinoamérica y el Caribe, fue observada una disminución de 64% de las hospitalizaciones por rotavirus, 32,8% de las hospitalizaciones y 53,5% de las defunciones por GEA en niños menores de 5 años (1).

A nivel mundial, antes de la introducción de la vacuna, los genotipos G1, G2, G3, G4, G9 en combinación con P [4], P [6] o P [8] constituían más del 90% de las cepas circulantes en humanos (77). Sin embargo, poco después de la introducción de la vacuna en varios países, se ha observado una variabilidad regional, donde se ha reportado la aparición repentina de cepas de rotavirus no comunes (6,22). Varios estudios epidemiológicos actuales indican fluctuaciones de G y P de los rotavirus circulantes en humanos, por ejemplo el aumento de genotipos G y P rotavirus predominantes en animales e inusuales en humanos como por ejemplo (G5-G6, G8,

G10, G12, G11 y G20) y (P[1]-P[3], P[5], P[7], P[9], P[11], P[14], P[19] y P[25]) (22,70,78). Así también, se ha observado el aumento de coinfecciones, informado en países como la India, Bangladesh, Sudáfrica y Malawi (6,79,80).

1.8. Situación de la infección por rotavirus en Paraguay

El Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (DBMB-IICS) ha estudiado la epidemiología de rotavirus en Asunción y alrededores desde 1998, siendo los datos reportados por el DBMB-IICS antes de la introducción de la vacuna los únicos disponibles en la literatura. Los genotipos predominantes a nivel mundial (G1P[8], G2P[4], G3P[8] (*Wa-like*), G4P[8] y G9P[8]) fueron detectados en diferentes porcentajes en la población de Asunción y Gran Asunción (81,82). Desde el año 2010, Rotarix® forma parte del PAI (33). Según lo informado por el Ministerio de Salud, la cobertura de vacunación nacional en los años 2010 al 2019 varió entre el 55% y el 81% (83). En el sector privado, también se encuentra habilitada para su aplicación la vacuna RotaTeq®.

Chavers y colaboradores reportaron que Paraguay se encontraba con un estrato de alta mortalidad infantil (≤ 5 años) hasta el año 2010, en comparación con otros países de Latinoamérica (Figura 5) utilizando los datos reportados por UNICEF (66).



Figura 5: Mapa de países de América Latina y el Caribe incluidos en revisión sistemática por estratos de mortalidad (66).

Los últimos reportes emitidos por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en Paraguay, en el 2017 el 12,5 % de los casos de gastroenteritis severa fue causada por rotavirus, con un 5,5% de mortalidad (84). Estos son los datos sobre la situación de la infección por RV en nuestro país, siendo importante resaltar que la información disponible es escasa.

Pasados 11 años de vacunación a nivel nacional en Paraguay la información sobre su potencial influencia sobre el comportamiento de las infecciones, así como de los genotipos de rotavirus que circulan en nuestro país, es limitada.

Si bien es difícil estimar el impacto futuro de la vacuna en la genética del virus y cómo estos potenciales cambios puedan impactar en la efectividad de la inmunización, sabemos que las vacunas anti-rotavirus se enfrentan a virus que son genéticamente diversos y evolutivamente dinámicos. El monitoreo continuo de la dinámica de genotipos de rotavirus circulantes es necesario para entender su patrón evolutivo. Esto requerirá de un análisis cuidadoso para interpretar si la

predominancia de nuevos genotipos se debe a patrones naturales de cambios de genotipos en el tiempo o a la presión selectiva inducida por la vacunación, con miras a evaluar y refinar en el tiempo las estrategias de inmunización contra este patógeno. Debido a que la introducción de la vacunación con RVA requiere una información exhaustiva de la carga de la enfermedad y la diversidad viral, este trabajo tuvo como objetivos aportar datos sobre la diversidad de genotipos de RVA circulantes en los años post-vacunales 2015, 2016, 2018 y 2019, así como datos de las infecciones en la población infantil que asistió de 2011 a 2019 a uno de los mayores hospitales pediátricos de la ciudad de Asunción, Paraguay.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

1. Analizar los genotipos G (VP7) y P (VP4) de las cepas de rotavirus circulantes en Asunción y sus alrededores de los años 2015, 2016, 2018 y 2019.
2. Analizar la estacionalidad y distribución etaria de los casos de rotavirus post introducción de la vacuna (2011-2019) en Asunción y sus alrededores.

2.2 Objetivos específicos

Para el objetivo general 1

1. Determinar la presencia de rotavirus en muestras fecales de diarrea de niños menores de 5 años provenientes de Asunción y Gran Asunción durante los años 2015-2016 y 2018-2019.
2. Determinar los genotipos de los genes VP7 (genotipos G) y VP4 (genotipos P) de las muestras positivas para rotavirus detectadas.
3. Analizar filogenéticamente la secuencia de los genes VP7 y VP4 de las cepas de rotavirus predominantes en Asunción y Gran Asunción durante los años 2015-2016 y 2018-2019.
4. Analizar los cambios aminoacídicos en sitios antigénicos de las proteínas VP7 y VP4 de rotavirus.

Para el objetivo general 2

1. Determinar la frecuencia de casos de RVA en niños menores de 5 años, por mes, de 2011 a 2019.
2. Determinar la frecuencia de casos de RVA en años por rango etario en niños menores de 5 años de 2011 a 2019.

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño, sujeto de estudio y reclutamiento

Estudio de tipo observacional, descriptivo, la colecta de muestras fue probabilística por conveniencia. Las muestras corresponden a remanentes de muestras fecales de niños con GEA con edad comprendida entre 0 a 5 años, que acudieron a un hospital privado de la ciudad de Asunción de junio a septiembre de los años 2015, 2016, 2018 y 2019. Las muestras fueron seleccionadas al azar en el laboratorio de origen y enviadas al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (DBMB-IICS-UNA) para los análisis moleculares donde fueron codificadas y almacenadas en a -80C. El hospital colaborador proporcionó los datos epidemiológicos de las muestras colectadas (edad, sexo y fecha de toma para todas las muestras y resultado de inmunocromatografía para RVA en algunos casos). Así también proporcionó la planilla anual de muestras analizadas por inmunocromatografía para la presencia de rotavirus en su laboratorio, que cuenta con datos de edad y fecha de toma de muestra.

3.2. Muestras a ser analizadas para detección de RVA por RT-PCR en tiempo real y genotipificación de VP7 y VP4 por RT-PCR convencional

Se colectaron 79 muestras de 2015, 128 de 2016, 137 de 2018 y 215 de 2019 en los meses de alta circulación de rotavirus: junio, julio, agosto y septiembre. El flujo de trabajo para la detección de RVA y su genotipificación es como sigue:

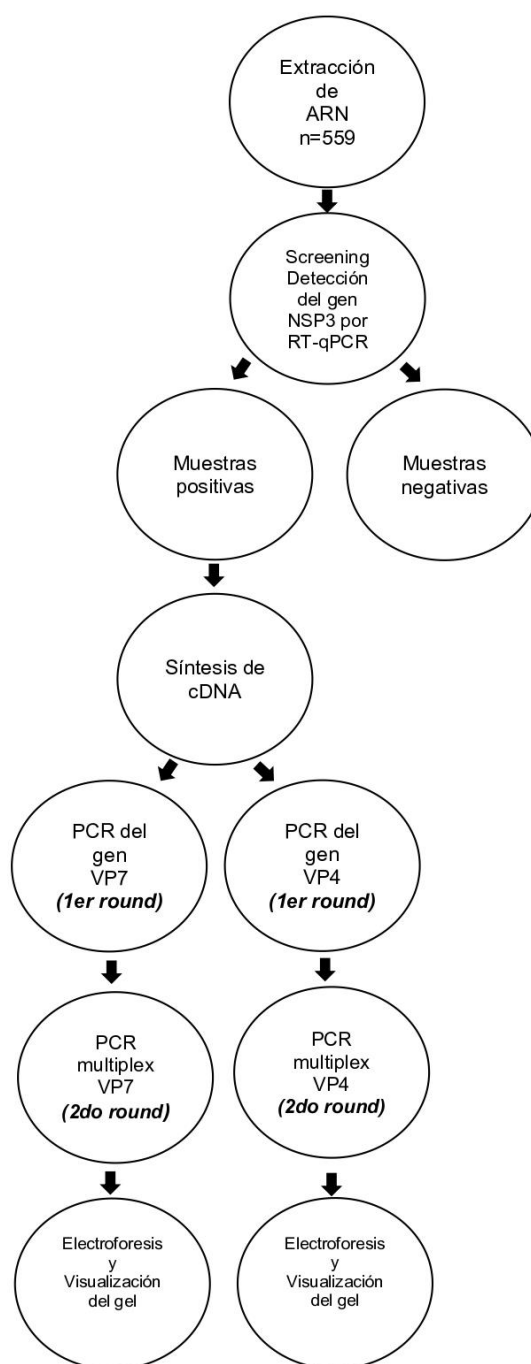


Figura 6: Flujograma de Trabajo para análisis moleculares (28,42,85,86).

3.3. Extracción de ARN partir de muestras fecales

Se realizó la extracción de ARNdc de 559 muestras fecales correspondiente a los años 2015, 2016, 2018 y 2019, almacenadas a -80°C en el DBMB-IICS-UNA. Se utilizó el kit de extracción *Tissue Total RNA Purification (Favorgen, USA)*, partiendo

de una solución fecal al 10% a partir de 0,100g (peso húmedo) de heces en una solución de PBS al 0,01%.

3.4. Detección de ARN de rotavirus

Primeramente, se realizaron pruebas con ARN de muestras positivas para rotavirus previamente tipificadas y secuenciadas, algunas de ellas depositadas en el GenBank (KJ626609.1, KJ626756.1) (87,88) para la detección mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, RT-qPCR, del gen NSP3 según lo descrito por Zeng y colaboradores en 2008 (89). Al tratarse de ARN de doble cadena, se requiere su desnaturalización para una mayor eficiencia de amplificación. Se probaron dos reacciones, una desnaturalizando el ARN de cadena doble antes de la RT-PCR y otra omitiendo el paso de desnaturalización según lo descrito por Mijatovic y colaboradores en 2013 (90). Se decidió que la detección de las muestras del estudio se realizara con el protocolo sin desnaturalización previa.

3.5. Caracterización molecular de los genes VP7 y VP4 de rotavirus mediante *heminested-multiplex-RT-PCR*

Se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) de las muestras positivas para el gen NSP3. Se utilizaron cebadores randómicos hexaméricos (Invitrogen, USA) y transcriptasa reversa MMLV (Promega, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Para obtener el ADNc para la PCR convencional, sí se realizó la desnaturalización del ARNdc, debido a que la sensibilidad de esta técnica es menor a la RT-PCR en tiempo real.

3.5.1. Primera Amplificación

Se amplificaron la porción VP8* (variable) del gen VP4 y VP7 utilizando cebadores específicos según lo descrito por Gentsh y colaboradores, 1992 y Gouvea y colaboradores, 1990 respectivamente (28,42). Para el gen VP4 (876 pb), se realizó una mezcla de reacción compuesto por: agua libre de RNAsas, Buffer [1X], MgCl₂ [1mM], mezcla de dNTPs [0,2 mM], par de cebadores [0,2 uM], Taq Polimerasa (InvitrogenTM) [5U/uL] y 2 uL de ADNc para un volumen final de 25 uL. El protocolo de ciclado se describe a continuación: desnaturalización inicial a 94°C por

5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 47°C por 30 segundos, 72°C por 1 minutos y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Para el gen VP7 (1062 pb); se realizó una mezcla de reacción compuesta por: agua libre de RNAsas, de Buffer [1X], MgCl₂ [1 mM], 1 uL de DMSO, mezcla de dNTPs [0,2 mM], par de cebadores [0,2 uM], Taq Polimerasa (Invitrogen™) [5U/uL] y 2 uL de ADNc para un volumen final de 25 uL. El protocolo de ciclado se describe a continuación: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 47°C por 30 segundos, 72°C por 1 minutos y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

3.5.2 Segunda Amplificación: identificación de genotipos G (VP7) y P (VP4)

Seguidamente se realizó *heminested multiplex*-PCR del producto inicial de cada uno de los genes, según los descrito por Gentsch y colaboradores, 1992, Das y colaboradores, 1994 y Castello y colaboradores, 2006 (28,85,86). Esto permitió la identificación de los genotipos que circulan más ampliamente en la población humana: P8, P6, P4 y P9 de VP4 así como G1, G2, G3, G4, G9 y G12 de VP7.

Para la genotipificación de VP4, se tomó 2 uL de producto de la primera amplificación de VP4 y se agregó a la mezcla de reacción compuesta por: Buffer [1X], 1 uL MgCl₂ [1 mM], mezcla de dNTPs [0,2 mM], cada cebador [0,2 uM], Taq Polimerasa (Invitrogen™) [5U/uL] y agua libre de RNAsas hasta llegar a 25 uL de reacción. El protocolo de ciclado es desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 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. Los fragmentos esperados se observan en la Tabla 2. Para la genotipificación de VP7, se tomó 2 uL de producto de la primera amplificación de VP7 y se agregó a la mezcla de reacción compuesta por: Buffer [1X], MgCl₂ [1 mM], mezcla de dNTPs [0,2 mM], cada cebador [0,2 uM], Taq Polimerasa (Invitrogen™) [5U/uL] y agua libre de RNAsas hasta llegar a 25 uL de volumen. El protocolo de ciclado es desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 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. Los fragmentos esperados se observan en la Tabla 2 (28,42,85,86).

3.5.2. Detección de los genotipos G6 y G8 de rotavirus

Para detectar los genotipos G6 y G8, se tomó 2 uL de producto de la primera amplificación de VP7 y se agregó a la mezcla de reacción compuesta por: Buffer [1X], MgCl₂ [1 mM], mezcla de dNTPs [0,2 mM], cada cebador [0,2 uM], Taq Polimerasa (Invitrogen™) [5U/uL] y agua libre de RNAsas hasta llegar a 25 uL de volumen. La lista de cebadores utilizados se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores empleados para el genotipado de rotavirus grupo A.

GEN	CEBADOR	SECUENCIA	AMPLIFICADO (pb)	REFERENCIA
VP7 1er Round	VP7-1	5'ATGTATGGTATTGAATATACCAC3'	1062	Gouvea et al, 1990
	VP7-2	5' AACTTGCCACCATTTTTTCC 3'		
VP7 2do Round	9con1	5' TAGCTCCTTTTAATGTATGG 3'		Das et al, 1994 Castello et al, 2006
	G1-R	5' TCTTGTCAAAGCAAATAATC 3'	158	
	G2-R	5' GTTAGAAATGATTCTCCACT 3'	244	
	G3-R	5' GTCCAGTTGCAGTGTTAGC 3'	466	
	G4-R	5' GGGCTGATGGAAAATTAGC 3'	403	
	G6-R	5' CTAGTTCCTGTGTAGAATC 3'	449	
	G8-R	5' CGGTTCCGGATTAGACAC 3'	754	
	G9-R	5' TATAAAGTCCATTGCAC 3'	110	
	G12-R	5' GTCCAGTCGGGATCAGTT 3'	308	
VP4 1er Round	VP4-1	5'TGGCTTCGCCATTTLATAGAC3'	876	Gentsch et al, 1992
	VP4-2	5'ATTTCCGACCATTTATAACC 3'		
VP4 2do Round	VP4-1	5'TGGCTTCGCCATTTLATAGACA3'		Gentsch et al, 1992
	P4K-R	5'CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC3'	483	
	P6-R	5'TGTTGATTAGTTGGATTCAA 3'	267	
	P8K-R	5'TCTACTTGGATAACGTGC 3'	345	
	P9-R	5'TGAGACATGCAATTGGAC 3'	392	

pb: pares de base

3.5.3. Visualización de productos de amplificación

Los productos de la segunda amplificación de los genes VP7 y VP4 se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, junto con un marcador de peso molecular como referencia. La electroforesis se realizó por 1 hora a 100 V

constantes. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en el equipo de transiluminador con cámara (*UVDI-Major Science*).

Objetivo específico 3: Analizar filogenéticamente la secuencia de los genes VP7 y VP4 de las cepas de rotavirus predominantes en Asunción y Gran Asunción durante los años 2015-2016 y 2018-2019.

3.6. Obtención de productos para secuenciación

Se seleccionaron al azar del 10% al 20% de las muestras de genotipos predominantes de cada año y todas las muestras disponibles de los genotipos poco comunes para su secuenciación. Se amplificó un fragmento de 950 pb que cubre todo el marco de lectura del gen VP7, mediante PCR de la primera amplificación descrita en el punto 3.6.1, utilizando los primers 9con1 y 9con2 descritos por Das y colaboradores, 1994 (85).

El producto a ser secuenciado para VP4 fue el producto de primera amplificación (876 pb) descrito en el punto 3.6.1, que corresponde a la porción VP8*, región variable de VP4.

Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1% junto con un marcador de peso molecular como referencia. Se cuantificaron utilizando el fluorómetro QubitTM y enviaron a Macrogen, Corea, para su secuenciación por el método de Sanger. La empresa realizó la secuenciación y envió los cromatogramas obtenidos.

3.7. Análisis de secuencias obtenidas

Los cromatogramas recibidos se verificaron y corrigieron manualmente utilizando el software BioEdit 7.2 (91). Se creó un archivo fasta de las secuencias corregidas. Los genotipos se determinaron utilizando la herramienta de genotipificación *Rotavirus A Genotype Determination* de VIPR (*Virus Pathogen Resource*) (92).

3.8. Análisis filogenético de la secuencia nucleotídica de los genes VP7 y VP4 de rotavirus

Para determinar las agrupaciones filogenéticas, se prepararon matrices de secuencias a partir de secuencias de rotavirus depositadas en Genbank (93) para cada genotipo

de VP7 y VP4. Las secuencias se renombraron de acuerdo con las reglas de nomenclatura para rotavirus (Grupo-Especie/Hospedero de origen/País de identificación /Nombre común /Año de identificación/Genotipos Gx y Px) utilizando el programa BioEdit y NotePad++ (37,91,94).

Se realizó el alineamiento global de las secuencias obtenidas en el estudio junto a las secuencias obtenidas del Genbank utilizando la herramienta en línea MAFFTv7 (95). Para inferir la filogenia de los rotavirus analizados con el método de máxima probabilidad, se utilizó la herramienta en línea IQ-TREE (96), para encontrar el mejor modelo de sustitución y construir los árboles. Se consideró mejor modelo aquél cuyo valor AIC (*Akaike Information Criterion*) fue menor. Una vez elegido el modelo, se construyó un árbol filogenético llevando a cabo 1000 reproducciones aleatorias (*Bootstrap* = 1000) del árbol.

Los árboles contruidos fueron visualizados y editados con FigTreeV1.4.4 (97).

Objetivo específico 4: Analizar los cambios aminoacídicos en sitios antigénicos de las proteínas VP7y VP4 de rotavirus

3.9. Inferencia de la secuencia de aminoácidos de las proteínas VP7 y VP4 (porción VP8*)

A partir de los alineamientos nucleotídicos, se infirió la secuencia de aminoácidos utilizando la herramienta “*Translate*” el programa Bio-Edit. Todas las secuencias de la matriz se colocaron en el marco de lectura correcto (ORF) de VP7 y VP8*(91).

3.10. Mapeo de sustituciones de aminoácidos de las proteínas VP7 y VP4 (porción VP8*)

Los alineamientos de aminoácidos de VP7 y VP4 se construyeron con MAFFT v7.2. Los análisis estructurales de VP7 y VP4 se realizaron mapeando las sustituciones sobre el modelo 4V7Q del *Protein Data Bank* (PDB) (98). Las estructuras y los sitios con sustituciones señalados, se visualizaron utilizando el programa Chimera USCF (99).

Objetivo general 2

Objetivo específico 1: Determinar la frecuencia de casos de RVA en niños menores de 5 años, por mes, de 2011 a 2019.

3.11. Análisis de base de datos por fecha de toma

A partir de los datos anuales totales de pedidos de análisis de inmucromatografía para rotavirus, en el rango de 0-60 meses, proveídos por el hospital colaborador, se creó una base de datos (anonimizada) en el programa Excel. El número de casos de GEA con análisis para rotavirus por año se describe en el Anexo 1. La base de datos posee datos epidemiológicos como fecha de toma de muestra, edad, sexo, diagnóstico de rotavirus por inmunocromatografía, estatus internado/ambulatorio de los años 2011-2019. En este hospital, se pide la prueba para RVA de rutina para los casos de diarrea. Con estos datos se cuantificaron la frecuencia de casos positivos para RVA por mes y por año, para crear un gráfico de estacionalidad de RVA en el periodo analizado.

Objetivo específico 2: Determinar la frecuencia de casos de RVA por rango etario en niños menores de 5 años de 2015 a 2019.

3.12. Análisis de base de datos por edad

A partir de la base de datos descrita en el objetivo específico 3.12, se cuantificaron los casos positivos para RVA en los rangos 0-23 meses, 24-47 meses y 48-60 meses, para determinar la distribución de los casos positivos según el grupo etario.

3.13. Asuntos éticos

Las muestras remitidas al DBMB-IICS-UNA fueron condicadas, de manera a que durante todo el estudio no se utilice información sensible y se respete el anonimato. El acceso a los datos del Biobanco es limitada para los investigadores implicados en el estudio. Las muestras que se utilizaron corresponden al proyecto P23/03 con adenda actualizada en el 2021.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados del Objetivo general 1: Analizar los genotipos G (VP7) y P (VP4) de las cepas de rotavirus circulantes en Asunción y alrededores de los años 2015, 2016, 2018 y 2019.

4.1.1. Detección de rotavirus en muestras fecales de diarrea de niños menores de 5 años provenientes de Asunción y Gran Asunción durante los años 2015-2016 y 2018-2019 mediante RT-PCR en tiempo real.

Para probar la efectividad del gen NSP3 de RVA como blanco de detección para diferentes genotipos, se realizó la prueba previamente con muestras positivas de todos los genotipos detectados hasta la fecha en estudios previos el laboratorio del DBMB-IICS-UNA. Se realizaron dos reacciones diferentes: con desnaturalización previa del ARNdc y sin desnaturalización previa del ARNdc, como sugiere Mijatovic y colaboradores (90), con el fin de comprobar si era posible omitir el paso de desnaturalización del ARN para estas reacciones. Los valores de Ct obtenidos se observan en la Tabla 3 y la intensidad de la fluorescencia en la Figura 7.

Tabla 3: Detección del gen NSP3 de RVA por RT-PCR en tiempo real

Muestra/(genotipo)	Ct de ARN sin desnaturalizar	Ct de ARN desnaturalizado
1657SR (G1[P8])	21,58	15,25
1388SR (KJ626609.1)* (G2[P4])	9,94	10,1
1395SR (KJ626756.1)* (G2[P4])	25,11	17,87
LV15(G3[P8])	19,54	19,57
385(G4[P8])	14,98	14,88
HBO516(G6[P8])	18,56	13,06
346(G4[P8])	11,72	11,2
agua_ext	N/A	N/A

Ct: *Cycle threshold*; * número de acceso genbank

Como se observó en la Tabla 4 y la Figura 7, la máxima diferencia en valores de Ct fue de 7. Todas las muestras analizadas corresponden a casos de consulta por cuadros de diarrea aguda; el *shedding* de partículas de rotavirus durante la diarrea es muy alto, por lo que la posibilidad de perder un positivo es baja. Debido a que el proceso de desnaturalización implica un paso más de manipulación del ARN, aumentando así el riesgo de contaminación y en vista al resultado obtenido, se decidió omitir el paso de desnaturalización a las muestras en estudio.

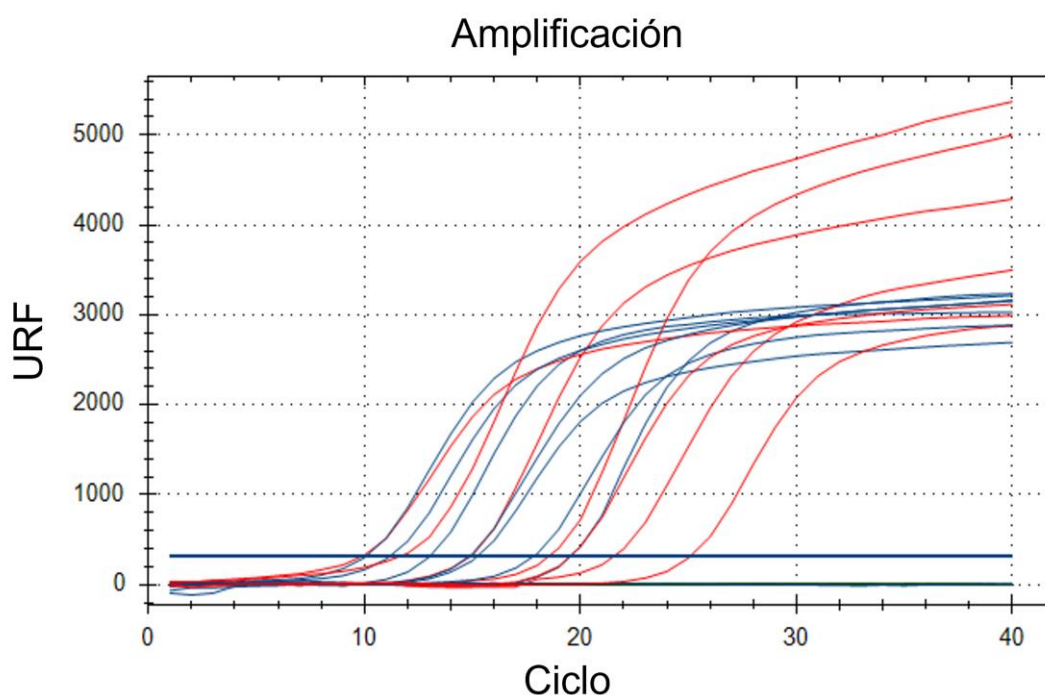


Figura 7: Curva de amplificación de muestras positivas para rotavirus. Curvas con valores de Ct correspondiente a la RT-qPCR para el gen NSP3 en muestras de ARN sin desnaturalizar (rojo), según el protocolo de Zeng y colaboradores; muestras de ARN desnaturalizado (azul), según el protocolo de Mijatovic y colaboradores. UFR: unidades de fluorescencia relativa.

4.1.1.1 Detección de ARN de rotavirus muestras fecales de los años 2015, 2016, 2018 y 2019

De las 559 muestras extraídas, un total de 202 fueron positivas por RT-qPCR para gen NSP3 de rotavirus: 47/79 (59,5%) del 2015, 69/128 (54%) del 2016, 52/137 (38%) del 2018 y 34/215 (15,8%) del 2019. El 100% de las muestras positivas tuvo un Ct igual o menor a 31. (Figura 8).

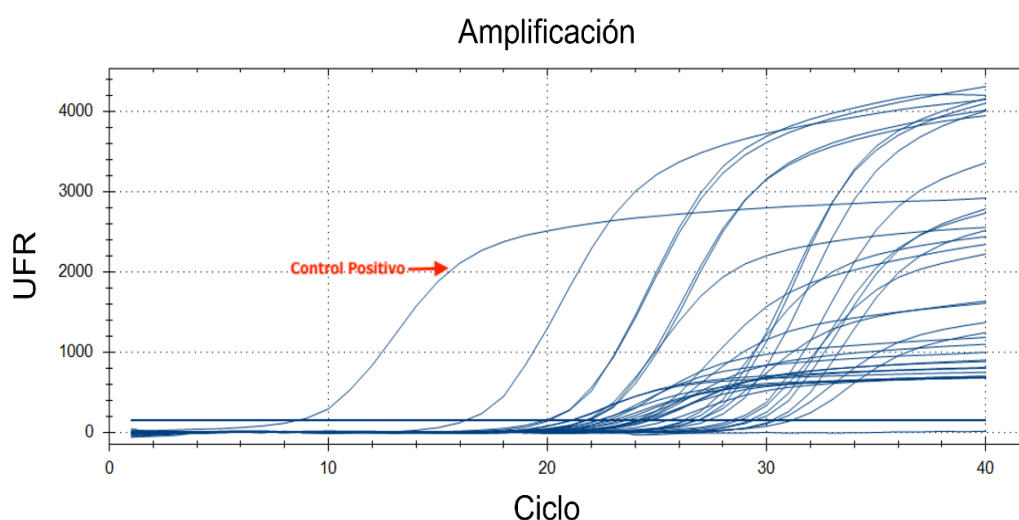


Figura 8: Curva de amplificación obtenida mediante RT-qPCR para la detección del gen NSP3 de rotavirus a partir de muestras fecales. Se evaluaron 559 muestras fecales. La curva señalada corresponde al control positivo con Ct: 10. UFR: unidades de fluorescencia relativa.

4.1.2. Determinar los genotipos de los genes VP7 (genotipos G) y VP4 (genotipos P) de las muestras positivas para rotavirus detectadas.

4.1.2.1 Genotipos G (VP7) de rotavirus detectados en los años 2015, 2016, 2018 y 2019 en Asunción y Gran Asunción

De las 202 muestras analizadas para identificar genotipos G (VP7), 156 muestras (77,23%) fueron genotipificadas con éxito. En el año 2015 de 47 muestras, 34 (72%) correspondieron al genotipo G3 y 11 (23%) correspondieron al genotipo G12, mientras que G1 y G9 circularon en menor proporción (2%). En el año 2016, de las 69 muestras analizadas, el genotipo predominante fue G9, presente en 50 muestras (72%), en menor proporción estuvo presente G2 (4%) mientras que 15 (22%) no pudieron ser tipificadas y fueron denominadas como Gx.

En el 2018 el genotipo mayoritario fue G3, presente en 24 (46%) de las muestras. De las muestras con G3, 5 (9,6%) fueron identificados con co-infecciones de otros genotipos. Los genotipos G1, G2 y G9 se detectaron en el 8%, 13,5% y 9,5% respectivamente. El 13,5% de las muestras no pudo ser tipificada. En el 2019 de las muestras analizadas sorprendentemente se observó 23 (65,7%) muestras no tipificables en el genotipo G, mientras que los genotipos G3 y G12 se detectaron en el 8,5%, y 5,7% respectivamente. Además, el 20% correspondió a de co-infecciones entre los genotipos identificados (Figura 9).

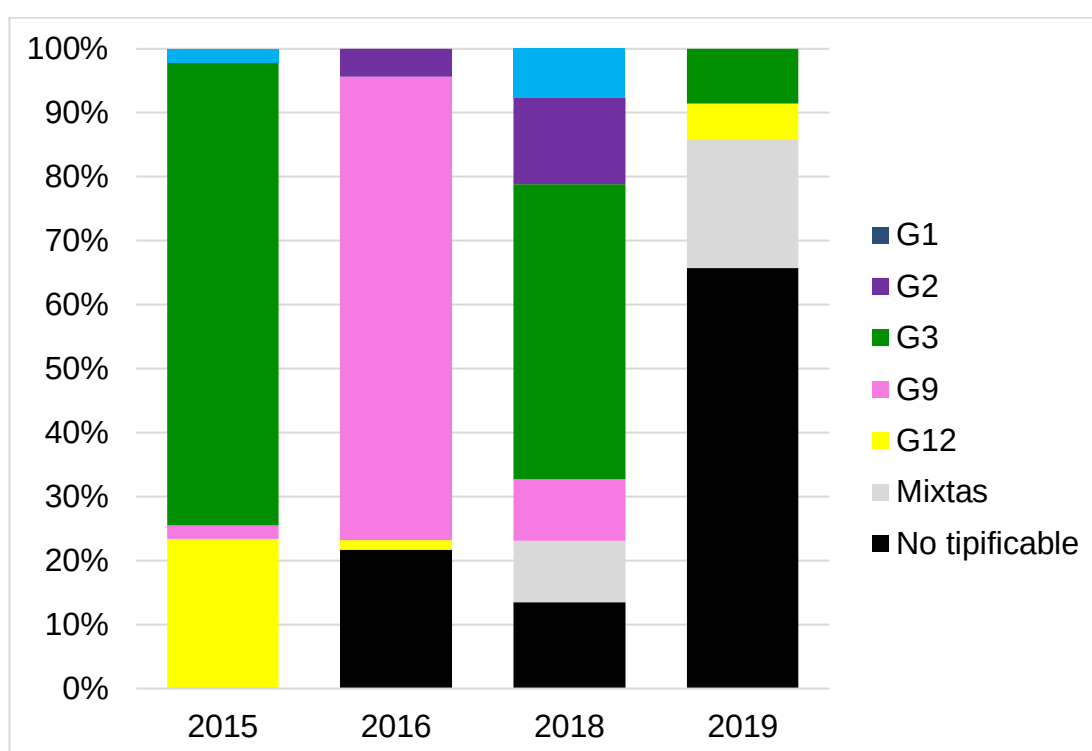


Figura 9: Proporción de genotipos G de rotavirus detectados por RT-PCR en muestras positivas para rotavirus, de los años 2015, 2016, 2018 y 2019.

Debido al alto porcentaje de genotipos G no tipificados, se realizó una revisión de genotipos reportados en esos años, principalmente en países vecinos. En base a lo publicado por Gutierrez, 2020 en Brasil y Degiuseppe, 2021 en Argentina (100,101), se realizó una *heminested-multiplex-PCR* con cebadores específicos para los genotipos G6 y G8, atípicos en humanos.

Las muestras no tipificables de 2016 tampoco amplificaron con dichos cebadores. Sin embargo, el 86% de las no tipificadas del 2018, presentó el amplicón

correspondiente al genotipo G6, el cual representó el 11,5% de los genotipos circulantes ese año. Así mismo, en el 2019, el 91% de las muestras Gx presentó bandas correspondientes a G6, el cual correspondió al 60% de los genotipos G circulantes en 2019, y en dos muestras no fue tipificable en el genotipo G (Figura 10).

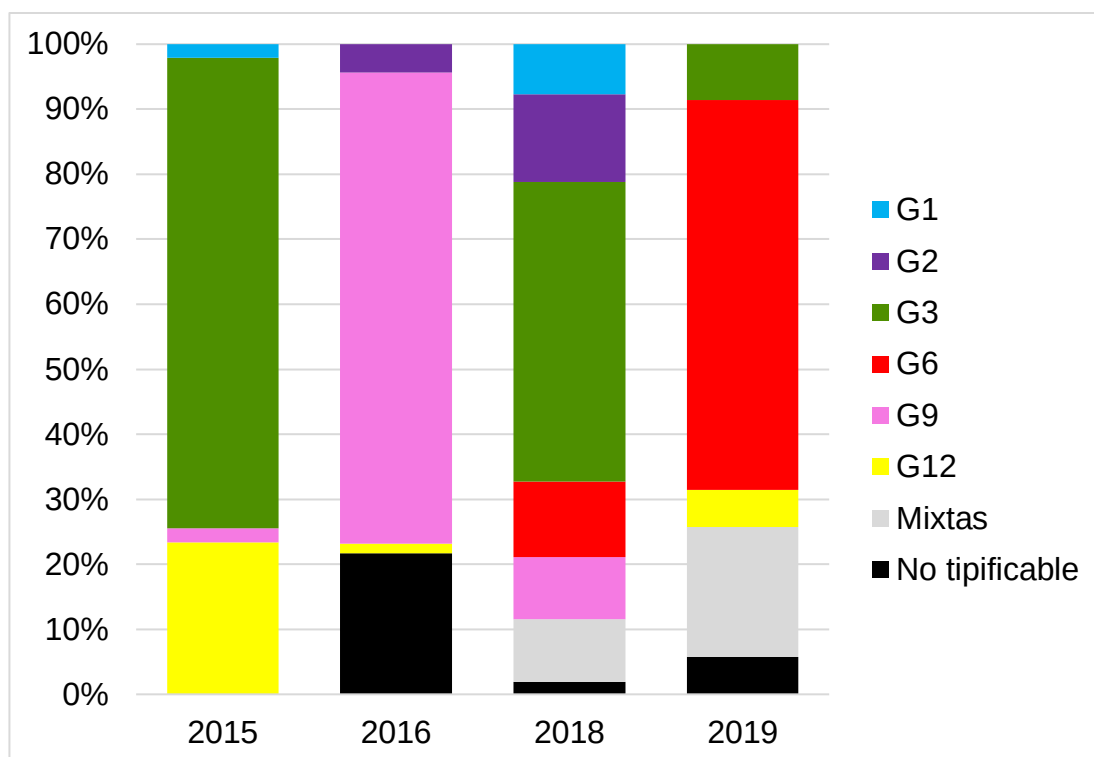


Figura 10: Proporción de genotipos G de rotavirus detectados por RT-PCR en muestras positivas para rotavirus, de los años 2015, 2016, 2018 y 2019. (Incluyendo los cebadores G6 y G8).

4.1.2.2 Genotipos P (VP4) de rotavirus detectados en los años 2015, 2016, 2018 y 2019 en Asunción y Gran Asunción

A diferencia de lo observado para los genotipos G, todas los genotipos P (correspondientes al gen VP4) pudieron ser determinados mediante el protocolo de PCR semianidada inicial, debido a que todos los genotipos detectados (P[8], P[4] y P[9]), correspondían a genotipos comunes en humanos.

En el 2015 el genotipo P[8] fue detectado en el 100% de las muestras. En el 2016, P[8] fue predominante (97,1%), detectándose en menor proporción P[4] (2,9%). En el 2018, P[8] estuvo presente en el 73% de las muestras, mientras que P[9] se vió en

el 2%. La proporción de co-infecciones entre P[8] y P[4] o P[9], fue del (25%). Durante 2019 la proporción de genotipos P circulantes fue: P[8] (46,2%), P[9] (13,4%) y co-infecciones de ambos genotipos (9,6%), una muestra presentó co-infección del genotipo P[6] con el genotipo P[9] (Figura 11).

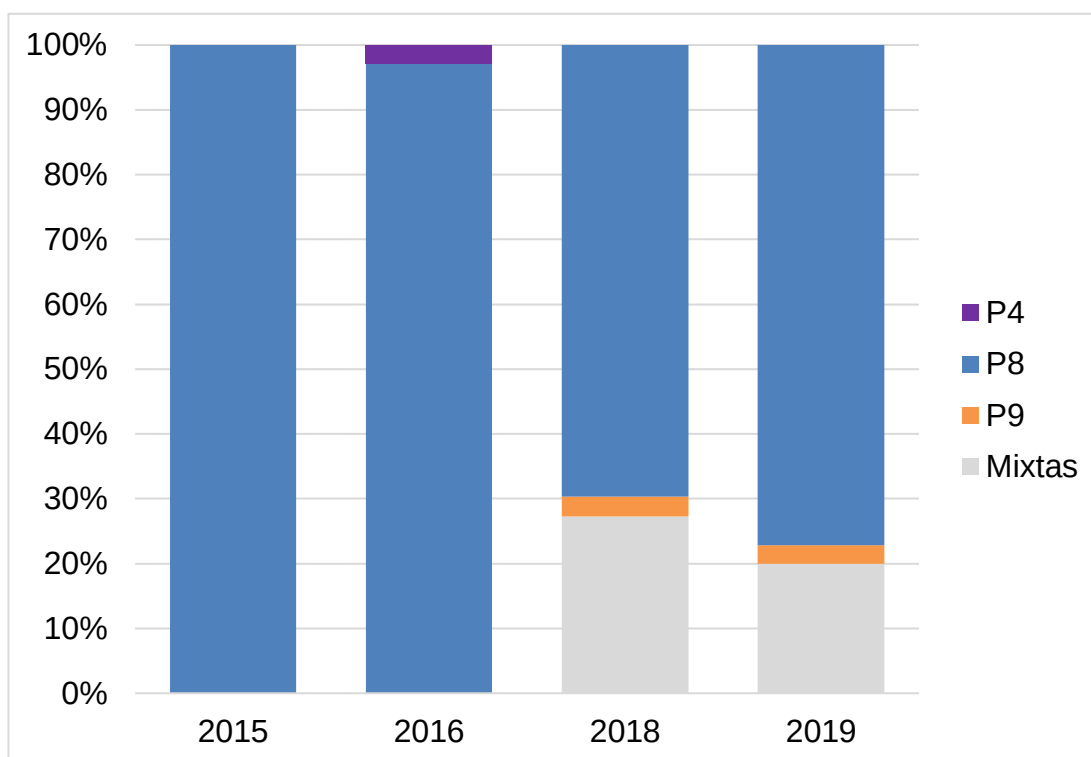


Figura 11: Proporción de genotipos P de rotavirus detectados por RT-PCR en muestras positivas para rotavirus, de los años 2015, 2016, 2018 y 2019.

4.1.2.3. Proporción de genotipos circulantes según la clasificación binaria de RVA

Los genotipos predominantes según la clasificación binaria (combinación de genotipos G y P), en el periodo post-vacunal estudiado fueron G3P[8] (2015 y 2018), G9P[8] (2016) y sorprendentemente G6P[8] en 2019 (Figura 12). Otros genotipos circulantes en una proporción importante fue G12P[8] en 2015 y en muy baja proporción se observó a G1P[8], G2P[4] y G12P[9] (Figura 12). El número de muestras por genotipo y los genotipos presentes en las co-infecciones se detallan en el Anexo 2.

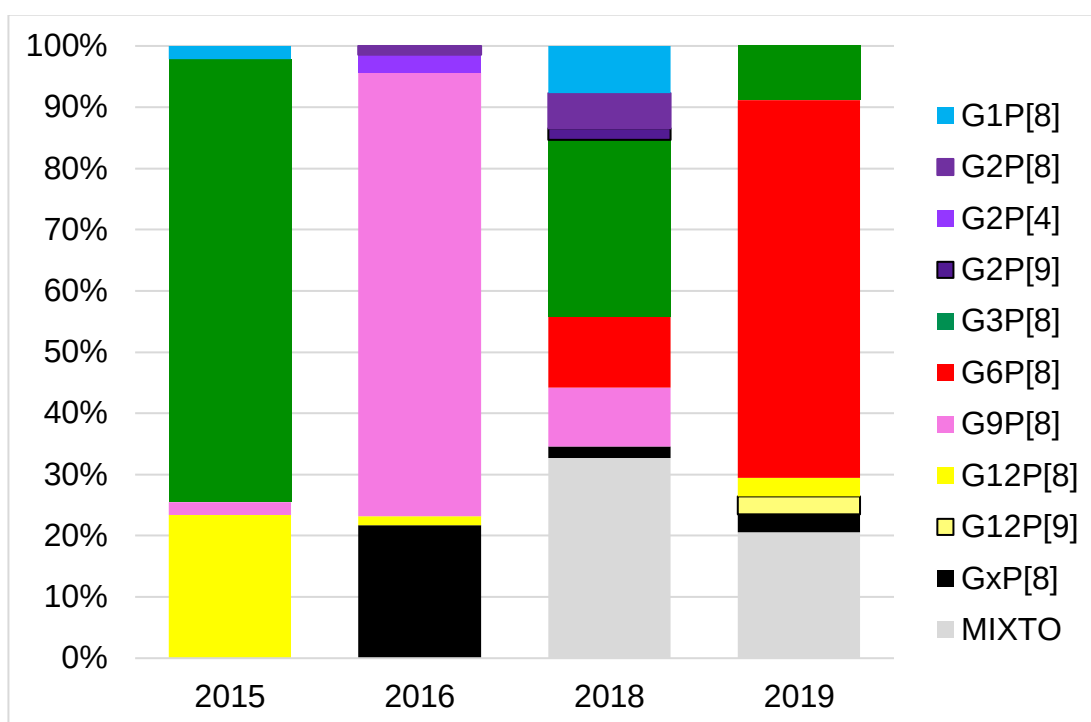


Figura 12: Proporción de genotipos (clasificación binaria) circulantes en 2015, 2016, 2018 y 2019.

4.1.3. Analizar filogenéticamente la secuencia de los genes VP7 y VP4 de las cepas de rotavirus predominantes en Asunción y Gran Asunción durante los años 2015-2016 y 2018-2019.

4.1.3.1 Análisis filogenético del gen VP7 de rotavirus, Genotipo G3

El análisis filogenético reveló que el gen VP7 de la G3 muestra un alto grado de identidad (~99%) con cepas de origen equino. Nuestras muestras del 2015, 2018 y 2019 forman un *clúster* con la G3 de origen equino, que fue detectada por primera vez en humanos en el año 2013, en países como Australia, Tailandia e Indonesia. Además se observa secuencias correspondientes al gen VP7 de las cepas G3P[9] y G3P[8] detectadas en Paraguay en el año 2009 forman sub-grupos separados entre sí y con respecto a las G3P[8] de origen equino (Figura 13).

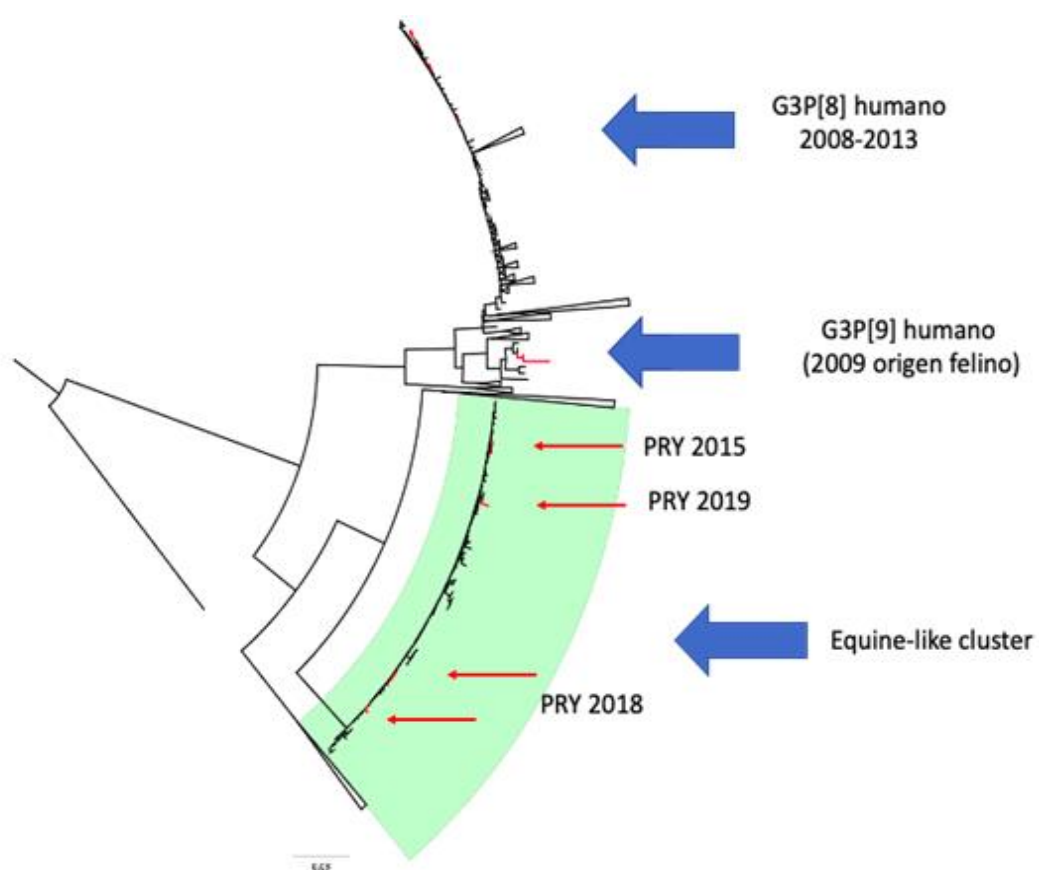


Figura 13. Árbol filogenético del gen VP7 de rotavirus del genotipo G3. Las muestras paraguayas se indican con las flechas rojas. Las flechas azules indican los clusters de G3 detectados en Paraguay en este y otros estudios. En sombreado verde se resalta el cluster donde agruparon las muestras paraguayas de 2015, 2018 y 2019. Se utilizó el algoritmo *Maximum likelihood* y el modelo de sustitución GTR+F+I con distribución gamma. Como soporte estadístico, se implementó el método *bootstrap* (1000 réplicas).

4.1.3.2 Análisis filogenético del gen VP7 de rotavirus, Genotipo G9

El árbol filogenético fue construido a partir 367 de secuencias de nucleótidos de cepas de G9 que fueron detectadas desde los años 1986 a la actualidad (Anexo 3). Las secuencias coloreadas corresponden cepas que circularon en Paraguay desde el año 2000, las cuales corresponden al linaje III (Figura 14).

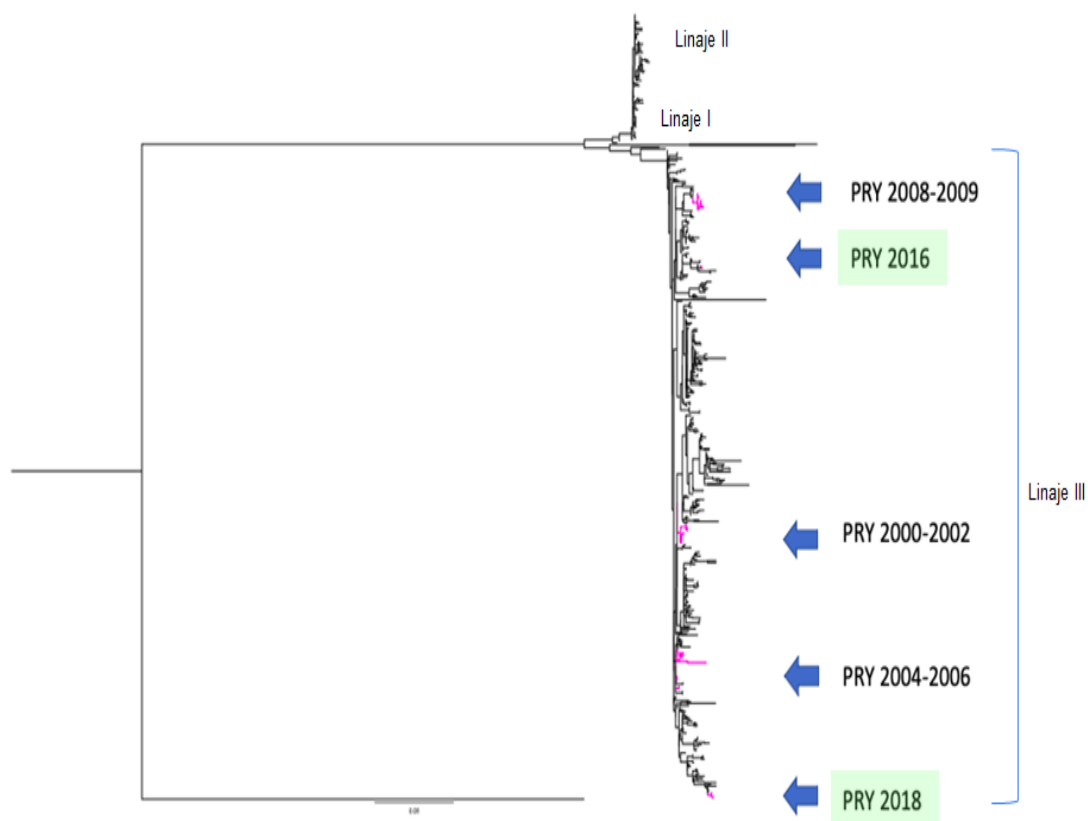


Figura 14: Árbol filogenético del gen VP7 de rotavirus del genotipo G9. Las ramas color rosa indican las cepas paraguayas de todos los años disponibles en Paraguay en este y otros estudios. Los años correspondientes a este trabajo se señalan en recuadro verde. Se utilizó el algoritmo *Maximum likelihood* y el modelo de sustitución TVM+F+I con distribución gamma. Como soporte estadístico, se implementó el método *bootstrap* (1000 réplicas).

4.1.3.3 Análisis filogenético del gen VP7 de rotavirus, Genotipo G6

Para determinar la relación de los segmentos G6 de los rotavirus que circularon en el 2018 y 2019, con los que circularon en otras partes del mundo, se generó un árbol *Maximum likelihood* de 217 secuencias de nucleótidos G6 VP7 depositadas en el GenBank (Anexo 3). Los *clusters* correspondientes a secuencias de origen bovino se encuentran colapsados. Las cepas de G6 detectadas en el 2018 y 2019, junto con cepas reportadas por Brasil en el 2019, forman un *cluster* separado de otras G6 encontradas en humanos, y de las cepas bovinas (Figura 15).

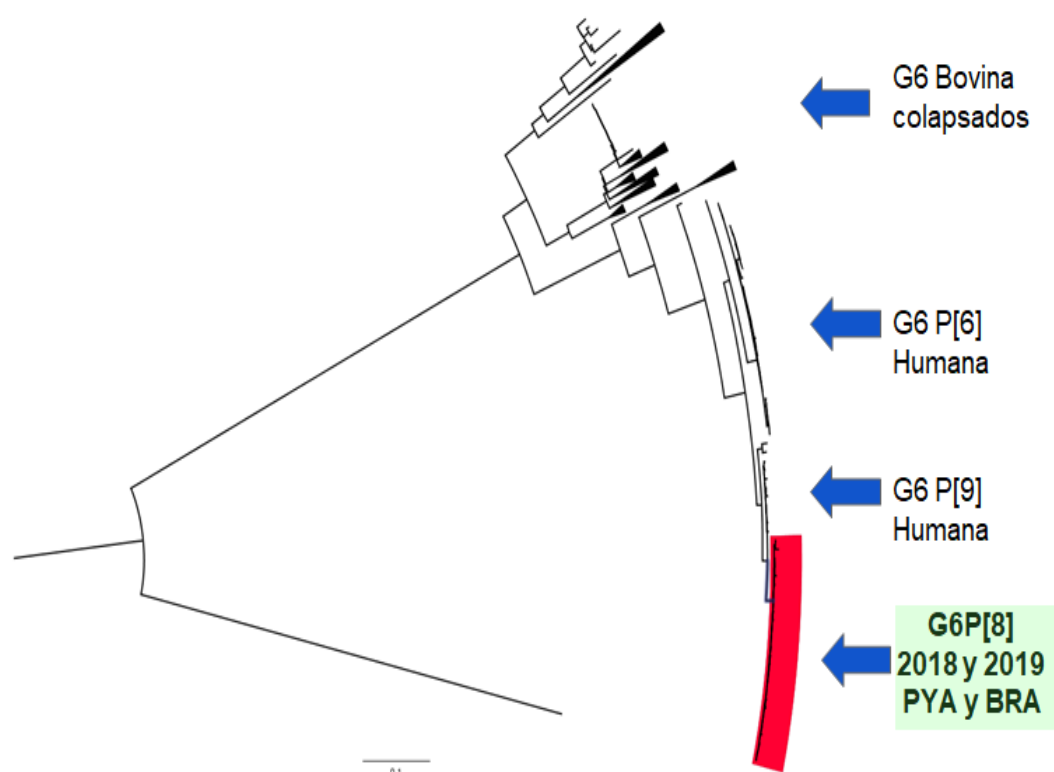


Figura 15: Árbol filogenético del gen VP7 de rotavirus del genotipo G6. El *cluster* señalado en rojo incluye exclusivamente a las muestras paraguayas de este estudio y a muestras brasileiras del 2019. Las flechas azules indican los todos *clusters* de las cepas G6 detectadas en humanos, bovinos y otros animales, disponibles en bases de datos. Se utilizó el algoritmo *Maximum likelihood* y el modelo de sustitución TIM2+F+I con distribución gamma. Como soporte estadístico, se implementó el método *bootstrap* (1000 réplicas).

4.1.3.4 Análisis filogenético del gen VP7 de rotavirus, Genotipo G12

Para identificar la asociación de las cepas G12 circulantes en este periodo con otras G12 que circularon previamente en Paraguay y en otras regiones (Anexo 3), se construyó un árbol filogenético utilizando secuencias depositadas en bases de datos (Figura 16).

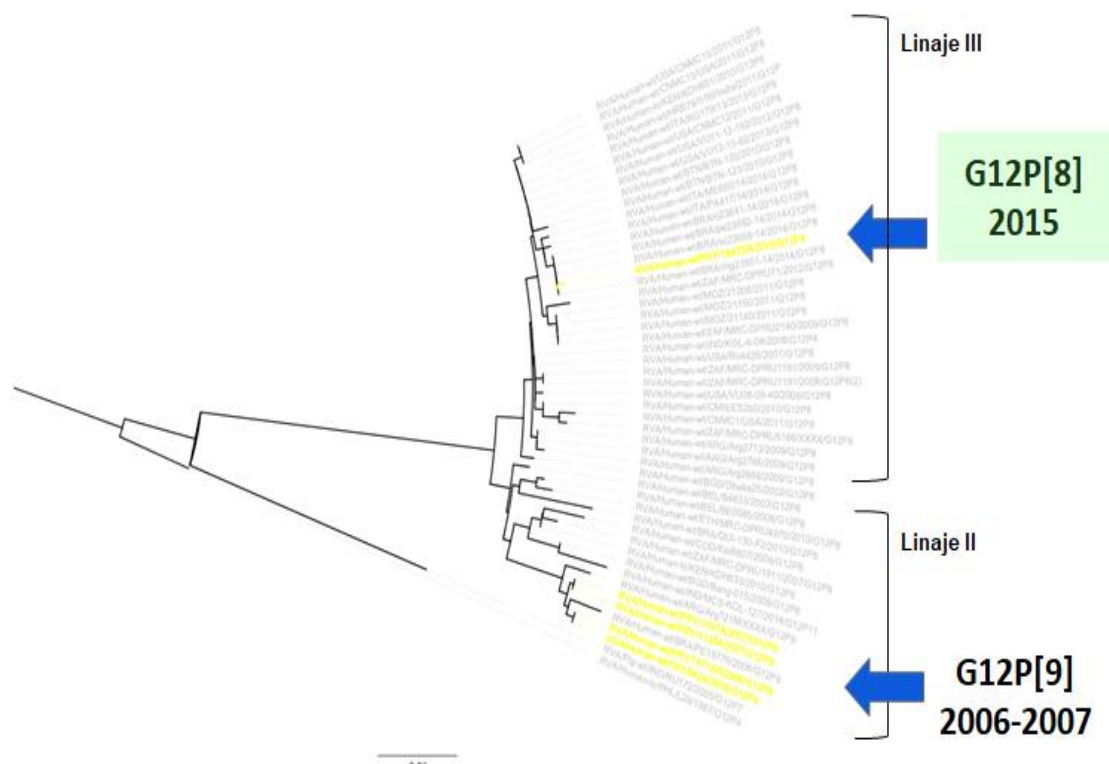


Figura 16: Árbol filogenético del gen VP7 de rotavirus del genotipo G12. Las G12 paraguayas se indican en amarillo. Los linajes de G12 se indican a un lado del corchete. El año correspondiente a este estudio se indica en verde. Se utilizó el algoritmo *Maximum likelihood* y el modelo de sustitución TVM+F+I con distribución gamma. Como soporte estadístico, se implementó el método *bootstrap* (1000 réplicas).

En el 2015, el genotipo G12 fue detectado en el 23% de las muestras analizadas. Se identificó por primera vez la G12 del linaje III humano, que corresponde al grupo de G12 que se expande a nivel mundial a partir del nuevo milenio, para volverse uno de los genotipos más prevalentes en humanos (102). Si bien el análisis de secuenciación tuvo una limitante en el número de muestras que se lograron secuenciar, cabe señalar que todas las G12 identificadas en 2015 exhibieron un genotipo G12P[8] (ver inciso 4.1.2.3 Proporción de genotipos circulantes según la clasificación binaria de RVA), por lo que es probable que se trate del mismo linaje circulante.

4.1.3.5 Análisis filogenético del gen VP4 de rotavirus, Genotipo P[8]

Se realizó el árbol filogenético del gen VP4, del genotipo P[8], a partir de 210 secuencias extraídas de las bases de datos. Las cepas detectadas corresponden al linaje III de mayor circulación a nivel mundial, donde las P[8] que acompañan a las G3 de origen equino y la G6 de origen bovino forman un sólo *clúster*, pero se diferencian de las P[8] que acompañan a las G9 y G12 humanas (Figura 17).

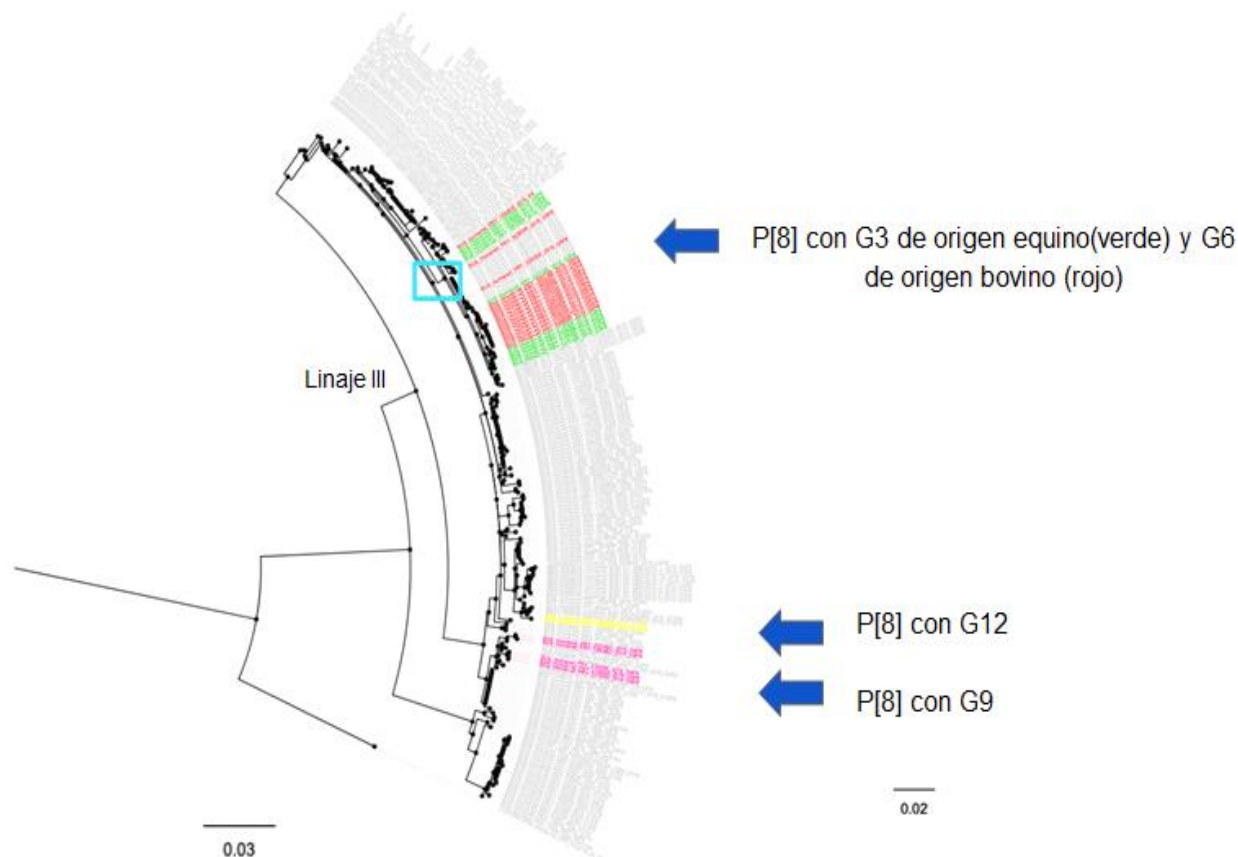


Figura 17: Árbol filogenético de la secuencia nucleótidos del gen VP4 de rotavirus de genotipo P[8]. Los marcadores en colores indican el genotipo P[8] identificado en muestras paraguayas que acompaña a cada genotipo G, verde (G3), rojo (G6), amarillo (G12) y rosa (G9). Se utilizó el algoritmo *Maximum likelihood* y el modelo de sustitución TPM3+F con distribución gamma. Como soporte estadístico, se implementó el método *bootstrap* (1000 réplicas).

4.1.4. Analizar los cambios aminoacídicos en sitios antigénicos de las proteínas VP7 y VP4 de rotavirus

4.1.4.1 Diferencias en los sitios antigénicos de los genes VP7 de cepas G3P[8]

En la Figura 18 se muestran diferentes vistas de los cambios en la proteína VP7 entre las cepas de origen animal G3P[8] equina y las cepas vacunales de origen humano G3 de RotaTeq® y G1 de Rotarix®.

En los epitopos VP7 de las cepas G3 equinas se encontraron 5 substituciones, en regiones antigénicas, y estos se ubican en las regiones antigénicas 7-1a (sitio 87) y 7-1b (sitios 212, 213, 238, 242).

Las G3 de las cepas G3P[8] equina presentan además variaciones aminoacídicas en las posiciones que interaccionan con VP6 (sitios 72, 55, 66, 68, 72, 73, 75). Estas variaciones se observan al comparar la G3 equina con las G3 que circularon en Paraguay previamente. Las mismas están relacionadas con G3 humanas y G3 humana de origen felino, como puede observarse en el árbol filogenético de la Figura 13.

En la Figura 19, se muestran los alineamientos de las muestras con las cepas de referencia.

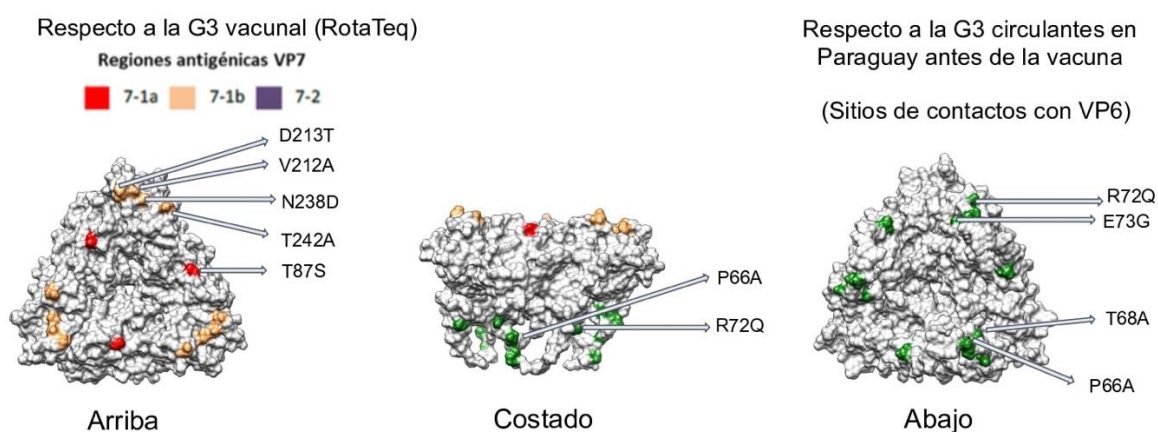


Figura 18: Substituciones en la proteína VP7 genotipo G3. Los cambios en sitios antigénicos se colorean según la leyenda. Los sitios de la G3 de origen equino se comparan con los aminoácidos presentes en la cepa vacunal de origen humano G3. En verde se indican los cambios en la cara interna de VP7, que posee residuos de contacto con la proteína de la cápside intermedia VP6.

7-1a															7-2						7-1b								
	87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	143	145	146	147	148	190	217	221	264	201	211	212	213	238	242
RVA/Vaccine/USA/Rotarik-A41CB052A/1988/G1P1A[9]	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	K	D	Q	N	L	S	M	N	G	Q	N	V	D	N	T
RVA/Vaccine/USA/RotaTeg-W78-8/1992/G3P7[5]	S	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	K	D	A	T	L	S	E	A	G	Q	D	A	T	D	A
RVA/Human-wiPRY/1925SF/2015/G3P[8]	S	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	K	D	A	T	L	S	E	A	G	Q	D	A	T	D	A
RVA/Human-wiHBO/2015/G3P[8]	S	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	K	D	A	T	L	S	E	A	G	Q	D	A	T	D	A
RVA/Human-wiESPS98244047/2015/G3P[8]	S	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	K	D	A	T	L	S	E	A	G	Q	D	A	T	D	A
RVA/Human-wiHUNERN82632015/G3P[8]	S	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	K	D	A	T	L	S	E	A	G	Q	D	A	T	D	A
RVA/Human-wiAUSWAPC1740/2013/G3P[8]	S	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	K	D	A	T	L	S	E	A	G	Q	D	A	T	D	A
RVA/Human-wiTHA/SKT-289/2013/GP[8]	S	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	K	D	A	T	L	S	E	A	G	Q	D	A	T	D	A
RVA/Human-wiPRY/1256A/2009/G3G4P[9]	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	R	K	D	A	A	L	S	E	A	G	Q	D	T	S	N	N
RVA/Human-wiPRY/1709SR/2009/G3P[9]	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	R	K	D	A	A	L	S	E	A	G	Q	D	T	S	N	N
RVA/Human-wiPRY/1747SR/2009/G3G1P[8]	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	K	D	A	T	L	S	E	A	G	Q	D	T	N	N	N
RVA/Human-wiPRY/1756SR/2009/G3G9P[8]	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	K	D	A	T	L	S	E	A	G	Q	D	T	N	N	N

Figura 19: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP7 de las RVA G3 2015, 2018 y 2019 en comparación a la G3 presente en la vacuna RV5. Las secuencias de referencia se señalan en color salmón.

4.1.4.2 Diferencia de aminoácidos en las regiones antigénicas del gen VP7 de RVA G9 circulantes de 2015 a 2018, respecto a las G9 pre-vacunal circulantes en Paraguay

En la Figura 20 se muestran los cambios en los sitios antigénicos de la proteína VP7 de genotipo G9 predominante en el año 2016, en comparación con los RVA G9 que circularon en Paraguay antes de la introducción de la vacuna (2000-2009). En el análisis se observó que las G9 post-vacunales presentan solo una variación aminoacídica (aminoácido 100) en la región antigénica 7-1a. En la Figura 21, se muestran los alineamientos de las muestras con las cepas de referencia.

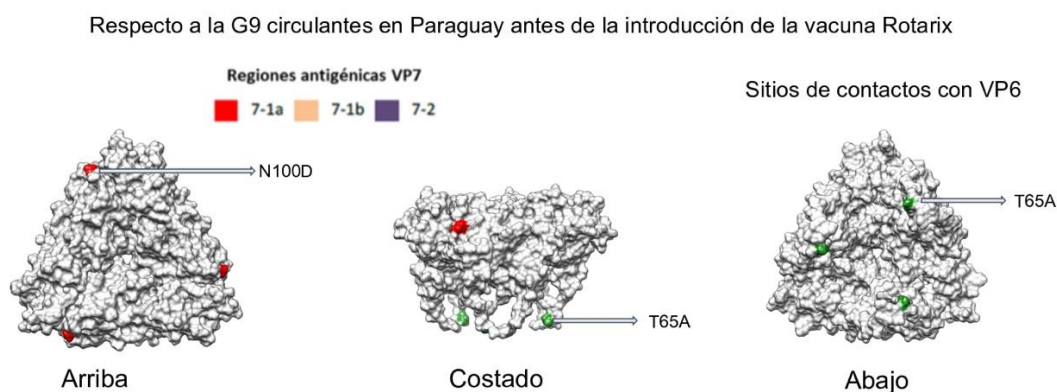


Figura 20: Substituciones en la proteína VP7 genotipo G9 de rotavirus. Las regiones antigénicas en las que se encuentran las substituciones se indican según el color de la leyenda, en verde se indica el cambio en la cara interna de VP7, en residuos de contacto con la proteína VP6.

		7-1a										7-2										7-1b						
87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	201	143	145	146	147	148	190	217	221	264	201	211	212	213	238	242
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	N	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	N	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	N	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	N	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L	S	E	S	G	Q	N	T	A	D	N
T	T	G	T	E	W	K	D	Q	D	A	I	D	K	K	D	S	T	L</										

Figura 21: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP7 de las RVA G9 2016 y 2018 respecto a las G9 circulantes en Paraguay antes de la introducción de la vacuna RV1. Las secuencias de referencia se señalan en color salmón.

4.1.4.3 Diferencias en los sitios antigénicos de los genes VP7 de rotavirus de cepas G6P[8]

Se encontraron 9 substituciones, en regiones antigénicas de VP7 respecto a la G6 de la vacuna RotaTeq® que contiene virus de genotipo G6, debido a que el *backbone* de los reordenantes es una cepa bovina G6P[1]. La G6 identificada en este estudio, presenta 9 substituciones en las regiones 7-1a (87, 100, 130, 291), 7-1b (211, 213, 242) y 7-2 (147, 148) respecto a la G6 vacunal (Figura 22). Así también, las G6 presentan variaciones aminoacídicas en las posiciones (55, 66, 73, 75), las cuales son residuos que interaccionan con VP6 (Figura 21-Abajo). Los aminoácidos de las regiones antigénicas de VP7 de las G6 paraguayas y la G6 vacunal, se muestran en la Figura 23.

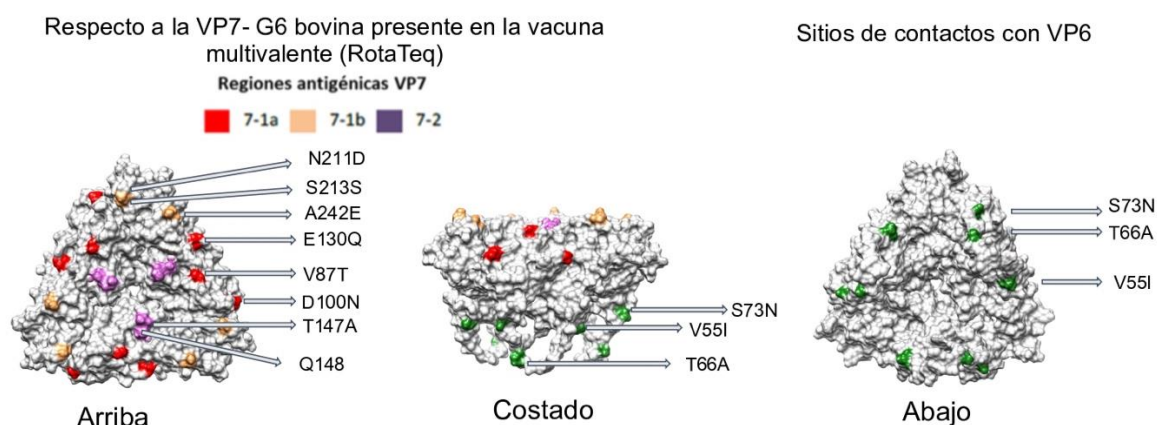


Figura 22: Substituciones en la proteína VP7 de rotavirus. Las substituciones en regiones antigénicas se indican según el color de la leyenda. En verde se indica el cambio en la cara interna de VP7, en residuos de contacto con la proteína VP6.

4.1.4.4 Diferencias en los sitios antigénicos de los genes VP4 de cepas P[8]

Las proteínas VP4 de las cepas G3P[8] y G6P[8] presentan variaciones aminoacídicas en los sitios antigénicos de la porción VP8*: 8-1 (145, 149, 195), 8-3 (113) y 8-4 (89) en comparación con P[8] presente en Rotarix (Figura 24-A). En el caso de las cepas G12P[8] y G9P[8], ambas presentaron 2 sustituciones en las región 8-1 (149, 195) y (194,195) respectivamente (Figura 24-B-C)

En las Figuras 25 , 26, 27 Y 28 se muestran los alineamiento en regiones antigénicas de la porción VP8* de cepas G3P[8], G6P[8], G12P[8] y G9P[8], respecto a la P[8] presente en Rotarix.

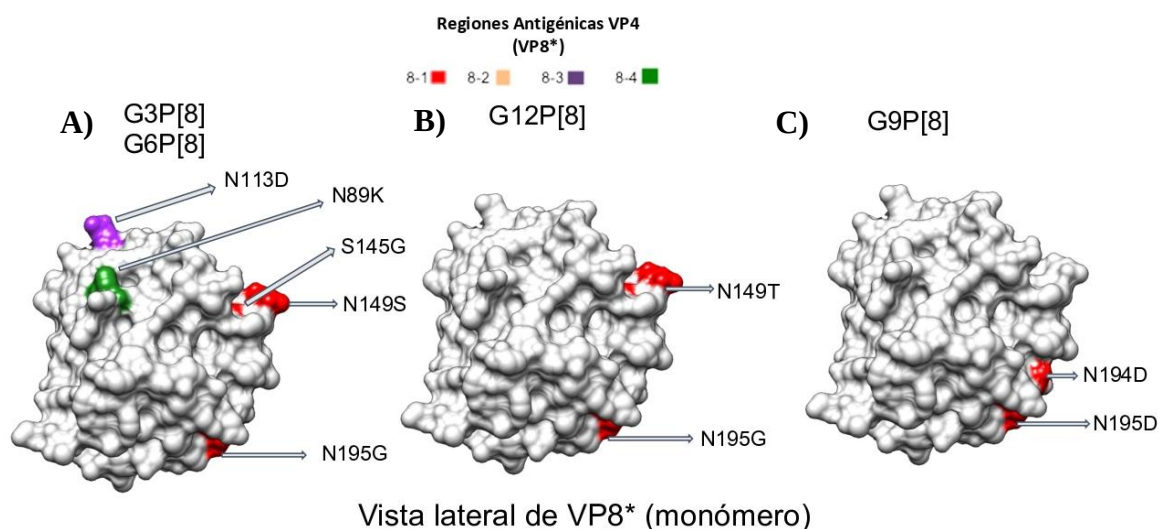


Figura 24: Substituciones en la proteína VP4 de rotavirus del genotipo P[8] que acompañan a diferentes genotipos G (A, B y C), respecto a la P[8] presente en la vacuna Rotarix. Las regiones antigénicas en las que se encuentran las subtituciones se indican según el color de la leyenda. Al costado izquierdo se indica la ubicación de la porción VP8* en una sección de la partícula de RVA.

	8.1										8.2					8.3					8.4					
	100	145	147	149	187	189	191	192	193	194	195	179	182	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89	
RVA/Vaccine/USA/RotariA41CB052A/1988/G1P8	D	S	S	S	N	S	S	A	N	L	N	D	E	R	N	P	V	D	S	S	N	D	N	N	T	N
RVA/Vaccine/USA/RotatEqW794/1992/G6P8	D	S	S	S	N	S	N	A	N	L	N	D	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	N	T	N	N
RVA/Humanw/PRY/1934SR/2015/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N
RVA/Humanw/PRY/1939SR/2015/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N
RVA/Humanw/PRY/1936SR/2015/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N
RVA/Humanw/PRY/1929SR/2015/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N
RVA/Humanw/PRY/2182SR/2018/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N
RVA/Humanw/PRY/2204SR/2018/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N
RVA/Humanw/PRY/2201SR/2018/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N
RVA/Humanw/PRY/2157SR/2018/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N
RVA/Humanw/PRY/2231SR/2018/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	K
RVA/Humanw/PRY/2156SR/2018/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	K
RVA/Humanw/PRY/2135SR/2018/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	K
RVA/Humanw/PRY/2135SR/2018/G3P8	D	G	S	S	S	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N

Figura 25: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP8* de las RVA P[8] (G3) circulantes en 2015 y 2018 respecto a las P[8] presente en la vacuna RV1. Las secuencias de referencia se señalan en color salmón.

	8.1										8.2					8.3										8.4				
	100	145	147	149	187	189	191	192	193	194	195	179	182	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89					
RVA/Vaccine/USA/RotariA41CB052A/1988/G1P8	D	S	S	S	S	S	A	N	L	N	N	E	R	N	P	V	D	S	S	N	D	N	N	T	N					
RVA/Vaccine/USA/RotariA41CB052A/1992/G6P8	D	S	S	S	S	S	A	N	L	N	D	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N					
RVA/Humanw/PRY/2991SR/2019/G6P8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N					
RVA/Humanw/PRY/2998SR/2019/G6P8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N					
RVA/Humanw/PRY/3036SR/2019/G6P8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N					
RVA/Humanw/PRY/3002SR/2019/G6P8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N					
RVA/Humanw/PRY/3006SR/2019/G6P8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N					
RVA/Humanw/PRY/3007SR/2019/G6P8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N					
RVA/Humanw/PRY/3000SR/2019/G6P8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	K					
RVA/Humanw/PRY/3043SR/2019/GXP8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N					
RVA/Humanw/PRY/3012SR/2019/G6P8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	K					
RVA/Humanw/PRY/3009SR/2019/G6P8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N					
RVA/Humanw/PRY/2999SR/2019/G6P8	D	G	S	S	S	S	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N					

Figura 26: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP8* de las RVA P[8] (G6) circulantes en 2018 y 2019 respecto a las P[8] presente en la vacuna RV1. Las secuencias de referencia se señalan en color salmón.

	8.1										8.2										8.3										8.4									
	100	145	147	149	187	189	191	192	193	194	195	179	182	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89															
RVA/Vaccine/USA/RotariA41CB052A/1988/G1P8	D	S	S	N	S	S	A	N	L	N	N	E	R	N	P	V	D	S	S	N	D	N	N	T	N															
RVA/Vaccine/USA/RotaTeqW1794/1992/G6P8	D	S	S	N	S	N	A	N	L	N	D	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N															
RVA/Humanwt/PRY/1943SR/2015/G12P8	D	S	S	T	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N															

Figura 27: Substitución de aminoácidos de las regiones antigénicas de VP8* de las RVA P[8] (G12) circulantes en 2015 respecto a las P[8] presente en la vacuna RV1. Las secuencias de referencia se señalan en color salmón.

	8.1										8.2					8.3										8.4		
	100	145	147	149	187	189	191	192	193	194	195	179	182	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89			
RVA/Vaccine/USA/RotarixA41CB052A/1988/G1P8	D	S	S	N	S	S	A	N	L	N	N	E	R	N	P	V	D	S	S	N	D	N	N	T	N			
RVA/Vaccine/USA/RotaTeq/W1794/1992/G6P8	D	S	S	N	S	N	A	N	L	N	D	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N			
RVA/Humanw/PRY/252HBO/2016/G9P8	D	G	S	N	S	N	A	N	L	D	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N			
RVA/Humanw/PRY/105HBO/2016/G9P8	D	G	S	N	S	N	A	N	L	D	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N			
RVA/Humanw/PRY/2169SR/2018/G9P8	D	G	S	N	S	N	A	N	L	D	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N			
RVA/Humanw/PRY/2216SR/2018/G9P8	D	G	S	N	S	N	A	N	L	D	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N			
RVA/Humanw/PRY/2194SR/2018/G9P8	D	G	S	N	S	N	A	N	L	D	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N			

Figura 28: Substitución de aminoácidos en las regiones antigénicas de VP8* de las RVA P[8] (G9) circulantes en 2016 y 2018 respecto a las P[8] presente en la vacuna Rotarix.

4.2. Resultados del Objetivo general 2: Analizar la estacionalidad y distribución etaria de los casos de rotavirus post introducción de la vacuna (2011-2019) en Asunción y sus alrededores

4.2.1. Proporción de casos positivos de rotavirus por año.

Mediante datos proveídos por el hospital privado colaborador, se realizó en análisis de estacionalidad por mes durante los años 2011-2019. Se analizaron 10691 casos de GEA en niños menores a 5 años. Mediante inmunocromatografía, se detectó que el 46% (905 muestras) fue positivo para RVA. La proporción de positivos de 2000 al 2010 (pre-vacuna) fluctuó entre el 10,6% al 33,7%, mientras que en el periodo 2011 al 2020 fue del 5,4% al 16,3%, con un promedio de 23% y 9% respectivamente (Figura 29).

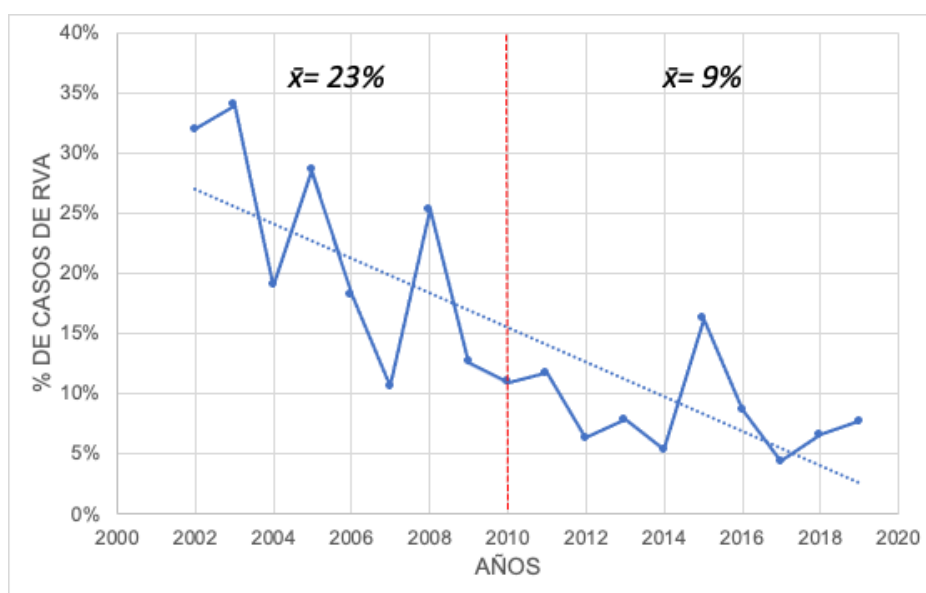


Figura 29: Frecuencia de casos de rotavirus en niños <5 años pre y post introducción de la vacuna. La línea vertical roja punteada indica la introducción de la vacuna en el programa ampliado de inmunización. Se indica el promedio correspondiente a los periodos 2002-2010 y 2011-2019.

Del 2002 al 2008, se puede observar que la proporción se mantiene por encima del 15%, excepto en el 2007 (Anexo 1), que podría deberse a factores como por ejemplo, el estatus inmunológico poblacional frente al genotipo circulante. Como se había mencionado previamente, en el 2008 el sector privado comenzó a comercializar la vacuna RV1, por lo que el descenso de 2009 a 2010 podría en parte deberse a ello; sin embargo, al no contar con datos como por ejemplo, dosis administradas y en vista a que naturalmente pueden ocurrir fluctuaciones en la incidencia de RVA, es difícil

atribuir una causa. Luego del 11% observado en 2011, se observó que la proporción de RVA se mantuvo menor al 10%, con una visible excepción en el 2015. Interesantemente, en el 2015 se detectan dos genotipos nuevos en Paraguay: la G3P[8] reordenante (equina/humana) y G12P[8].

4.2.1. Estacionalidad de casos de RVA posterior a la introducción de la vacuna

En cuanto a la distribución mensual de los 10691 casos positivos de 2011 a 2019, se observó que ocurre un incremento de los casos en de los meses de junio a octubre, observándose un leve incremento en algunos años, y un aumento más marcado en otros, en los meses de agosto a octubre (Figura 30).

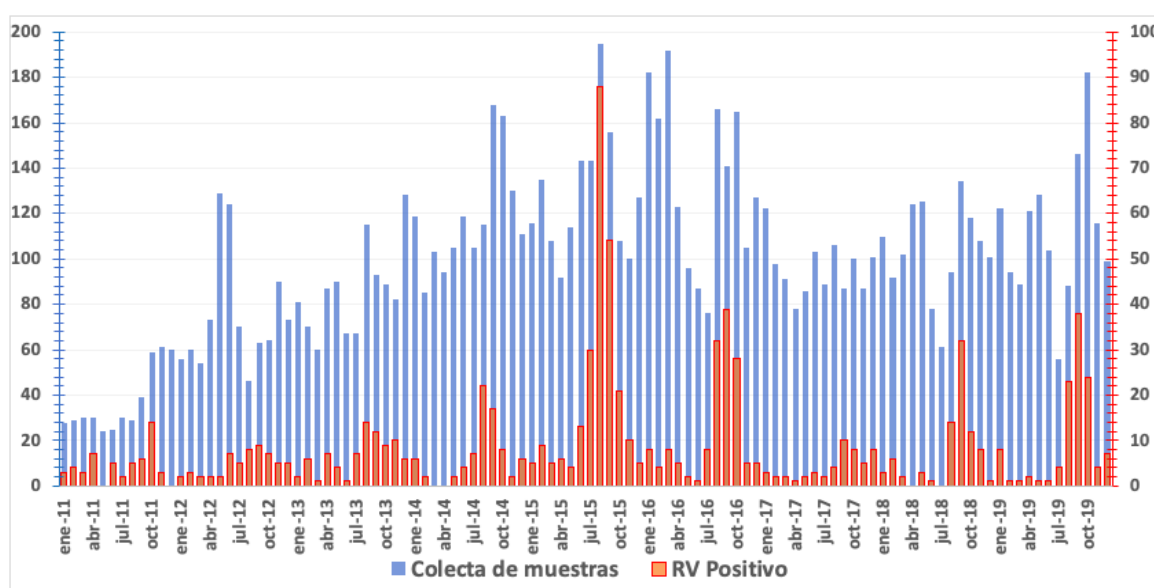


Figura 30: Frecuencia de casos de RVA en niños menores de 5 años, por mes, de 2011 a 2019. Barras azules: número de casos de diarrea atendidos en el hospital colaborador, indicados en el eje Y izquierdo. Barras naranjas: proporción (%) de casos positivos para rotavirus, indicado en el eje Y derecho.

4.15. Distribución etaria de rotavirus

Se realizó el análisis de distribución etaria de casos de rotavirus en niños de 0 a 5 años de los años 2016 al 2019, según los datos proveídos por el Centro Hospitalario colaborador. Se observó un mayor número de casos de RV en niños en la edad comprendida entre 24 y 47 meses, en los años 2015, 2016, 2017, 2018 y 2019 (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de detección de RVA por franja etaria

2015					
Rango etareo ^a	Pruebas (PR) ^b	Positivos (POS) ^c	Frecuencia (%) ^d	FRP (PR) ^e	FRP (POS) ^f
0 -23	40 ^a	40**	NA	NA	21,2
24 - 47	408	87	21,3	NA	46,0
48 - 60	370	62	16,8	NA	32,8
Total	NA	149			
2016					
Rango etareo ^a	Pruebas (PR) ^b	Positivos (POS) ^c	Frecuencia (%) ^d	FRP (PR) ^e	FRP (POS) ^f
0 -23	549	42	7,7	32,8	29,0
24 - 47	811	69	8,5	48,4	47,6
48 - 60	316	34	10,8	18,9	23,4
Total	1676	145			
2017					
Rango etareo ^a	Pruebas (PR) ^b	Positivos (POS) ^c	Frecuencia (%) ^d	FRP (PR) ^e	FRP (POS) ^f
0 -23	33	3	9,1	2,9	6,0
24 - 47	759	24	3,2	66,1	48,0
48 - 60	356	23	6,5	31,0	46,0
Total	1148	50			
2018					
Rango etareo ^a	Pruebas (PR) ^b	Positivos (POS) ^c	Frecuencia (%) ^d	FRP (PR) ^e	FRP (POS) ^f
0 -23	372	15	4,0	29,9	18,3
24 - 47	656	44	6,7	52,6	53,7
48 - 60	218	23	10,6	17,5	28,0
Total	1246	82			
2019					
Rango etareo ^a	Pruebas (PR) ^b	Positivos (POS) ^c	Frecuencia (%) ^d	FRP (PR) ^e	FRP (POS) ^f
0 -23	569	25	4,4	44,9	25,5
24 - 47	495	47	9,5	39,1	48,0
48 - 60	202	26	12,9	16,0	26,5
total	1266	98			

^aRango de edad en meses; ^bNúmero de pruebas inmucromatográficas para RVA; ^cNúmero de resultados positivos para RVA; ^dFrecuencia relativa porcentual de casos positivos por franja etaria; ^eFrecuencia relativa porcentual de casos de diarrea en una franja etarea/año; ^f Frecuencia relativa porcentual de casos de diarrea por RVA en

una franja etaria /casos de RVA/año; *No se cuenta con las edades de las determinaciones negativas en la franja etaria 0-23; ** Se cuenta con el 100% de las edades de las determinaciones positivas en la franja etaria 0-23; NA: no aplica.

5. DISCUSIÓN

Las enfermedades diarreicas agudas son la segunda causa principal de muerte entre los niños menores de cinco años en todo el mundo. El RVA es el agente causal más importante de la GEA, con altas tasas de mortalidad infantil en los países en desarrollo (32). En 2006, la OMS recomendó y autorizó la inclusión de dos vacunas contra rotavirus en los programas de inmunización de todos los países del mundo, especialmente aquellos con altas tasas de diarrea infantil, como parte de una estrategia para controlar la diarrea asociada a rotavirus (67). Desde el 2006, 19 países de América Latina y el Caribe han incorporado estas vacunas a sus calendarios de vacunación; uno de ellos es Paraguay, que desde el año 2010 implementó a nivel nacional la vacunación con Rotarix®, como parte del PAI. El propósito de la vacunación contra RVA es reducir la morbilidad y mortalidad en países en desarrollo y reducir la morbilidad y su consecuente impacto económico en países desarrollados (34,50,76,103). Varios países de América Latina alcanzaron altos niveles de cobertura de vacunación y en los primeros años se han reportado reducciones sustanciales en muertes y hospitalizaciones (103,104). Sin embargo, a pesar de su importancia, muchas veces los datos son incompletos o inconsistentes.

Es sabido que la distribución de RVA fluctúa geográfica y temporalmente en ausencia de vacunación, debido a factores como la inmunidad homo y heterotípica de una población, la emergencia de cepas nuevas o diferentes mediante mecanismos evolutivos, el movimiento de personas alrededor del mundo, factores sociales y características del hospedero. Sin embargo, es de esperarse que el uso de una vacuna que posee una sola o un número limitado de cepas o genotipos virales, tenga influencia sobre la distribución de los genotipos virales circulantes. Existen ejemplos como el virus de la influenza y metapneumovirus aviar o HIV-1 y es improbable que la vacuna para RVA sea diferente (105). En América Latina en general, debe tenerse en cuenta, además, que es socioeconómicamente heterogénea lo cual tiene implicancia en factores dependientes del hospedero relacionados a la efectividad de las vacunas: estatus nutricional, lactancia, composición de la microbiota, genética, entre otros (48,76,103).

El componente principal de este trabajo fue identificar los genotipos de RVA circulantes luego de 5 años del inicio de la vacunación nacional contra rotavirus, en la población de la ciudad de Asunción y alrededores, trabajando con muestras uno de

los mayores servicios pediátricos de la ciudad. El segundo componente de este trabajo es analizar los datos disponibles en la base de datos de este centro de atención pediátrica, para describir el comportamiento estacional y la distribución por edad de los casos de GEA positivos para rotavirus luego de la introducción de la vacunación masiva en nuestro país.

Las vacunas contra el rotavirus (desarrolladas desde 1983) tenían como objetivo proporcionar una protección específica contra la enfermedad grave causada por los genotipos comunes de rotavirus G1P[8], G3P[8] y G4P[8] del genogrupo *Wa-like*, así como G2P[4] del genogrupo *DS-1-like*. En el transcurso del tiempo, los genotipos G9P[8] y G12P[8] se sumaron al grupo de genotipos comunes en humanos, sin embargo al ser ambos del tipo *Wa-like* y contar con la P[8], se esperaba que la protección heterotípica de las vacunas sea eficiente. Nuestro grupo ha identificado anualmente los genotipos de RVA circulantes en el área de Gran Asunción de 1998 al 2010 detectando la predominancia de los genotipos comunes en humanos (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8]). Mediante la secuenciación del genoma, se vio además que estas cepas presentaron en su amplia mayoría las constelaciones de mayor relevancia epidemiológica en humanos: *Wa-like* y *DS-1-like*, identificándose eventos de zoonosis y reordenamiento sólo de manera ocasional (20,33,57,106).

En este trabajo, se analizaron los genotipos circulantes en Gran Asunción en los años 2015, 2016, 2018 y 2019, luego de cinco años de la introducción de la vacuna monovalente Rotarix al programa de vacunación nacional. En estos años la cobertura de vacunación de Asunción fue del 94, 90%, 91% y 86% respectivamente (83).

Los análisis moleculares de detección de RVA mostraron una alta proporción de casos positivos (16% al 60%) pero debe tenerse en cuenta que los meses de colecta de muestras fueron en los meses de alta circulación de RVA, por lo que estos valores no son indicadores de la positividad anual de RVA, que será discutida más adelante de acuerdo a los análisis de las bases de datos anuales.

Estos análisis moleculares incluyeron la identificación de genotipos G y P por RT-PCR y la secuenciación y análisis filogenético de VP7 y VP4 (VP8*) para identificar las variantes de estos genotipos en una población ampliamente vacunada. En el año

2015 fueron detectados dos genotipos co-circulando mayoritariamente: G3P[8] seguido de G12P[8]. El genotipo G3P[8] ya había sido identificado como predominante en el 2009, presentando un genoma típicamente humano del tipo *Wa-like*. Así mismo, la G12 identificada antes de la introducción de la vacuna correspondía a una cepa G12P[9] *AU-1-like* que circuló de forma minoritaria en 2006 y 2009 (33). La filogenia de la G3P[8] y G12P[8] detectadas en 2015 reveló genotipos G3 y G12 completamente diferentes a los identificados previamente. El genotipo G3 ha sido identificado en una amplia gama de huéspedes, incluidos gatos, vacas, perros, caballos, cerdos, conejos, ovejas, monos y murciélagos, en asociación con varios tipos de P (107–109). El genotipo G3 identificado en 2015 se encuentra estrechamente relacionado con una VP7 de origen equino que fue identificada alrededor del mundo recientemente, en países como Australia, Tailandia Hungría, España y Brasil (Figura 13) (19,110,111). Esta cepa cuenta además con una P[8] humana y el resto del genoma del tipo *DS-1-like* (Figura 31.a). La P[8] identificada en Asunción en 2015 también formó un mismo clúster con la VP4 de esta G3P[8] emergente, sugiriendo que se trata de esta misma cepa (Figura 17).

La aparición y propagación de la cepa RVA de G3P[8] equino de tipo *DS-1-like*, se dio por primera vez en 2013, en Tailandia y Australia y posteriormente, se propagó a nivel mundial (Figura 31.b) (109,112). El probable origen de esta cepa pudo darse en las cepas G1P[8] que poseían el genoma de tipo *DS-1-like* que ya circulaban entre humanos (inicialmente en Japón y Sudáfrica) (22,41,112,113). Esta cepa recibió una G3 de origen equino (Figura 13).

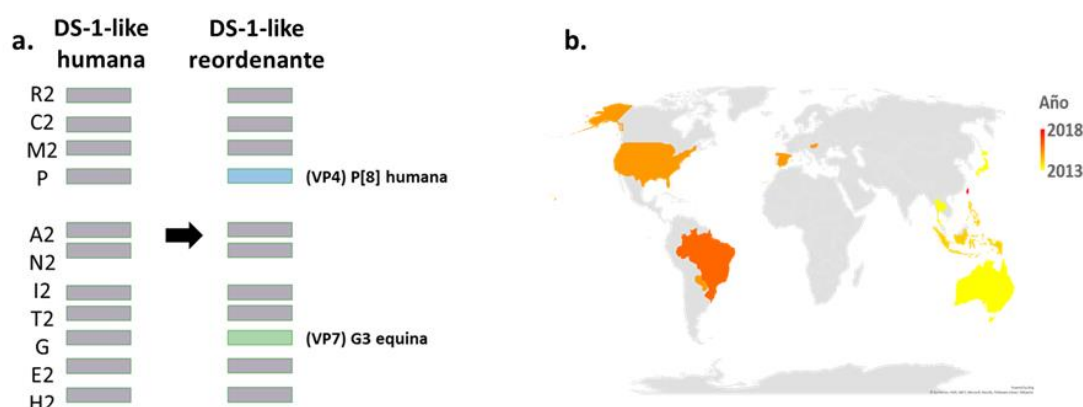


Figura 31: Genoma y *heat-map* de diseminación de G3P[8] *DS-1-like* A) izquierda composición de un genoma del tipo *DS-1-like*, a la derecha se indican los

genes que fueron reemplazados (VP4 y VP7). B) introducción y diseminación de G3P[8] reordenante en la población humana; La intensidad de los colores de amarillo al anaranjado indican las detecciones más antiguas y las más recientes, respectivamente.

Como se observa en la Figura 10, en el año 2018, G3P[8] volvió a ser el genotipo predominante. En las Figuras 13 y 17, se observa que se trata de la misma G3P[8] equina-reordenante, que la circulante (en menor proporción) durante 2019. Las regiones antigénicas de las VP7 - G3 equinas que circularon en el 2015, 2018 y 2019, presentan substituciones 5 residuos de las regiones 7-1a y 7-1b, al igual que en las regiones antigénicas de la porción VP8* de la proteína VP4, donde se observaron 5 substituciones distribuidos en las regiones 8-1, 8-3 y 8-4 (al comparar la G3 presente en la vacuna RotaTeq y la P[8] presente en la vacuna Rotarix, respectivamente) (Figuras 18 y 24), lo que puede explicar en parte la expansión reciente de las cepas a nivel mundial. Si bien queda pendiente la secuenciación de los otros genes, la G3P[8] detectada agrupa filogenéticamente con la G3P[8] que posee un genoma *DS-1-like* (Figura 31a). Aunque el reordenamiento de genes es uno de los mecanismos más importante de los RVA para generar diversidad, se ha visto que existen constelaciones de genes “preferidas”, que se encuentran determinadas en gran parte por la afinidad de las proteínas que van a conformar al virión (25,48,114). Por ello, se analizó la secuencia de aminoácidos de VP7 en las regiones en las que la misma hace contacto con VP6 en un virión ensamblado (25,114,115). El análisis mostró que al comparar los residuos de la G3 equina que se ensambla con una VP6 del tipo *DS-1-like*, respecto a una G3 humana que posee una VP6 *Wa-like*, encontramos 5 substituciones (posiciones 55, 66, 68, 72, 73) en residuos de potencial interacción entre VP7-VP6.

También en el 2015, se detectó por primera vez en nuestro país el genotipo G12P[8], en base a lo disponible en la literatura, es uno de los genotipos más frecuentes a nivel mundial recién desde el inicio del nuevo milenio (102).

Tanto la VP7 como la VP4 de los RVA G12P[8] descritos en este estudio, están filogenéticamente asociadas con RVA descritos alrededor del mundo de origen humano y constelación génica *Wa-like*, a diferencia de la G12P[9] asociada a un genoma *AU-1-like*, previamente reportada en Paraguay en los años 2006 y 2007. La

G12 humana pertenece al linaje III del genotipo G12 mientras que la G12 pre-vacunal pertenece al linaje II (Figura 16); sumado a ello, G12P[8] volvió a circular en el 2019 de manera minoritaria y tanto la VP7 G12 como la VP4 P[8] de ambos años se agruparon con otras cepas G12P[8] humanas.

Por otra parte, en este estudio se observó que en el año 2016 hubo una predominancia de G9P[8] en las muestras analizadas. La Euro Rota Net, encargada de reportar el estado epidemiológico de RVA en varios países Europeos, notificó la predominancia de G9P[8] en los años 2015/2016 en 5 de 14 países (116). Las cepas de G9 del genogrupo *Wa-like*, se identificaron por vez primera a principios de la década de 1980 en los Estados Unidos, sin embargo, posteriormente no se detectó durante varios años. Re-emergió en la década de 1990 con un nuevo linaje (linaje III) con el que se expande alrededor del mundo. Se ha informado que este genotipo tiene una distribución global, destacándose por ser uno de los causantes de grandes brotes de gastroenteritis en muchos países (45,54,117,118). En Paraguay, el genotipo G9 se identificó por primera vez en el año 2000 y circuló cada año de manera continua hasta el 2009, siendo el genotipo predominante en el 2000, 2004 y 2008 (33). Al observar el árbol filogenético de VP7-G9, se pudo observar que estos años coinciden con la aparición de nuevos *clusters*, que si bien no tienen una mucha distancia genética, pueden distinguirse unos de otros. Este mismo patrón se observa en el año 2016, en el que se observa un *cluster* nuevo donde G9 fue el genotipo mayoritario, sin embargo, a pesar de que en el 2018 se observa una G9 que agrupa distante de la G9 del 2016, no fue el genotipo predominante ese año (Figura 14). En una localidad determinada, el mismo linaje de rotavirus puede ser observado en largos periodos de tiempo, incluso en lugares que tienen estacionalidad marcada con bajos niveles de circulación de RVA en determinados meses del año (48), tal como se observó en Paraguay con G9 y G12 en otras partes del mundo. Esto sugiere, que podría existir una persistencia local del virus en la población, posiblemente a través de niveles bajos de infecciones asintomáticas en adultos. El estatus inmunológico de una población vacunada podría presentar fluctuaciones, dependiendo del grado de protección homotípica y heterotípica de los individuos, así como la duración de la protección. Esto podría explicar la predominancia de G9P[8] un año después de la aparición de G3P[8]. Análisis de los demás genes que conforman el genoma podrían

aportar al entendimiento de la capacidad de G9 de persistir en la población humana (48).

En los años 2016, 2018 y 2019 se observaron casos de muestras no tipificables en el gen VP7 (Gx) y si bien esto sucede con frecuencia (entre al 5% al 10% de las muestras), en el año 2019 se registró un alto porcentaje de RVA que no pudo ser genotipificado en el gen VP7 mediante la estrategia de RT-PCR anidada múltiple, la cual incluye un conjunto de cebadores para los genotipos G comunes (G1-G4, G9 y G12) (28,42). Estas observaciones condujeron a las siguientes hipótesis: i) la introducción de un genotipo atípico de VP7, ya sea por introducción de un virus presente en animales o por reordenamiento que no pueden ser reconocidos por los cebadores ii) cambios puntuales de algunos genotipos prevalentes en el segmento VP7, disminuyendo así la especificidad de los cebadores.

En los años 2018 y 2019, países vecinos como Brasil y Argentina reportaron la circulación de genotipos atípicos como G6 y G8 respectivamente, los cuales son genotipos que no se encontraban en la multiplex de rutina empleada en este trabajo, razón por la cual estos genotipos no fueron analizados en ese momento (100,101). Sorprendentemente, luego de realizar la tipificación de las muestras de genotipo Gx con los cebadores de G6 y G8, se detectó por primera vez en Paraguay la circulación del genotipo G6 en el año 2018 y la predominancia de este genotipo en el año 2019.

Los rotavirus con genotipo G6 son comunes en el ganado y otros rumiantes, se ha visto que son muy poco frecuentes en enfermedades humanas. Las cepas G6 humano de tipo bovino, RVA/Human-tc/ITA/ PA151/1987/G6P[9] y RVA/Human-tc/ITA/PA169/1988/G6P[14], respectivamente, se identificaron por primera vez en dos niños italianos hospitalizados con GEA (119). Desde entonces se ha detectado G6 de manera esporádica en combinación con otros genotipos P en diferentes países (Hungría, Australia, Estados Unidos e India) (120–123). En animales G6 se encuentra principalmente en combinación con el genotipo P[14] (comúnmente detectados en antílopes, vacas, conejos, cabras y ovejas). En humanos, principalmente en reportes de Europa se ha identificado G6 con otros tipos de P (G6P[4], G6P[6], y G6P[11]) (124,125). Las cepas identificadas en este trabajo presentaron la combinación G6P[8].

Los análisis filogenéticos de VP7 de estas muestras, mostraron que las G6P[8] paraguayas formaron un mismo *clúster* con las recientemente reportadas en Brasil en el 2019, dentro de una agrupación mayor que incluye a cepas G6P[9] detectadas previamente en humanos (100).

Al analizar la filogenia del gen VP4 de las cepas G6P[8] detectadas en 2018 y 2019, se observó algo muy interesante; las P[8] formaron un mismo *clúster* con las G3P[8] (equinas) observadas en Paraguay en 2015, 2018 y 2019 y con G3P[8] equinas de otras partes del mundo; así como cepas G1P[8] de Japón, G8P[8] de Japón y Tailandia, G9P[8] de Japón y Vietnam (Figura 17); todas ellas caracterizadas por presentar una constelación Gx-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, es decir un genoma *DS-1-like* reordenante con una P[8] humana y diferentes genotipos de VP7 (126–128). Si bien debe analizarse el resto del genoma viral, esto sugiere ampliamente que la G6P[8] identificada posee potencialmente, un genoma *DS-1-like*; y esto a su vez demuestra que esta combinación génica (P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) resultó favorable y podría establecerse en la población humana. Además, tanto VP7 como VP4 de las G6P[8] paraguayas, formaron un *clúster* estrechamente relacionados con las G6P[8] de Brasil (100), por lo que se puede sugerir una circulación regional.

Si se confirma la hipótesis de que las cepas que predominaron con más frecuencia en estos años de estudio post-vacunales poseen un genoma *DS-1-like*, ¿podría deberse a la presión selectiva inducida por la vacunación con Rotarix, una vacuna monovalente compuesta por una cepa *Wa-like*?. Como mencionaron Matthijnssens y colaboradores (105), los datos obtenidos de estudios de hibridación y de secuenciación, mostraron que los RVA *Wa-like* y *DS-1-like* son cepas distintas a lo largo de todo el genoma, mostrando identidad del 75% al 90% en los diferentes segmentos. Sumado a esto, los sitios antigénicos presentes en Rotarix, son en su mayoría diferentes a los presentes en las cepas *DS-1-like*. Por ello, es de esperarse que la proporción relativa de cepas *DS-1-like* (principalmente las que poseen G y P diferente a G1 y P[8]) aumente significativamente respecto a las cepas *Wa-like*, sin que ello necesariamente implique una disminución en la eficacia de la vacuna para prevenir los casos severos de RVA.

Otro aspecto a tener en cuenta, es que esta es la primera vez que se reporta una cepa G6P[8] como predominante en una población determinada. Interesantemente, de las cepas *DS-1-like* reordenantes mencionadas más arriba, a nuestro conocimiento, sólo las G3P[8] (VP7 equina) reportadas a nivel mundial y las G8P[8] (VP7 bovina) reportadas en Tailandia y Vietnam, fueron reportadas como predominantes. Los cambios aminoacídicos analizados en este estudio corresponden a sitios antigénicos, por lo que las diferencias respecto a cepas vacunales o a genotipos humanos favorecen el escape a anticuerpos neutralizantes, por lo que estos genotipos de VP7 nuevos para el sistema inmune humano, podrían estar presentando una ventaja frente a otros genotipos. Esta misma situación podría presentarse con la G6P[8] identificada en este estudio (Figuras 22, 24). Si bien estos genotipos animales pueden presentar una ventaja a la hora de evadir el sistema inmune, no se ha reportado que tengan alguna influencia en la severidad de los casos.

Por último respecto a los genotipos circulantes, debe mencionarse que mediante RT-PCR se identificaron los genotipos G1P[8] y G2P[4]. Debido a su detección muy esporádica (Anexo 2), este trabajo se enfocó principalmente en la filogenia de los genotipos predominantes en este periodo. Sin embargo, es importante mencionar que todavía siguen circulando a muy baja frecuencia y que su presencia puede dar oportunidad a otros reordenamientos.

La epidemiología del rotavirus es un fenómeno complejo. Así como, la distribución de los genotipos predominantes presenta fluctuaciones, de igual manera ocurre con la estacionalidad de los casos de rotavirus, por lo que es difícil determinar un patrón claro. Se ha reportado que, en áreas tropicales, RVA circula durante todo el año sin picos marcados de infecciones, mientras que en países de climas templados, la estacionalidad de RVA ha sido bien definida, durante los meses secos y fríos (100). En Paraguay, nuestro grupo ha observado que la circulación de RVA presentaba un pico estacional marcado en los meses fríos del año (julio a septiembre) en un estudio llevado a cabo en los años 2003 al 2005 antes de la introducción de la vacuna (20). En este estudio, analizamos la base de datos proveída por el hospital privado colaborador, donde se registran datos de la fecha de toma de muestras, resultados de detección de RVA por inmunocromatografía, edad y sexo. En el análisis de los años 2011 a 2019, se pudo observar dos escenarios: de 2011 a 2014, así como en 2017, si

bien se observa un leve aumento en los meses de invierno/primavera (agosto a octubre), el pico estacional es bastante menos marcado que lo observado por Amarilla y colaboradores en los años 2003 al 2005 (20). El segundo escenario se observa en 2015, 2016, 2018 y 2019, donde se pudo ver un aumento de casos positivos más importante, también de agosto a octubre. Un dato importante es que se produjo un desplazamiento del periodo de GEA causada por rotavirus, de aproximadamente dos meses en comparación con el periodo antes de la introducción de la vacuna. Este fenómeno ya fue descrito en otros países de América Latina, incluyendo a Paraguay, e incluso en países como Estados Unidos, se ha llegado a describir las epidemias de RVA como bianuales (48,76,100,103,129). Este “retraso” en la actividad de RVA luego de la introducción de la vacuna, se debe en gran parte a la reducción de la proporción de población susceptible a la infección por RVA (48,103), en este contexto es interesante observar que el año post-vacunal con mayor pico estacional (Figura 30) corresponde con el año de mayor proporción de casos positivos (2015) (Figura 29). Para entender el contexto de la evolución de las epidemias anuales de RVA en nuestro país, analizamos la frecuencia de casos positivos antes y después de la vacunación masiva, utilizando la base de datos del servicio pediátrico colaborador, de 2002 a 2019. Al analizar la incidencia de RVA en 6019 pruebas realizadas en el periodo pre-vacunal (2002-2010) se observó que la prevalencia anual de RVA varió del 34% a 11% (promedio del 23%) (Figura 29) (Anexo 1). Excepto por el 2007, 2009 y 2010, el resto de los años se encuentran dentro de los márgenes descritos para Paraguay, de entre el 45% y el 20% para 1405 pruebas realizadas (103). Luego de la implementación de la vacuna contra rotavirus (2011-2019), la tasa de detección anual en nuestra población estudiada varió entre el 16% a 4%, con un promedio del 9% (10611 pruebas para detección de RVA) (Figura 28) (Anexo 1). Este número difiere de lo reportado por Shioda y colaboradores, donde se observan incidencias anuales entre el 35% y el 15% calculadas en base a 897 muestras analizadas en los años 2013 al 2015. Esta diferencia en los valores puede deberse, a que los datos descritos en nuestro trabajo se limitan a Gran Asunción, mientras que los datos reportados por Shioda y colaboradores (103), incluyen datos de todo el país y ya fueron reportadas diferencias en cuanto a la incidencia y los genotipos circulantes dentro de un mismo país en un mismo periodo

de tiempo (48). Sin embargo, cabe resaltar que, a pesar de estas diferencias, los valores de reducción absoluta fueron similares en ambos estudios, del 14% en este estudio en comparación al 13% descrito en la referencia mencionada (103).

Con respecto a las infecciones por RVA entre los diferentes grupos de edad, en este estudio se observó una mayor frecuencia de infecciones entre los niños de 24 a 60 meses. En Paraguay, antes de la introducción de la vacuna, la tasa de infección por rotavirus era más alta en niños de 6 a 23 meses de edad (130). Este cambio en la edad de los niños más afectados por la enfermedad de RVA (niños mayores) se ha observado, en varios países que han introducido la vacunación contra RVA, como Brasil y Argentina (41,131,132). Por el contrario, los países donde las vacunas RVA aún no se han introducido en los programas nacionales de inmunización, han informado que la mayoría de los casos positivos de RVA (~ 90%) se dan en los primeros 2 años de vida (133,134). Esta menor incidencia en los niños menores a 2 años, puede deberse a la pronta respuesta inmune generada por la vacuna, después de las dosis administradas a los 2 y 4 meses, a su vez, el decaimiento de la eficacia de la vacuna luego de un año, podría aumentar la susceptibilidad de niños a partir de los 2 años de edad, sobre todo en países en desarrollo. Esta situación ha llevado a plantear la inclusión de una dosis de refuerzo de las vacunas anti-RVA (135). La información detallada sobre la distribución por edades en la era post-vacuna anti-RVA se vuelve fundamental para diseñar programas de vacunación eficaces para las diferentes situaciones a las que se enfrentan los países.

Debido a que contamos con datos de años continuos antes y después de la vacunación, nuestros datos describen por primera vez, de manera continua la dinámica de RVA de una población en específico dentro de Paraguay. Sin embargo, sabemos que los genotipos de RVA fluctúan naturalmente debido a factores poblacionales, ambientales e individuales y pueden diferir en diferentes poblaciones dentro de un mismo país (48). La población estudiada posee un perfil socioeconómico homogéneo, correspondiente a un nivel medio-alto para nuestro medio, ello implica que en su mayoría provienen del área urbana, con acceso a saneamiento y agua potable, no se convive en cercanía con ganado u otro tipo de animales (no mascotas), no presentan desnutrición y tienen acceso a atención de salud inmediata, medicamentos y vacunación completa. Así mismo, estos factores (y

otros) influyen en la efectividad de la vacunación y por lo tanto en el estatus inmunológico de los individuos. Esto constituye una limitante ya que como hemos mencionado, en Paraguay y América Latina en general, la situación socioeconómica es heterogénea. A pesar de que la evidencia presentada en este y otros trabajos apuntan a un efecto de la presión ejercida por la vacunación en la ecología viral, es necesario que este tipo de estudios amplíe su alcance y tengan continuidad en el tiempo, para lograr diseñar estrategias que logren mantener el impacto de la inmunización contra este y otros virus a través del tiempo.

6. CONCLUSIÓN

- Ha sido observado que el periodo de oscilación en la prevalencia de diferentes genotipos varía entre 3 a 11 años (134), por lo tanto, se necesitan al menos 4 años para describir la distribución de genotipos en una localidad determinada. Por lo tanto, este trabajo sugiere que ocurrió un reemplazo en el patrón de genotipos de RVA circulantes en Asunción y Gran Asunción, a partir de 5 años posteriores a la introducción de la vacunación al sistema nacional.
- Este patrón mostró el predominio de cepas con genotipos G de origen animal (G3 equino y G6 bovino) atípicos en la población humana, en 3 de los 4 años de estudio.
- La predominancia del genotipo G9, el más frecuente en el periodo pre-vacunal, sugiere una diferencia en la protección homotípica y heterotípica frente a este genotipo, diferente respecto a otros genotipos altamente frecuentes como G1.
- La disminución del número de casos de GEA puede causar que en algunos años no se observen picos estacionales de RVA. Los picos pueden ocurrir de agosto a octubre en años donde se produzca un aumento en la cantidad de casos positivos de RVA.
- El decaimiento de la protección conferida por la vacuna podría ser uno de los factores causantes de una mayor susceptibilidad del grupo etario mayor a 24 meses de edad.

7. PERSPECTIVAS

- El análisis filogenético de los genes VP7 y VP4 sugiere que las cepas G3P[8] y G6P[8] poseen un genoma DS-1-like, al igual que otras cepas descritas en otras partes del mundo. Esto sugiere que la constelación P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 puede estar estableciéndose en la población humana, por lo que se torna fundamental analizar estas cepas a nivel genómico.
- Dada la evidente influencia de las cepas animales en la evolución de los rotavirus humanos, el continuo monitoreo de las cepas circulantes en humanos y animales será necesario para entender la evolución de los rotavirus en la población humana luego de la inmunización. Este monitoreo deberá incluir poblaciones con características más heterogéneas para poder analizar diferentes escenarios de la infección por RVA.
- El cambio en el patrón de genotipos predominantes conduce a una revisión del sistema de genotipificación de rutina utilizado.
- El análisis más exhaustivo de las interacciones a nivel proteico en la partícula viral proporcionará una mayor comprensión sobre la influencia de las constelaciones génicas en el fitness de nuevas cepas reordenantes.

7. BIBLIOGRAFIA

1. WHO. Rotavirus - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. Available from: <https://www.paho.org/es/temas/rotavirus>
2. 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* . 2016;5(1).
3. Stuenkel ND, Seroy J, Labat-butler JR, Permanente T, Group M. Viral Gastroenteritis (Nursing). 2021;1–6.
4. Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet*. 2018;392(10142):175–86.
5. Toczyłowski K, Jackowska K, Lewandowski D, Kuryłonek S, Waszkiewicz-Stojda M, Sulik A. Rotavirus gastroenteritis in children hospitalized in northeastern Poland in 2006–2020: Severity, seasonal trends, and impact of immunization. *Int J Infect Dis*. 2021;108:550–6.
6. Lartey BL, Damanka S, Dennis FE, Enweronu-Laryea CC, Addo-Yobo E, Ansong D, et al. Rotavirus strain distribution in Ghana pre- and post- rotavirus vaccine introduction. *Vaccine*. 2018;36(47):7238–42.
7. Burnett, Eleanor Parashar, Umesh Tate J. Rotavirus Vaccines: Effectiveness, Safety and Future Directions. *Paediatr Drugs*. 2018;20(3):223–33.
8. Attoui H, Jaafar F, Mertens P. The Reovirales a new taxonomic order : families Sedoreoviridae and Spinareoviridae. 13th Int Double-Stranded RNA Virus Symp. 2018;
9. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D708–17.
10. Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adriaenssens EM, Dempsey DM, et al. Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). *Arch Virol*. 2020 Nov 20;165(11):2737–48.

11. Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2010;140(3–4):246–55.
12. Bishop R. Discovery of rotavirus: Implications for child health. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24 Suppl 3:S81–5.
13. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res.* 2014;190:75–96.
14. Daniel C. Payne, PhD, MSPH; Umesh D. Parashar, MBBS M. Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases. Chapter 13: Rotavirus. Cdc [Internet]. 2018; Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/>
15. Levy K, Hubbard AE, Eisenberg JNS. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: A systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2008;38(6):1487–96.
16. Patel MM, Pitzer V, Alonso WJ, Vera D, Lopman B, Tate J, et al. Global Seasonality of Rotavirus Disease. *Pediatr Infect Dis.* 2014;32(4):e134–e147.
17. Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ.* 1990;68(2):171–7.
18. Ghoshal V, Das RR, Nayak MK, Singh S, Das P, Mohakud NK. Climatic Parameters and Rotavirus Diarrhea Among Hospitalized Children: A Study of Eastern India. *Front Pediatr.* 2020 Oct 30;8.
19. Arana A, Montes M, Jere KC, Alkorta M, Iturriza-Gómara M, Cilla G. Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015. *Infect Genet Evol.* 2016;44:137–44.
20. Amarilla AA, Espínola E, Galeano ME, Fariña N, Russomando G, Parra GI. Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. *Med Sci Monit.* 2007;13(7):17599029.
21. Hyser JM, Estes MK. Rotavirus Vaccines and Pathogenesis: 2008. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010;25(1):36–43.

22. Bwogi J, Jere KC, Karamagi C, Byarugaba DK, Namuwulya P, Baliraine FN, et al. Whole genome analysis of selected human and animal rotaviruses identified in Uganda from 2012 to 2014 reveals complex genome reassortment events between human , bovine , caprine and porcine strains. 2017;1–23.
23. Heinimäki S, Tamminen K, Hytönen VP, Malm M, Blazevic V. Rotavirus Inner Capsid VP6 Acts as an Adjuvant in Formulations with Particulate Antigens Only. *Vaccines*. 2020 Jul 7;8(3):365.
24. Caddy SL, Vaysburd M, Wing M, Foss S, Andersen JT, O'Connell K, et al. Intracellular neutralisation of rotavirus by VP6-specific IgG. *PLoS Pathog*. 2020;16(8):1–18.
25. Heiman EM, McDonald SM, Barro M, Taraporewala ZF, Bar-Magen T, Patton JT. Group A Human Rotavirus Genomics: Evidence that Gene Constellations Are Influenced by Viral Protein Interactions. *J Virol*. 2008;82(22):11106–16.
26. Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus Antigens. In 1994. p. 179–227.
27. Mackow ER, Shaw RD, Matsui SM, Vo PT, Benfield DA, Greenberg HB. Characterization of homotypic and heterotypic VP7 neutralization sites of rhesus rotavirus. *Virology*. 1988;165(2):511–7.
28. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(6):1365–73.
29. Dormitzer PR, Greenberg HB, Harrison SC. Purified Recombinant Rotavirus VP7 Forms Soluble, Calcium-Dependent Trimers. *Virology*. 2000 Nov;277(2):420–8.
30. Dormitzer PR, Nason EB, Venkataram Prasad B V., Harrison SC. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature*. 2004 Aug;430(7003):1053–8.
31. Fauquet C, International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses; 8th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York:

Elsevier/Academic Press; 2005. 485 p.

32. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3.
33. Magaly Martínez GIP, Postgrado GR. Tesis Doctoral Análisis de los cambios genéticos como mecanismos utilizados por los rotavirus para persistir en poblaciones humanas. CONACYT. Universidad Nacional de Asunción; 2018.
34. World Health Organization. Manual of rotavirus detection and characterization methods. 2009. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70122>
35. McDonald SM, Aguayo D, Gonzalez-Nilo FD, Patton JT. Shared and Group-Specific Features of the Rotavirus RNA Polymerase Reveal Potential Determinants of Gene Reassortment Restriction. *J Virol.* 2009;83(12):6135–48.
36. Patton JT. Rotavirus Diversity and Evolution in the Post-Vaccine World. *Discov Med.* 2013;13(68):85–97.
37. Matthijnssens J et al. Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 2011;156(8):1397–413.
38. Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):426–33.
39. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, et al. Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *J Virol.* 2008;82(7):3204–19.
40. Sadiq A, Bostan N, Yinda KC, Naseem S, Sattar S. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Rev Med Virol.* 2018;28(6):1–13.
41. Donato CM, Bines JE. Rotaviruses and Rotavirus Vaccines. *Pathogens* [Internet]. 2021 Jul 29;10(8):959.
42. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al.

- Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990;28(2):276–82.
43. Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Estes MK, Gentsch JR, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008;153(8):1621–9.
 44. Maes P, Matthijnssens J, Rahman M, Van Ranst M. RotaC: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 2009;9:2–5.
 45. Matthijnssens J, Taraporewala ZF, Yang H, Rao S, Yuan L, Cao D, et al. Simian Rotaviruses Possess Divergent Gene Constellations That Originated from Interspecies Transmission and Reassortment. *J Virol.* 2010;84(4):2013–26.
 46. Leclair CE, Budh DP, Hospital LB. Rotavirus Pathophysiology. Vol. StatPearls, NCBI Bookshelf. 2021. 1–7 p.
 47. Comité Asesor de Vacunas de la AEP. Rotavirus. MANUAL DE VACUNAS EN LÍNEA DE LA AEP. 2021. Available from: <https://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-35>
 48. L.Svensson, U.Desselberger, M. Estes, H.B. Greenberg. Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis. Vol. 1. ELSEVIER; 2016. 279–295 p.
 49. Kim KG, Kee HY, Park HJ, Chung JK, Kim TS, Kim MJ. The long-term impact of rotavirus vaccines in Korea, 2008–2020; emergence of G8P[8] strain. *Vaccines.* 2021;9(4).
 50. J. I. Degiuseppe, J. A. Stupka, G. I. Parra. Human Virology in Latin America: From Biology to Control. Chapter 5 Molecular Epidemiology of Human Rotaviruses in Latin America. J.E. Ludert, F. H. Pujol, J. Arbiza, editors. Vol. 1. SPRINGER NATURE; 2017. 63–65 p.
 51. McDonald SM, McKell AO, Rippinger CM, McAllen JK, Akopov A, Kirkness EF, et al. Diversity and Relationships of Cocirculating Modern Human Rotaviruses Revealed Using Large-Scale Comparative Genomics. *J*

- Viol. 2012;86(17):9148–62.
52. Miño S, Barrandeguy M, Parreño V, Parra GI. Genetic linkage of capsid protein-encoding RNA segments in group A equine rotaviruses. *J Gen Virol.* 2016;97(4):912–21.
 53. Donker NC, Kirkwood CD. Selection and evolutionary analysis in the nonstructural protein NSP2 of rotavirus A. *Infect Genet Evol.* 2012;12(7):1355–61.
 54. Kirkwood CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: Potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis.* 2010;202(SUPPL. 1).
 55. Aida S, Nahar S, Paul SK, Hossain MA, Kabir MR, Sarkar SR, et al. Whole genomic analysis of G2P[4] human Rotaviruses in Mymensingh, north-central Bangladesh. *Heliyon.* 2016;2(9).
 56. Uprety T, Wang D, Li F. Recent advances in rotavirus reverse genetics and its utilization in basic research and vaccine development. *Arch Virol.* 2021;166(9):2369–86.
 57. Martinez M, Galeano ME, Akopov A, Palacios R, Russomando G, Kirkness EF, et al. Whole-genome analyses reveals the animal origin of a rotavirus G4P[6] detected in a child with severe diarrhea. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014;27:156–62.
 58. Jain S, Vashist J, Changotra H. Rotaviruses: Is their surveillance needed? *Vaccine.* 2014;32(27):3367–78.
 59. Vesikari T. Rotavirus vaccination: A concise review. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(SUPPL. 5):57–63.
 60. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis.* 1996;174(SUPPL. 1):65–72.
 61. Yih WK, Lieu TA, Kulldorff M, Martin D, McMahonill-Walraven CN, Platt R, et al. Intussusception Risk after Rotavirus Vaccination in U.S. Infants. *N Engl*

- J Med. 2014;370(6):503–12.
62. Rha B, Tate JE, Weintraub E, Haber P, Yen C, Patel M, et al. Intussusception following rotavirus vaccination: An updated review of the available evidence. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(11):1339–48.
 63. Armah GE, Kapikian AZ, Vesikari T, Cunliffe N, Jacobson RM, Burlington DB, et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of two doses of a tetravalent rotavirus vaccine RRV-TV in Ghana with the first dose administered during the neonatal period. *J Infect Dis*. 2013;208(3):423–31.
 64. WHO | PATH. India-made rotavirus vaccine achieves World Health Organization prequalification. Available from: <https://www.path.org/media-center/india-made-rotavirus-vaccine-achieves-world-health-organization-prequalification/>
 65. Burke RM, Tate JE, Kirkwood CD, Steele AD, Parashar UD. Current and new rotavirus vaccines. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(5):435–44.
 66. Chavers T, De Oliveira LH, Parashar UD, Tate JE. Post-licensure experience with rotavirus vaccination in Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Vaccines*. 2018;17(11):1037–51.
 67. Khandoker N, Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Nishimura S, Kikuta H, et al. Molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis in Japan during 2014-2015: Characterization of re-emerging G2P[4] after rotavirus vaccine introduction. *J Med Virol*. 2018;90(6):1040–6.
 68. Desselberger U. Reverse genetics of rotavirus. *PNAS*. 2017;114(9):2106–8.
 69. VIEW-hub by IVAC. Global Introduction Status | Rota Council [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 2]. Available from: <https://preventrotavirus.org/vaccine-introduction/global-introduction-status/>
 70. Ogden KM, Tan Y, Akopov A, Stewart LS, McHenry R, Fonnesbeck CJ, et al. Multiple Introductions and Antigenic Mismatch with Vaccines May Contribute to Increased Predominance of G12P[8] Rotaviruses in the United States. *J Virol*. 2019;93(1).

71. Zeller M, Patton JT, Heylen E, De Coster S, Ciarlet M, Van Ranst M, et al. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in rotarix and RotaTeq. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):966–76.
72. Curns AT, Steiner CA, Barrett M, Hunter K, Wilson E, Parashar UD. Reduction in Acute Gastroenteritis Hospitalizations among US Children After Introduction of Rotavirus Vaccine : Analysis of Hospital Discharge Data from 18 US States. *J Infect Dis*. 2010;30329(11):1617–24.
73. Buttery JP, Lambert SB, Bs MB, Grimwood K, Nissen MD, Field EJ, et al. Reduction in Rotavirus-associated Acute Gastroenteritis Following Introduction of Rotavirus Vaccine Into Australia ' s National Childhood Vaccine Schedule. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1):25–9.
74. Jonesteller CL, Burnett E, Yen C, Tate JE, Parashar UD. Effectiveness of rotavirus vaccination: A systematic review of the first decade of global postlicensure data, 2006-2016. *Clin Infect Dis*. 2017;65(5):840–50.
75. Neuzil KM, Zaman K, Victor JC. A proposed framework for evaluating and comparing efficacy estimates in clinical trials of new rotavirus vaccines. *Vaccine* [Internet]. 2014;32(S1):A179–84.
76. Degiuseppe JI, Stupka JA. Genotype distribution of Group A rotavirus in children before and after massive vaccination in Latin America and the Caribbean: Systematic review. *Vaccine*. 2020;38(4):733–40.
77. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/ genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine Norma. *Rev Med Virol*. 2005;15:29–56.
78. Damanka S, Lartey B, Agbemabiese C, Dennis FE, Adiku T, Nyarko K, et al. Detection of the first G6P[14] human rotavirus strain in an infant with diarrhoea in Ghana. *Virol J* [Internet]. 2016;13(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0643-y>
79. Zeev NB, Kapanda L, Tate JE, Jere KC, Itu. Effectiveness of a monovalent rotavirus vaccine in infants in Malawi after programmatic roll-out: an

- observational and case-control study. *Lancet Infect Dis.* 2015;14:422–8.
80. Groome MJ, Page N, Cortese MM, Moyes J, Zar HJ, Kapongo CN, et al. Effectiveness of monovalent human rotavirus vaccine against admission to hospital for acute rotavirus diarrhoea in South African children: A case-control study. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(11):1096–104.
 81. Martinez M, Phan TG, Galeano ME, Russomando G, Parreno V, Delwart E, et al. Genomic characterization of a rotavirus G8P[1] detected in a child with diarrhea reveal direct animal-to-human transmission. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014;27:402–7.
 82. Martínez M, Amarilla AA, Galeano ME, Aquino VH, Fariña N, Russomando G, et al. Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asunción, Paraguay, 2006-2007. *Arch Virol.* 2010;155(4):525–33.
 83. MSPBS-Paraguay. Coberturas de Vacunación – Programa Ampliado de Inmunizaciones – PAI [Internet]. [cited 2021 Oct 27]. Available from: <https://pai.mspbs.gov.py/coberturas-de-vacunacion/>
 84. World Health Organization. Epidemiological Surveillance Indicators for Diseases Preventable by New Vaccines in Reporting Countries, Latin America and the Caribbean. Ctry reports to FPL-IM/PAHO. 2018;(August):2018.
 85. Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 1994;32(7):1820–2.
 86. Castello AA, Argüelles MH, Rota RP, Olthoff A, Jiang B, Glass RI, et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. *J Clin Microbiol.* 2006;44(6):2046–50.
 87. Kirkness E, Halpin RA, Akopov A, Fedorova N, Tsitritin T, Stockwell T, et al. Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/1388SR/2006/G2P[4] segment 9 capsid - Nucleotide - NCBI. 2014.
 88. Kirkness E, Halpin RA, Akopov A, Fedorova N, Tsitritin T, Stockwell T, et al. Rotavirus A strain RVA/Human-wt/PRY/1395SR/2006/G2P[4] segment 9

capsi - Nucleotide - NCBI . 2014

89. 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.
90. Mijatovic-Rustempasic S, Tam KI, Kerin TK, Lewis JM, Gautam R, Quaye O, et al. Sensitive and Specific Quantitative Detection of Rotavirus A by One-Step Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay without Antecedent Double-Stranded-RNA Denaturation. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2013 Sep;51(9):3047–54.
91. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *J Virol*. 1999;(41):95–8.
92. Pickett BE, Sadat EL, Zhang Y, Noronha JM, Squires RB, Hunt V, et al. ViPR: An open bioinformatics database and analysis resource for virology research. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(D1):593–8.
93. Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(SUPPL. 1):5–12.
94. Don Ho. Notepad++ [Internet]. [cited 2022 Feb 23]. Available from: <https://notepad-plus-plus.org/>
95. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*. 2018;20(4):1160–6.
96. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*. 2015;32(1):268–74.
97. BEAST. Software FigTree. [cited 2022 Feb 23]. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
98. Berman HM. The Protein Data Bank (PDB). *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Jan 1;28(1):235–42.

99. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* 2021 Jan 22;30(1):70–82.
100. Gutierrez MB, Fialho AM, Maranhão AG, Malta FC, de Andrade J da SR, de Assis RMS, et al. Rotavirus A in Brazil: Molecular epidemiology and surveillance during 2018–2019. *Pathogens.* 2020;9(7):1–15.
101. Degiuseppe JI, Stupka JA. Emergence of unusual rotavirus G9P[4] and G8P[8] strains during post vaccination surveillance in Argentina, 2017–2018. *Infect Genet Evol.* 2021 Sep;93:104940.
102. Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol.* 2010;27(10):2431–6.
103. 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.* 2020;38(2):323–9.
104. Degiuseppe JI, Stupka JA. First assessment of all-cause acute diarrhoea and rotavirus-confirmed cases following massive vaccination in Argentina. *Epidemiol Infect.* 2018;146(15):1948–54.
105. Matthijnssens J, Nakagomi O, Kirkwood CD, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M. Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? *Expert Rev Vaccines.* 2012;11(11):1347–54.
106. Martínez M, Amarilla AA, Galeano ME, Aquino VH, Fariña N, Russomando G, et al. Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asunción, Paraguay, 2006–2007. *Arch Virol.* 2010 Apr 7;155(4):525–33.
107. Malik YS, Kumar N, Sharma K, Saurabh S, Dhama K, Prasad M, et al. Multispecies reassortant bovine rotavirus strain carries a novel simian G3-like VP7 genotype. *Infect Genet Evol.* 2016;41:63–72.
108. Nemoto M, Nagai M, Tsunemitsu H, Omatsu T, Furuya T, Shirai J, et al.

- Whole-genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s and 2009-2010. *Arch Virol*. 2015;160(5):1171–9.
109. Cowley D, Donato CM, Roczo-Farkas S, Kirkwood CD. Emergence of a novel equine-like G3P[8] intergenogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J Gen Virol*. 2016;97(2):403–10.
 110. Dóró R, Marton S, Bartókné AH, Lengyel G, Agócs Z, Jakab F, et al. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 -is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2016;63(2):243–55.
 111. Guerra SFS, Soares LS, Lobo PS, Penha Júnior ET, Sousa Júnior EC, Bezerra DAM, et al. Detection of a novel equine-like G3 rotavirus associated with acute gastroenteritis in Brazil. *J Gen Virol*. 2016;97(12):3131–8.
 112. Komoto S, Ide T, Negoro M, Tanaka T, Asada K, Umemoto M, et al. Characterization of unusual DS-1-like G3P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Japan. *J Med Virol*. 2018;90(5):890–8.
 113. Malasao R, Saito M, Suzuki A, Imagawa T, Nukiwa-Soma N, Tohma K, et al. Human G3P[4] rotavirus obtained in Japan, 2013, possibly emerged through a human–equine rotavirus reassortment event. *Virus Genes* [Internet]. 2015 Feb;50(1):129–33.
 114. Trask SD, Ogden KM, Patton JT. Interactions among capsid proteins orchestrate rotavirus particle functions. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2012;2(4):373–9.
 115. Chen JZ, Settembre EC, Aoki ST, Zhang X, Bellamy AR, Dormitzer PR, et al. Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(26):10644–8.
 116. Hungerford D, Iturriza-Gómara M. EuroRotaNet: Annual report 2016. 2017;(June).
 117. Wu F-T, Bányai K, Jiang B, Liu LT-C, Marton S, Huang Y-C, et al. Novel G9 rotavirus strains co-circulate in children and pigs, Taiwan. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Feb 18;7(1):40731.

118. Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect Genet Evol.* 2007;7(5):656–63.
119. Gerna G, Sarasini A, Parea M, Arista S, Miranda P, Brussow H, et al. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. *J Clin Microbiol.* 1992;30(1):9–16.
120. Bányai K, Gentsch JR, Glass RI, Szucs G. Detection of human rotavirus serotype G6 in Hungary. *Epidemiol Infect.* 2003;130(1):107–12.
121. Palombo EA, Bishop RF. Genetic and antigenic characterization of a serotype G6 human rotavirus isolated in Melbourne, Australia. *J Med Virol.* 1995;47(4):348–54.
122. Griffin DD, Nakagomi T, Hoshino Y, Nakagomi O, Kirkwood CD, Parashar UD, et al. Characterization of Nontypeable Rotavirus Strains from the United States: Identification of a New Rotavirus Reassortant (P2A[6],G12) and Rare P3[9] Strains Related to Bovine Rotaviruses. *Virology.* 2002 Mar;294(2):256–69. 9
123. Kelkar SD, Ayachit VL. Circulation of group A rotavirus subgroups and serotypes in Pune, India, 1990-1997. *J Health Popul Nutr.* 2000;18(3):163–70.
124. Matthijnssens J, Rahman M, van Ranst M. Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin. *J Gen Virol.* 2008;89(10):2630–5.
125. Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect.* 2011;139(6):895–909.
126. Akane Y, Tsugawa T, Fujii Y, Honjo S, Kondo K, Nakata S, et al. Molecular and clinical characterization of the equine-like G3 rotavirus that caused the first outbreak in Japan, 2016. *J Gen Virol.* 2021 Feb 15;102(3):001548.
127. Hoa-Tran TN, Nakagomi T, Vu HM, Nguyen TTT, Takemura T, Hasebe F, et al. Detection of three independently-generated DS-1-like G9P[8] reassortant

- rotavirus A strains during the G9P[8] dominance in Vietnam, 2016–2018. *Infect Genet Evol.* 2020;80(1):104194.
128. Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Sinchai P, Upachai S, et al. Full Genome Characterization of Novel DS-1-Like G8P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Thailand: Reassortment of Bovine and Human Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like Intergenogroup Reassortant Strains. *PLoS One.* 2016;11(11):1–25.
 129. Tate JE, Haynes A, Payne DC, Cortese MM, Lopman BA, Patel MM, et al. Trends in national rotavirus activity before and after introduction of rotavirus vaccine into the national immunization program in the United States, 2000 to 2012. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(7):741–4.
 130. Candia N, Parra GI, Chirico M, Velázquez G, Farina N, Laspina F, et al. Acute diarrhea in Paraguayan children population: Detection of rotavirus electropherotypes. *Acta Virol.* 2003;47(3):137–40.
 131. Carvalho-Costa FA, De Assis RMS, Fialho AM, Araújo IT, Silva MF, Gómez MM, et al. The evolving epidemiology of rotavirus A infection in Brazil a decade after the introduction of universal vaccination with Rotarix®. *BMC Pediatr.* 2019;19(1):1–10.
 132. Hull JJ, Teel EN, Kerin TK, Freeman MM, Esona MD, Gentsch JR, et al. United States rotavirus strain surveillance from 2005 to 2008: Genotype prevalence before and after vaccine introduction. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(SUPPL. 1):42–7.
 133. Samdan A, Ganbold S, Guntev O, Orosoo S, Javzandorj N, Gongor A, et al. Hospital-based surveillance for rotavirus diarrhea in Ulaanbaatar, Mongolia, April 2009 through March 2016. *Vaccine [Internet].* 2018;36(51):7883–7.
 134. Huyen DTT, Hong DT, Trung NT, Hoa TTN, Oanh NK, Thang HV, et al. Epidemiology of acute diarrhea caused by rotavirus in sentinel surveillance sites of Vietnam, 2012–2015. *Vaccine.* 2018;36(51):7894–900.
 135. Burnett E, Lopman BA, Parashar UD. Potential for a booster dose of rotavirus vaccine to further reduce diarrhea mortality. *Vaccine.* 2017;35(51):7198–203.

8. ANEXO

ANEXO 1: Tabla de numeros de pruebas desde el 2002 al 2019

Año	Muestras Positivas	Muestras Negativas	Total	%Positivas
2002	39	82	121	32%
2003	158	311	469	34%
2004	75	329	404	19%
2005	170	424	594	29%
2006	156	699	855	18%
2007	173	1460	1633	11%
2008	225	662	887	25%
2009	132	914	1046	13%
2010	11	89	100	11%
2011	52	392	444	12%
2012	57	845	902	6%
2013	81	948	1029	8%
2014	76	1341	1417	5%
2015	250	1287	1537	16%
2016	145	1477	1622	9%
2018	82	1165	1247	7%
2019	114	1231	1345	8%

ANEXO 2: Clasificación Binaria de Genotipos Circulantes en 2015, 2016, 2018 y 2019.

	2015		2016		2018		2019	
	Nro	%	Nro	%	Nro	%	Nro	%
G1P[8]	1	2	0	0	4	8	0	0
G2P[8]	0	0	1	1	3	6	0	0
G2P[4]	0	0	2	3	0	0	0	0
G2P[9]	0	0	0	0	1	2	0	0
G3P[8]	34	72	0	0	15	29	3	9
G6P[8]	0	0	0	0	6	12	21	62
G9P[8]	1	2	50	72	5	10	0	0
G12P[8]	11	23	1	1	0	0	1	3
G12P[9]	0	0	0	0	0	0	1	3
GxP[8]	0	0	15	22	1	2	1	3
Co-infecciones								
G2P[4]+P[8]	0	0	0	0	3	6	0	0
G3P[8]+P[4]	0	0	0	0	10	19	0	0
G3P[8]+G1	0	0	0	0	1	2	0	0
G3P[8]+G4	0	0	0	0	1	2	0	0
G3P[8]+G9	0	0	0	0	1	2	0	0
G3P[8]+G12	0	0	0	0	0	0	1	3
G6P[8]+P[4]	0	0	0	0	0	0	3	9
G9P[8]+G4	0	0	0	0	1	2	0	0
G12P[8]+G9	0	0	0	0	0	0	1	3
GxP[4]+P[9]	0	0	0	0	0	0	1	3
GxP[9]+P[6]	0	0	0	0	0	0	1	3
TOTAL	47		69		52		34	

ANEXO 3: Lista de secuencias utilizada para realizar los arboles filogenéticos de los diferentes genotipos de rotavirus.

	Lista de secuencias para alineamientos				
	ACCN - Genbank				
	VP7-G9	VP7-G3	VP7-G6	VP7-G12	VP4-P[8]
1	AB848997	KT694944	MT386422	MF580639	KJ627153
2	AB905463	JQ069506	MT386421	KP732452	KJ627038
3	AB905464	JQ069506	MT386420	KT025868	KJ626618
4	AB905466	KF371986	MT386419	KX574275	KJ627118
5	AF260959	KT919067	MN615836	KP882230	KJ627119
6	AF501578	KF371878	KM590367	AB861961	KJ626527
7	AF529869	MF469098	KM590371	KF907303	KJ626849
8	AF529872	MF469162	KM590373	KP732446	KJ626850
9	AY629560	LC477355	KM590372	KP732448	KJ627014
10	D38055	JF491055	KM590370	JX273721	KJ627050
11	DQ096288	KY418051	KM590368	MG557583	KJ626908
12	DQ096289	KF372019	KM590369	KU048649	KJ627130
13	DQ096290	JX088017	KM590366	KU097002	KJ626821
14	DQ096291	JQ069458	KX880436	KP881911	KJ626674
15	DQ096292	GU393006	JX271006	KJ870868	KJ626630
16	DQ096293	GQ282614	JF793943	KT025861	KJ626663
17	DQ096294	GQ282613	EF554087	JX273710	KJ626885
18	DQ321495	JQ069469	JN116527	KP732443	KJ626505
19	DQ321497	KF006857	JN116532	MG602303	KJ627027
20	DQ490173	LC172437	MG602315	KU360948	KJ627068
21	EF059922	JX088016	MG602326	MG602291	KJ626596
22	EF672623	KF371867	MG602314	KP119464	KJ626707
23	EF990708	MG816525	JX154492	JN706554	KJ626788
24	EU753963	KF372008	JX154496	KU048638	KJ626550
25	EU753971	KJ919899	JX154526	KP732442	KJ626551
26	EU839929	MN106112	JX154497	KU097005	KJ626743
27	EU839931	MG816526	JX154483	EU496258	KJ626765
28	EU839936	KF371942	JX154523	KT025866	KJ626696
29	EU839936	LC172349	MG602298	KU048646	KJ627103
30	EU839938	LC172317	JN116530	KU097003	KJ626930
31	EU839940	KJ454515	JN116526	KM245611	KJ626979
32	EU839941	KJ454455	JN116531	KF907305	KJ626799
33	FJ183360	KJ454517	JX154527	MF580637	KJ626641
34	FJ361209	MK043942	JX154495	KX574273	KJ626538

35	GQ229050	KJ454454	JX154487	MG602302	KJ627081
36	GQ229051	JQ069464	JX154484	KJ870794	KJ626919
37	GQ229052	KJ454505	JX154499	MG602312	KJ626685
38	GQ229053	KJ454500	JX154513	KJ870874	KJ626562
39	GQ229054	KJ454510	MG602306	MF580644	KJ626777
40	GQ869841	AB525799	MG602320	KU360950	KJ626731
41	GQ869842	AB525797	MG602311	KU360949	KJ626652
42	GQ869843	AB525798	JN116529	KF920568	KJ626516
43	GQ996900	KF371713	JN116528	EU496255	KJ626968
44	GQ996914	JQ069480	JN116533	JN706565	KJ627164
45	GQ996924	KF371975	JX154525	KP119465	KJ626585
46	GU377148	EU708579	JF793942	MG602308	KJ626862
47	GU377164	GQ452925	JF793946	KY198341	KJ626718
48	GU392976	GQ452924	JF793945	KJ870836	KJ626832
49	GU392978	GQ452923	EF554120	JX273709	KJ626607
50	GU392986	FJ915079	KC819342	KU048654	KJ626754
51	GU393002	GQ117006	KF414563	KM068237	KJ626573
52	HM534680	KU973952	JX008866	KY198347	KJ626874
53	HM773587	GU985259	KU714460	KT025867	KJ627141
54	HM773598	FJ447568	KC986967	KU048641	KJ626941
55	HM773598	JQ069459	KJ753685	DQ490556	KJ627001
56	HM773609	JF490913	KP752882	KU048651	KJ626896
57	HM773620	KT988218	JX470515	KX574283	KJ626956
58	HM773631	KF371931	JX470516	KJ870808	KJ627092
59	HM773642	KJ753186	JX131338	KU360953	KJ626990
60	HQ127445	JN706297	AB625621	KY198332	KJ559392
61	HQ127446	JN706296	AB625623	AB861950	KJ559196
62	HQ392002	EU708578	AB625622	KX574276	KJ559129
63	HQ702215	GU985262	AB625625	MG676190	KJ559279
64	HQ702215	JN706306	MH140443	KY688162	KJ559280
65	HQ702226	JN706307	MH140438	KP732449	KJ559370
66	HQ702226	KF371812	MH140445	KF920573	KJ559263
67	HQ702237	KF371790	MH140448	MF580645	KJ559326
68	HQ702237	KJ753440	MH140447	KX574278	KJ559293
69	HQ702248	LC325471	AB625619	KF907302	KJ559207
70	HQ702248	KF371757	MH140441	KU097008	KJ559359
71	HQ702259	KU059799	MH140437	KY688168	KJ559348
72	JF521469	AB527010	KC895794	MF580638	KJ559337
73	JF521480	HQ425285	KC895786	KJ870871	KJ559229
74	JF521480	AB527008	KC678693	MG602295	KJ626707

75	JF766583	GU985261	KC678695	KP732455	KJ559304
76	JF766594	HQ425284	KC678696	KT025859	KJ412680
77	JF766605	JN706325	KC895778	MG602313	KJ412601
78	JF813102	JN706294	MG452930	MG602293	KJ412578
79	JF813106	HQ425280	MG452929	MH382840	KJ412534
80	JN001865	DQ873678	MG452928	MG602305	KJ412844
81	JN377704	DQ873671	MG452926	KJ870831	KJ412713
82	JN377706	JQ043266	KX121167	MH382866	KJ412647
83	JN377709	GU985254	KX121170	EU496259	KJ412735
84	JN591406	JX470505	KX121174	KU048656	KJ412702
85	JN605409	JN706304	KX121171	KJ870824	KJ412778
86	JN605420	JN706295	KX121169	KY198344	KJ412545
87	JN605431	GU985263	KX121166	LC019068	KJ412556
88	JN605442	JF490990	KX121165	HQ657165	KJ412589
89	JN605453	HM773730	KX121168	KM068246	KJ412658
90	JN706561	KF371823	MG452923	KU048652	KJ412833
91	JN706562	JQ069526	MG452921	MG557584	KJ412612
92	JN849128	JQ069523	KC895784	JX986579	KJ412789
93	JN849132	JN258362	GU259589	KU048648	KJ412691
94	JN849142	HM773664	FJ495133	KP732444	KJ412746
95	JQ253563	AB585924	GU937882	KX574282	KJ412897
96	JQ253564	KT988185	GU937889	KP732450	KJ412634
97	JQ253565	KT988174	GU937891	KY198333	KJ412669
98	JQ253566	AB585928	JX442784	KT025864	KJ412767
99	JQ253567	JX088014	JX442777	KF920572	KJ412523
100	JQ253568	KF018790	JX442766	KX574279	KJ412789
101	JQ253569	KC689824	JX442787	KU360947	KJ412567
102	JQ253570	KC822929	EF199507	KP881900	KJ412885
103	JQ837881	KC689827	EF199501	KU048639	KJ412800
104	JQ993318	MG652301	JX442764	KJ870790	KJ412822
105	JX185763	GU377169	FJ598310	JN706563	KJ412623
106	JX195068	GU138222	JF411748	KU048657	KJ412909
107	JX195079	JX470506	JF411746	KF920565	KJ412855
108	JX195090	JF491066	JF411751	HQ657154	KJ412680
109	JX273705	AB527009	JF411750	KY198349	KJ626550
110	JX273708	GU985256	JF411747	KY198336	KJ626551
111	KC215567	AB527006	JF411749	KP732451	KJ626956
112	KC215578	EU708582	JX273726	KF907304	KJ412724
113	KC242226	EU708583	JX273728	KU097004	KJ412872
114	KC687065	HQ230033	KC895771	KP881933	KJ412811

115	KC687066	HQ230032	KC895765	KU097006	LC477408
116	KC687067	KT007625	KC895763	MG602325	MT410498
117	KC687068	KT007637	KC895766	KU360951	LC477399
118	KC687069	KT007572	KC895768	MG602297	MT410487
119	KC687070	KX362815	KC895761	KP732453	MT410476
120	KC687071	KC689818	KC895757	MG602301	LC477397
121	KC762219	JN706360	KC895764	MG602310	LC477398
122	KC762220	JN706355	KC895773	MG602307	LC477401
123	KC762222	JN706352	KC895776	KJ870916	MW254176
124	KC782524	KT007563	KC895774	FJ747630	MW254175
125	KC896143	JN706347	KC895772	KY198340	MW254173
126	KF006873	KT007628	KC895755	KU048643	MW254174
127	KF006874	KT007632	KC895760	KU048655	MW254177
128	KF414565	JN706353	KJ482514	KP119466	MW254179
129	KF414568	KT988163	KC815663	KY198339	MW254178
130	KF414569	JN706367	HE646656	EU496256	LC491560
131	KF414570	JN706335	HE646643	KY198346	LC477402
132	KF414571	JN706373	MG452894	KU048650	LC477403
133	KF636294	JN706371	HE646655	MG557582	MN106121
134	KF636305	JN706372	HE646654	MG676196	MN106123
135	KF648937	JN706378	GU259586	KM068217	MN106122
136	KF648938_	JN706567	HE646653	KX574280	LC477407
137	KF812604	JN706566	JN410628	KF907301	MN106119
138	KF812605	JN706326	JN410621	MG602292	MN106120
139	KF812606	JN706333	JN410624	KM245613	LC477404
140	KF812607	JX088009	HE646642	KT025860	LC477409
141	KF812608	JN706338	HE646652	KY688161	MW558495
142	KF812609	JN706364	HE646646	KF920570	LC514495
143	KF812610	JN706365	GU259584	KP881966	LC491463
144	KF812611	JN706313	HE646644	KJ870869	LC477396
145	KJ094942	JN706317	HE646648	KU097007	MN577176
146	KJ094943	JN706316	HE646645	KP732456	LC491539
147	KJ094944	JN706314	HE646641	MF580640	LC477400
148	KJ094945	JN706312	HE646650	KU048642	MT300315
149	KJ094946	JN706375	GU259583	KJ870870	MK417780
150	KJ412525	JN706320	JX470519	KP119467	MK417781
151	KJ412558	JX088012	JX470523	KU048640	LC430883
152	KJ412614	HQ537521	EU873015	KY198334	LC430884
153	KJ412636	HQ738583	EU873014	KU360946	MN414261
154	KJ412660	JN706359	GU183211	KU048653	MN414262

155	KJ412671	KT007631	KF636261	KU048647	MN414267
156	KJ412758	JN706293	JN831236	KP732445	MN414268
157	KJ412769	GU598248	MG452886	KX574274	MN414263
158	KJ412791	JN706330	MG452888	KX574281	MN414264
159	KJ412835	JQ069524	MG452897	DQ490550	MN414265
160	KJ432722	KF006856	MG452878	KT025863	MN414266
161	KJ432723	KC689823	MG452883	KP732447	MN577164
162	KJ432725	JF491001	MG452890	MF673457	MN577148
163	KJ432726	JF790316	JQ943566	MF580641	MT386439
164	KJ454448	JF491105	JQ943557	KM245612	MT386437
165	KJ454449	JF491025	JQ943565	KY198342	MT386438
166	KJ454450	JF491122	JQ943567	KU048658	MT386440
167	KJ454451	HM773697	JQ943560	EU496254	LC514550
168	KJ454452	KU973946	JQ943562	KC484726	MT005301
169	KJ454457	HQ425279	JQ943559	MG602299	
170	KJ454458	GU377144	JQ943563	MG602309	
171	KJ454459	AB585927	JQ943558	JN706564	
172	KJ454460	GU985251	MG452904	JN711097	
173	KJ454461	JQ069475	MG452891	KY198348	
174	KJ454462	KF371997	JN410629	KY198337	
175	KJ454463	AB585929	KF537257	KU048645	
176	KJ454464	KU059801	KF537255		
177	KJ454465	KF680466	MG452884		
178	KJ454466	AB525800	MG452882		
179	KJ454467	JQ069501	MG452900		
180	KJ454468	EU708584	MG452889		
181	KJ454469	GQ452929	MG452901		
182	KJ454470	KT988251	MG452873		
183	KJ454471	KU059802	MG452880		
184	KJ454472	HM773719	MG452881		
185	KJ454473	KJ560460	MG452879		
186	KJ454475	KT921118	MG452906		
187	KJ454476	KT921019	MG452862		
188	KJ454477	KJ560470	MG452875		
189	KJ454478	KT920887	KX121172		
190	KJ454479	GQ452928	KX121173		
191	KJ454480	LC056795	JX131342		
192	KJ454481	MN551992	JX131340		
193	KJ454482	KJ751773	JX131339		
194	KJ454483	KF371779	JX131337		

195	KJ454484	JN129124	FJ598309		
196	KJ454485	JN129122	KT694944		
197	KJ454486	KC689819			
198	KJ454487	JN706310			
199	KJ454488	KT988229			
200	KJ454489	MH382862			
201	KJ454490	MK050161			
202	KJ454491	MH382860			
203	KJ454492	MH382848			
204	KJ454494	JN706328			
205	KJ454495	JN706323			
206	KJ454496	JQ358764			
207	KJ454497	FJ747619			
208	KJ454498	JN706334			
209	KJ454499	MH182445			
210	KJ559350	MH182446			
211	KJ626507	MK370887			
212	KJ626518	MF621175			
213	KJ626540	MF563894			
214	KJ626587	MF563898			
215	KJ626632	MF563890			
216	KJ626643	MF621177			
217	KJ626654	LC477363			
218	KJ626665	MN414258			
219	KJ626676	MN414254			
220	KJ626687	MF621176			
221	KJ626801	MH712892			
222	KJ626812	MH712889			
223	KJ626823	MF563916			
224	KJ626876	FJ947216			
225	KJ626887	LC482502			
226	KJ626910	FJ947238			
227	KJ626921	FJ947293			
228	KJ626992	FJ947227			
229	KJ627029	FJ947425			
230	KJ627052	FJ947878			
231	KJ627094	FJ947249			
232	KJ627132	FJ947315			
233	KJ627143	KC579965			
234	KJ751663	FJ998278			

235	KJ751674	JF460839			
236	KJ751707	KM660408			
237	KJ751762	KM660412			
238	KJ751817	KJ752100			
239	KJ751965	KP188813			
240	KJ751987	KJ560451			
241	KJ752111	KJ560444			
242	KJ752221	KX655478			
243	KJ752254	KX632281			
244	KJ752300	KP882593			
245	KJ752513	KP882461			
246	KJ752689	KP882571			
247	KJ752797	LC406802			
248	KJ752941	MH291293			
249	KJ753134	MH291298			
250	KJ753315	KJ751894			
251	KJ753373	KJ752188			
252	KJ753473	LC434537			
253	KJ753484	MH382850			
254	KJ753539	MN029131			
255	KJ820885	MH291297			
256	KJ919848	KX632336			
257	KJ919851	KM660409			
258	KJ919852	KJ583201			
259	KM008658	KJ583190			
260	KM008660	FJ947757			
261	KM008665	FJ947746			
262	KM581032	FJ947205			
263	KM581036	FJ947304			
264	KM581038	FJ947370			
265	KM581039	FJ947194			
266	KP013529	FJ947348			
267	KP013540	FJ947768			
268	KP013545	FJ947403			
269	KP013546	FJ947381			
270	KP013547	FJ947779			
271	KP013553	FJ947801			
272	KP222830	FJ947469			
273	KP222836	LC438915			
274	KP752465	LC438916			

275	KP752521	GQ996896			
276	KP752642	MF621173			
277	KP753098	MF621174			
278	KP881999	KJ751729			
279	KP882021	MF563907			
280	KP882032	KT007561			
281	KP883209	GU296431			
282	KP941126	KF500524			
283	KT007646	JX088008			
284	KT919508	JX088021			
285	KU243681	KF018794			
286	KU363149	MN029120			
287	KU532205	JX946173			
288	KU532206	KT007560			
289	KU532207	LC433677			
290	KU532208	KR262157			
291	KU532209	GU296430			
292	KU532210	KJ919864			
293	KU532211	AB585923			
294	KU532212	JN706555			
295	KU532214	KF202506			
296	KU532215	EU708588			
297	KU532218	KJ187604			
298	KU532219	LC328182			
299	KU738603	LC328183			
300	KU738604	GU377159			
301	KU740011	MF563923			
302	KU740013	MF346890			
303	KU740031	KX655444			
304	KX009887	KX655445			
305	KX009888	LC095877			
306	KX033672	MK597987			
307	KX033683	AY740736			
308	KX033684	AY456382			
309	KX536667	EU708906			
310	KX536668	EU708895			
311	KX536669	HQ661117			
312	KX545309	KF185108			
313	KX545327	KF360219			
314	KX632325	EU791924			

315	KX655511	KF690130			
316	KX673365	KU597744			
317	KX778607	JF742651			
318	KX778608	KU059782			
319	LC095899	KU059771			
320	LC105478	KU550297			
321	LC105489	LC490286			
322	LC190491	LC086730			
323	LC227987	KU870393			
324	LC227990	MF997040			
325	LC227991	LC434517			
326	LC227992	LC311227			
327	LC228408	MN203561			
328	MN552077	MH569775			
329	LC569531	LC477351			
330	LC569530	KU550295			
331	LC569529	LC490235			
332	LC569521	KX880414			
333	LC514541	LC434525			
334	LC514475	MN231001			
335	MK050184	LC434521			
336	LC514486	LC434524			
337	LC569526	KY000546			
338	MN921190	MF044158			
339	MN921192	MG652318			
340	MN921191	KY418050			
341	MN552087	MF093555			
342	LC477350	LC477366			
343	LC477354	MF044169			
344	MN552103	MH569777			
345	MN577084	MH569778			
346	MN552091	KU059793			
347	MN921188	LC260217			
348	LC491451	MG652321			
349	MN577090	MN230993			
350	MN577100	KX880425			
351	MT005292	LC260212			
352	MT005303	LC434520			
353	LC477371	LC260209			
354	LC514552	LC260214			

355	LC514497	LC434529			
356	LC491462	LC455759			
357	LC477367	LC490219			
358	LC477379	MF044125			
359	MN577087	MK690513			
360	LC477378	LC490221			
361	LC491559	MK690510			
362	LC477377	KX469404			
363	MN106113	KX469400			
364	MN106114	KY986432			
365	MN106115	LC490229			
366	MT107165	MH569774			
367	KT694944	MH569776			
368		LC434540			
369		LC260218			
370		LC386081			
371		LC477370			
372		MN230996			
373		MN577173			
374		LC490222			
375		MT063065			
376		MT063064			
377		MT386424			
378		MT386433			
379		KJ412888			
380		KJ412857			
381		KJ412749			
382		KJ412900			
383		HM627558			
384		MH769742			