

TESIS DOCTORAL



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública

**Epidemiología de la infección por rotavirus en Gipuzkoa
(1995 - 2015). Carga de la enfermedad y genotipos circulantes**

Ainara Arana Salaverría

Donostia – San Sebastián, 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Emilio Pérez-Trallero, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Donostia y Catedrático de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad del País Vasco, por darme oportunidad de realizar la presente Tesis Doctoral, por sus valiosos consejos y por ese enfoque diferente que le da un valor añadido a todos sus trabajos. Al Dr. Gustavo Cilla por su gran implicación, continuo apoyo e inestimable ayuda sin los cuales habría sido imposible la consecución de este trabajo. Siempre le agradeceré todo lo que me ha enseñado además del esfuerzo realizado para sacar tiempo de donde no tenía para solventar mis dudas y problemas.

A la Dra. Mila Montes por compartir conmigo su extenso conocimiento en técnicas de laboratorio y virología. Gracias por el asesoramiento y ayuda recibidos durante todos estos años y por la lectura crítica de este trabajo.

A mis compañeras y amigas del grupo de investigación, por acogerme como a una más desde el primer día y por los ánimos y consejos recibidos. En especial, a la Dra. María Fernández-Reyes y Esther Moreiro por cuidarme siempre tantísimo.

A las técnicas del coprocultivo y virología por ayudarme en todo lo que he necesitado y por estar siempre pendientes de mis muestras.

A todo el personal del Servicio de Microbiología por el cariño y ánimo recibido.

Y por último, a mi familia y amigos por su apoyo incondicional. En especial, a mis padres porque sin su ayuda y esfuerzo todo esto habría sido imposible. A mis hermanos y hermana por sus continuos ánimos y a Ibai por su comprensión e infinita paciencia demostrada durante todo este tiempo.

A todos, por todo, ¡muchísimas gracias!

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de rotavirus e importancia epidemiológica de la enfermedad	3
1.2 Antecedentes históricos de rotavirus	4
1.3 Estructura de rotavirus	6
1.4 Clasificación y diversidad de rotavirus	9
1.4.1 Grupos o especies de rotavirus	9
1.4.2 Sistema binario de genotipado de rotavirus (VP7 y VP4)	9
1.4.3 G-tipos de rotavirus identificados en humanos	10
1.4.4 Distribución global de genotipos de rotavirus.....	14
1.5 Clasificación del genoma completo de rotavirus (Constelaciones de genes) .	14
1.6 Patogénesis de rotavirus.....	17
1.7 Replicación de rotavirus.....	17
1.8 Mecanismos de evolución y diversidad de rotavirus	19
1.8.1 Mutaciones puntuales – <i>drift</i>	19
1.8.2 Reordenamiento genético - <i>reassortment</i>	20
1.8.3 Reorganización del genoma - <i>rearrangements</i> (concatenaciones y truncamientos de fragmentos genéticos).....	20
1.8.4 Transmisión interespecies	21
1.9 Transmisión de la infección por rotavirus.....	22
1.10 Enfermedad causada por rotavirus	23
1.11 Diagnóstico de laboratorio de la infección por rotavirus.....	24
1.12 Tratamiento de la enfermedad causada por rotavirus.....	24
1.13 Métodos de prevención frente a la enfermedad causada por rotavirus	24
1.14 Inmunidad protectora frente a la infección por rotavirus	24
1.15 Vacunas frente a rotavirus	25
1.15.1 Generalidades	25
1.15.2 Vacunas frente a rotavirus retiradas del mercado	26
1.15.3 Vacunas frente a rotavirus autorizadas y utilizadas a nivel internacional.....	27
1.15.4 Otras vacunas frente a rotavirus autorizadas en distintas naciones	32
1.15.5 Vacunas frente a rotavirus en estudio	33
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
2.1 Justificación	39
2.2 Hipótesis.....	39
2.3 Objetivo general	40
2.3.1 Objetivos específicos	40

3. MATERIAL Y MÉTODOS	41
3.1. Diseño del estudio	43
3.2. Área geográfica y población de estudio	43
3.2.1 Situación y clima	43
3.2.2 Población de Gipuzkoa	44
3.2.3 Organización Sanitaria de Gipuzkoa	45
3.2.4 Territorio en el que se ha realizado el estudio	46
3.3 Definición de algunos términos epidemiológicos empleados	47
3.4. Cobertura de las vacunas frente a rotavirus en Gipuzkoa	47
3.5 Grupos de población objeto de estudio	48
3.5.1 Selección de la población	48
3.5.2 Estudio de incidencia de hospitalización	48
3.5.3 Población en la que se efectuó el genotipado de rotavirus	50
3.6 Toma y envío de muestras	50
3.7 Métodos de detección de rotavirus	52
3.7.1 Cambios ocurridos en los métodos de investigación de enteropatógenos y específicamente en la detección de virus en heces durante el período de estudio ...	52
3.7.2 Detección de antígeno de rotavirus (hasta junio de 2013)	53
3.7.3 Detección de rotavirus mediante métodos moleculares	53
3.8 Genotipado de rotavirus	55
3.8.1 Transcripción inversa	55
3.8.2 Genotipado habitual (genes VP7 y VP4)	56
3.8.3 Detección de los segmentos génicos VP6 y NSP4	60
3.8.4 Secuenciación y análisis de secuencias	60
3.9 Obtención del genoma completo de rotavirus (Secuenciación Masiva)	61
3.9.1 Extracción del ARN de muestras de heces	61
3.9.2 Preparación de librerías y secuenciación	63
3.10 Análisis de las secuencias y estudios filogenéticos	66
3.10.1 Asignación de genotipo	66
3.10.2 Denominación de genotipos	66
3.10.3 Análisis de secuencias para estudios filogenéticos	67
3.10.4 Secuencias introducidas en GenBank	67
3.11 Programas informáticos utilizados en el estudio	70
3.12 Análisis estadístico	71

4.1 Estudio epidemiológico. Circulación de rotavirus en el área de estudio	75
4.1.1 Distribución por temporada, edad y sexo	75
4.1.2 Estacionalidad y características de las ondas epidémicas	76
4.1.3 Relación temporal entre infección por rotavirus, gripe y temperatura media ..	78
4.1.4 Impacto de la infección por rotavirus	80
4.1.5 Infección por rotavirus en el ámbito rural y urbano	81
4.1.6 Gastroenteritis de origen mixto (coinfecciones de rotavirus y otro/s enteropatógeno/s)	82
4.2 Infecciones graves por rotavirus que requirieron hospitalización en el período 2008 - 2014. Comparación con el período 1996 - 2008	82
4.2.1 Porcentaje de niños hospitalizados por infección con rotavirus adquirida en la comunidad. Distribución por sexo y estacionalidad	84
4.2.2 Incidencia de hospitalización a causa de gastroenteritis aguda por rotavirus de origen comunitario	85
4.2.3 Hospitalización y genotipos de rotavirus	88
4.2.4 Comparación de la hospitalización a causa de gastroenteritis por rotavirus y por otros enteropatógenos	88
4.3 Infecciones por rotavirus en niños de cinco o más años, jóvenes y adultos ...	89
4.4 Circulación de genotipos de rotavirus en menores de 5 años (1995 - 2015) ..	90
4.4.1 Rentabilidad del genotipado de rotavirus	90
4.4.2 Genotipos detectados (1995 - 2015)	91
4.4.3 Comparación de las principales características epidemiológicas de las infecciones causadas por los G-tipos principales (período 1997 - 2015)	98
4.4.4 Infecciones por rotavirus con asociaciones inusuales de G- y P-tipo e infecciones simultáneas por varios genotipos de rotavirus	98
4.4.5 Infecciones por rotavirus de G-tipos inusuales	99
4.4.6 Reinfecciones por rotavirus en niños menores de 5 años	100
4.4.7 G-tipos de rotavirus circulantes en niños de cinco o más años, jóvenes y adultos	102
4.5. Rotavirus emergente G12P[8]	103
4.5.1 Circulación de rotavirus G12: epidemias, incidencia, sexo, edad y marco geográfico	103
4.5.2 Análisis filogenético de rotavirus G12P[8]	105
4.6 Rotavirus G3 atípico de origen equino. Emergencia y circulación en 2015 en Gipuzkoa	125
4.6.1 Marco geográfico del estudio	125
4.6.2 Genotipos circulantes de rotavirus en la temporada epidémica 2014 - 2015	125

4.6.3 Distribución de las cepas de rotavirus G3 de origen equino	127
4.6.4. Genotipado basado en el genoma completo y análisis filogenético de rotavirus G3 atípico	128
5. DISCUSIÓN	133
5.1 Características epidemiológicas e impacto de la infección por rotavirus....	135
5.2 Infecciones graves por rotavirus que requirieron hospitalización en niños de 1 mes a < 5 años.....	140
5.3 Circulación de genotipos de rotavirus en menores de cinco años.....	145
5.4 Circulación de genotipos inusuales de rotavirus	156
5.5 Reinfecciones por rotavirus en niños menores de cinco años	160
5.6 Gastroenteritis debida a rotavirus en niños de cinco años o más, jóvenes y adultos	162
5.7 Rotavirus emergente G12P[8].....	165
5.7.1 Estudio epidemiológico.....	165
5.7.2 Estudio molecular	173
5.8 Rotavirus G3 atípico de origen equino	176
6. CONCLUSIONES.....	181
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	185
8. APÉNDICES	231
Apéndice I	233
Apéndice II	234
Apéndice III.....	236
Apéndice IV.....	237
Apéndice V.....	238
Apéndice VI.....	244
Apéndice VII	245

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BIC: *Bayesian Information Criterion*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BMV: Virus del mosaico del bromo

C. A.: Comunidad Autónoma

CAPV: Comunidad Autónoma País Vasco

CI: Control interno

CIC: Código de Identificación Corporativo

CIE-9-MC: Clasificación Internacional de Enfermedades, 9ª revisión, Modificación Clínica

EuroRotaNet: Red Europea de Vigilancia de Rotavirus

GEA: Gastroenteritis aguda

pb: Pares de bases

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

DLP: Partículas de doble capa

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

HUD: Hospital Universitario Donostia

M-MLV RT: Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney

NSP: *Non-structural protein*

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: Marco abierto de lectura

OSI: Organización Sanitaria Integrada

pb: pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

POD: Peroxidasa de rábano picante

RT: Transcripción inversa

RV: Rotavirus

RVA: Rotavirus del grupo A
SD: Desviación estándar
SRO: Solución de rehidratación oral
TAE: Tris acetato EDTA
TBE: Tris borato EDTA
TLP: Partículas de triple capa
UAP: Unidad de Atención Primaria
UTR: Región no traducida
UV: Ultravioleta
VLPs: *Virus-like particles*
VP: *Viral protein*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de rotavirus e importancia epidemiológica de la enfermedad

Rotavirus (RV) (género *Rotavirus*) es un miembro de la familia *Reoviridae*, familia compuesta por virus icosaédricos con genomas formados por 9 - 12 segmentos de ARN de doble cadena ¹. Es la causa más común de enfermedad diarreica grave en humanos y varias especies de animales incluyendo primates (macacos), animales de granja (vacas, cerdos, ovejas), animales de compañía (perros, gatos), animales exóticos (llamas, jirafas), roedores y aves ^{2, 3}. Actualmente, el género *Rotavirus* se subdivide en ocho especies o grupos (A - H) en función de la reactividad del gen VP6 ⁴, siendo RV grupo A (RVA) la causa más importante de diarrea infantil en el mundo ⁵. Prácticamente todos los niños han sido infectados por RVA al menos una vez para cuando alcanzan la edad de 3 - 5 años ⁶. Además, es probable que un mismo niño se reinfecte varias veces en los primeros años de vida, si bien la sintomatología de las segundas infecciones suele ser más leve, siendo las terceras típicamente asintomáticas ⁵. La infección por RVA en adultos es normalmente subclínica o leve, aunque puede ser grave en inmunocomprometidos o personas de edad avanzada ⁷. Los escenarios epidemiológicos más comunes en el mundo para la infección por RVA entre los adultos incluyen la enfermedad endémica, brotes epidémicos, infecciones relacionadas con viajes y la enfermedad resultante de la transmisión niño a adulto ⁷. Los niños y adultos con infección asintomática por RVA excretan virus en sus heces convirtiéndose en una fuente de virus en la comunidad que facilita su diseminación global ^{7, 8}. De hecho, un estudio realizado en niños menores de cinco años con gastroenteritis aguda (GEA) debida a RVA en Dinamarca reveló que en el 43% de los episodios infecciosos estudiados al menos un miembro familiar, incluyendo los adultos, también experimentó síntomas gastrointestinales ⁹. RVA también es una causa importante de diarrea nosocomial.

En la mayoría de los países en vías de desarrollo de Asia y África, la epidemiología de RVA se caracteriza por transmisión ininterrumpida a lo largo del año, con uno o más periodos de circulación relativamente intensa, mientras que en los países desarrollados con climas templados se suele observar una marcada estacionalidad invernal ^{5, 10}. Este hecho, añadido a las grandes diferencias existentes en el estado nutricional y de salud en general, la disponibilidad de asistencia médica y la comorbilidad en la infancia explican la marcada desigualdad en la carga de enfermedad por RVA existente entre los países en vías de desarrollo y los países desarrollados ⁵. La Organización Mundial de la Salud

(OMS) estimó que en 2008 se produjeron 453.000 muertes de niños asociadas a GEA por RVA en el mundo. Estas muertes representaron el 5% del total de muertes y el 37% de las muertes debidas a diarrea en niños ¹¹ siendo la tasa de mortalidad por RVA en niños menores de 5 años a nivel mundial de 86 muertes por 100.000. La práctica totalidad de estas muertes (90%) se producen por deshidratación en los países en vías de desarrollo y están relacionadas con una asistencia sanitaria deficiente ^{5, 12}. Por el contrario, en los países desarrollados la mortalidad es muy baja, pero RVA es la principal causa de hospitalización infantil debida a GEA. A nivel mundial, RVA es responsable de un elevado número de consultas pediátricas cada año, causando alrededor de 2 millones de hospitalizaciones y 25 millones de consultas ambulatorias ¹³. En España, la mortalidad debida a RVA es casi inexistente, pero el virus genera una carga asistencial importante en el Sistema de Salud. Este virus es responsable de entre el 14% al 30% de todos los casos de GEA, de los cuales un cuarto requiere hospitalización ¹⁴. A pesar de que se estima que el 41% de los niños con GEA por RVA no necesita atención médica y son cuidados en casa, la GEA por RVA cuesta al Sistema Nacional de Salud español alrededor de 28 millones de euros al año ¹⁵. El hecho de que las infecciones por RVA se produzcan incluso en entornos con un alto estándar de higiene corrobora la elevada transmisibilidad del virus.

1.2 Antecedentes históricos de rotavirus

En 1943, Jacob Light y Horace Hodes aislaron un agente filtrable a partir de heces recogidas en niños recién nacidos con diarrea infecciosa y demostraron que este agente también causaba diarrea en terneros ¹⁶. Dichas muestras fueron liofilizadas y tres décadas más tarde se demostró que ese agente filtrable era RV ¹⁷. En 1973, Bishop y colaboradores ¹⁸ identificaron mediante microscopía electrónica partículas virales dentro de los enterocitos de la mucosa duodenal en biopsias recogidas de niños con GEA. Ese mismo año, Flewett y colaboradores ¹⁹ y el grupo de Bishop ²⁰ identificaron de manera independiente las mismas partículas virales en heces de niños con GEA y reconocieron a RV como causa principal de GEA en niños menores de 5 años ^{18, 21}. En 1974, Flewett sugirió el nombre de RV tras observarlo por el microscopio electrónico, donde vio que parecía una rueda (*rota* en latín) (Figura 1) ²². La partícula de virus fue nombrada de diferentes formas; orbivirus, rotavirus, *reovirus-like agent*, *human reovirus-like agent* (HRVL), duovirus e *infantile gastroenteritis virus* (IGV) ²³. Sin embargo, el nombre de

RV fue oficialmente reconocido por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus cuatro años más tarde (1978) ²⁴. En 1976, se informó sobre la detección de RV en otras especies ²⁵. Los serotipos de RV fueron descritos por primera vez en 1980 ²⁶, y al año siguiente, se logró su obtención en cultivos celulares derivados de riñón de simio, con la adición de tripsina en el medio de cultivo ²⁷. La capacidad de hacer crecer RV en cultivos aceleró el ritmo de la investigación, y en la década de los 80 se empezaron a evaluar las primeras vacunas ²⁸.

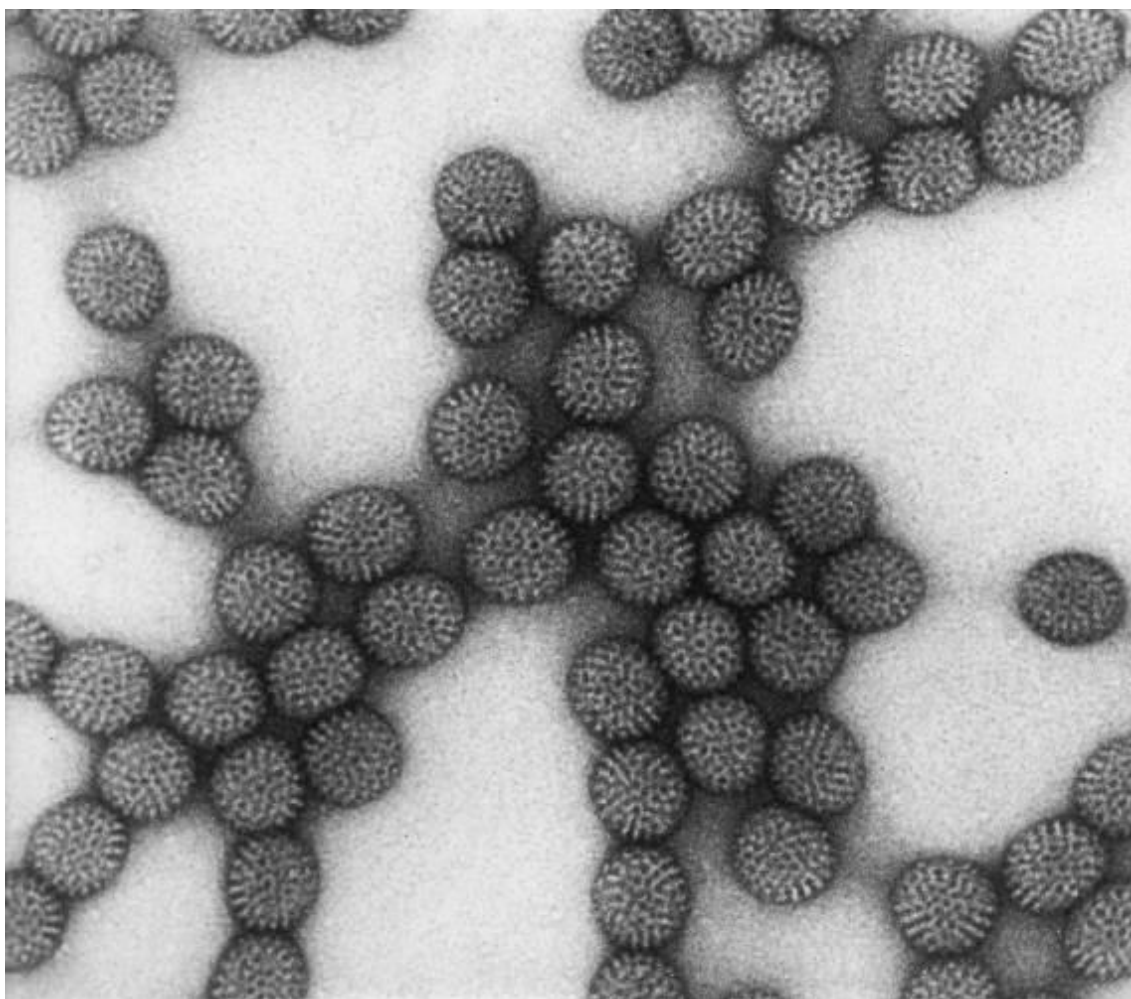


Figura 1.- Micrografía de transmisión de electrones de partículas de rotavirus (Autor: Dr. Erskine Palmer. CDC. 1978).

1.3 Estructura de rotavirus

La partícula infecciosa de RVA (virión) es una partícula icosaédrica de 70 - 75 nm sin envoltura que posee una cápside que consta de tres capas proteicas concéntricas (Figura 2) por lo que también es denominada partícula de triple capa (TLP = Triple-Layered Particle)^{29,30}.

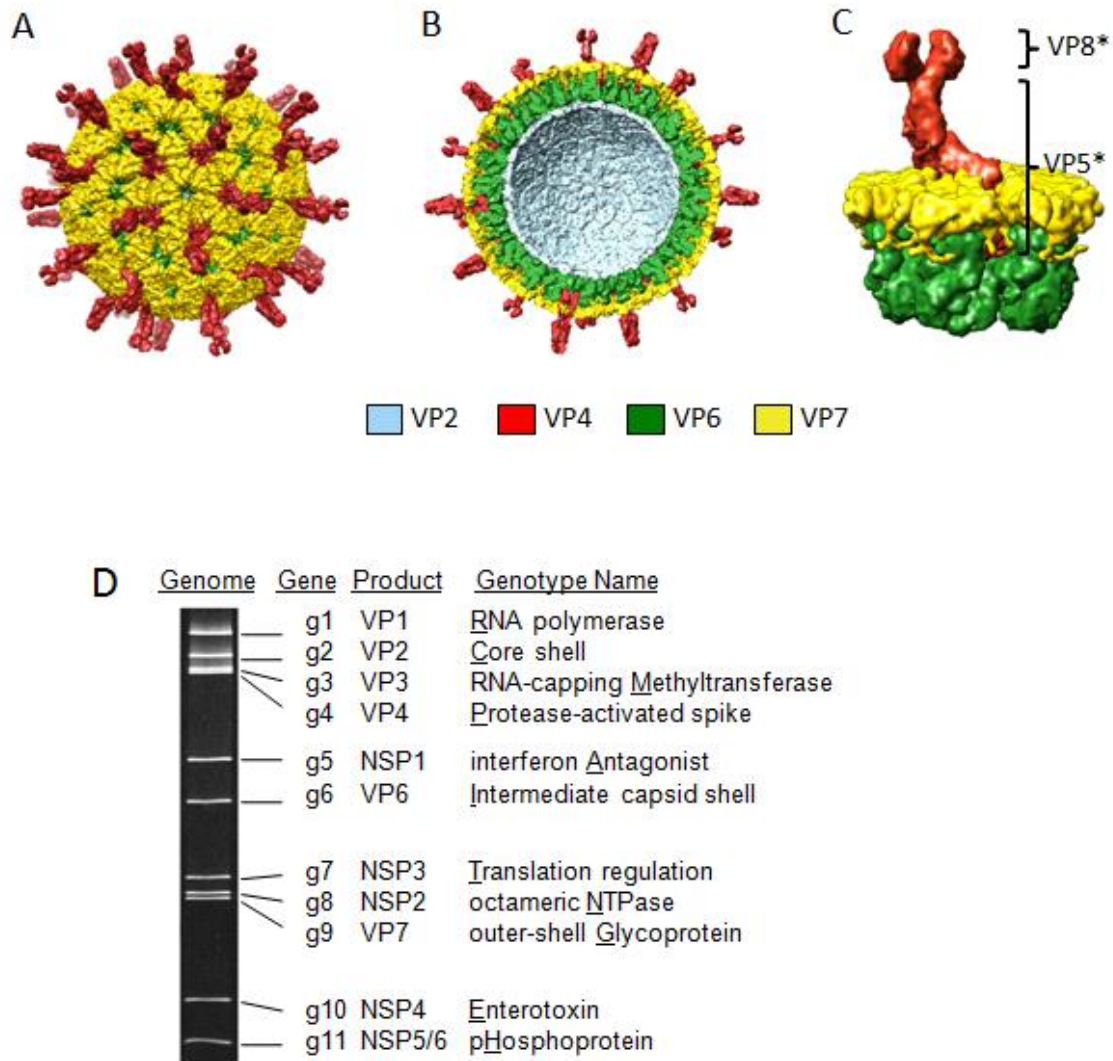


Figura 2.- Estructura de la cápside de rotavirus y su genoma. (A) Partícula de rotavirus intacta. (B) Corte transversal del virión mostrando las tres capas proteicas concéntricas (VP2, VP6 y VP7). (C) Espícula de VP4 (VP8* + VP5*) anclada en VP6 y VP7. (D) Gel de electroforesis en el que se muestran los 11 segmentos de ARN de doble cadena. Los segmentos se han denominado como g1 - g11 (g = gen) y se han enumerado los productos proteicos y sus funciones o propiedades asociadas. La letra subrayada identifica el segmento en el acrónimo de genes: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx³¹.

La cápside engloba el genoma de RVA que está compuesto por 11 segmentos de ARN de doble cadena numerados del 1 al 11 en función de su migración electroforética. La longitud de los segmentos oscila desde 667 pb para el segmento 11 hasta 3302 pb para el segmento 1 (cepa de referencia SA11), y suman un total de 18.555 pb o 6.120 KDa³²,³³. El ARNm de RVA contiene una caperuza o tapón metilado en el extremo 5' (5'cap) pero carece de cola poli-A en el extremo 3'. Además, los 11 genes virales empiezan con la secuencia consenso 5' -GGC- 3' y terminan con la secuencia 5'- UGACC- 3'³⁴. Estos segmentos genómicos codifican seis proteínas estructurales virales denominadas con las iniciales VP (viral protein) seguido de un número (VP1 - VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales que se designan con las iniciales NSP (non-structural protein) y un número (NSP1 - NSP5/6). Cada segmento genómico codifica una proteína excepto el segmento 11 (NSP5) que puede codificar dos (NSP5 y NSP6)^{35, 36}. Las proteínas no estructurales tienen diversas funciones virales que incluyen la replicación del genoma, el ensamblaje de la partícula, la regulación de la respuesta innata del huésped y la estimulación de la expresión génica viral (Tabla 1)³¹.

La capa interna o *core layer* del virión está formada por la proteína VP2²⁹ que contiene el genoma viral. Unidas al interior de la capa VP2, están la proteína ARN polimerasa ARN dependiente VP1 y la proteína VP3 con función fosfodiesterasa, guaniltransferasa y metilasa^{37, 38}. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 junto con el genoma ARN de doble hebra forman el núcleo del virión. El núcleo está rodeado por una capa intermedia compuesta por 260 trímeros de VP6, interrumpidos por 132 canales acuosos que conectan la superficie externa con la capa interna. La capa externa del virión está compuesta mayoritariamente por VP7. Proyectando hacia el exterior de la superficie viral, hay 60 espículas de VP4 que interactúan con VP7 y VP6³⁹. En el huésped infectado, las proteasas intestinales tipo tripsina dividen la espícula VP4 en dos polipéptidos, VP8* y VP5*, estimulando la interacción del virus y la penetración a los enterocitos intestinales susceptibles⁴⁰. El polipéptido VP8* representa la cabeza globular de la espícula mientras que VP5* forma su tallo y base³⁰. Las proteínas de RVA VP7 y VP4 contienen múltiples epítomos antigénicos que pueden inducir la producción de anticuerpos neutralizantes y por lo tanto se consideran importantes para la inmunidad protectora^{41, 42}. Gracias a la disponibilidad de las estructuras atómicas de VP7 y VP4 y a la caracterización de mutantes de escape, ha sido posible localizar e identificar los aminoácidos críticos para las propiedades antigénicas de RVA.

Tabla 1.- Funciones de las proteínas de rotavirus. A cada proteína de rotavirus se le ha asignado el número de su segmento génico, el nombre del genotipo con la letra utilizada en el acrónimo de la constelación de genes, el número de genotipos descritos hasta el momento, la longitud del gen, la localización en la partícula viral y sus funciones y/o propiedades ^{31, 43-47}.

Segmento	Proteína	Nombre del Genotipo	Número de genotipos	Tamaño (pb)	Localización	Función
1	VP1	R (<i>RNA polymerase</i>)	12 R	3302	Núcleo	ARN polimerasa ARN dependiente; unión ARN de una hebra; interactúa con VP3
2	VP2	C (<i>Core Shell</i>)	12 C	2690	Núcleo	Necesaria para la actividad ARN polimerasa ARN dependiente; unión ARN; caparazón del núcleo.
3	VP3	M (<i>RNA-capping Methyltransferase</i>)	11 M	2591	Núcleo	Guanililtransferasa; metiltransferasa; 2',5'-fosfodiesterasa; unión ARN de una hebra; interactúa con VP1
4	VP4	P (<i>Protease-sensitive</i>)	37 P	2362	Capa externa	Proteína de unión; hemaglutinina; Unión a células, virulencia, antígeno neutralizante P-tipo; formada por VP5*+VP8*
5	NSP1	A (<i>Interferon Antagonist</i>)	22 A	1611	No estructural	Antagonista de interferón; Unión ARN; No es esencial en el crecimiento del virus.
6	VP6	I (<i>Intermediate Capsid Shell</i>)	20 I	1356	Capa intermedia	Determinante de especies; Protección (neutralización intracelular); necesario para la transcripción
7	NSP3	T (<i>Translation enhancer</i>)	14 T	1104	No estructural	Aumenta la actividad del ARNm viral y finaliza la síntesis de proteínas celulares; inhibe la traducción de proteínas del huésped
8	NSP2	N (<i>NTPase</i>)	12 N	1059	No estructural	NTPasa involucrada en el empaquetamiento de ARN; unión ARN; NDP quinasa; esencial para la formación de viroplasmos
9	VP7	G (<i>Outer Shell Glycoprotein</i>)	27 G	1062	Capa externa	Antígeno de neutralización G-tipo; glicoproteína
10	NSP4	E (<i>Enterotoxin</i>)	18 E	751	No estructural	Enterotoxina; glicoproteína transmembrana del retículo endoplasmático rugoso; viroporina, receptor intracelular para las DLP; modula el Ca ²⁺ intracelular y la replicación del ARN; virulencia
11	NSP5 NSP6	H (<i>PHosphoprotein</i>)	13 H	667	No estructural	Moduladora de la unión del ARN de una y doble hebra; esencial para la formación de viroplasmos; proteína fosfo- y O-glicosilada; quinasa; Interacción con VP2

1.4 Clasificación y diversidad de rotavirus

1.4.1 Grupos o especies de rotavirus

RV se subdivide en especies en base a las propiedades antigénicas de la proteína de la cápside intermedia VP6 o más recientemente, a su secuencia aminoacídica. Hasta el momento, se han identificado ocho especies (A - H) de RV ⁴, habiendo evidencia filogenética de que existe una nueva, recientemente descrita (especie I) ⁴⁸. Estas “especies de RV” son referidas habitualmente como “grupos de RV”. Al contrario que las cepas del mismo grupo/especie, no hay evidencia de reordenamiento (*reassortment*) genético entre cepas de RV que pertenecen a diferentes grupos/especies. Su incapacidad de intercambiar segmentos genómicos durante la coinfección incluso bajo condiciones experimentales indica que los grupos de RV actúan como especies virales únicas ⁴³. Sin embargo, se cree que tuvo lugar un reordenamiento genético entre cepas ancestrales de RVA y RVD de origen aviar en el que estaba implicado el segmento genómico NSP1 ⁴⁹. RVA infecta humanos y animales, RVB, RVC, RVE, RVH y RVI se han identificado mayoritariamente en mamíferos domesticados mientras que RVD, RVF y RVG se han detectado en aves ⁵⁰. De todas las especies/grupos de RV, RVA es responsable de la mayor parte de la morbilidad y mortalidad en humanos asociada a RV y es la diana de los programas de vacunación actuales.

1.4.2 Sistema binario de genotipado de rotavirus (VP7 y VP4)

Para la clasificación de RVA, inicialmente se asignaban serotipos G y P a las diferentes cepas en base a la reactividad de los epítomos antigénicos de las proteínas externas VP7 (G de Glicoproteína) y VP4 (P de proteína sensible a Proteasas) con antisueros de referencia ⁵¹. Posteriormente, el sistema binario de serotipado G/P fue reemplazado por el sistema de genotipado G/P que está basado en el análisis de la secuencia de los genes que codifican las proteínas VP7 y VP4 ^{52, 53}. Debido a que la combinación de G- y P-tipo puede variar de manera independiente, se usa un sistema de tipado binomial para identificar las cepas.

RVA posee una elevada diversidad genética. Hasta el momento, se han descrito 27 G-tipos (G1 - G27) y 37 P-tipos (P[1] - P[37]) ^{43, 44}. Sin embargo, los estudios de vigilancia solo han identificado en humanos 15 G-tipos (G1 – G6, G8 – G12, G14, G20, G24 y G26) y 17 P-tipos (P[1] - P[11], P[14], P[15], P[19], P[24], P[25] y P[28]) con cerca de 90 combinaciones G/P en todo el mundo ^{50, 54}. Globalmente, las cepas humanas

más comunes son G1P[8] (31 – 53%), G2P[4] (10 – 13%), G3P[8] (5 – 11%), G4P[8] (5 – 14%), G9P[8] (10 – 11%) y G12P[8] (1 – 3%)⁵⁰. En los países desarrollados, estas cepas pueden causar casi el 100% de las infecciones dependiendo de la temporada⁵⁵⁻⁵⁷. Varios o incluso todos los genotipos de RVA pueden cocircular en una misma temporada^{58, 59}. Los genotipos prevalentes pueden variar de una temporada a otra incluso en una misma área geográfica^{58, 60, 61}.

En los países en vías de desarrollo, existe una mayor diversidad de RVA. Hay años en los que no se puede identificar un único genotipo dominante y son comunes las infecciones causadas por genotipos múltiples de RVA (infecciones mixtas) creando condiciones que favorecen la formación de virus recombinantes (*reassortants*)⁶². Además, es frecuente que cepas de RVA con combinaciones G/P-tipo atípicas o de origen zoonótico originadas mediante reordenamiento genético causen enfermedad en niños⁶³⁻⁶⁵. Los G/P-tipos de las cepas de RVA atípicas muestran amplia variación de una región a otra⁶⁶.

Excepcionalmente nuevos RVA como G9 y G12 han emergido y se han diseminado en la población humana a nivel mundial habiendo sido recientemente incluidos en la lista de RVA principales.

1.4.3 G-tipos de rotavirus identificados en humanos

G1

RVA G1 fue aislado por primera vez en 1974 en un niño con GEA en Estados Unidos. Fue uno de los primeros RVA en ser adaptado con éxito al cultivo celular⁶⁷. Este genotipo pertenece al genogrupo Wa-like (genogrupo 1, ver apartado “1.5 Clasificación del genoma completo de RVA (constelaciones de genes)”, pág. 14) y se asocia normalmente a P[8] siendo la combinación G/P mayoritaria a nivel mundial. Sin embargo, en 2012 emergió en Asia una nueva cepa recombinante G1P[8] con constelación genómica tipo DS-1 (genogrupo 2)^{68, 69}. El genotipo G1 también ha sido identificado asociado a otros P-tipos como P[4] y P[6]^{70, 71}.

G2

G2 fue detectado por primera vez en 1976 en un paciente con GEA en Estados Unidos (Washington D.C.)⁷². RVA G2 está normalmente asociado a P[4] y pertenece al genogrupo DS-1-like (genogrupo 2, ver pág. 14). También se han detectado cepas G2 combinadas con P[6] y P[8]^{73, 74}. El reordenamiento genético entre las cepas circulantes locales puede dar lugar a combinaciones inusuales de G- y P-tipos comunes^{75, 76}. Por

ejemplo, la detección de cepas G1P[4] y G2P[8] es frecuente en temporadas en las que cepas G1P[8] y G2P[4] cocirculan ⁵⁰.

G3

El genotipo G3 posee el rango de huéspedes más amplio, infectando humanos, simios, felinos, caninos, bovinos, equinos, ovinos, porcinos y lepóridos, entre otros ^{2, 43, 77}. Consecuentemente, es el genotipo que se ha asociado a más P-tipos diferentes como por ejemplo a P[2], P[3], P[4], P[6], P[7], P[8], P[9], P[12], P[14], P[22] y P[24] ^{78, 79}. A pesar de su amplia diversidad, G3 suele ir en la mayoría de los casos acompañado de P[8] cuando infecta humanos y su constelación de genes pertenece al genogrupo 1 (tipo Wa, ver pág. 14) ⁸⁰. Sin embargo, G3P[8] también ha sido detectado con esqueleto tipo DS-1 en Asia ⁶⁸, Australia ⁸¹ y posteriormente en nuestro territorio ⁸² y en Hungría ⁸³. La combinación G3P[8] ha circulado poco durante los años 90 a nivel global pero ha vuelto a resurgir en la última década ⁷⁸.

G4

G4 fue identificado por primera vez en humanos en el año 1975 en Reino Unido asociado al P-tipo P[6]. Este genotipo normalmente se asocia a P[8] cuando infecta a humanos y su constelación de genes es de tipo Wa (genogrupo 1). Sin embargo, también se han detectado dos combinaciones inusuales de origen porcino, G4P[4] y G4P[6], generadas mediante transmisión interespecies y múltiples reordenamientos genéticos ⁸⁴.

G5

El genotipo G5 se ha asociado a enfermedad en cerdos e identificado alguna vez en caballos pero raramente en humanos ^{85, 86}. En 1994, se identificó por primera vez RVA G5 en niños con diarrea en Brasil y se demostró que la combinación G/P G5P[8] había estado circulando en ese país desde al menos 1982 ^{86, 87}. G5 también ha sido detectado en otros países de Sudamérica (Argentina, Paraguay y Brasil) y posteriormente, en el año 2000, esporádicamente en Camerún ^{86, 88}, países del Sudeste asiático y Bulgaria. Suele ir acompañado de P[8] y a veces de P[6] y se cree que es el resultado de un reordenamiento humano-porcino ⁸⁹.

G6

G6 es un genotipo poco común pero con amplia distribución geográfica. Este genotipo está asociado sobre todo a infección en ganado vacuno y otros rumiantes (orden *Artiodactyla*). En un estudio realizado en los años 1987 - 1988 en Italia, se detectaron dos cepas G6 (G6P[9] y G6P[14]) en dos niños hospitalizados con GEA ⁹⁰. Desde

entonces, G6 ha sido detectado esporádicamente en países como Australia ⁹¹, India ^{92, 93}, Estados Unidos ⁹⁴, Bélgica ^{95, 96}, Hungría ^{97, 98}, Egipto ⁹⁹, Malawi ¹⁰⁰, España ¹⁰¹ y Tailandia ¹⁰². G6 se suele encontrar en combinación con varios P-tipos como P[6], P[9] y P[14] ^{86, 93}. El genotipo humano P[14] en combinación con G6 ha sido referido en muchos países, siendo esta combinación detectada solo en humanos, cabras y antílope sable ⁹⁵.

G8

G8 es habitualmente detectado en ganado vacuno ¹⁰³ en combinación con P[1], P[5] y P[11] ¹⁰⁴. Además, se ha identificado G8 en otras especies animales como ovejas, vicuñas, guanacos, cabras y camellos ¹⁰⁵. G8 fue aislado por primera vez en humanos en combinación con P[10] en Indonesia en un estudio realizado entre 1979 y 1981 ^{106, 107}. Desde entonces, G8 ha sido detectado en humanos de manera significativa en África (12%) y de manera esporádica fuera de ese continente ^{105, 108}. Además de a P[10], G8 se ha asociado a diversos P-tipos como P[1], P[2], P[4], P[6], P[8] y P[14] ⁸⁶. Esta gran diversidad de combinaciones G/P puede ser el resultado de reordenamientos genéticos entre dos RVA humanos o un RVA animal y otro humano.

G9

Tras su primera detección en Filadelfia (Estados Unidos) en los años 1983 - 1984 ¹⁰⁹, G9 desapareció durante una década para reemerger en 1995 en la misma ciudad ^{55, 86, 110}. A partir de entonces, G9 fue identificado en niños con diarrea a nivel mundial hasta convertirse en el quinto de los genotipos principales ⁶². G9 suele ir acompañado de P[8] aunque se ha informado de la detección de G9 en combinación con P-tipos como P[4], P[6], P[11] y P[19] ¹¹¹. Se cree que las cepas G9 adquirieron el gen VP7 de un huésped animal, mientras que los 10 genes restantes son de origen humano. La detección ocasional de RVA G9 en ovejas y especialmente en cerdos o la identificación esporádica de cepas G9 con una constelación de genes de origen porcino avalan su origen animal ^{86, 112, 113}.

G10

RVA G10 fue detectado por primera vez en ganado vacuno americano y canadiense en 1983 ¹¹⁴. Desde entonces, se ha considerado uno de los genotipos más prevalentes en bóvidos en todo el mundo mayoritariamente en combinación con P[1], P[5] y P[11] ¹¹⁵. Ocasionalmente, RVA G10 también ha sido detectado en cerdos, ovejas y caballos. Además, ha sido identificado esporádicamente en humanos considerándose resultado de transmisiones zoonóticas ^{86, 116, 117}. La primera detección de G10 en humanos tuvo lugar

en un niño inmunocomprometido de Reino Unido en el año 1992¹¹⁸. Un año más tarde, se detectó G10 de origen bovino (asociado a P[11]) en neonatos asintomáticos en India^{119, 120}. Posteriormente G10 ha sido detectado junto con P[4], P[6] P[8], P[9], P[11] o P[14] en diferentes regiones de India y en Brasil, Paraguay, Ghana, Vietnam, Tailandia, Eslovenia, Italia y Australia^{84, 86, 115-117, 121-125}.

G11

G11 fue identificado por primera vez en cerdos en 1983¹²⁶ y en humanos en 2005¹²⁷, siendo su detección desde entonces esporádica¹²⁸. RVA G11 ha sido detectado en humanos en combinación con P[4], P[6], P[8] y P[25]¹²⁹. Debido a su similitud con los G11 hallados en animales se cree que los pocos casos informados en humanos tuvieron origen en transmisiones de tipo zoonótico¹²⁹.

G12

RVA G12, genotipo inusual hasta aproximadamente el año 2008, es uno de los agentes causantes de GEA que más rápido ha emergido a nivel mundial. El primer caso de infección por G12 en humanos (P-tipo P[4]) fue informado en Filipinas en 1987¹³⁰. Posteriormente, en 1998, fue detectado en Tailandia (P-tipo P[9])¹³¹ y al año siguiente en Estados Unidos (P-tipo P[6])⁹⁴ y Argentina (P-tipo P[9])¹³². En los primeros años de este siglo, cepas G12 fueron detectadas con frecuencia notable casi exclusivamente en países del subcontinente indio¹³³⁻¹³⁵, habiéndose señalado el Sudeste de Asia como el probable origen de este genotipo¹³⁶. A partir de entonces, apareció en el resto del mundo¹³⁶⁻¹⁴⁰. G12 suele ir acompañado de P[6] y P[8] cuando infecta humanos⁶². Sin embargo, la transmisión interespecies de un rotavirus felino resultó en la combinación G12P[9], observada en algunas partes del mundo^{131, 141}. El gen VP7 del genotipo G12 parece haber sido adquirido a partir de un huésped animal debido a su detección ocasional en ganado vacuno y porcino¹⁴²⁻¹⁴⁴. RVA G12 tiene una marcada diversidad debido a su gran actividad de reordenamiento genético.

G14, G20, G24 y G26

Los genotipos G14, G20, G24 y G26 han sido detectados muy raramente en humanos.

G14 es un genotipo detectado habitualmente en caballos. En la era postvacunal (2009), se detectó una nueva cepa, G14P[24], en un niño de Estados Unidos. Esta cepa parece ser el resultado de un reordenamiento genético múltiple entre RVA de origen humano, equino, simio y bovino¹⁴⁵.

RVA **G20** (P-tipo P[28] y VP6 I13) fue detectado por primera vez en un área rural de Ecuador en 2006. Era una cepa no tipable a la que el “Grupo de Trabajo para la

Clasificación de RV” (*Rotavirus Classification Working Group, RCWG*) asignó un genotipo nuevo ¹⁴⁶.

RVA **G24** (asociado a P[33]) fue aislado por primera vez en 2007 en Japón de una vaca y su ternero asintomáticos ¹⁴⁷ y no fue hasta 2012 cuando este genotipo (asociado a P[14]) volvió a ser detectado, esta vez en un niño de Estados Unidos. Esta cepa podría ser el producto de una transmisión interespecies y de eventos de reordenamiento incluyendo cepas de origen canino/felino, simio y particularmente bovino ⁵⁴.

El genotipo de RVA **G26** (P-tipo P[19]) fue detectado por primera vez en humanos en un hospital de Vietnam durante la epidemia de 2009 - 2010. Esta cepa de origen porcino parece haber sido fruto de una transmisión interespecies en la que ha habido uno o más reordenamientos genéticos ¹⁴⁸.

1.4.4 Distribución global de genotipos de rotavirus

Según el Boletín de Información Global y Vigilancia de RV de la OMS (*Global Rotavirus Information and Surveillance Bulletin*) de 2011 ⁶⁶, la distribución de los genotipos de RVA varía ampliamente en las diferentes regiones del mundo y temporadas. En el año 2010, G1P[8] fue el genotipo más prevalente en América (43%), Europa (33%) y Oeste Pacífico (47%) siendo el genotipo de RVA más frecuentemente detectado a nivel global. En el mismo año, las prevalencias de G4P[8] (23%) en Europa y de G3P[8] (25%) en el Oeste Pacífico también fueron notables. En la región del Este Mediterráneo, G2P[4] (41%) fue el genotipo más comúnmente identificado seguido de una proporción substancial de cepas inusuales (31%). Por el contrario, en África y el Sudeste Asiático RVA G12P[8] y cepas inusuales como G2P[6], G3P[6], G9P[6] y G12P[6] fueron las predominantes.

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

La limitación del sistema binario de clasificación G-/P-tipo es que solo analiza dos (VP7 y VP4) de los 11 genes virales. Por lo tanto, el sistema binario no proporciona la información necesaria para evaluar por completo la diversidad genética y la dinámica evolutiva de las cepas de RVA cocirculantes. Esta limitación se ha superado parcialmente gracias a los avances en la tecnología de secuenciación de alto rendimiento que permite secuenciar el genoma completo de RVA y a la creación de un sistema de clasificación de RVA basado en el análisis de las secuencias de los 11 genes que

permite asignar un genotipo concreto a cada segmento genómico del virus ¹⁴⁹. En este sistema de clasificación, los segmentos genómicos VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 se representan mediante el acrónimo G_x-P_[x]-I_x-R_x-C_x-M_x-A_x-N_x-T_x-E_x-H_x (x = números arábigos ≥ 1) ¹⁵⁰. Los genotipos VP7 y VP4 utilizados en el sistema de clasificación del genoma completo son los mismos que se han descrito anteriormente en el sistema binario de G/P-tipado (ver apartado 1.4.2). Hasta la fecha, se han descrito al menos 11 genotipos para cada uno de los nueve segmentos restantes (también denominados genes internos) de las cepas de RVA (Tabla 1).

La mayoría de las cepas de RVA de origen humano se clasifican en tres constelaciones genotípicas: Wa-like (I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), DS-1-like (I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) y la menos frecuente AU-1-like (I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3) ¹⁵¹. Las cepas G1P[8], G3P[8], G4P[8] y G9P[8] habitualmente pertenecen a la constelación Wa-like o genotipo 1 ⁸⁰. Por el contrario, las cepas G2P[4] normalmente pertenecen a la constelación DS-1-like o genotipo 2 y las cepas G3P[9] a la constelación AU-1-like o genotipo 3 (Tabla 2) ^{150, 152, 153}. Las cepas de RVA con constelaciones de genes internos puramente del genotipo 1 ó 2 son raramente recuperadas de animales. Esto sugiere que las cepas con constelaciones puras de genes del genotipo 1 ó 2 son especialmente adecuadas para la replicación en humanos ³¹. Una cepa de RVA se clasifica como cepa tipo Wa, DS-1 o AU-1 si los genotipos de al menos siete de sus 11 segmentos genómicos se correlacionan con las cepas prototipo (cepa Wa, DS-1 y AU-1) (Tabla 2) de estos genogrupos ¹⁵⁰. Las cepas humanas de RVA Wa-like parecen tener un origen común con RVA de origen porcino, las cepas humanas DS-1-like poseen una relación evolutiva estrecha con cepas bovinas ¹⁵⁰ y las cepas AU-1-like con cepas felinas ¹⁵⁴.

Tabla 2.- Constelaciones de genes de cepas de rotavirus humanas, vacunales, inusuales y animales. Los genes correspondientes al genotipo 1 o Wa-like están marcados con verde, los genes correspondientes al genotipo 2 o DS-1-like están marcados en rojo y los correspondientes al genotipo 3 o AU-1-like en azul ^{31, 43-46}.

Cepa	Origen	Genotipo											
		VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	
Cepas comunes	Wa	Humano	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	DS-1	Humano	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	P	Humano	G3	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	ST3	Humano	G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	WI61	Humano	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	Dhaka25-02	Humano	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
Cepas vacunales	Rotarix RIX441	Humano	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	RotaTeq WI79-9	Recombinante humano-bovino	G1	P[5]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3
	RotaTeq SC2-9	Recombinante humano-bovino	G2	P[5]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3
	RotaTeq WI78-8	Recombinante humano-bovino	G3	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
	RotaTeq BrB-9	Recombinante humano-bovino	G4	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
	RotaTeq WI79-4	Recombinante humano-bovino	G6	P[8]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
Cepas inusuales	AU-1	Humano	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
	MWI	Humano	G8	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	GR 10924/99	Humano	G9	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	6717/2002/ARN	Humano	G10	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	Dhaka 12-03	Humano	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
Cepas animales	SA11-H96	Simio	G3	P[2]	I3	R2	C5	M5	A5	N5	T5	E2	H5
	RRV	Simio	G8	P[3]	I2	R2	C3	M3	A9	N2	T3	E3	H6
	OSU	Porcino	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	WC3	Bovino	G6	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3

■ Wa-like (genotipo 1)
 ■ DS-1-like (genotipo 2)
 ■ AU-1-like (genotipo 3)

1.6 Patogénesis de rotavirus

RVA infecta humanos y animales mediante adhesión al revestimiento epitelial del tracto intestinal, en concreto, infecta los enterocitos maduros en las porciones distal y media de las vellosidades del intestino delgado. Existen varios mecanismos que contribuyen a la fisiopatología de la diarrea por RVA ^{111, 155}:

1. La entrada viral causa destrucción de enterocitos maduros generando malabsorción intestinal.
2. La proteína NSP4 actúa como una viroporina, mediando la liberación del calcio (Ca^{2+}) desde el retículo endoplasmático, lo que resulta en un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ¹⁵⁶, llevando a alteración del citoesqueleto y lisis celular.
3. La proteína NSP4 (enterotoxina) altera la biogénesis y la integridad de las uniones estrechas de los enterocitos, lo que resulta en un flujo paracelular de agua y electrolitos.
4. Además, la infección desregula la bomba Na^+/K^+ , esencial para la retención de fluidos y nutrientes de las células. Esta desregulación se produce debido a la expresión disminuida de las enzimas digestivas después de la infección.
5. Por último, la infección por RVA estimula la secreción de electrolitos y agua debido a la activación del Sistema Nervioso Entérico por NSP4, lo que deriva en diarrea secretora ¹⁵⁷.

Todos estos factores contribuyen de manera colectiva a la pérdida de capacidad de absorción del intestino resultando en diarrea.

1.7 Replicación de rotavirus

RVA infecta los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado en forma de partícula de triple capa (TLP) (Figura 3). La porción VP8* de la espícula VP4 interacciona con un glicano celular con residuos de ácido siálico (sialorreceptor), lo que induce un cambio conformacional en VP4 que hace que VP5* se exponga a la superficie ¹⁵⁸. A continuación, se producen más interacciones con otros receptores celulares como las integrinas y Hsc70. La penetración de RVA en las células se produce tanto por penetración directa de la membrana como por endocitosis mediada por receptor. Las partículas del virión son transportadas en el citoplasma mediante endosomas tempranos. El nivel bajo de calcio en los endosomas da lugar a la pérdida del revestimiento de las

TLPs convirtiéndose en partículas de doble capa (DLPs). Posteriormente y gracias a VP5*, las DLPs penetran la membrana endosomal para salir al citoplasma ¹⁵⁹. En el citoplasma, las DLPs se vuelven transcripcionalmente activas y sintetizan segmentos de ARN de una sola hebra de sentido (+) no-poliadeniladas con capuchón (5'cap) gracias a las enzimas virales VP1 (ARN polimerasa ARN dependiente) y VP3 (enzima de *capping* con actividad fosfodiesterasa, guanililtransferasa y metilasa). VP1 y VP3 se localizan en la superficie interna de la capa VP2 (core). Estas transcripciones abandonan las DLPs a través de los canales y sirven tanto para la traducción de proteínas virales como para sintetizar ARN de doble hebra para la progenie de RVA actuando como hebras molde para la replicación ¹⁶⁰. La replicación ocurre en los viroplasmos que se localizan cerca del núcleo y el retículo endoplasmático. Los viroplasmos están mayoritariamente compuestos por las proteínas virales NSP2 y NSP5 ¹⁶¹ y son fábricas virales que contienen todos los componentes necesarios para la replicación y el empaquetado inicial del genoma viral. Una vez formadas, las partículas de *core* o núcleos se recubren rápidamente por VP6 dando lugar a las DLPs. Tras salir del viroplasma, la progenie de DLPs recién formada brota hacia el retículo endoplasmático para su maduración. Las proteínas NSP4, presentes en la membrana del retículo endoplasmático, actúan a modo de receptor e interactúan con VP6 ¹⁶². Ahí, las DLPs adquieren su capa más externa (60 trímeros de VP4 y 260 trímeros de VP7) y forman TLPs totalmente desarrolladas. Los viriones de triple capa maduros tardan en producirse 10 - 12 horas y se liberan en grandes cantidades al lumen intestinal, abandonando la célula mediante lisis en el caso de las células no polarizadas o en el caso de las células epiteliales mediante un proceso de gemación que no implica la muerte inmediata de la célula ⁴⁷. La destrucción de estas células reduce la capacidad de absorción de las vellosidades causando diarrea.

Posteriormente, RVA puede infectar las células vecinas dando lugar a una continua replicación y excreción que deriva en una elevada carga viral.

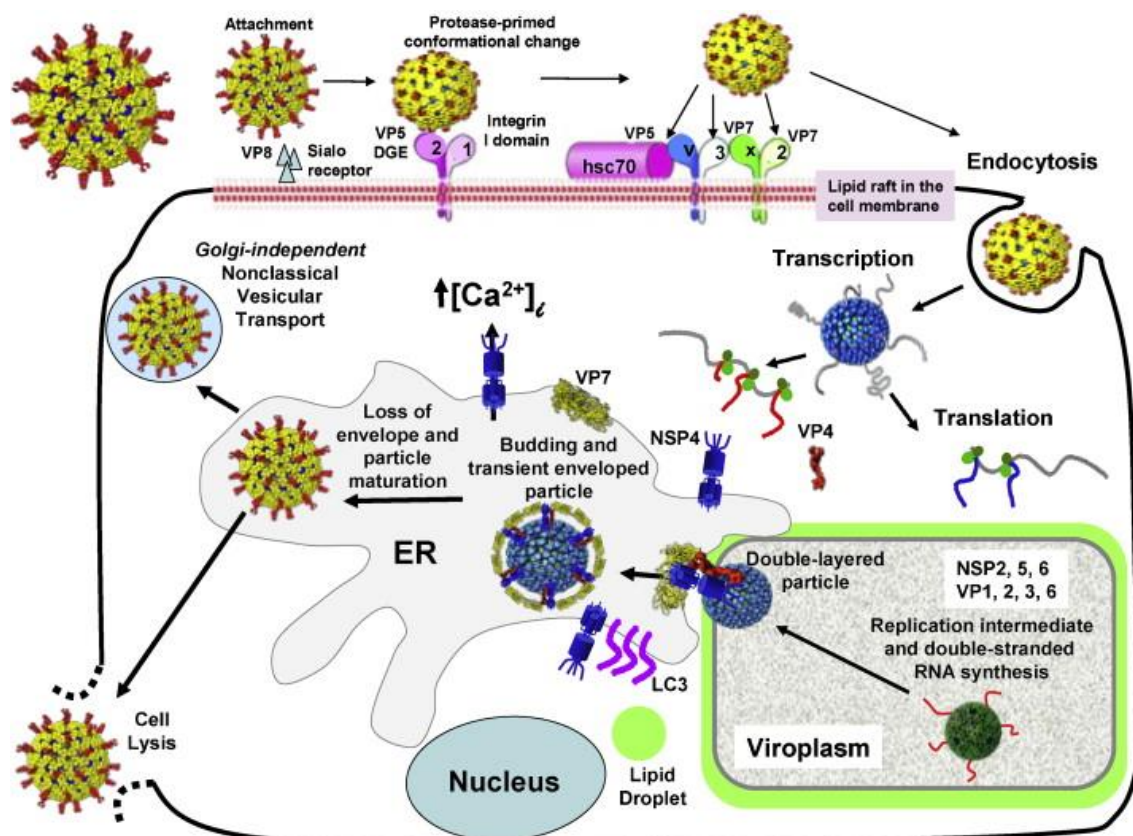


Figura 3.- Ciclo de replicación de rotavirus. Las partículas de rotavirus entran en los enterocitos mediante endocitosis directa o con la ayuda de receptores celulares. Las partículas de doble capa se generan en los endosomas y se vuelven transcripcionalmente activas para producir moléculas ARNm (+) en el citoplasma. Las moléculas de ARNm son traducidas para sintetizar las proteínas necesarias para el ensamblaje de la partícula del virión o a replicación para sintetizar el genoma (ARN de doble cadena). La replicación y el ensamblaje de los componentes del virus ocurren en el viroplasma donde se producen las partículas de doble capa (progenie) que brotan hacia el retículo endoplasmático para adquirir la capa más externa. Finalmente, los viriones salen de la célula mediante lisis o un proceso de gemación ⁴⁷.

1.8 Mecanismos de evolución y diversidad de rotavirus

Los mecanismos responsables de la evolución y diversidad de RVA son:

1.8.1 Mutaciones puntuales – *drift*

La acumulación de mutaciones puntuales (deriva genética - *genetic drift*) se produce como consecuencia de una transcripción propensa a errores que es característica de los virus ARN. De hecho, se calcula que se produce aproximadamente una mutación por cada ciclo de replicación del genoma ¹⁶³. Estas mutaciones puntuales dan lugar a variación intratípica y deriva antigénica (linajes), resultando en la aparición de mutantes de escape a los anticuerpos neutralizantes ¹⁶⁴.

1.8.2 Reordenamiento genético - *reassortment*

La naturaleza segmentada del ARN de RVA facilita los reordenamientos del genoma (cambios antigénicos mayores - *antigenic shift*). Cuando un mismo enterocito se infecta con dos o más cepas de RVA diferentes, se puede producir un virus recombinante con segmentos de ARN de cada uno de los virus progenitores (Figura 4A) ^{165, 166}. Las infecciones mixtas con cepas de RVA diferentes son más comunes en los países en vías de desarrollo (tasa de coinfección 20%) que en los países desarrollados (tasa de coinfección $\leq 5\%$) ^{57, 62, 66, 76}. Los reordenamientos dentro de un mismo genogrupo (constelación genotípica) son observados frecuentemente mientras que el intercambio de genes entre cepas de diferente genogrupo (reordenamiento intergenogrupo) son menos frecuentes ^{80, 167}.

1.8.3 Reorganización del genoma - *rearrangements* (concatenaciones y truncamientos de fragmentos genéticos)

Normalmente cada segmento genómico de RVA contiene regiones no traducidas (UTRs) que flanquean un marco abierto de lectura (ORF). Sin embargo, se han descrito variantes de RVA que poseen segmentos de tamaño atípico debido a reorganizaciones de secuencia (*rearrangements*) ¹⁶⁸. En muchos casos, la reorganización de un gen (recombinación intragénica) se origina a partir de una duplicación parcial de una secuencia, que comienza después del codón stop del ORF y se extiende hasta el extremo 3' dando lugar a una región 3' no traducida (3'UTR) larga que no afecta al producto proteico del segmento. También pueden tener lugar reorganizaciones del genoma que impliquen deleciones de fragmentos de ARN aunque son relativamente raras. La reorganización génica ocurre más frecuentemente en el segmento 11 del genoma ¹⁶⁹. Sin embargo, también se han observado eventos de reorganización en los segmentos 5 a 10 ³⁶. RVA con genomas reorganizados suelen ser aislados en niños inmunocomprometidos crónicamente infectados y pueden ser generados *in vitro* mediante pases seriados del virus a alta multiplicidad de infección. No está claro el mecanismo por el que se forman las reorganizaciones del genoma, aunque se cree que tiene lugar una disociación y reasociación de la ARN polimerasa viral con la hebra molde durante la transcripción ¹⁶⁸.

1.8.4 Transmisión interespecies

La transmisión interespecies puede producirse de manera directa o mediante reordenamiento genético entre una cepa de RVA de origen humano y otra de origen animal (Figura 4B). Para esto último, se requiere una infección simultánea (coinfeción) del huésped con una cepa de RVA animal y otra humana ².

Las constelaciones de genes de cepas de RVA animal son a menudo únicas y bastante diferentes a las constelaciones de cepas de RVA de origen humano, lo que refleja probablemente la coevolución de RVA con su huésped natural ¹⁷⁰. La adquisición de genes a partir de cepas de RVA humano podría mejorar la eficiencia replicativa de cepas de RVA animal en humanos, y facilitar su diseminación a nivel global ^{50, 171}. Sin embargo y a pesar de que los humanos son susceptibles a la infección por cepas de RVA de origen animal ^{82, 172-175}, la infección sintomática con estas cepas suele ser rara. El proceso de co-especiación podría explicar por qué es tan inusual que las infecciones zoonóticas deriven en brotes a gran escala en humanos ².

La transmisión de cepas de RVA de origen animal a humanos puede ocurrir directamente mediante contacto estrecho con animales ¹¹¹ o indirectamente mediante contacto con fómites contaminados fecalmente. Además, el agua contaminada con heces puede contener cepas de RVA de origen humano y animal, facilitando infecciones simultáneas y por tanto oportunidades para que se produzcan reordenamientos genéticos *in vivo* ⁵⁰.

Dado que la vigilancia de cepas se centra principalmente en pacientes clínicamente enfermos y las cepas de RVA animal tienden a ser menos virulentas en humanos, los casos documentados de eventos de transmisión interespecies representarían solo la punta del iceberg. En los países en vías de desarrollo se producen más infecciones asociadas a cepas de RVA animal que en los países desarrollados debido a la mala calidad del suministro de agua y al hecho de compartir espacio vital con animales domésticos ¹⁷⁶.

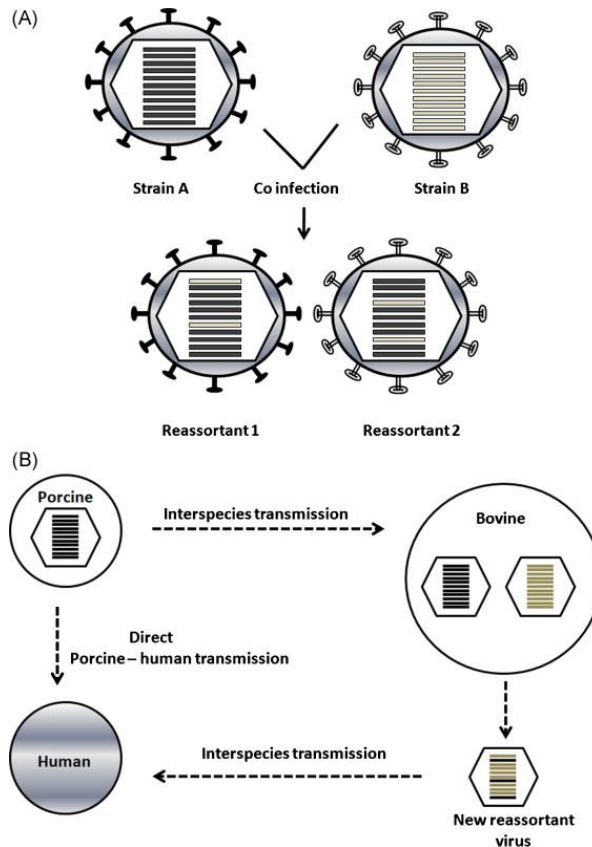


Figura 4.- Reordenamiento genético y transmisión interspecies. (A) Reordenamiento genético. La coinfección de dos cepas diferentes de rotavirus (A y B), requisito indispensable para que el reordenamiento tenga lugar, resulta en la aparición de virus recombinantes debido al intercambio de segmentos génicos. Los recombinantes generados adquieren segmentos génicos de ambos virus. (B) Transmisión interspecies. La transmisión del virus completo o de segmentos génicos de rotavirus no humanos resulta en la aparición de nuevas cepas de rotavirus en humanos. La nueva cepa detectada en humanos puede ser el resultado de una transmisión directa de una cepa animal o podría ser un virus recombinante con una combinación de segmentos génicos humanos y animales ¹¹¹.

1.9 Transmisión de la infección por rotavirus

RVA es muy contagioso. La dosis infectiva de RVA estimada es de 100 a 1.000 partículas virales ¹⁷⁷. El modo principal de transmisión es la ruta fecal-oral que puede ser directa de persona a persona o indirecta mediante fómites contaminados, es decir, el paso del virus de las heces de un individuo infectado a la boca de otro individuo mediante contacto con manos, superficies, objetos y ocasionalmente comida o agua, contaminados. La transmisión ocurre normalmente cuando los cuidadores de un niño infectado no se lavan las manos después de cambiarle los pañales etc o niños mayores no se lavan las manos tras utilizar el baño. Los niños pueden excretar RVA desde 2 días antes a 10 días o más después del inicio de los síntomas en concentraciones muy

elevadas (hasta 10^{11} partículas/g heces) en sus heces y vómitos. Niños con diarrea grave pueden excretar un mayor número de virus ^{178, 179}.

RVA es muy estable y puede permanecer viable en el ambiente durante meses si no se desinfecta. Puede sobrevivir durante días en superficies duras y secas y puede vivir durante horas en las manos. Las superficies contaminadas con RVA se deben lavar con agua y jabón y desinfectar con una solución de cloro (1.000 ppm) ¹⁸⁰.

1.10 Enfermedad causada por rotavirus

El espectro clínico de la infección por RVA va desde la enfermedad asintomática o diarrea leve acuosa con duración limitada hasta diarrea profusa frecuente con vómitos y fiebre que puede derivar en deshidratación con shock, desequilibrio electrolítico y muerte. En los casos típicos, hay un periodo de incubación de uno a tres días con un inicio de la enfermedad brusco con fiebre y vómitos seguido de diarrea acuosa explosiva uno o dos días después del inicio. Entre un 30 - 40 % de los niños tienen fiebre moderada ¹⁸¹. Los vómitos suelen durar uno o dos días y el resto de síntomas gastrointestinales de tres a siete días, pero ocasionalmente se prolongan hasta dos o tres semanas ^{5, 181}. Los enfermos pueden perder las ganas de comer y beber y por consiguiente perder fluidos. Sin un adecuado reemplazo de líquidos, el cuadro clínico puede ocasionar una deshidratación. Los vómitos son especialmente peligrosos ya que es difícil reemplazar fluidos en niños pequeños que están vomitando con frecuencia ⁵.

Aunque la GEA es la principal manifestación de infección por RVA, diversos estudios han mostrado que, raramente, se puede detectar ARN y proteínas de RVA fuera del intestino (pulmón, riñón, tracto respiratorio, ganglios linfáticos y Sistema Nervioso Central) así como viriones en sangre ¹⁸²⁻¹⁸⁴. El significado clínico de la expansión extraintestinal de RVA no es claro, aunque ha habido informes de infección por RVA causando viremia, en el tracto respiratorio o afectando al Sistema Nervioso Central, causando meningitis aséptica y/o encefalitis ¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. En cualquier caso, parece tratarse de situaciones poco frecuentes. Sin embargo, la infección por RVA ha sido asociada con cierta frecuencia a la aparición de convulsiones ¹⁸⁸.

1.11 Diagnóstico de laboratorio de la infección por rotavirus

La detección de RVA en heces puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas que incluyen microscopía electrónica, electroforesis en gel de poliacrilamida, inmunoensayos de detección de antígeno, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) previa transcripción inversa (RT) del ARN y aislamiento del virus en líneas celulares.

1.12 Tratamiento de la enfermedad causada por rotavirus

Actualmente no hay disponible ninguna terapia específica frente a RVA. Como en otras diarreas infantiles, el pilar esencial del tratamiento es el aporte de fluidos para prevenir la deshidratación. Las soluciones de rehidratación oral (SRO) con osmolaridad reducida son más efectivas a la hora de aportar fluidos que las formulaciones SRO previamente existentes con mayor concentración de sodio y glucosa ¹⁸⁹. El tratamiento con zinc puede disminuir la gravedad y la duración de la diarrea en niños con deficiencia de este metal, una situación frecuente en países en vías de desarrollo ¹⁹⁰. Medidas terapéuticas adicionales durante el episodio diarreico incluyen alimentación continuada, también la lactancia materna y si no hay disponibilidad de SRO, el uso de fluidos apropiados disponibles en el hogar ¹⁹¹.

1.13 Métodos de prevención frente a la enfermedad causada por rotavirus

Los métodos de prevención contra la enfermedad causada por RVA incluyen la lactancia materna y nutrición adecuada, extremar en la medida de lo posible la higiene personal y disponer de agua de buena calidad. Sin embargo, estas medidas no son suficientes para prevenir la enfermedad y detener la diseminación viral en la población. Actualmente, la vacunación es el único modo de prevenir episodios graves de infección por RVA.

1.14 Inmunidad protectora frente a la infección por rotavirus

La protección frente a la infección por RVA está mediada por componentes humorales y celulares del sistema inmune. Los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra VP4 y/o VP7 pueden evitar la unión y penetración de RVA a los enterocitos.

Los niños con uno, dos o tres episodios previos de infección tienen progresivamente menos riesgo de adquirir infecciones por RVA posteriormente, siendo las

primoinfecciones más graves que las reinfecciones y el G-tipo causante diferente en la mayoría de los casos ¹⁹². Después de una primera infección, la respuesta serológica está dirigida principalmente contra un genotipo viral específico (respuesta homotípica), mientras que tras infecciones subsiguientes por RVA la respuesta de anticuerpos generada tiende a ser más amplia, heterotípica ¹⁹³. Sin embargo, un estudio efectuado en la India informó que el riesgo de enfermedad grave por RVA, aunque disminuido, persiste después de varias infecciones ¹⁹⁴.

Curiosamente, la infección por RVA en neonatos es frecuentemente asintomática o leve, probablemente por la protección que les confieren los anticuerpos maternos. En pacientes inmunocomprometidos, la infección natural por RVA no suele estar asociada con diarrea grave o enfermedad sistémica pero la excreción del virus podría ser prolongada. Sin embargo, individuos con inmunodeficiencia congénita o trasplante de médula ósea u órganos sólidos a veces padecen GEA por RVA grave, prolongada e incluso mortal ⁵.

1.15 Vacunas frente a rotavirus

1.15.1 Generalidades

Una de las estrategias utilizadas para el desarrollo de las primeras vacunas frente a RVA fue utilizar cepas de RVA de origen animal. La administración de cepas de RVA animal a humanos, incluso en dosis elevadas, no suele causar enfermedad ¹⁹⁵ aunque sí induce respuestas inmunológicas protectoras frente a RVA ^{196, 197}. Una segunda estrategia fue utilizar cepas humanas atenuadas. Se ha referido que algunas de esas cepas humanas estaban atenuadas de manera natural ya que causaron infecciones subclínicas en salas neonatales mientras que otras fueron atenuadas mediante pases seriados en cultivo celular. Una tercera estrategia alternativa fue el desarrollo de vacunas multivalentes que contienen varios genotipos diferentes que representan algunos de los G-/P-tipos principales en una única dosis vacunal. Todas las vacunas son vivas y se administran oralmente en múltiples dosis con pocas semanas de diferencia para imitar el curso natural de las infecciones por RVA e inducir inmunidad homo- y heterotípica incluso frente a genotipos no incluidos en las vacunas ¹⁹².

También existen vacunas candidatas no replicativas inactivadas o subunitarias ^{198, 199}.

1.15.2 Vacunas frente a rotavirus retiradas del mercado

Vacuna recombinante rhesus-humano tetravalente - RotaShield®

La primera vacuna que se desarrolló frente a RVA fue desarrollada por la casa Wyeth-Lederle (RotaShield®, Philadelphia, PA, USA). RotaShield® estaba compuesta por la cepa de rhesus RRV (G3P[3]) y tres cepas recombinantes rhesus-humano. El gen VP7 de las tres cepas recombinantes era de origen humano (G1, G2 y G4) y los 10 genes restantes de origen simio (rhesus) ²⁰⁰. Los ensayos clínicos realizados en Estados Unidos, Venezuela y Finlandia demostraron que RotaShield® poseía una eficacia del 80 al 100% para prevenir diarrea grave por RVA ²⁰¹. Debido a su elevada eficacia, su uso en Estados Unidos fue aprobado en 1998 ²⁰². Sin embargo, nueve meses después de incluirse en el programa de inmunización y de haber sido inmunizados más de 600.000 niños, se observó un incremento de casos de intususcepción asociado a la administración de esta vacuna ²⁰³, con un riesgo atribuible de 1 por 10.000 niños vacunados ^{204, 205}.

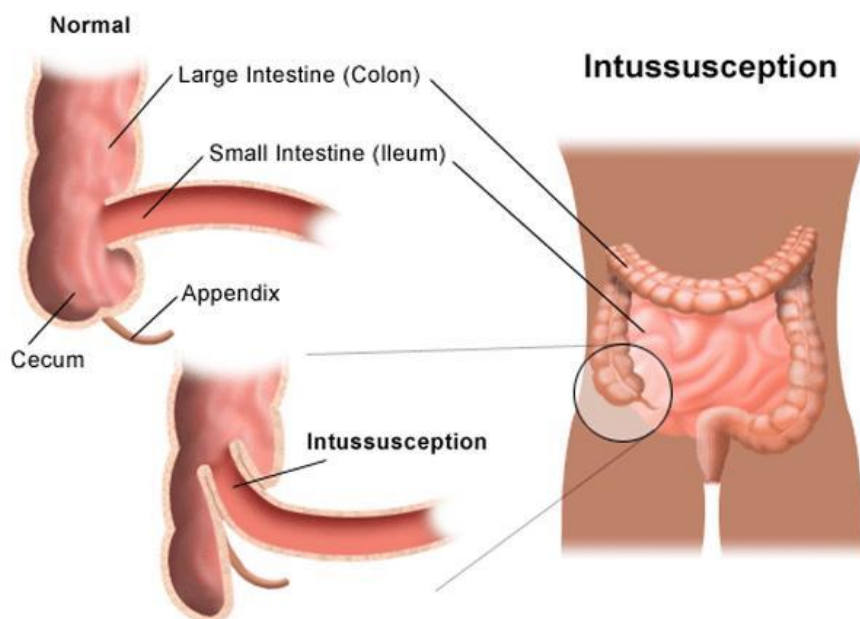


Figura 5.- Intususcepción. Invaginación de una porción del intestino en otra a modo de telescopio (Fuente: Stanford Children's Health).

La intususcepción consiste en una invaginación intestinal que da lugar a una obstrucción (Figura 5) y está caracterizada clínicamente por dolor abdominal grave, sangre en heces, bulto palpable en el abdomen y vómitos. Esta enfermedad, que es grave y potencialmente fatal, fue asociada principalmente con la primera de las tres dosis orales de la vacuna y el mayor riesgo atribuible fue encontrado en niños mayores

de tres meses. Por ello, 14 meses después de su introducción (1999), la vacuna RotaShield® fue retirada del mercado. A partir de este hecho, la intususcepción se convirtió en un gran motivo de preocupación para cualquier vacuna de RVA. Sin embargo, en los estudios realizados, no se ha detectado un aumento en el riesgo de intususcepción con las vacunas comercializadas con posterioridad (Rotarix® y RotaTeq®) ^{206, 207}. Más recientemente, un ensayo clínico de fase II llevado a cabo por *International Medica Foundation* en Ghana en el que se administró RotaShield® a neonatos con la intención de minimizar el riesgo de intususcepción obtuvo resultados prometedores por lo que la reintroducción de esta vacuna en países en vías de desarrollo es aún posible. La eficacia de la vacuna fue del 63% para dos dosis ^{208, 209} aunque se especula si los anticuerpos maternos frente a RVA transferidos por vía transplacentaria podrían haber reducido la eficacia.

1.15.3 Vacunas frente a rotavirus autorizadas y utilizadas a nivel internacional

En 2006, se autorizaron a nivel internacional dos nuevas vacunas frente a RVA que demostraron ser seguras y efectivas en niños, la vacuna monovalente Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) y la pentavalente RotaTeq® (Sanofi Pasteur MSD, Lyon, France) ²⁰¹. En junio de 2009, la OMS recomendó que la vacunación frente a RVA se incluyera en todos los programas nacionales de inmunización, haciendo especial énfasis en los países en los que las muertes por diarrea son responsables de más del 10% de la mortalidad en niños menores de cinco años ^{59, 201, 210}. Actualmente, estas vacunas están siendo incluidas en los calendarios de vacunación de un número creciente de países (81 en mayo de 2016), de los cuales 12 son europeos (Armenia, Austria, Bélgica, Estonia, Finlandia, Georgia, Alemania, Letonia, Luxemburgo, Moldavia, Noruega y Reino Unido) y casi 20 americanos (incluidos Estados Unidos, México y Brasil) (Figura 6) ²¹¹⁻²¹³. En España, las vacunas frente a RVA están disponibles desde agosto de 2006 (Rotarix®) y enero de 2007 (RotaTeq®) pero el Sistema Nacional de Salud no las financia. A pesar de ello, se han alcanzado tasas significativas de cobertura vacunal. En base a las dosis vendidas respecto al censo, la cobertura a nivel nacional aumentó de un 17% en 2007, a un 35% en 2008 y a un 38% en 2009 (47% Rotarix® y 53% RotaTeq®) ²¹⁴.

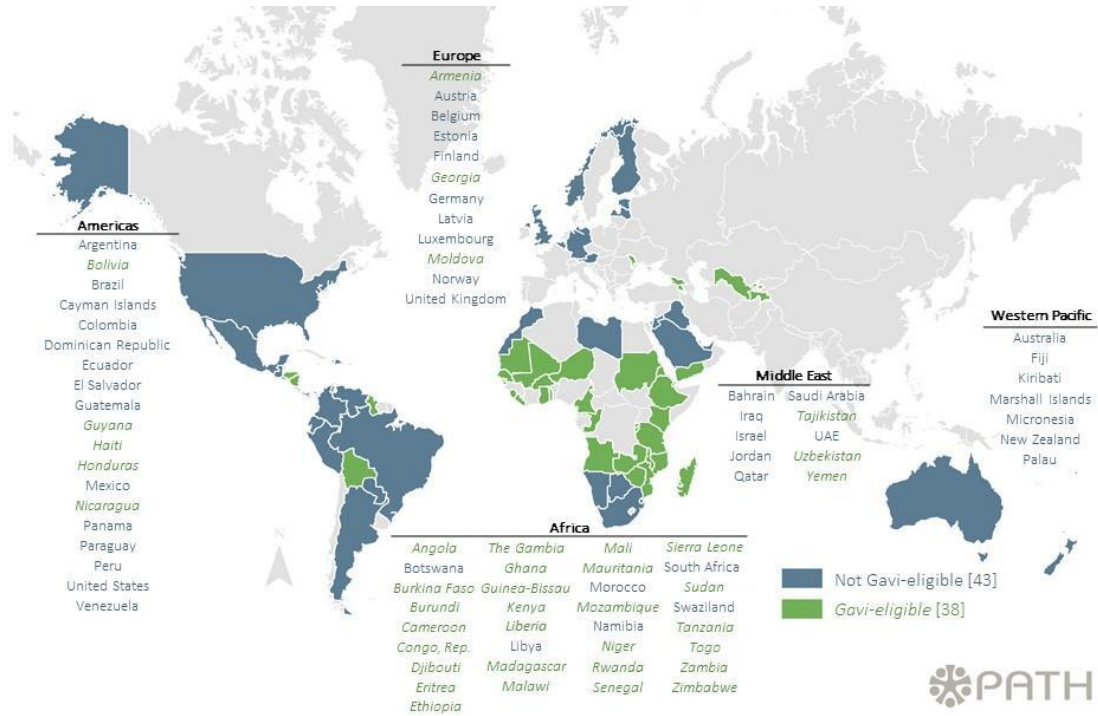


Figura 6.- Mapa representativo de las introducciones de la vacunación frente a RVA a nivel nacional por región geográfica. Se muestran 81 países (a mayo de 2016) ²¹³.

Vacuna monovalente humana - Rotarix®

Rotarix® es una vacuna oral monovalente viva-atenuada originada a partir de una cepa G1P[8] que fue aislada de un caso infantil de GEA. Esta cepa, RIX4414, fue atenuada mediante pases seriados en cultivo celular ²¹⁵. Se administra a bebés a los 2 y 4 meses de edad ²¹⁶. Las dos dosis de la vacuna se deben administrar en un intervalo de al menos 4 semanas. Según el fabricante, la primera dosis debe administrarse a niños de 6 semanas o más y la segunda dosis antes de las 24 semanas ²¹⁷. La vacuna está disponible a nivel mundial y es la vacuna preferida en el 70% de los países en los que se ha instaurado la vacunación de rutina frente a RVA ⁵⁰.

Vacuna recombinante humano-bovina pentavalente - RotaTeq®

RotaTeq® es una vacuna oral viva-atenuada compuesta por cinco cepas recombinantes humano-bovinas (cepa bovina WC3). Cuatro de las cepas recombinantes expresan una proteína VP7 correspondiente a cepas humanas y la proteína VP4 de la cepa bovina (W179-9 (G1P[5]), SC-2 (G2P[5]), WI78-8 (G3P[5]) y BrB-9 (G4P[5])), mientras que la quinta cepa recombinante expresa el VP4 de una cepa humana y el VP7 de la cepa bovina (WI79-4 (G6P[8])) (Figura 7) ²¹⁸.

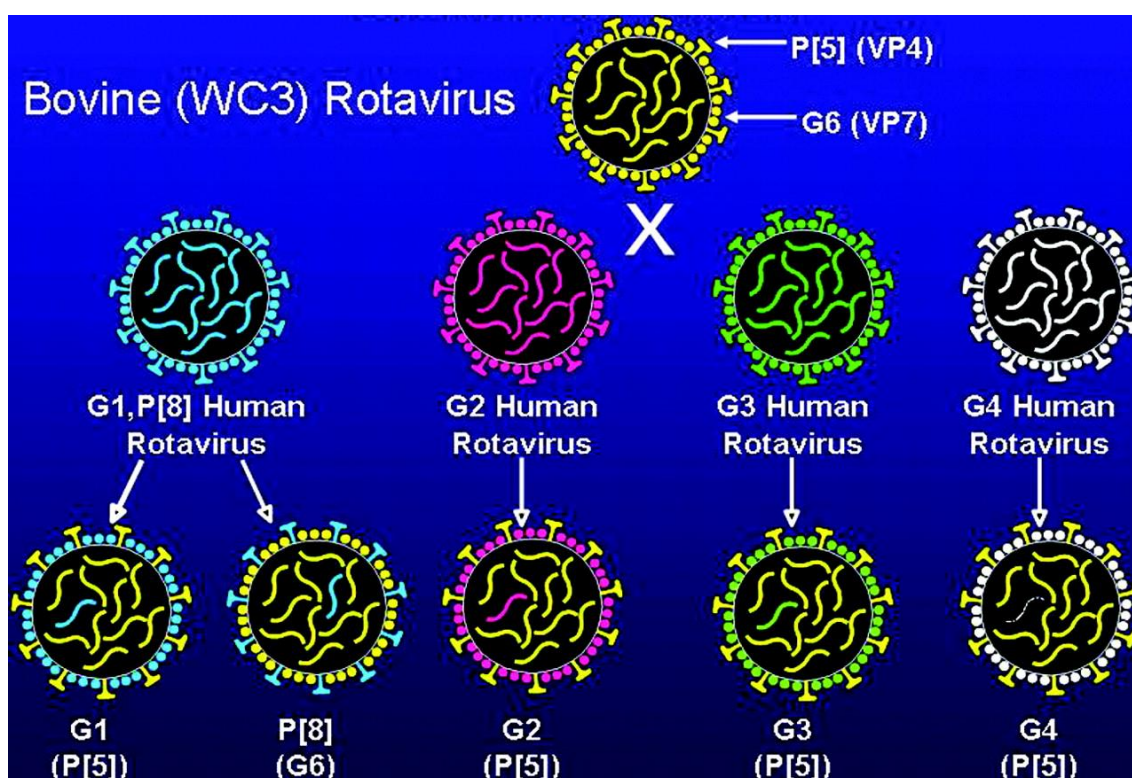


Figura 7.- Composición de la vacuna recombinante humano-bovina pentavalente, RotaTeq®²⁰¹.

El calendario recomendado por el fabricante prescribe tres dosis orales a los 2, 4 y 6 meses²¹⁹. La primera dosis debe administrarse entre las 6 - 12 semanas y las dosis posteriores a intervalos de 4 - 10 semanas. Según el fabricante, las tres dosis deben administrarse para las 32 semanas de edad²²⁰.

RotaTeq® está disponible a nivel mundial y es la que utilizan aproximadamente el 30% de los países con inmunización de rutina frente a RVA⁵⁰.

Eficacia y efectividad de las vacunas frente a rotavirus Rotarix® y RotaTeq®

Casi diez años tras su introducción en Europa, las vacunas de RVA han mostrado ser muy eficaces con un gran impacto en la atención sanitaria relacionada con GEA por RVA, disminuyendo en gran medida las hospitalizaciones, infecciones nosocomiales y visitas a Atención Primaria²²¹. Similares resultados se han obtenido en Australia²²² y Estados Unidos²²³. Para ambas vacunas (Rotarix® y RotaTeq®), los ensayos clínicos realizados en países de ingresos altos y medio-altos de América, Asia y Europa demostraron una eficacia vacunal del 72 - 100% en la prevención de GEA severa mientras que en los ensayos realizados en países de ingresos menores de África y Asia demostraron una eficacia vacunal del 49 - 72%. Estudios adicionales han demostrado que la eficacia de la vacuna en la prevención de hospitalizaciones por GEA debida a

RVA es similar a la observada en ensayos clínicos ²²⁴. Se desconocen las razones por las que la eficacia de las vacunas frente a RVA es menor en los países en vías de desarrollo pero se cree que puede ser debido a factores que pueden generar interferencias en la asimilación de la vacuna viva oral como son la leche materna, el ácido del estómago, los anticuerpos maternos y la coadministración con la vacuna oral frente a poliovirus; y a factores que pueden afectar a la respuesta inmune frente a la vacuna como son la malnutrición, la presencia de otras infecciones (por ejemplo VIH, malaria y tuberculosis) incluyendo la elevada frecuencia de infecciones por enteropatógenos y las diferencias en el microbioma y/o vellosidades intestinales de los niños que viven en entornos con pocos recursos y los que viven en entornos desarrollados ²²⁵⁻²²⁷.

Los estudios de valoración de impacto de Rotarix[®] y RotaTeq[®] realizados en su mayoría en Europa, Australia y América han mostrado reducciones sustanciales, del 22 – 50% en la mortalidad asociada a diarrea, del 17 – 55% en las hospitalizaciones asociadas a diarrea y del 49 – 91% en las hospitalizaciones debidas a GEA por RVA en los niños menores de cinco años de edad. Muchos estudios han informado también sobre la existencia de beneficios potenciales indirectos para los niños mayores y los jóvenes adultos no vacunados debido al efecto rebaño, con reducciones del 6 al 51% en las hospitalizaciones asociadas a diarrea y del 20 al 92% en las hospitalizaciones específicas de RVA ²²⁴. Este impacto indirecto de la vacuna en los individuos no vacunados podría ser atribuido a las fluctuaciones estacionales naturales de la actividad de RVA. Sin embargo, las reducciones observadas han sido significativamente más pronunciadas que las debidas a las fluctuaciones naturales ²²¹.

El diseño multivalente de la vacuna RotaTeq[®] se basó en el principio de que la respuesta protectora de la infección por RVA podría ser predominantemente homotípica en la naturaleza, específica para el G/P-tipo infectante ²²⁸. De hecho, estudios anteriores de protección con cepas individuales de RVA animales (por ejemplo RRV G3P[3], RotaShield[®]) indicaron que estos RVA monovalentes eran muy poco efectivos induciendo protección heterotípica ¹⁹⁶. Puesto que todos los genotipos dominantes a nivel global G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] y G12P[8] contienen al menos un G- o P-tipo en común con las cepas de la vacuna RotaTeq[®], la vacuna debería ser efectiva proporcionando respuestas protectoras a cualquiera de las cepas dominantes. Sorprendentemente, se ha referido que tanto Rotarix[®] como RotaTeq[®] proporcionan un nivel similar de protección frente a las diferentes cepas de RVA bien sean homotípicas,

parcialmente heterotípicas o totalmente heterotípicas ²²⁹⁻²³¹. La amplia protección heterotípica sugiere que otras proteínas diferentes a las de la cápside externa VP7 y VP4 podrían jugar un papel importante en la inducción de inmunidad protectora ²³². Sin embargo, los resultados de diversos estudios observacionales y de eficacia de la vacuna monovalente Rotarix[®] muestran que aunque la vacuna protege completamente frente a genotipos heterólogos (por ejemplo G2P[4]) podría hacerlo en menor medida ^{206, 233, 234}. Por otra parte, algunos estudios indican que tras la introducción de la vacuna no se ha producido una alteración consistente de los genotipos circulantes de RVA, pero otros sugieren que la prevalencia de genotipos específicos ha cambiado como resultado de la presión inmune de la población vacunada.

Contaminación de las vacunas frente a rotavirus Rotarix[®] y RotaTeq[®]

En marzo de 2010, la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) informó sobre la contaminación de la vacuna Rotarix[®] con ADN completo de circovirus porcino tipo 1 y recomendó suspender temporalmente su uso mientras durara la investigación de este hecho. En mayo de ese mismo año, se detectaron niveles bajos de fragmentos de ADN de circovirus porcino tipo 1 y tipo 2 también en la mayoría de los lotes de RotaTeq[®] ²³⁵. Sin embargo, la FDA recomendó reanudar el uso de Rotarix[®] y continuar con el uso de RotaTeq[®] ya que no hay evidencia de que el circovirus porcino infecte ni cause enfermedad en humanos y además, los beneficios de las vacunas son muchos y bien conocidos ²³⁶. Por el contrario en España, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) suspendió la comercialización de ambas vacunas durante cinco meses (de junio a noviembre de 2010) y la cobertura vacunal a nivel nacional descendió del 37 - 38% en 2009 al 19% en 2010 ^{214, 237}. Posteriormente, solo se reanudó la venta de RotaTeq[®] y no fue hasta mediados de 2016 cuando se procedió a levantar la suspensión de la comercialización de Rotarix[®]. En Galicia, costó tres años volver a los niveles de cobertura vacunal previos ²³⁷. Se ha estimado que en España durante los cinco meses en los que no se dispuso de vacunas frente a RVA alrededor de 85.000 niños no pudieron ser vacunados, casi 500 hospitalizaciones no fueron evitadas y se gastaron más de 2 millones de euros en gastos directos e indirectos relacionados ²³⁸.

1.15.4 Otras vacunas frente a rotavirus autorizadas en distintas naciones

El elevado coste de las vacunas actuales puede limitar su disponibilidad en diversas regiones del mundo, precisamente aquellas en las que más se necesita. Por consiguiente, hay una iniciativa global de desarrollo de nuevas vacunas frente a RVA que puedan ser fabricadas *in situ* por un precio menor ²³⁹.

Vacuna monovalente ovina – LLR (*Lanzhou Lamb Rotavirus*)

La vacuna viva atenuada *Lanzhou Lamb Rotavirus* (LLR) (Lanzhou Institute of Biomedical Products, China) es una vacuna monovalente oral que contiene una cepa de RVA G10P[12] de origen ovino ²⁴⁰. Se comercializó en China en el año 2000 para su uso en humanos ²⁴¹. A finales de 2014, se distribuyeron 60 millones de dosis de esta nueva vacuna a niños en China. Sin embargo, la eficacia de la vacuna LLR no ha sido reconocida internacionalmente ya que no ha sido confirmada por un ensayo clínico de Fase III diseñado correctamente. Varios estudios de casos-control llevados a cabo en hospitales han medido la eficacia de la vacuna LLR. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron inconsistentes ²⁴²⁻²⁴⁴.

Vacuna monovalente humana - Rotavin-M1™

Rotavin-M1™ (Center for Research and Production of Vaccines and Biologicals, POLYVAC, Vietnam) es una vacuna monovalente oral compuesta por una cepa humana atenuada G1P[8] que fue aislada de un niño vietnamita hospitalizado en 2003 ²⁴⁵. En 2012 fue aprobada para su uso en Vietnam. Aunque es necesario realizar más estudios, Rotavin-M1™ parece tener un perfil de seguridad y de inmunogenicidad similar a Rotarix® ²⁴⁵.

Vacuna monovalente humano-bovina - ROTAVAC®

La vacuna ROTAVAC® (Bharat Biotech, Hyderabad, India) es una vacuna viva atenuada compuesta por la cepa 116E (G9P[11]) que se aprobó en India en enero de 2014. La cepa 116E es un virus recombinante natural que contiene un gen de origen bovino (VP4 P[11]) y diez genes de origen humano. Se aisló en neonatos asintomáticos nacidos en el *All India Institute of Medical Sciences* de Nueva Delhi durante 1986 - 1988. ROTAVAC® se administra en tres dosis orales separadas por 4 semanas comenzando a las 6 semanas de edad y no se debe administrar a niños mayores de 8 meses. La eficacia de esta vacuna en el primer año de vida fue de un 56% y en el

segundo de un 49% ²⁴⁶. Actualmente, Bharat Biotech busca ser incluido entre los proveedores de vacuna preseleccionados por la OMS ²²⁴.

1.15.5 Vacunas frente a rotavirus en estudio

Vacuna monovalente humana - RV3-BB

RV3 (Biofarma. Indonesia) es una vacuna compuesta por una cepa G3P[6] humana viva atenuada que fue aislada en las heces de recién nacidos asintomáticos en un hospital de Australia en 1977 ²⁴⁷. La infección natural con la cepa RV3 mostró protección contra GEA clínicamente grave durante la reinfección con cepas de RVA heterotípicas en los tres primeros años de vida por lo que RV3 fue considerada una buena candidata para el desarrollo de nuevas vacunas ²⁴⁸. Dado que Rotarix[®], RotaTeq[®] y ROTAVAC[®] no se administran hasta las seis semanas de vida, se está estudiando dar la primera dosis de la vacuna RV3 por vía oral en el nacimiento y denominarla RV3-BB. Un ensayo clínico (Fase IIa) realizado en Nueva Zelanda ha mostrado que RV3-BB es una vacuna segura e inmunogénica cuando es administrada tanto a niños como a neonatos. Actualmente se está llevando a cabo un ensayo sobre la eficacia de esta posible vacuna en Indonesia ²⁴⁹.

Vacunas recombinantes humano-bovinas (*Bovine rotavirus* - BRV)

BRV es una vacuna autorizada por *National Institutes of Health* (NIH. USA) a varias compañías localizadas en tres países diferentes, Brasil, China e India (Instituto Butantan, Brazil, Serum Institute of India, India; Shantha Biotech, India, Minghai Biotechnology Co., China; Wuhan Institute of Biological Products, China).

Vacuna recombinante humano-bovina tetravalente - BRV-TV

La vacuna BRV-TV está compuesta por cuatro cepas recombinantes humano-bovinas, vivas y atenuadas cuyo gen VP7 ha sido cedido por cuatro cepas de RVA humano diferentes (G1, G2, G3 y G4) y su esqueleto por la cepa *UK Compton* bovina (G6P[7]). Esta vacuna consta de tres dosis y su administración es por vía oral. La primera dosis se administra a niños de 6 a 8 semanas de vida con posteriores dosis administradas tras intervalos de 4 semanas. Las fases I y II del estudio mostraron que la vacuna era segura, bien tolerada e inmunogénica en niños ²⁵⁰. En octubre de 2014 se inició la fase III del ensayo clínico de la vacuna BRV-TV en India.

Vacuna recombinante humano-bovina pentavalente - BRV-PV

La vacuna BRV-PV deriva de la vacuna BRV-TV. Esta vacuna pentavalente tiene la misma composición que BRV-TV con la diferencia de que BRV-PV incluye una quinta cepa recombinante cuyo gen VP7 es un G9 de origen humano (cepa AU32) (Figura 8). RVA G9 es un G-tipo importante en India ya que ha circulado ampliamente durante las últimas dos décadas ²⁵¹. A mediados de 2014, comenzó un ensayo clínico fase III en India y Níger para valorar la eficacia de esta vacuna.

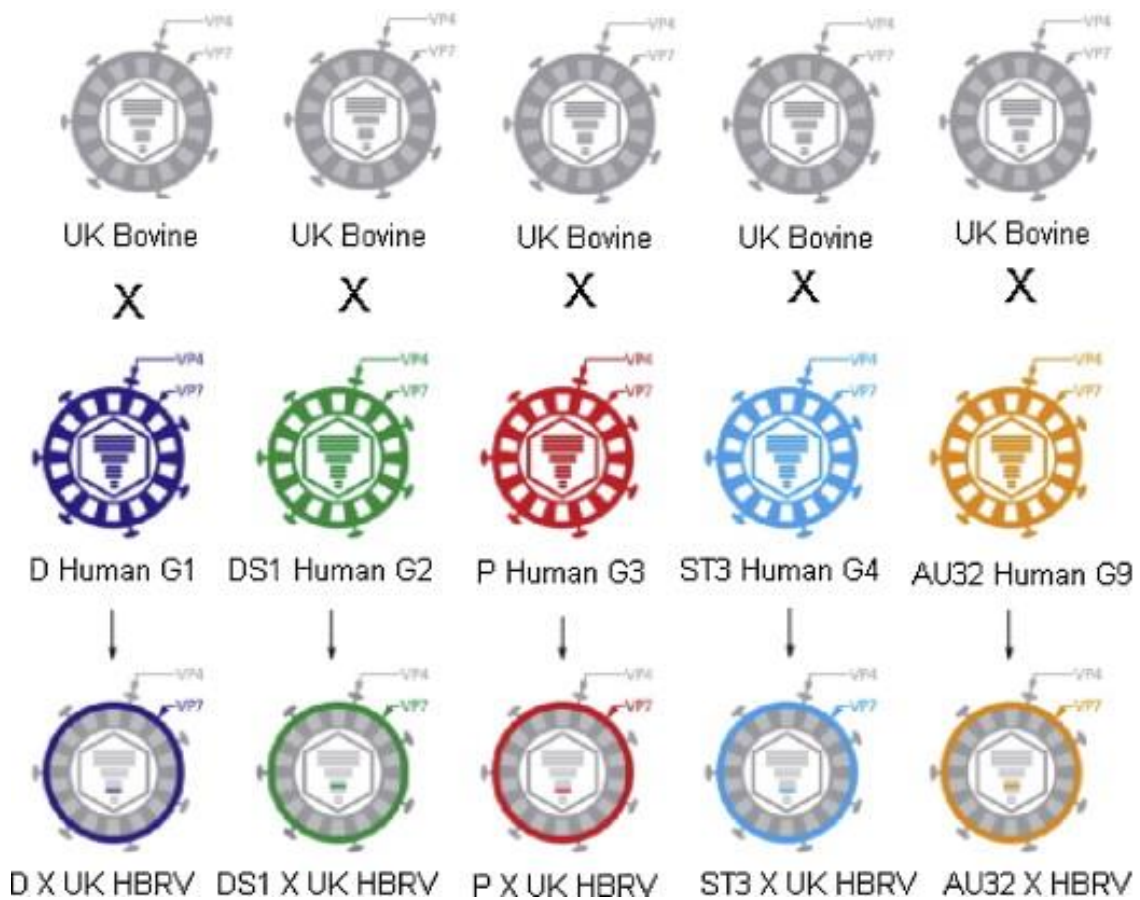


Figura 8.- Composición de la vacuna recombinante humano-bovina pentavalente BRV-PV (Serum Institute of India Ltd. India) ²⁵¹.

Vacuna recombinante humano-bovina hexavalente - BRV-HV

Esta vacuna se caracteriza por ser igual que la anterior pero además añade el G-tipo G8 (cepa 1290) a su composición.

Estas y otras vacunas en fase de desarrollo se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3.- Resumen de las características de las vacunas que se utilizan a nivel regional, recientemente autorizadas o en desarrollo ²²⁴.

Nombre	Composición	Vía de administración	Organización/Compañía	Etapas de desarrollo
Lanzhou Lamb Rotavirus (LLR)	Cepa de RVA de cordero viva atenuada G10P[12]	Oral	Lanzhou Institute of Biological Products, China	Autorizado para su uso en China
Rotavin - M1	Cepa de RVA humano viva atenuada G1P[8]	Oral	POLYVAC, Vietnam	Autorizado para su uso en Vietnam
ROTAVAC	Cepa de RVA neonatal viva atenuada G9P[11] (aka 116E)	Oral	Bharat Biotech, India	Autorizado en 2014 para su uso en India; en proceso de preselección por la OMS.
Recombinantes LLR	Cepa de RVA recombinante ovino-humano viva atenuada, G2, G3, G4	Oral	Lanzhou Institute of Biological Products, China	Fase III
RotaShield	Cepa de RVA recombinante rhesus-humano tetravalente viva atenuada,	Oral	International Medica Foundation, USA	Fase II completa Fase III pendiente
RV3	Cepa de RVA neonatal viva atenuada G3P[6]	Oral	Biofarma, Indonesia	Fase II
Recombinantes UK	Cepas de RVA recombinantes bovino-humano tetravalente, pentavalente, hexavalente vivas atenuadas	Oral	National Institutes of Health, USA; Instituto Butantan, Brazil; Serum Institute of India, India; Shantha Biotech, India; / Minghai Biotechnology Co., China; Wuhan Institute of Biological Products, China	Fase I y II, En investigación
NF-R7	Cepa de RVA recombinante ovino-humano viva atenuada, G4	Oral	Shenzhen Kangtai Biological Products Company, China	Fase I
Subunidad	VP8 truncado de P[4], P[6], P[8]	Intramuscular	National Institutes of Health and PATH, USA	Fase I
IRV	G1P[8], G2P[4] inactivados	Intramuscular o intradérmica	US CDC; múltiple (China, Europe, India)	Pre-clínico
Subunidad	Partículas tipo virus (VLPs): VP2/6/7 y VP2/4/6/7	Sin determinar	Baylor College of Medicine, USA	En investigación
Subunidad	VP8 truncado en partículas P de norovirus	Sin determinar	Cincinnati Children's Hospital Medical Center, USA	En investigación
Subunidad	VP6 combinado con VLPs de norovirus GI y GII	Sin determinar	University of Tampere School of Medicine, Finland	En investigación

2. JUSTIFICACIÓN,

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

El estudio de la presente Tesis se justifica por la necesidad de investigar una infección que es la primera causa de GEA infantil en el mundo, y responsable de más de un tercio de las muertes debidas a diarrea en los menores de cinco años. Aunque la práctica totalidad de las muertes suceden en países en vías de desarrollo, en nuestro medio el impacto de la infección es también importante, y supone un elevado número de visitas a Servicios de Urgencias y Atención Primaria, así como de hospitalizaciones. Además, el hecho de que dos vacunas frente a RVA estén siendo incluidas en los calendarios de vacunación de un número creciente de países, entre los que no se encuentra España aumenta la necesidad de conocer el impacto y carga de esta enfermedad en nuestro medio así como los genotipos circulantes, por lo que la presente Tesis proporcionará información útil para la toma de decisiones en Salud.

2.2 Hipótesis

La hipótesis de la presente Tesis Doctoral es que las principales características epidemiológicas y la carga de la enfermedad debida a RVA en la población infantil de Gipuzkoa serán similares a las comunicadas recientemente en otros países europeos que no han introducido la vacunación. RVA será la primera causa de hospitalización por GEA en niños menores cinco años de Gipuzkoa siendo su incidencia mayor en los menores de dos años. La estacionalidad de RVA será invernal como la habitualmente observada en países de clima templado o frío y nivel de desarrollo elevado. Además, estimamos que las reinfecciones y la GEA por RVA en el adulto serán raras debido a que las infecciones de repetición confieren cierta inmunidad. La vigilancia de los genotipos circulantes en Gipuzkoa revelará que unos pocos genotipos, denominados “principales”, causarán habitualmente la mayor parte de las infecciones tanto en la población infantil como en la adulta. Los genotipos causantes de las primoinfecciones serán, en su mayoría, diferentes a los de las reinfecciones debido, probablemente, a una menor protección frente a cepas de RVA parcialmente o totalmente heterotípicas. Se conoce muy poco aún sobre la repercusión que puede tener la progresiva introducción de las vacunas en la circulación global de los genotipos, incluso en los países en los que no han sido introducidas. Sin embargo, creemos que la presión selectiva ejercida por la vacunación influirá en la circulación global de los genotipos de manera que los genotipos principales serán reemplazados por otros actualmente inusuales no incluidos

en las vacunas como es el caso de RVA G12P[8] que desde la primera epidemia que causó en Gipuzkoa en 2010 – 2011 tendrá un papel importante en nuestro entorno y en el mundo. El análisis del genoma completo de las cepas G12P[8] de Gipuzkoa revelará que su exitosa diseminación se debe a un único clon que ha ido evolucionando en cada epidemia mediante mutaciones puntuales y/o eventos de reordenamiento genético. Por último, la circulación de genotipos inusuales será esporádica y, en la mayoría de los casos, resultado de una transmisión interespecies que fallará en la diseminación debido a la ineficiente replicación de las cepas zoonóticas en la población humana.

2.3 Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es describir las principales características epidemiológicas de las infecciones causadas por rotavirus del grupo A en la población de Gipuzkoa durante el período 1995 – 2015, con especial referencia al impacto y carga de la enfermedad y a los genotipos virales circulantes.

2.3.1 Objetivos específicos

1. Conocer a lo largo de las dos décadas de estudio las características epidemiológicas de la infección por rotavirus: comportamiento epidémico, estacionalidad, distribución etaria, impacto en términos de incidencia por edad y de hospitalización.
2. Estudiar la circulación de los genotipos de rotavirus detectados en Gipuzkoa, su distribución y fluctuaciones en las epidemias anuales, su participación en las reinfecciones y la posible emergencia de genotipos inusuales.
3. Estudiar las características virológicas del nuevo genotipo emergente G12P[8] efectuando un análisis filogenético para comparar entre sí las cepas detectadas en Gipuzkoa y conocer su persistencia y diversidad genética, así como para comparar su genoma completo con el de cepas internacionales.
4. Vigilar la aparición de cepas de genotipos inusuales y su frecuencia, describir su circulación esporádica o causando brotes. Analizar y comparar las características moleculares de las cepas inusuales detectadas y efectuar un análisis de su genoma completo si alguna de estas cepas fuera detectada persistentemente o causara brotes, para tratar de conocer su origen (humano o zoonótico y geográfico).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Estudio descriptivo, prospectivo (julio de 2008 - junio de 2015) y retrospectivo (julio de 1995 – junio de 2008) de las principales características epidemiológicas y moleculares (genotipos) de las cepas de RVA causantes de GEA en la población infantil menor de cinco años de edad de Gipuzkoa.

3.2. Área geográfica y población de estudio

3.2.1 Situación y clima

Gipuzkoa es una provincia situada al norte de España y uno de los Territorios Históricos que conforman la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). Limita al norte con el golfo de Bizkaia (mar Cantábrico), al sur con Araba y Navarra, al oeste con Bizkaia y Araba y al este con Navarra y Francia. Tiene una superficie de 1.909 km² y una población de 705.210 personas (censo del año 2011).

El territorio se divide en siete comarcas, cuatro de ellas situadas en la Costa (Bajo Bidasoa, San Sebastián, Urola - Costa y Bajo Deba) y tres en el interior (Tolosa, Goierri y Alto Deba) (Figura 9). En la costa guipuzcoana, el clima es de tipo oceánico, caracterizado por temperaturas moderadas y precipitaciones abundantes a lo largo de todo el año, pero predominando en otoño y comienzos del invierno. Los inviernos suelen ser moderados, con temperaturas mensuales medias en torno a los 8 - 10 °C y los veranos frescos, con temperaturas medias entre 18 y 20 °C. Por el contrario, en el interior, el territorio es montañoso y el clima tiende a ser de tipo continental, con oscilaciones térmicas de mayor magnitud debido a que la influencia moderadora del mar se debilita y al aumento de la altitud, siendo los inviernos más fríos y los veranos más calurosos.

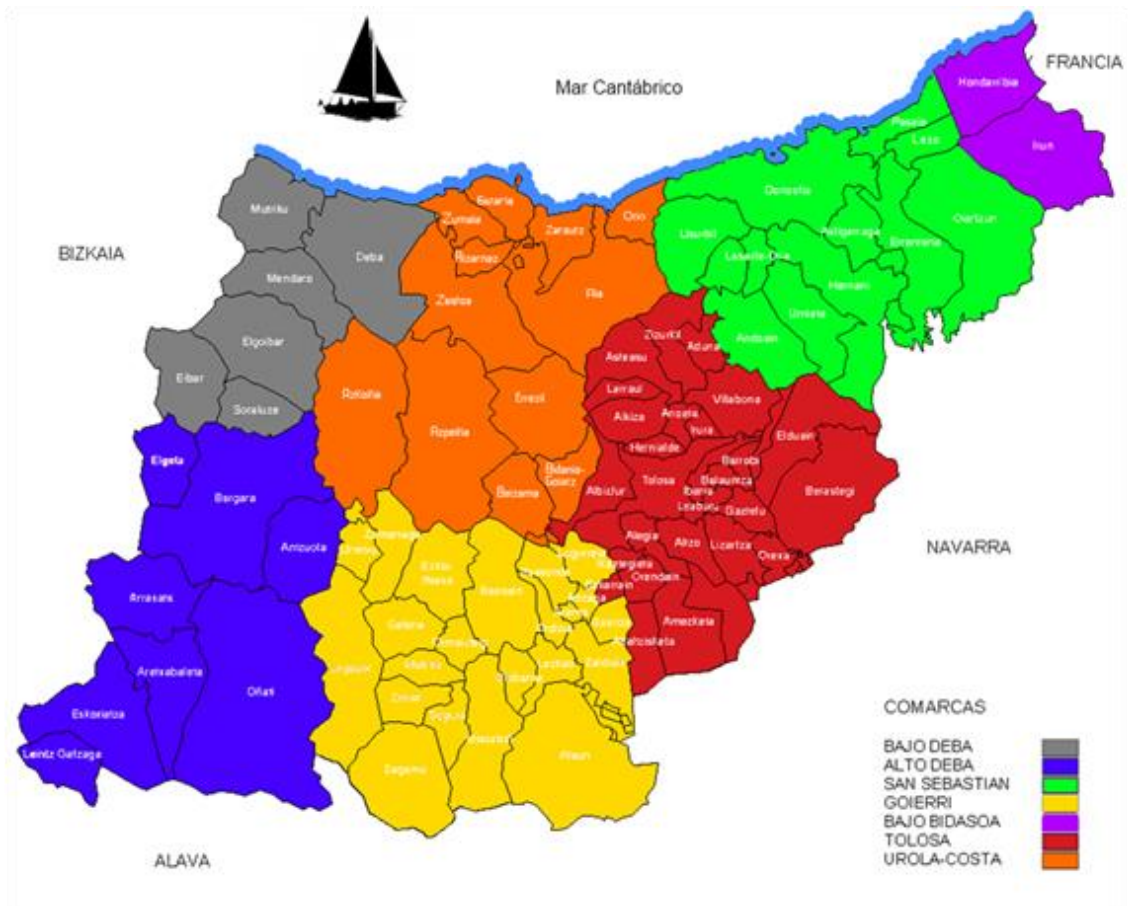


Figura 9.- Mapa de Gipuzkoa dividido en comarcas y municipios

3.2.2 Población de Gipuzkoa

El territorio de Gipuzkoa está densamente poblado (356,1 habitantes/km², dato de 2011). La población se agrupa en 88 municipios de los que 19 tienen más de 10.000 habitantes, siendo el más poblado la capital Donostia - San Sebastián (181.788 habitantes). Sin embargo, una parte significativa de la población (22,9%) habita en pequeñas localidades de carácter rural (localidades con menos de 10.000 habitantes), en las que las explotaciones ganaderas, especialmente de vacas y ovejas, y en menor número de cerdos, son numerosas. El 1,8% de la población (12.527 personas), vive en municipios de menos de 1.000 habitantes. La población ha permanecido relativamente estable en el último cuarto de siglo. En 1986 se censaron en la provincia 689.222 personas, disminuyendo este número ligeramente hasta 673.563 en el año 2001 (descenso del 2,3%) y aumentando de nuevo hasta 2011 (año del último censo disponible, en el que, como se ha señalado antes, se registraron 705.210 personas). La población infantil ha experimentado una evolución similar, aunque con variación más acusada: si bien en 1986 había 36.219 niños menores de 5 años de edad, este número

descendió hasta 26.439 en 1996 (descenso del 27,0%), aumentando progresivamente hasta 36.296 en 2011.

3.2.3 Organización Sanitaria de Gipuzkoa

Gipuzkoa está dividida en cinco Comarcas Sanitarias u “Organizaciones Sanitarias Integradas” (OSIs) (Figura 10). Cada OSI incluye las Unidades de Atención Primaria (UAP) de su área y el correspondiente Hospital Comarcal. Las OSIs son las siguientes: OSI Bidasoa (Hospital Bidasoa), OSI Bajo Deba (Hospital de Mendaro), OSI Goierri y Alto Urola (Hospital de Zumarraga), OSI Alto Deba (Hospital Alto de Deba o de Mondragón) y OSI Gipuzkoa (antes Comarca Gipuzkoa), que incluye las Comarcas geográficas San Sebastián, Tolosa y Urola - Costa, atendidas por el Hospital Universitario Donostia (HUD) (Donostia - San Sebastián), que es asimismo el hospital de nivel terciario para la provincia, excepto para la OSI Alto Deba, que por proximidad geográfica tiene como hospital de nivel terciario el de Txagorritxu (Vitoria - Gasteiz).



Figura 10.- Mapa de Gipuzkoa mostrando las “Organizaciones Sanitarias Integradas” (OSIs).

3.2.4 Territorio en el que se ha realizado el estudio

El área atendida por el Servicio de Microbiología del HUD ha cambiado a lo largo del período de estudio siguiendo las modificaciones en las redes asistenciales decididas por el Servicio Vasco de Salud/Osakidetza (Tabla 4). Hasta junio de 2011 el Servicio de Microbiología del HUD prestaba servicio a la población habitante de las comarcas de San Sebastián, Tolosa y Urola - Costa (Área 1). En julio de 2011 asumió la asistencia de la comarca de Bajo Bidasoa (Área 1+2) y en julio de 2014 la de las comarcas de Goierri - Alto Urola y Bajo Deba (Área 1+2+3). El área que actualmente atiende el Servicio de Microbiología del HUD (Área 1+2+3) cubre una extensión de 1.566 km² y cuenta con 643.115 habitantes, suponiendo el 91,2% de la población total de Gipuzkoa y el 29,5% de la población de la CAPV (Tabla 4).

Tabla 4.- Superficie, número de municipios y población de las diferentes comarcas atendidas por el Hospital Universitario Donostia durante el periodo de estudio.

Comarcas	Superficie (km ²)	Municipios	Población total	Niños < 5 años
San Sebastián	306	11	323.357	15.189
Tolosa	332	29	47.517	2.819
Urola - Costa*	326	11	73.450*	4.383
Área 1	964	51	444.324	22.391
Bajo Bidasoa	72	2	76.191	3.948
Área 1+2	1036	53	520.515	26.339
Goierri - Alto Urola	350	21	67.634	4.004
Bajo Deba	180	6	54.966	2.828
Área 1+2+3	1566	80	643.115	33.171

*No se incluyeron las localidades de Azpeitia, Azkoitia, Beizama y Errezil que fueron consideradas como parte de la comarca de Goierri.

No obstante, y para poder comparar las 20 epidemias de estudio entre sí sin que las modificaciones referidas afecten a sus resultados, el área analizada en la presente Tesis Doctoral fue el área 1, que incluye las comarcas de San Sebastián, Tolosa y Urola-Costa, cubriendo el 63% de la población de Gipuzkoa. Como excepciones, y para conocer el alcance de las epidemias causadas por algunos genotipos inusuales, el área de estudio se amplió a la comarca de Goierri-Alto Urola (ver punto 4.5.1) en el caso del

genotipo emergente G12 y en el caso del genotipo G3 atípico, al área final 1+2+3 que comprende todas las OSIs de Gipuzkoa excepto la de Alto Deba (ver punto 4.6).

3.3 Definición de algunos términos epidemiológicos empleados

Dado que RVA es un virus de carácter invernal y habitualmente, en los países de clima templado o frío, la epidemia anual se extiende a caballo entre dos años, se definió como **temporada epidémica** de RVA el período de tiempo transcurrido entre el 1 de julio de un año y el 30 de junio del año siguiente. Se consideró que los meses de **inicio y final de cada epidemia** fueron el primer y último mes de la temporada en los que se detectaron al menos 15 casos de GEA causada por RVA, respectivamente. Se consideró como **pico epidémico** el mes con mayor número de casos de GEA por RVA de cada temporada. Se consideró **ámbito rural** al conjunto de poblaciones con menos de 10.000 habitantes en las cuales normalmente, la dispersión de la población en un territorio concreto es mayor, y **ámbito urbano** a la capital y pueblos con 10.000 habitantes o más, en los que hay una mayor concentración de personas en un territorio concreto.

En este estudio se definió como **genotipo dominante** de una temporada aquél con mayor presencia y **codominantes** aquellos (segundo e incluso tercer genotipo) detectados en número al menos similar a la mitad de las cepas que fueron positivas para el genotipo dominante.

3.4. Cobertura de las vacunas frente a rotavirus en Gipuzkoa

En España se comercializan dos vacunas frente a RVA: Rotarix[®] (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) desde agosto de 2006 y RotaTeq[®] (Sanofi Pasteur-MSD, Lyon, France) desde enero de 2007. Estas vacunas no han sido incluidas en el calendario vacunal de la CAPV ni en los de otras comunidades autónomas españolas durante el periodo de estudio. La cobertura media para ambas vacunas en Gipuzkoa (estimada en base al número de dosis dispensadas en farmacias de la provincia) fue baja, y menor del 20% entre 2007 y 2010. La comercialización de ambas vacunas en España se suspendió de junio a noviembre de 2010 debido a la detección de material genético de circovirus porcino en su composición, lo que hizo que la cobertura vacunal en Gipuzkoa disminuyera del 18% en 2009 al 9% en 2010. Posteriormente, solo se reanudó la venta de RotaTeq[®] y no fue hasta mediados de 2016 cuando se procedió a levantar la suspensión de la comercialización de Rotarix[®]. Para conocer la cobertura

vacunal en nuestro medio en 2013, 2014 y 2015, se solicitó a las tres distribuidoras farmacéuticas (Distribuidora Farmacéutica Guipuzcoana (DFG), Cofares y Alliance Healthcare) que abastecen a las oficinas de farmacia de Gipuzkoa, el número de dosis de RotaTeq[®] distribuidas cada año (Apéndice I, Tabla AI-1). En base a esos datos, la cobertura vacunal en Gipuzkoa fue del 5,3% en 2013, del 4,3% en 2014 y del 5,1% en 2015.

3.5 Grupos de población objeto de estudio

3.5.1 Selección de la población

Se incluyeron en el estudio todos los niños menores de cinco años de edad atendidos por GEA en los Centros de Atención Primaria de las áreas de estudio, en el Servicio de Urgencias del HUD y/o aquellos que fueron hospitalizados (> 24h) por GEA en el HUD, a los que se detectó RVA en una muestra de heces. En las dos últimas temporadas de estudio, 2013 – 2014 y 2014 – 2015, el estudio se amplió a los pacientes de cinco o más años, aunque los resultados obtenidos se analizaron de forma separada a los de la población infantil (ver apartados 4.3 y 4.4.7).

Para evitar episodios duplicados, solamente se incluyó la primera muestra positiva en el caso de que un mismo paciente tuviera más de una muestra positiva a RVA en un periodo de seis meses.

3.5.2 Estudio de incidencia de hospitalización

Para obtener la relación total de niños hospitalizados a causa de GEA por RVA, se efectuó una doble búsqueda informática, empleando por un lado los registros del Servicio de Documentación Clínica del HUD, y por otro los del Servicio de Microbiología.

En el Servicio de Documentación Clínica, los niños menores de cinco años de edad hospitalizados por GEA de cualquier causa (> 24h) fueron identificados mediante búsqueda informática de los datos de alta hospitalaria. Inicialmente, se seleccionaron todas aquellas altas hospitalarias que tuvieran un código de GEA de la Clasificación Internacional de Enfermedades, 9ª revisión, Modificación Clínica (CIE-9-MC). Se usaron los códigos del grupo de “Enfermedades Infecciosas Intestinales” de una determinada etiología (001 – 009, excluyendo 003.2 y 006.3 – 006.8) y los códigos para aquellas de etiología sin determinar, incluyendo aquellos casos de presunto origen

infeccioso (009.0 – 009.3) y no infeccioso (558.9, 787.03 y 787.91) (Tabla 5). Todos los niños con código de GEA como principal código de alta fueron incluidos, así como aquellos con código de GEA como código de alta secundario pero cuyo historial médico mostró una clara asociación con GEA (ej: deshidratación que requiere reposición de líquidos por vía intravenosa). Los reingresos debidos a un mismo agente enteropatógeno en un mismo semestre fueron excluidos del estudio, a pesar de que hubiera una pequeña posibilidad de que algunos fueran nuevos episodios.

Tabla 5.- Descripción de los códigos de la CIE-9-MC incluidos y excluidos en el estudio.

Código CIE-9-MC	Definición	Incluido/Excluido
001 - 009	Enfermedades Infecciosas Intestinales	Incluido
003.2	Infecciones por salmonella localizadas	Excluido
006.3	Absceso amebiano del hígado	Excluido
006.4	Absceso amebiano pulmonar	Excluido
006.5	Absceso amebiano cerebral	Excluido
006.6	Ulceración amebiana cutánea	Excluido
006.8	Infección amebiana de otros sitios	Excluido
008.61	Rotavirus	Incluido
008.63	Norovirus	Incluido
008.43	<i>Campylobacter</i>	Incluido
009.0	Colitis, enteritis y gastroenteritis infecciosas	Incluido
009.1	Colitis, enteritis y gastroenteritis de origen presumiblemente infeccioso	Incluido
009.2	Diarrea infecciosa	Incluido
009.3	Diarrea de origen presumiblemente infeccioso	Incluido
558.9	Otras gastroenteritis/colitis no infecciosas y gastroenteritis y colitis no infecciosas no especificadas	Incluido
787.91	Diarrea	Incluido
787.03	Solo vómitos	Incluido

En el Servicio de Microbiología del HUD, los niños con GEA causada por RVA fueron identificados mediante búsqueda informática de los registros del Servicio. En el Servicio de Pediatría, como parte de los procedimientos de rutina se recoge uno o más coprocultivos de todos los pacientes hospitalizados con GEA. Los pacientes cuyas heces fueron simultáneamente positivas para RVA y/o algún otro virus y/o bacteria enteropatógena fueron incluidos en el estudio, aunque la presencia de RVA en algunos de estos pacientes pudo haber sido incidental (secundaria). Se obtuvieron los datos

demográficos de cada paciente con GEA relacionada con RVA durante el periodo de estudio y se anotó el número de historia clínica o CIC (código de identificación corporativo). Finalmente, se unieron ambas bases de datos (datos de alta hospitalaria y datos de laboratorio) usando el número de historia clínica o CIC para crear una única base de datos con los datos demográficos, clínicos y virológicos de los pacientes. De la base de datos obtenida, fueron excluidas las infecciones de tipo nosocomial en las que se recogieron muestras de heces en 5 días o más desde el ingreso en el hospital, así como entre 3 - 4 días si la revisión de la historia clínica indicaba que el paciente había sido hospitalizado por otra causa y el cuadro de GEA se había desencadenado durante el ingreso, las de tipo concomitante en las que la GEA no era la causa de ingreso y los niños menores de un mes de vida para evitar la posibilidad de incluir cuadros nosocomiales en el estudio.

3.5.3 Población en la que se efectuó el genotipado de rotavirus

Entre los pacientes infectados por RVA (detección de antígeno o ARN), se genotiparon las muestras en las que hubo materia fecal sobrante. Si bien hasta la temporada 2008 - 2009 se emplearon las muestras que presentaron densidad óptica más elevada (> 2.000) en la prueba inmunológica, con la finalidad de genotipar muestras con concentración alta de RVA en heces. A partir de la temporada 2009 - 2010 el genotipado se efectuó en todas las muestras positivas con independencia de la reactividad obtenida en la prueba de detección de antígeno. Cuando en muestras positivas para antígeno de RVA no se detectó ni G- ni P-tipo, se investigó la presencia de ARN del gen VP6 mediante PCR. Se consideró que las muestras negativas también a este gen carecían de suficiente ARN viral para el genotipado, aunque no se pudo excluir la posibilidad de que fuera consecuencia de resultados falsamente positivos del test de detección de antígeno utilizado (en los años en que éste fue el método de detección usado).

3.6 Toma y envío de muestras

Las muestras utilizadas en este estudio fueron heces recogidas en contenedor estéril de 100 ml o frotis rectales recogidos en hisopos estériles con medio de transporte viral MTV y/o Viscosa (Deltalab ref 300287, España) (Figura 11).



Figura 11.- Fotografía de los dos métodos de recogida de heces (contenedor e hisopo rectal) utilizados en este estudio.

Las muestras fueron procesadas siguiendo el procedimiento habitual en el HUD. Las muestras recogidas en el Hospital fueron remitidas en un plazo breve tras su colección (< 1 hora) al Área de Recepción de muestras del laboratorio, desde donde fueron enviadas al Servicio de Microbiología (< 2 horas) en horario de 8 h a 21 h o almacenadas a 2 – 8 °C fuera de ese horario y en días festivos. Las muestras recepcionadas en los Centros de Atención Primaria fueron enviadas al Servicio de Microbiología del HUD habitualmente en la misma mañana. En el inusual caso de no llegar a tiempo para ser incluidas en el envío, fueron mantenidas en frigorífico a 2 – 8 °C hasta el siguiente envío (un envío diario de lunes a viernes). En general, las muestras clínicas fueron procesadas en menos de 24 h desde su obtención o en menos de 48 h en fines de semana.

Tras su recepción en el Laboratorio, en todos los casos, una parte de cada muestra se re-suspendió en tampón fosfato salino 0,9% (PBS) esterilizado en autoclave, procedimiento seguido hasta el año 2005, y a partir de esa fecha en medio B199 (Sigma-Aldrich, USA). Se preparó una segunda alícuota de las muestras positivas, que fue almacenada a -80 °C, para estudios posteriores.

3.7 Métodos de detección de rotavirus

3.7.1 Cambios ocurridos en los métodos de investigación de enteropatógenos y específicamente en la detección de virus en heces durante el período de estudio

En todas las muestras recibidas en el Servicio de Microbiología del HUD desde mediados de los años 80 hasta el año 2012 se investigó rutinariamente la presencia de patógenos bacterianos (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157...) mediante inoculación en medios de cultivo, así como de antígeno de RVA mediante enzimoinmunoanálisis.

La detección de norovirus comenzó a realizarse en el año 2000 mediante PCR en tiempo real en pacientes afectados en el contexto de brotes, ampliándose este estudio en el año 2002 a un muestreo aleatorio (10 - 15 muestras/semana) con el fin de conocer la incidencia de GEA esporádica por norovirus entre las muestras fecales recibidas en el laboratorio para coprocultivo de niños con GEA. A partir del año 2009 la detección se realizó de forma prospectiva y regular en todos los niños menores de 15 años, adultos hospitalizados y ancianos institucionalizados.

En el año 2013 se sustituyó el coprocultivo tradicional por métodos moleculares (detección de todos los enteropatógenos mediante multiplex PCR en tiempo real) lo que supuso un importante cambio en el método de detección de RVA, abandonándose la detección mediante enzimoinmunoanálisis a favor de la PCR (julio de 2013) y extendiéndose el estudio de los virus enteropatógenos de la población infantil a la totalidad de los adultos (Figura 12).

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN EL PERIODO DE ESTUDIO

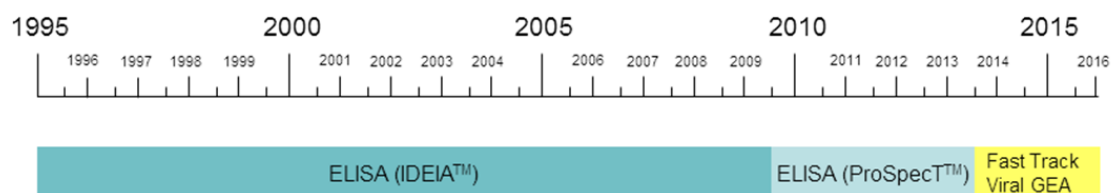


Figura 12.- Cronograma de los cambios ocurridos en la metodología de detección de rotavirus durante el periodo de estudio.

3.7.2 Detección de antígeno de rotavirus (hasta junio de 2013)

Para la detección de antígeno de RVA en muestras de heces se usaron dos kits de enzimoinmunoanálisis tipo sandwich de características similares: “IDEIA™ Rotavirus kit” (DAKO Diagnostics Ltd, UK) hasta junio del año 2009 y “ProSpecT™ Rotavirus kit” (Oxoid Ltd, UK) desde julio de ese año hasta junio de 2013 (Figura 12). Estos tests utilizan anticuerpos policlonales para detectar proteínas específicas de grupo. Los anticuerpos policlonales son por un lado inmovilizados en una fase sólida (microplaca de poliestireno) y por otro conjugados con peroxidasa de rábano picante (POD). Para detectar el antígeno de RVA se prepara una suspensión fecal en el tampón de dilución proporcionado por el kit, que es posteriormente añadida a los pocillos de la microplaca simultáneamente con el conjugado, e incubada durante 60 minutos a temperatura ambiente. El antígeno de RVA presente en la muestra es capturado entre el anticuerpo que está en la fase sólida y el anticuerpo conjugado con el enzima POD. Seguidamente, se lavan los pocillos con tampón de lavado para eliminar el exceso de muestra y el conjugado que no se hubiera unido. A continuación, se añade un cromógeno a los pocillos (tetrametilbencidina) y se deja incubar diez minutos a temperatura ambiente. La presencia de anticuerpos marcados con enzima específicamente unidos en los pocillos causa un cambio de color por oxidación del cromógeno (inoloro a azul), proceso que es detenido con la adición de la solución de parada (ácido sulfúrico). La intensidad del color valorada en un espectrofotómetro (450 nm) se relaciona con la presencia de antígeno de RVA en la muestra o control.

3.7.3 Detección de rotavirus mediante métodos moleculares

Extracción de ácidos nucleicos

Las muestras de heces se resuspendieron en PBS o en medio B199 según el periodo de estudio, (ver punto 3.6) y los ácidos nucleicos virales se extrajeron diariamente en el extractor NucliSENS® EasyMAG® (bio-Mérieux SA, Marcy l’Etoile, France) (Figura 13) obteniendo un eluido final de 55 µl a partir de 300 µl de muestra.

NucliSENS® EasyMAG® es un sistema automatizado para la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas basado en el método de Boom que aprovecha la tecnología de extracción con sílice magnetizado ²⁵². Tras un paso inicial de lisis con un agente caotrópico (hidrocloruro de guanidina) que destruye las estructuras virales externas, el ADN y ARN liberados se unen a las partículas magnéticas de sílice. Posteriormente, un imán atrae todas las partículas de sílice para que el sistema pueda

purificar los ácidos nucleicos unidos mediante múltiples lavados. A continuación, y mediante calentamiento se liberan los ácidos nucleicos de las partículas de sílice. Y por último, las partículas magnéticas de sílice son separadas del eluido mediante un imán, quedando los ácidos nucleicos extraídos en el eluido.



Figura 13.- Fotografía de la plataforma de extracción de ácidos nucleicos NucliSENS® EasyMAG®.

Amplificación y detección de rotavirus (julio 2013 - junio de 2015)

A partir de julio de 2013 la detección de RVA se realizó mediante el test “*in vitro* FTD® Viral Gastroenteritis” (Fast-Track Diagnostics Ltd, Junglinster, Luxembourg). Este kit detecta infecciones por RVA (NSP3), norovirus GI (unión ORF 1-2), norovirus GII (unión ORF 1-2), astrovirus (gen de la proteína de la cápside externa), adenovirus (gen hexón) y sapovirus mediante la detección cualitativa de ácidos nucleicos virales en muestras de heces. “FTD Viral Gastroenteritis” utiliza la tecnología TaqMan®. En un único tubo, se produce un paso de transcripción inversa en el que el ARN viral es transcrito a ADN complementario (ADNc) seguido de un segundo paso de multiplex PCR. La presencia de secuencias virales específicas amplificadas en la reacción es detectada por un aumento en la fluorescencia observada a partir de la correspondiente sonda doblemente marcada. Los resultados se informan como un valor de ciclo umbral (Ct) por el termociclador en tiempo real. El test utiliza el virus del mosaico del bromo (BMV) como control interno (CI), que debe ser añadido al tampón de lisis en la etapa de

extracción tanto en el control negativo como en cada una de las muestras. La técnica se efectuó en un termociclador CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) (Figura 14) siguiendo las instrucciones del fabricante (nº de ciclos, tiempos y temperaturas).



Figura 14.- Fotografía del termociclador CFX96 (Bio-Rad).

3.8 Genotipado de rotavirus

3.8.1 Transcripción inversa

En aquellas muestras positivas a RVA se realizó la transcripción inversa del ARN a partir del eluido previamente extraído (ver “Extracción de ácidos nucleicos” en apartado 3.7.3). Para ello, se utilizaron hexámeros aleatorios (Life Technologies, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT. Promega, Madison, Wi, USA). Esta enzima es una ADN polimerasa dependiente de ARN que cataliza la polimerización de ADNc a partir de ARN viral. La transcripción inversa se realizó en un volumen final de 110 μ l, aplicándose las siguientes condiciones: 1 h a 37 °C y 5 min a 95 °C en un termociclador convencional. Todas las PCR convencionales de la presente Tesis se llevaron a cabo en

termocicladores 9800 Fast Thermal Cycler o GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

3.8.2 Genotipado habitual (genes VP7 y VP4)

Tras la transcripción inversa, las muestras positivas a RVA fueron genotipadas mediante dos multiplex PCR semi-anidadas, siguiendo la metodología propuesta por EuroRotaNet (Red Europea de Vigilancia de Rotavirus) ⁵⁷. El primer *round* de estas PCR consiste en la amplificación parcial del gen VP7 (881 pb) y del gen VP4 (663 pb) utilizando las parejas de cebadores altamente conservados VP7-F/VP7-R y VP4-F/VP4-R, respectivamente. La descripción de los cebadores ha sido detallada en la Tabla 6.

Tabla 6.- Cebadores empleados para el genotipado de rotavirus grupo A.

GEN	NOMBRE	SECUENCIA	LOCALIZACIÓN (nt)	AMPLIFICADO (pb)	FUENTE	
VP7 1° round	VP7-F	5' ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC 3'	51-71	881	253	
	VP7-R	5' AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC 3'	914-932			
VP7 2° round	G1-F	5' CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G 3'	314-335	618	53, 57, 254	
	G2-F	5' CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G 3'	411-435	521		
	G3-F	5' ACG AAC TCA ACA CGA GAG G 3'	250-269	682		
	G4-F	5' CGT TTC TGG TGA GGA GTT G 3'	480-499	452		
	G8-F	5' TTR TCG CAC CAT TTG TGA AAT 3'	176-198	756		
	G9-F	5' CTT GAT GTG ACT AYA AAT AC 3'	757-776	179		
	G10-F	5' ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG 3'	666-687	266		
	G12-F	5' GGT TAT GTA ATC CGA TGG ACG 3'	548 -567	396		
	VP7-R	5' AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC 3'	914-932	-		-
	VP4 1° round	VP4-F	5' TAT GCT CCA GTN AAT TGG 3'	132-149		663
VP4-R		5' ATT GCA TTT CTT TCC ATA ATG 3'	775-795			
VP4 2° round	VP4-F	5' TAT GCT CCA GTN AAT TGG 3'	132-149	-	-	
	P[4]-R	5' CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC 3'	474-494	483	52, 254, 256	
	P[6]-R	5' TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA 3'	259-278	267		
	P[8]-R	5' TCT ACT GGR TTR ACN TGC 3'	339-356	345		
	P[9]-R	5' TGA GAC ATG CAA TTG GAC 3'	385-402	391		
	P[10]-R	5' ATC ATA GTT AGT AGT CGG 3'	575-594	583		
	P[11]-R	5' GTA AAC ATC CAG AAT GTG 3'	305-323	312		
VP6 parcial	VP6-F	5' GAC GGV GCR ACT ACA TGG T 3'	747-766	379		257
	VP6-R	5' GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG 3'	1106-1126			
VP6 completo	VP6-MattF	5' GGC TTT WAA ACG AAG TCT TC 3'	1-20	1356	150	
	VP6-MattR	5' GGT CAC ATC CTC TCA CT 3'	1340-1356			
NSP4 completo	NSP4-F	5' TAA AAG TTC TGT TCC GAG AGA G 3'	7-27	744	258	
	NSP4EUR-R	5' GGT CAC ACT AAG ACC ATT CC 3'	731-750			259

Ambas PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ l conteniendo 5 μ l de ADNc, Mg^{2+} a una concentración final de 2 mM, cada dNTP a 200 μ M, cada cebador a 0,25 μ M y 1,5 U de Taq polimerasa. Las PCR se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 10 min a 94 °C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C en el caso del gen VP7 y a 50 °C en el de VP4, 1 min a 72 °C y una elongación final de 7 min a 72 °C. A continuación, se realizó una segunda PCR (segundo *round*) de cada gen en un volumen final de 25 μ L conteniendo 2 μ L del producto amplificado en la primera PCR, Multiplex PCR Master Mix 2x (QIAGEN, Hilden, Germany) y solución *stock* de los cebadores a una concentración final de 0,2 μ M. Para la preparación de la solución *stock* de los cebadores se añadieron los diferentes cebadores a una concentración final de 2 μ M y se añadió TE (10 Mm TrisCl, 1 Mm EDTA, pH 8.0) hasta alcanzar un volumen final de 500 μ L. Con el fin de conocer el G- y P-tipo de las muestras de RVA sin necesidad de secuenciación, se añadieron, en el caso del gen VP7, el cebador VP7-R (*reverse*) de la primera reacción y diversos cebadores *forward* (G1-F, G2-F, G3-F, G4-F, G8-F, G9-F, G10-F y G12-F). Cada uno de estos cebadores *forward* tiene un sitio de unión diferente y específico de cada genotipo, pero incluido en los 881pb de la secuencia amplificada en el primer *round* (Figura 15). Los cebadores utilizados en el segundo *round* del gen VP4 fueron VP4-F/P[4]-R, P[6]-R, P[8]-R, P[9]-R, P[10]-R y P[11]-R. Las condiciones de las PCR correspondientes al segundo *round* fueron las siguientes: 10 min a 94 °C para una desnaturalización inicial, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 42 °C en el caso del gen VP7 y a 45 °C en el de VP4, 1 min a 72 °C y una elongación final de 7 min a 72 °C. De esta manera, se pudieron diferenciar los diferentes G- y P-tipos en función de los pesos moleculares de los amplificados al visualizar el resultado mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa (Agarose D1 LOW EEO, Laboratorios Conda, España) TAE al 2% utilizando bromuro de etidio (10 mg/mL BIORAD, USA) que fue sustituido en el año 2005 por SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, CA, USA). El gel se analizó con el aparato Gel Doc 1000 o a partir de 2014 con el aparato Molecular Imager[®] Gel Doc[™]XR+ with Image Lab[™] Software (BIO-RAD, USA) (Figura 16).

Ilustración esquemática de las posiciones específicas de los cebadores de VP7 y VP4 y los tamaños de los amplicones de G- y P-tipo.

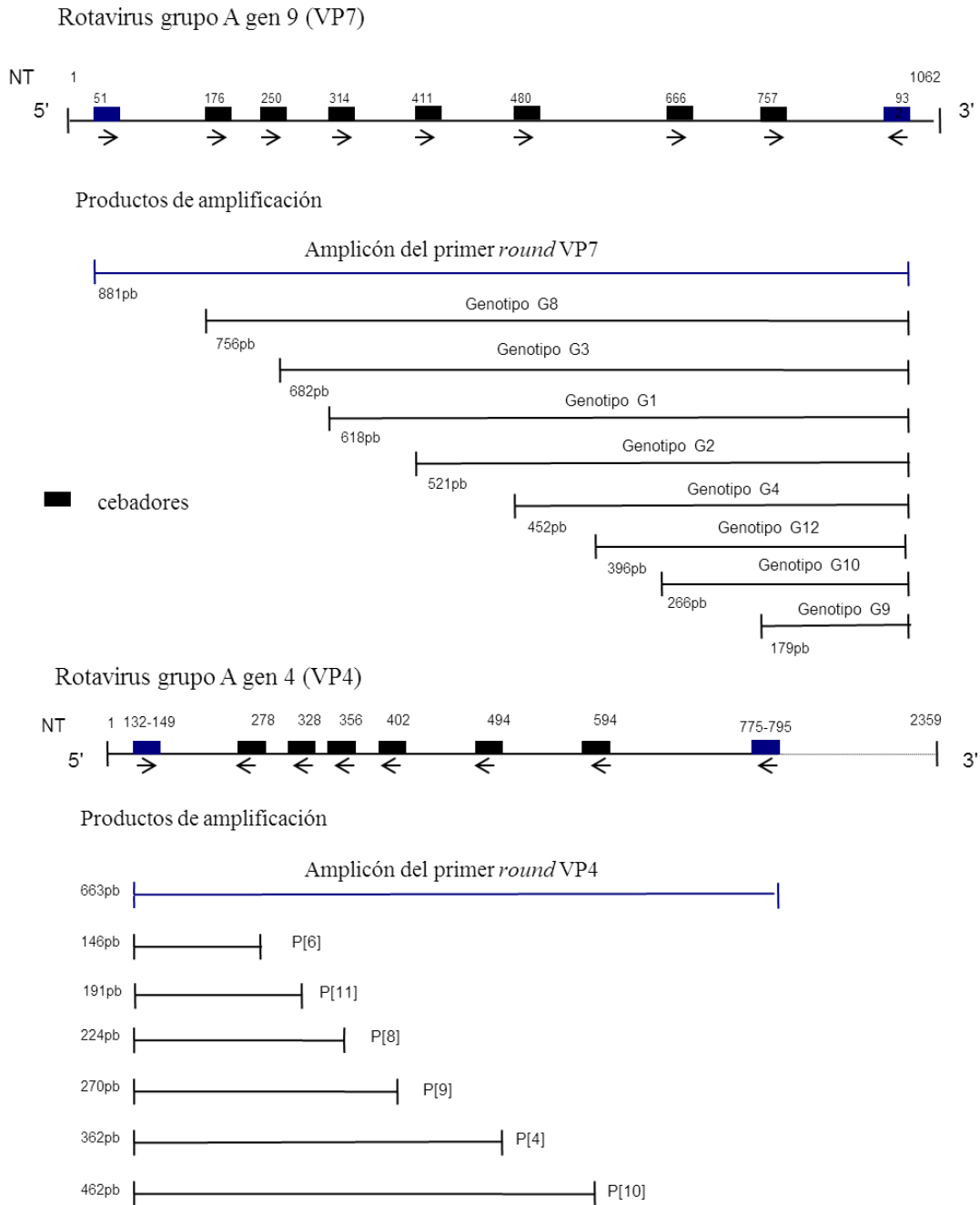


Figura 15.- Representación esquemática de las posiciones de los cebadores específicos para los genes VP7 y VP4 y los tamaños de los amplicones de G- y P-tipo ⁵⁷.

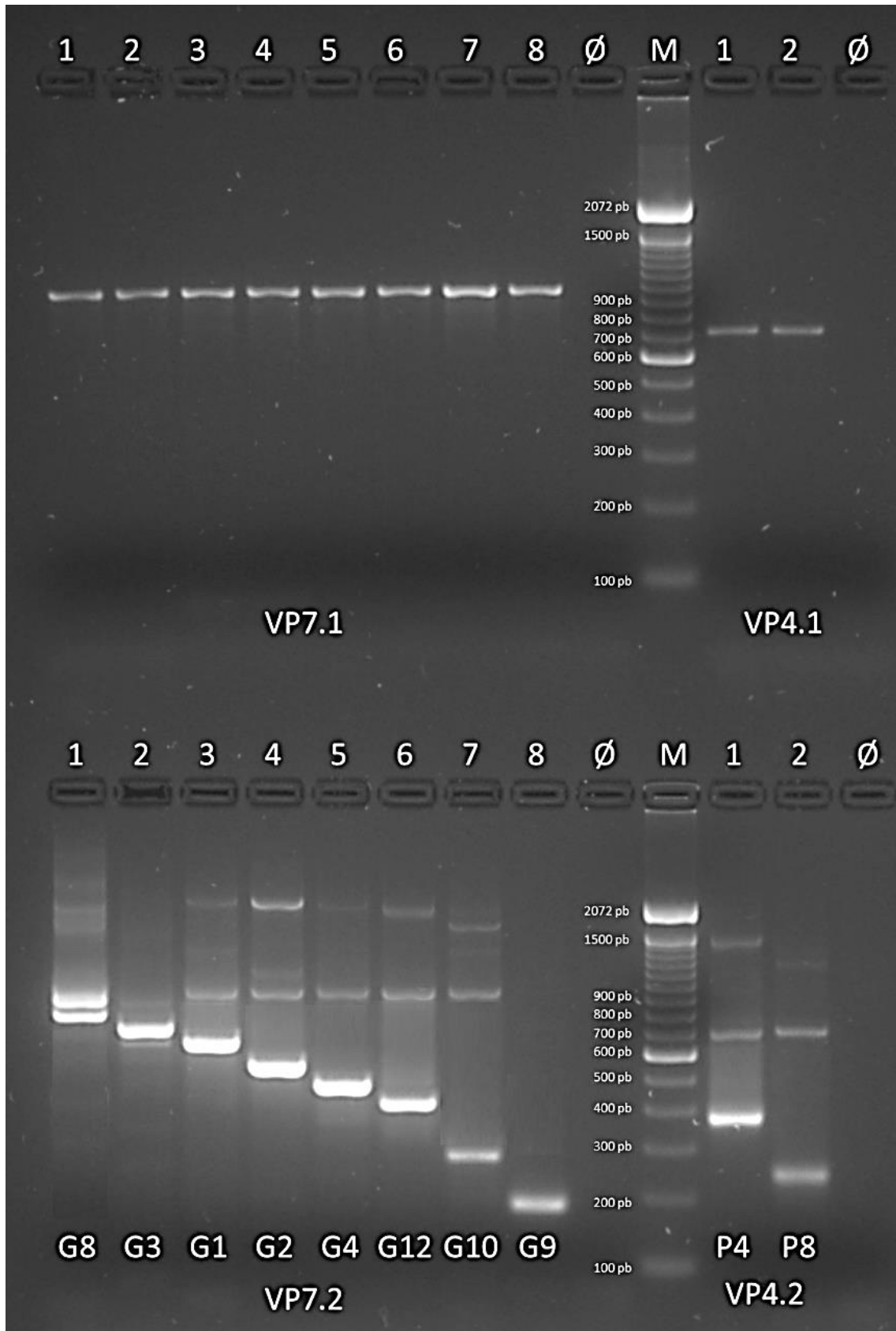


Figura 16.- Fotografía de un gel de agarosa bajo luz UV donde se observa en la parte superior el primer *round* de los genes VP7 y VP4 y en la parte inferior el segundo *round* representando algunos de los genotipos de rotavirus.

3.8.3 Detección de los segmentos génicos VP6 y NSP4

Como se ha mencionado en el apartado 3.5.3, en aquellas muestras en las que las PCR para detectar los genes VP7 y VP4 fueron negativas se realizó una PCR convencional de un tercer gen, VP6, para confirmar la presencia de RVA. Para la amplificación parcial del gen VP6 (379 pb) se utilizó una pareja de cebadores altamente conservados, VP6-F/VP6-R (Tabla 6). Esta reacción se realizó en un volumen final de 50 μ l conteniendo 5 μ l de ADNc, Mg^{2+} a una concentración final de 2 mM, cada dNTP a 200 μ M, cada cebador a 0,25 μ M y 1,5 U de Taq polimerasa, y se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 5 min a 94 °C para una desnaturalización inicial, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 55 °C, 1 min a 72 °C y una elongación final de 7 min a 72 °C.

Excepcionalmente, se amplificaron los genes VP6 y NSP4 completos de algunas cepas de RVA recogidas durante la temporada 2014 - 2015. En ambos casos, las PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ L conteniendo 5 μ l de ADNc, Multiplex PCR Master Mix 2x (QIAGEN) y la pareja de cebadores correspondiente a una concentración final de 0,2 μ M, y se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 15 min a 95°C para una desnaturalización inicial, 40 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 45°C para la hibridación específica de los cebadores, 3 min a 68 °C y una elongación final de 7 min a 72°C. En el caso del gen VP6 la pareja de cebadores utilizada fue VP6-MattF/VP6-MattR y en el caso del gen NSP4 fue NSP4-F/NSP4EUR-R (Tabla 6). En cada PCR del presente trabajo se incluyó un control negativo (agua) que fue tratado de manera idéntica a las muestras clínicas a lo largo de todo el experimento.

3.8.4 Secuenciación y análisis de secuencias

Selección de muestras para secuenciar

Para el cumplimiento de los diferentes objetivos de esta Tesis se secuenciaron genes de numerosas cepas de RVA. A) En cada tanda de PCR se secuenció el amplificado de una muestra por cada G-tipo diferente y su P-tipo correspondiente (genes parciales VP7 y VP4, respectivamente). Además, se secuenciaron los amplificados obtenidos de estos mismos genes, de todas las cepas con genotipo inusual o aquellas cuyo resultado fue dudoso. B) En la última temporada de estudio (2014 - 2015), se secuenció el amplificado parcial del gen VP7 de todas las muestras tipadas como G12. En todos los casos anteriores, se priorizó la secuenciación de aquellas muestras en las que se detectó producto amplificado en el primer *round* de PCR con el fin de obtener una secuencia de mayor longitud. C) Excepcionalmente, se secuenciaron los genes VP6 y NSP4

completos (*forward* y *reverse*) de las cepas G2P[4] detectadas en la temporada 2014 - 2015.

Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Investigación Biodonostia con el aparato ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) o en Macrogen Europe con el aparato ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA).

Ensamblado de secuencias para la obtención de los genes VP6 y NSP4 completos

Se secuenciaron en ambos sentidos (*forward* y *reverse*) todos los amplificadores obtenidos en las PCR de VP6 y NSP4, debido a la longitud de los fragmentos (1356 y 751 pb, respectivamente) y a la necesidad de evitar la existencia de bases ambiguas en toda su extensión. Posteriormente, para obtener una secuencia consenso se empleó el programa informático “Geneious R8”.

3.9 Obtención del genoma completo de rotavirus (Secuenciación Masiva)

Durante mi estancia de tres meses (mayo – agosto 2015) en el *Institute of Infection and Global Health* de la Universidad de Liverpool (Reino Unido), obtuvimos las secuencias correspondientes a los 11 genes de varias cepas de RVA mediante Secuenciación Masiva (*Next Generation Sequencing*, NGS). Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

3.9.1 Extracción del ARN de muestras de heces

Selección de muestras para la extracción de ARN de rotavirus

De entre las muestras positivas a RVA con genotipo G3 atípico aisladas en la temporada 2014 – 2015, genotipo G1 de la temporada 2010 – 2011 y genotipo G12 correspondientes a las temporadas 2010 - 2011, 2011 - 2012, 2012 - 2013, 2013 - 2014 y 2014 - 2015, se eligieron 35 muestras con bandas intensas al observar el gel de agarosa bajo luz UV en el genotipado habitual (8 G3 atípico 2015, 3 G1P[8] 2010 – 2011, 6 G12 2010 - 2011, 5 G12 2011 - 2012, 3 G12 2012 - 2013, 4 G12 2013 - 2014 y 6 G12 2014 - 2015). Además, en la medida de lo posible se procuró que las muestras fueran representativas de toda la temporada.

Extracción de ARN de rotavirus

Para la extracción del ARN total de las muestras de heces se añadió 1 ml de TRI-REAGENT-LS (Molecular Research Centre, Cincinnati, OH) en 300 µl de heces resuspendidas previamente en medio B199. Después de un periodo de incubación de 5 minutos, se añadieron 270 µl de cloroformo y se dejó reposar 3 minutos. Tras centrifugar las muestras durante 20 minutos a 13.000 rpm y 4 °C, se recogió el sobrenadante en tubos nuevos y se añadió 1 ml de isopropanol frío. Después de una incubación de 5 minutos, se precipitó el ARN mediante centrifugación de las muestras a temperatura ambiente, durante 30 minutos y a 13000 rpm. Se desechó el sobrenadante y después de dejar que el isopropanol se evaporara durante 10 min, se resuspendió el pellet obtenido con 95 µl de buffer para eluir (EB buffer de MinElute gel extraction kit; Qiagen, Hilden, Germany). La integridad del ARN extraído, se evaluó mediante un gel de agarosa TBE al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 17).

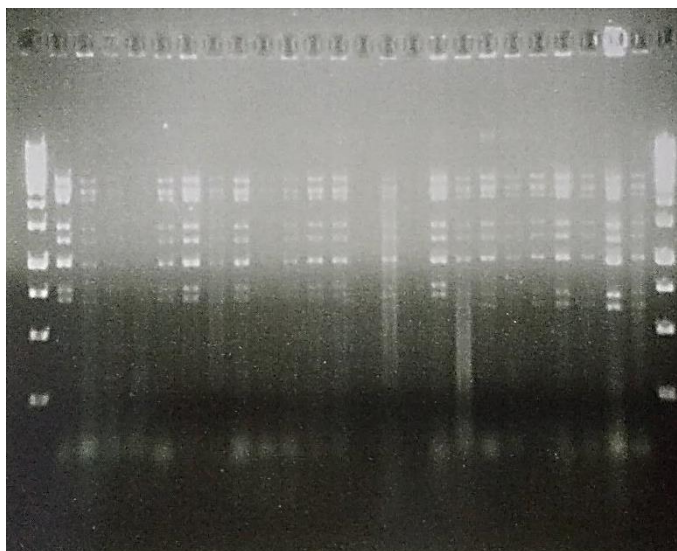


Figura 17.- Fotografía de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio bajo luz UV en la que se observan los 11 segmentos génicos de algunas muestras de rotavirus grupo A.

Purificación del ARN de doble hebra extraído

Se eliminó el ARN de una sola hebra y las impurezas proteicas del extraído mediante precipitación con cloruro de litio (LiCl). Para ello, se añadió LiCl a una concentración final de 2M en los 90 µl de extraído. Después de dejarlo reposar 20 minutos, se incubó a 4 °C durante 16 horas. Posteriormente, se centrifugó a 4 °C y 13000 rpm durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante (110 µl). Se eliminó el ADN de una hebra y doble hebra tratando el sobrenadante con DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

siguiendo el protocolo del fabricante y se purificó el ARN de doble hebra utilizando el kit de extracción MinElute gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). La pureza del ARN de doble hebra obtenido se valoró mediante un gel de agarosa TBE al 1 % teñido con bromuro de etidio y su concentración se midió utilizando el fluorómetro Qubit™ y el kit “RNA BR Assay kit” (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.9.2 Preparación de librerías y secuenciación

Selección de muestras para la preparación de librerías

De las 35 muestras extraídas, se obtuvo el genoma completo de RVA en 18 (6 G3 atípico 2015, 2 G1 2010 - 2011, 2 G12 2010 - 2011, 2 G12 2011 - 2012, 2 G12 2012 - 2013, 2 G12 2013 - 2014 y 2 G12 2014 - 2015). La selección de las 18 muestras se hizo en base a la imagen del gel de agarosa bajo luz UV (detección o no de bandas correspondientes al genoma segmentado de RVA y su intensidad) y a la concentración de ARN obtenida mediante el fluorómetro Qubit™.

Preparación de librerías

Para la preparación de librerías se utilizó “ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation Kit” (Illumina, San Diego, CA USA) y se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante (Figura 18).

Es necesario partir de 9,5 µl de muestra que contengan entre 500 pg y 50 ng de ARN. Por ello, se utilizaron 9,5 µl en el caso de las muestras con cantidad de ARN menor a 50 ng, y se diluyeron en agua libre de nucleasas hasta un máximo de 50 ng aquellas cuya cantidad era mayor. Antes de comenzar con la preparación de las librerías, se realizó un paso previo de desnaturalización (95 °C durante 5 min) del ARN de doble hebra de RVA para asegurar una fragmentación adecuada de su genoma.

La preparación de librerías consta de seis pasos importantes. El primero consiste en la *fragmentación del ARN* mediante un proceso enzimático. En el segundo paso, el ARN es transcrito en *ADNc* utilizando hexámeros aleatorios que contienen una secuencia de etiquetado que marca los extremos 5' del ADNc. En el tercer paso el *ADNc es marcado en los extremos 3'* dando lugar a ADNc marcado en sus dos extremos (5' y 3'). El cuarto paso consiste en una *purificación del ADNc* doblemente marcado (di-tagged cDNA) mediante el kit llamado “MinElute PCR Purification Kit” (Qiagen, Hilden, Germany). En el quinto paso el ADNc doblemente marcado se amplifica mediante una *PCR* en la

que los cebadores que tienen en su extremo las secuencias adaptador de Illumina hibridan con las secuencias de marcado y añaden los adaptadores. A su vez, los cebadores *reverse* tienen un código de barras que consiste en una secuencia de seis nucleótidos diferente para cada muestra. Las secuencias adaptador son necesarias para la posterior generación de clústeres y los códigos de barras para diferenciar cada muestra una vez que todas las muestras (máximo 96) sean introducidas en el mismo carril de la celda de flujo para ser secuenciadas (*multiplexing*). La PCR fue de 15 ó 22 ciclos dependiendo de si las concentraciones anteriormente medidas con Qubit™ fueron medias/altas o bajas, respectivamente.

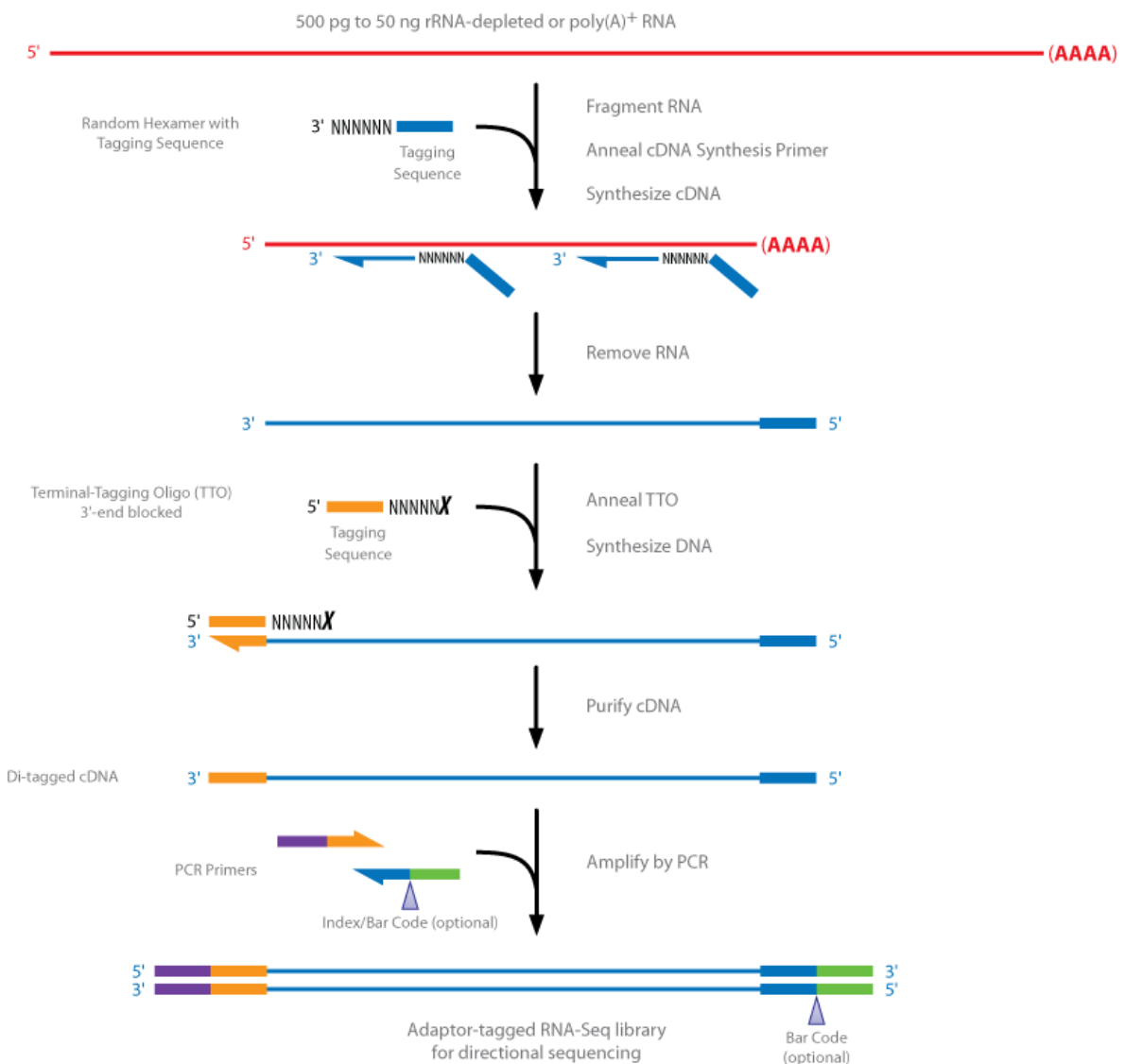


Figura 18.- Proceso de preparación de librerías para secuenciación mediante el método ScriptSeq (Illumina).

El sexto y último paso consiste en la *purificación de la librería* utilizando el Agencourt AMPure XP System (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) (Figura 19). Este método de purificación elimina los dNTPs y cebadores no incorporados y los dímeros de cebadores, sales y otros contaminantes mediante el uso de bolitas magnéticas.

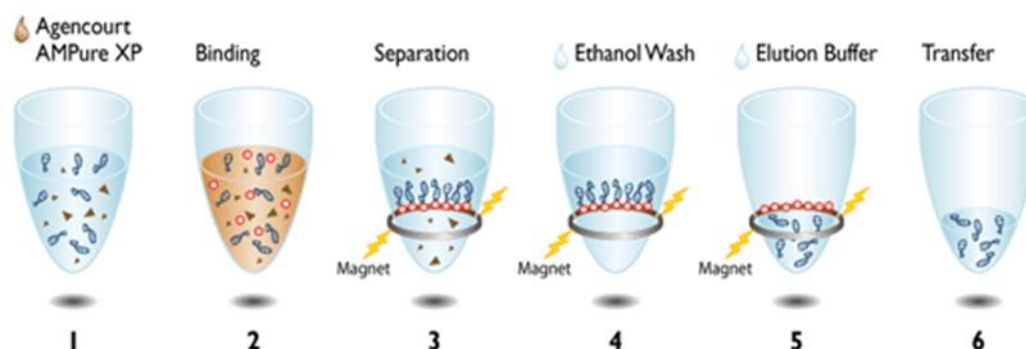


Figura 19.- Proceso de purificación mediante bolitas magnéticas (Agencourt AMPure XP System).

Valoración de la calidad de las librerías y secuenciación

Para conocer la concentración de la librería, se utilizó el fluorómetro Qubit™ y el kit “dsDNA HS Assay Kit” (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante.

Además, se realizó una PCR en tiempo real del gen VP6 para ver si la librería amplificada se correspondía con RVA y para cuantificar su presencia mediante los Ct obtenidos. Para ello, se utilizó Platinum Q PCR 2x (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), los cebadores VP6-F (*forward*) y VP6-R (*reverse*) (Tabla 6) a una concentración final de 0,8 μM , una sonda VP6 (^{FAM} 5' CCA CCR AAY ATG ACR CCA GCN GTA 3' ^{MGB}) a una concentración final de 0,1 μM y 2,5 μl de muestra (librería) en un volumen total de 25 μl . La PCR a tiempo real se realizó bajo las siguientes condiciones, 2 min a 50 °C, 2 min a 95 °C y 35 ciclos de 15 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C en el aparato Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) ⁵⁷.

La calidad de las librerías de ADN es crucial para tener éxito en la secuenciación. Por ello, todas las muestras se analizaron mediante el aparato Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Este análisis da información sobre los tamaños de fragmentos de la librería y su concentración (Figura 20). Las muestras con calidad suficiente fueron enviadas a secuenciar al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Liverpool. Para ello, se utilizó la plataforma HiSeq 2500 (Paired-End

Sequencing. Illumina) y las lecturas pareadas o *paired-ends* (2 x 125 pb) obtenidas fueron ensambladas mediante el programa bioinformático “Geneious R8”.

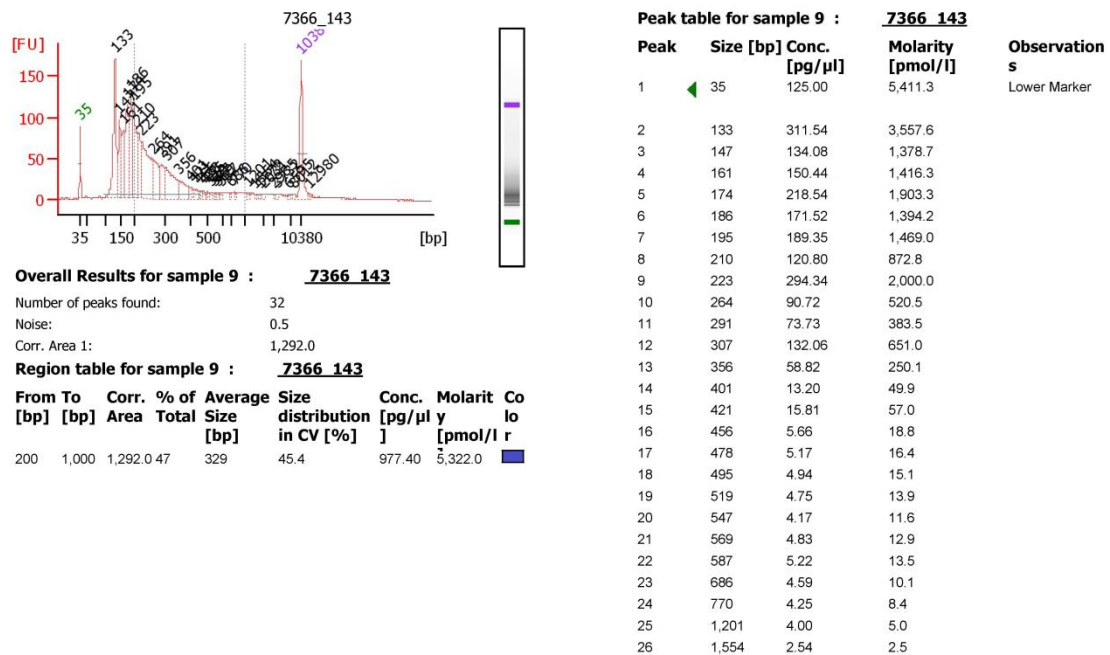


Figura 20.- Ejemplo de análisis de calidad de una librería mediante Bioanalyzer 2100. En el gráfico y la tabla se representan los tamaños de los fragmentos de la librería y su concentración.

3.10 Análisis de las secuencias y estudios filogenéticos

3.10.1 Asignación de genotipo

Las secuencias obtenidas correspondientes a los genes VP7 y VP4 se introdujeron en el programa online “nucleotide BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar el genotipo.

Para asignar el genotipo correspondiente al resto de genes de RVA (VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6), las secuencias obtenidas se introdujeron en el programa online “Rota C”²⁶⁰.

3.10.2 Denominación de genotipos

En el genotipado habitual, las cepas de RVA se denominan indicando el G-tipo seguido del P-tipo en base a los genes VP7 y VP4, respectivamente. El G-tipo se nombra usando la forma Gx y el P-tipo usando la forma P[x], donde la x es el número de genotipo establecido.

En abril de 2008, se desarrolló un sistema para la clasificación del genoma completo de las cepas de RVA. Este sistema asigna un genotipo específico para cada uno de los 11

segmentos de su genoma. Los genes de RVA VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 se describen usando las abreviaturas G_x-P_[x]-I_x-R_x-C_x-M_x-A_x-N_x-T_x-E_x-H_x (x = números arábigos empezando desde el 1), respectivamente ¹⁵⁰.

3.10.3 Análisis de secuencias para estudios filogenéticos

Para este estudio se analizaron detalladamente los cromatogramas de las secuencias obtenidas en el programa “Geneious R8” para ver su calidad y comprobar la presencia de bases ambiguas. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas usando el método de alineamiento múltiple “Muscle” en “MEGA 6”, siendo eliminados los extremos para que todas las secuencias tuvieran el mismo número de pares de bases. A continuación, se realizó un análisis filogenético de las secuencias mediante el programa “MEGA 6” utilizando el método de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood method*). Para ello, se determinó en primer lugar el modelo que mejor se ajustaba a nuestros datos mediante el programa “ModelTest” de “MEGA 6”. Se consideró mejor modelo aquél cuyo valor BIC (*Bayesian Information Criterion*) fue menor. Una vez elegido el modelo, se construyó un árbol filogenético llevando a cabo 1000 reproducciones aleatorias (*Bootstrap* = 1000) del árbol. En todos los árboles se mostraron aquellos valores de *bootstrap* mayores de 70.

3.10.4 Secuencias introducidas en GenBank

Se introdujo en “GenBank” (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) una representación de las secuencias de los genotipos principales y algunos inusuales, así como las secuencias correspondientes al genoma completo de las seis cepas G3 atípicas. Las características de las secuencias, así como los códigos para localizarlos en la base de datos de “GenBank” se detallan en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7.- Descripción de las características de las secuencias de rotavirus grupo A introducidas en “GenBank”.

GENBANK	CEPA	AÑO	GEN	GENOTIPO	LONGITUD (pb)
GU563713.1	Sp813	2007	VP4	G6P[14]	622
GU563714.1	Sp813	2007	VP7	G6P[14]	351
GU563715.1	Sp1524	2009	VP4	G8P[14]	633
GU563716.1	Sp1524	2009	VP7	G8P[14]	711
GU563717.1	Sp8319	2004	VP4	G12P[8]	636
GU563718.1	Sp8319	2004	VP7	G12P[8]	345
GU563719.1	Sp8358	2004	VP7	G12P[8]	345
GU563720.1	Sp8519	2005	VP7	G12P[8]	351
JQ410021.2	1869	2010	VP7	G12P[8]	824
JQ410022.2	1870	2010	VP7	G12P[8]	824
JQ410023.2	1873	2010	VP7	G12P[8]	824
JQ410024.2	1875	2010	VP7	G12P[8]	824
JQ410025.2	1883	2010	VP7	G12P[8]	824
JQ410026.2	1892	2010	VP7	G12P[8]	824
JQ410027.2	1899	2010	VP7	G12P[8]	824
JQ410028.2	1910	2010	VP7	G12P[8]	824
JQ410029.2	1931	2011	VP7	G12P[8]	824
JQ410030.2	1970	2011	VP7	G12P[8]	824
JQ410031.2	2029	2011	VP7	G12P[8]	824
JQ410032.2	2045	2011	VP7	G12P[8]	824
JQ410033.2	2076	2011	VP7	G12P[8]	824
JQ410034.2	2089	2011	VP7	G12P[8]	824
JQ410035.2	2097	2011	VP7	G12P[8]	824
JQ410036.2	2119	2011	VP7	G12P[8]	824
JQ410037.2	2118	2011	VP7	G12P[8]	824
JQ410038.1	1869	2010	VP4	G12P[8]	617
JQ410039.1	1873	2010	VP4	G12P[8]	617
JQ410040.1	1875	2010	VP4	G12P[8]	617
JQ410041.1	1883	2010	VP4	G12P[8]	616
JQ410042.1	1892	2010	VP4	G12P[8]	617
JQ410043.1	1899	2010	VP4	G12P[8]	617
JQ410044.1	1910	2010	VP4	G12P[8]	617
JQ410045.1	1931	2011	VP4	G12P[8]	617
JQ410046.1	2045	2011	VP4	G12P[8]	617
JQ410047.1	1932	2011	VP4	G1P[8]	617
JQ410048.1	1936	2011	VP4	G1P[8]	617
JQ410049.1	2024	2011	VP4	G1P[8]	617
JQ410050.1	2021	2011	VP4	G1P[8]	616
JQ410051.1	2083	2011	VP4	G9P[8]	617
KU522125	66240012	2015	VP7	G3P[8]	852
KU522126	68854185	2015	VP7	G3P[8]	842
KU522127	68947171	2015	VP7	G3P[8]	828
KU522128	75912259	2015	VP7	G3P[8]	854
KU522129	98243371	2015	VP7	G3P[8]	852
KU550260	SS96085815	2015	VP6	G2P[4]	1257
KU550261	SS98244980	2015	VP6	G2P[4]	1262
KX347173	SS68949094	2015	NSP4	G2P[4]	746
KX347174	SS96085815	2015	NSP4	G2P[4]	746

Tabla 8.- Descripción de las características de las secuencias del genoma completo de cepas G3 atípicas introducidas en “GenBank” (I).

GENBANK	CEPA	AÑO	GEN	GENOTIPO	LONGITUD (pb)
KU550262	SS98242319	2015	VP1	G3P[8] inusual	3302
KU550263	SS61720845	2015	VP1	G3P[8] inusual	3302
KU550264	SS75915299	2015	VP1	G3P[8] inusual	3302
KU550265	SS61921417	2015	VP1	G3P[8] inusual	3302
KU550266	SS96217158	2015	VP1	G3P[8] inusual	3302
KU550267	SS98244047	2015	VP1	G3P[8] inusual	3302
KU550268	SS98242319	2015	VP2	G3P[8] inusual	2684
KU550269	SS61720845	2015	VP2	G3P[8] inusual	2684
KU550270	SS75915299	2015	VP2	G3P[8] inusual	2684
KU550271	SS61921417	2015	VP2	G3P[8] inusual	2684
KU550272	SS96217158	2015	VP2	G3P[8] inusual	2684
KU550273	SS98244047	2015	VP2	G3P[8] inusual	2684
KU550274	SS98242319	2015	VP3	G3P[8] inusual	2591
KU550275	SS61720845	2015	VP3	G3P[8] inusual	2591
KU550276	SS75915299	2015	VP3	G3P[8] inusual	2591
KU550277	SS61921417	2015	VP3	G3P[8] inusual	2591
KU550278	SS96217158	2015	VP3	G3P[8] inusual	2591
KU550279	SS98244047	2015	VP3	G3P[8] inusual	2591
KU550280	SS98242319	2015	VP4	G3P[8] inusual	2359
KU550281	SS61720845	2015	VP4	G3P[8] inusual	2359
KU550282	SS75915299	2015	VP4	G3P[8] inusual	2359
KU550283	SS61921417	2015	VP4	G3P[8] inusual	2359
KU550284	SS96217158	2015	VP4	G3P[8] inusual	2359
KU550285	SS98244047	2015	VP4	G3P[8] inusual	2359
KU550286	SS98242319	2015	VP6	G3P[8] inusual	1356
KU550287	SS61720845	2015	VP6	G3P[8] inusual	1356
KU550288	SS75915299	2015	VP6	G3P[8] inusual	1356
KU550289	SS61921417	2015	VP6	G3P[8] inusual	1356
KU550290	SS96217158	2015	VP6	G3P[8] inusual	1356
KU550291	SS98244047	2015	VP6	G3P[8] inusual	1356
KU550292	SS98242319	2015	VP7	G3P[8] inusual	1062
KU550293	SS61720845	2015	VP7	G3P[8] inusual	1062
KU550294	SS75915299	2015	VP7	G3P[8] inusual	1044
KU550295	SS61921417	2015	VP7	G3P[8] inusual	1062
KU550296	SS96217158	2015	VP7	G3P[8] inusual	1062
KU550297	SS98244047	2015	VP7	G3P[8] inusual	1062

Tabla 8.- Descripción de las características de las secuencias del genoma completo de cepas G3 atípicas introducidas en “GenBank” (II).

GENBANK	CEPA	AÑO	GEN	GENOTIPO	LONGITUD (pb)
KU550298	SS98242319	2015	NSP1	G3P[8] inusual	1566
KU550299	SS61720845	2015	NSP1	G3P[8] inusual	1566
KU550300	SS75915299	2015	NSP1	G3P[8] inusual	1566
KU550301	SS61921417	2015	NSP1	G3P[8] inusual	1566
KU550302	SS96217158	2015	NSP1	G3P[8] inusual	1566
KU550303	SS98244047	2015	NSP1	G3P[8] inusual	1566
KU550304	SS98242319	2015	NSP2	G3P[8] inusual	1059
KU550305	SS61720845	2015	NSP2	G3P[8] inusual	1059
KU550306	SS75915299	2015	NSP2	G3P[8] inusual	1045
KU550307	SS61921417	2015	NSP2	G3P[8] inusual	1059
KU550308	SS96217158	2015	NSP2	G3P[8] inusual	1059
KU550309	SS98244047	2015	NSP2	G3P[8] inusual	1059
KU550310	SS98242319	2015	NSP3	G3P[8] inusual	1066
KU550311	SS61720845	2015	NSP3	G3P[8] inusual	1066
KU550312	SS75915299	2015	NSP3	G3P[8] inusual	1066
KU550313	SS61921417	2015	NSP3	G3P[8] inusual	1066
KU550314	SS96217158	2015	NSP3	G3P[8] inusual	1066
KU550315	SS98244047	2015	NSP3	G3P[8] inusual	1066
KU550316	SS98242319	2015	NSP4	G3P[8] inusual	751
KU550317	SS61720845	2015	NSP4	G3P[8] inusual	751
KU550318	SS75915299	2015	NSP4	G3P[8] inusual	751
KU550319	SS61921417	2015	NSP4	G3P[8] inusual	751
KU550320	SS96217158	2015	NSP4	G3P[8] inusual	751
KU550321	SS98244047	2015	NSP4	G3P[8] inusual	751
KU550322	SS98242319	2015	NSP5	G3P[8] inusual	816
KU550323	SS61720845	2015	NSP5	G3P[8] inusual	816
KU550324	SS75915299	2015	NSP5	G3P[8] inusual	809
KU550325	SS61921417	2015	NSP5	G3P[8] inusual	816
KU550326	SS96217158	2015	NSP5	G3P[8] inusual	816
KU550327	SS98244047	2015	NSP5	G3P[8] inusual	816

3.11 Programas informáticos utilizados en el estudio

Los programas informáticos utilizados para la realización de la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

Búsqueda bibliográfica:

- Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Bases de datos públicas para comparación de secuencias:

- Nucleotide BLAST y protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- Rota C (<http://rotac.regatools.be/>).

Alineamiento de secuencias:

- Multalin ²⁶¹.

Visualización y edición de alineamientos múltiples de secuencias:

- Genedoc ²⁶².

Edición, alineamiento, ensamblaje y análisis de secuencias:

- Geneious R8 ²⁶³.

Realización de árboles filogenéticos:

- MEGA 6 (incluido Muscle y ModelTest) ²⁶⁴.

Diagramas de similitud

- SimPlot versión 3.5.1 ²⁶⁵.

3.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa “GraphPad InStat version 3.05”, (GraphPad Software, La Jolla California USA) y los intervalos de confianza se calcularon en la página web: http://www.causascientia.org/math_stat/ProportionCI.html.

4. RESULTADOS

4.1 Estudio epidemiológico. Circulación de rotavirus en el área de estudio

4.1.1 Distribución por temporada, edad y sexo

Durante el periodo de estudio 1995 – 2015, abarcando 20 epidemias, se investigaron 66.877 muestras de heces de niños menores de 5 años de edad con GEA. Se detectó RVA en 7.018 (10,5%) muestras correspondientes a 6.671 episodios de GEA que ocurrieron en 6.601 niños, siendo 3.675 varones y 2.926 mujeres (relación varón/mujer 1,3). Un 13,0% de los episodios se produjeron en niños de menos de 6 meses de edad, un 69,3% en niños de 6 - < 24 meses, un 11,9% en niños de 24 - < 36 meses y un 5,4% en niños de 36 - < 60 meses (Tabla 9).

Tabla 9.- Distribución etaria de los episodios de gastroenteritis por rotavirus detectados en Gipuzkoa en 1995 – 2015.

Edad (meses)	Episodios de RVA (%)
< 6	864 (13,0)
6 - < 12	1972 (29,6)
12 - < 24	2652 (39,8)
24 - < 36	797 (11,9)
36 - < 48	244 (3,7)
48- < 60	115 (1,7)
Desconocida	27 (0,4)
TOTAL	6671

En la Figura 21 se puede observar la distribución por temporada de los casos de GEA causada por RVA. En general, se produjo un descenso paulatino en el número de episodios detectados por temporada a lo largo del estudio. En cuatro de las seis temporadas del primer sexenio del estudio (1995 - 2001) se detectaron más de 400 casos, observándose una media de 417 casos/temporada. Por el contrario, en todas las temporadas del último sexenio (2009 - 2015) se detectaron menos de 300 casos, con una media de 246 casos/temporada. En concreto, el número máximo de episodios se detectó en la temporada 1999 - 2000 (n = 492), siendo esta cifra 2,5 veces mayor que la detectada en la temporada 2010 - 2011 (n = 198), la de menor número de episodios. También disminuyó a lo largo del estudio el número de muestras a las que se solicitó estudio microbiológico a causa de GEA, de media 3736 y 2428 por temporada, respectivamente, para los periodos 1995 - 2008 y 2009 - 2015.

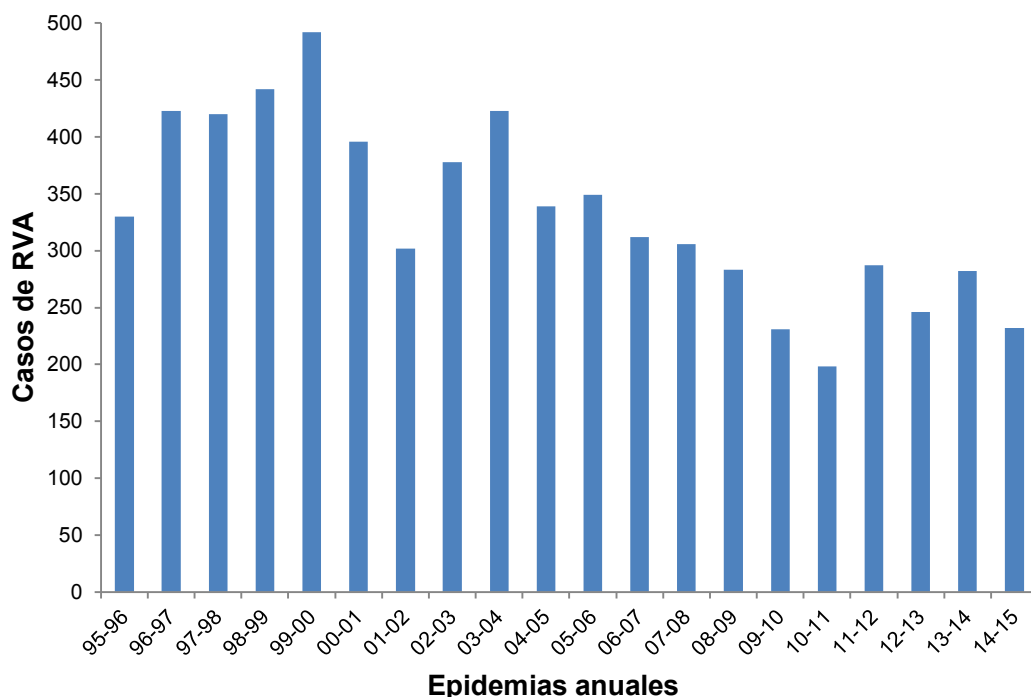


Figura 21.- Episodios de gastroenteritis causada por rotavirus en menores de 5 años de las Gipuzkoa por temporada epidémica (1995 - 2015).

Para estudiar la distribución por sexos de la infección, se valoraron los resultados de la totalidad de las muestras de heces recibidas para investigación de enteropatógenos entre 2013 y 2015 ($n = 4019$). No se observaron diferencias significativas siendo estas cifras 13,0% (288/2212) y 12,5% (226/1807) en varones y mujeres, respectivamente ($p = 0,66$). Por otra parte, la positividad mostró relación inversa con la edad, siendo 16,4% en niños < 12 meses, 15,9% en niños de 12 - < 24 meses, 7,0% en niños de 24 - < 36 meses y 3,2% en niños de 36 - < 60 meses de edad.

4.1.2 Estacionalidad y características de las ondas epidémicas

El porcentaje de positividad entre las muestras investigadas de menores de 5 años de edad fue de 30,3%, 14,0%, 0,6% y 1,7% en los respectivos cuatro trimestres del año (datos de 2013 – 2015). Como en la mayor parte de los estudios efectuados en países de clima templado o frío, las epidemias de GEA por RVA en Gipuzkoa comenzaron habitualmente a final del otoño o inicio del invierno, desarrollándose durante los meses fríos (Figura 22 y 23). Noviembre fue el mes de inicio de epidemia más frecuente ($n = 8$, 40%), seguido de diciembre ($n = 4$, 20%). Sólo ocasionalmente el inicio de la temporada fue más temprano, en octubre ($n = 1$, 5%) o septiembre ($n = 3$, 15%) (Apéndice II, Tabla AII-1). A partir de la temporada 2011 - 2012, se observó una

tendencia al retraso en el inicio de las epidemias comenzando éstas en el mes de diciembre en 2011 - 2012 y 2013 - 2014, enero en la temporada 2012 - 2013 y febrero en la 2014 - 2015 (Figura 23).

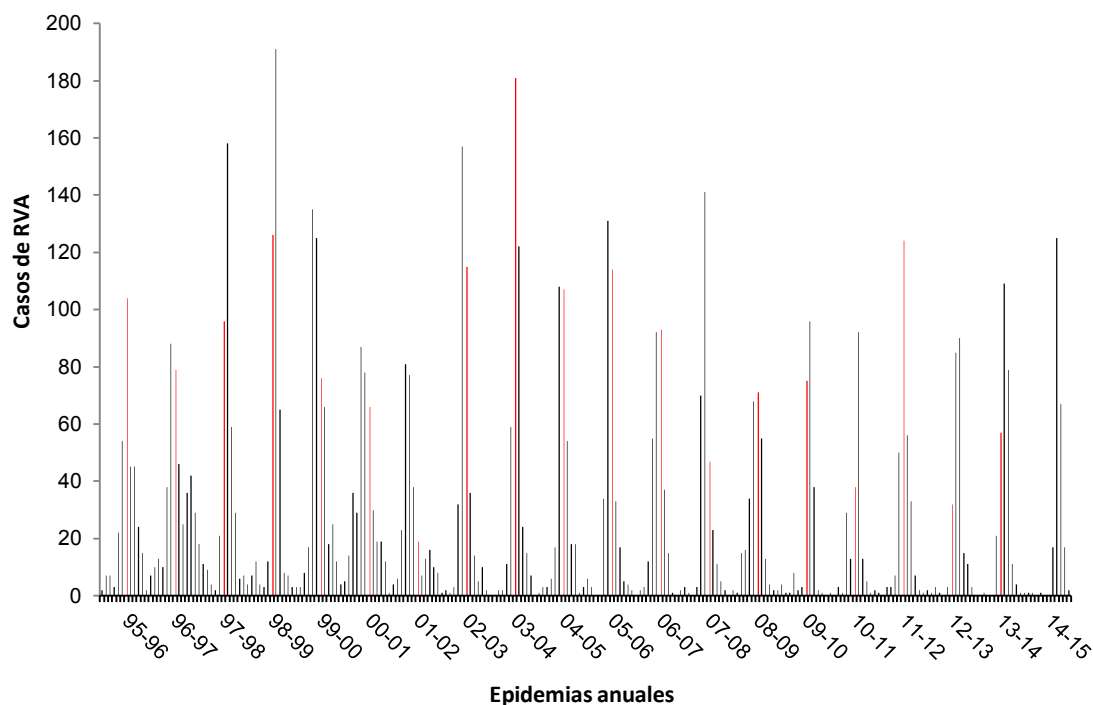


Figura 22.- Episodios de gastroenteritis causada por rotavirus en menores de 5 años de Gipuzkoa por mes y temporada epidémica (1995 - 2015). La barra roja indica el mes de enero.

Por otra parte, los meses en que más frecuentemente finalizó la epidemia fueron marzo y abril ($n = 6$ cada uno, 30%). La prolongación de la epidemia más allá de abril fue rara (mayo en 1995 - 1996 y 2014 - 2015 y julio en 1996 - 1997). Por tanto, aunque las epidemias se desarrollan habitualmente entre noviembre - diciembre y marzo - abril, los datos de este estudio documentan variabilidad en los meses de inicio y final, pudiendo estos hitos oscilar en la práctica en un arco de seis meses.

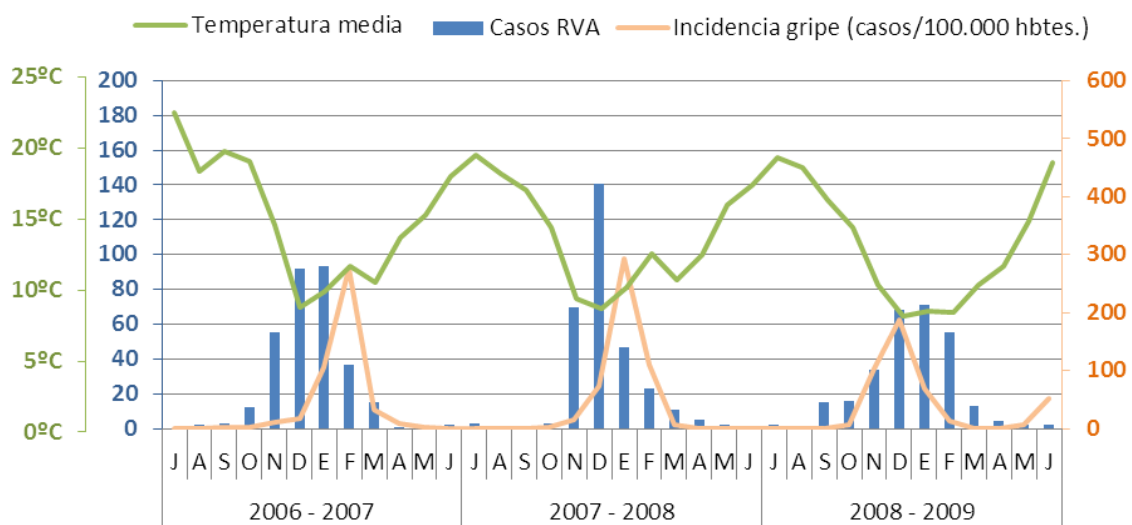
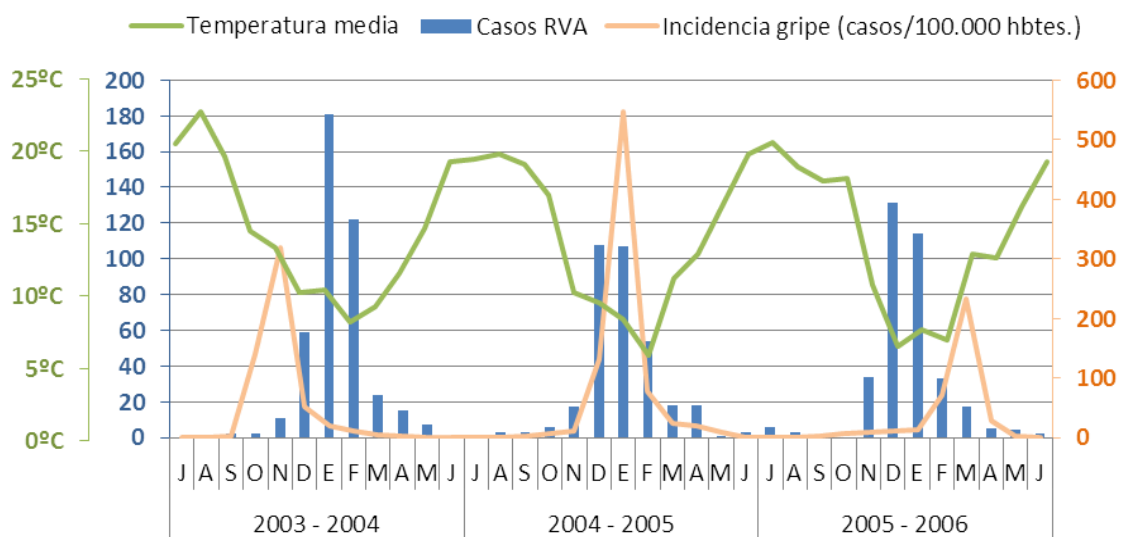
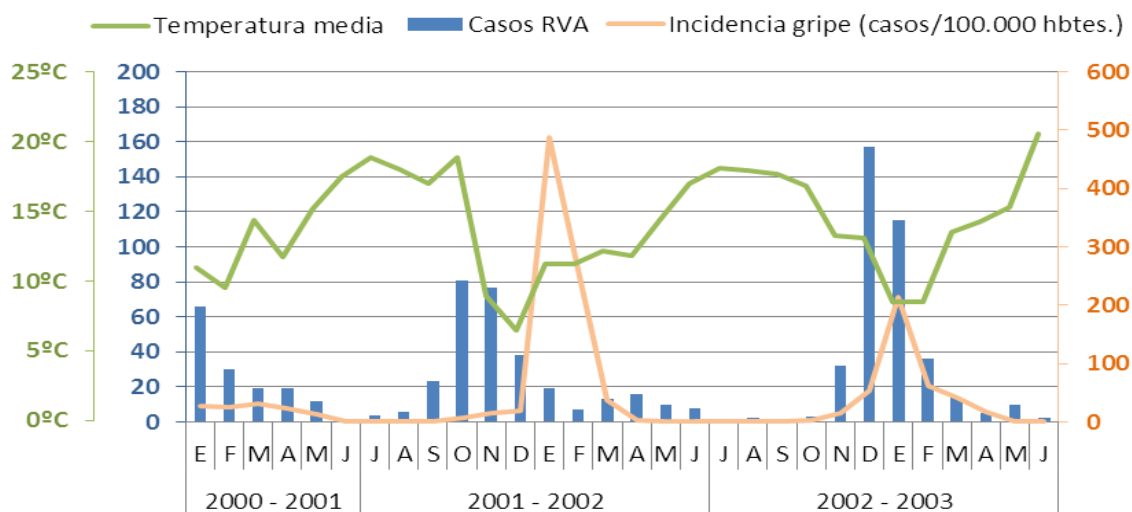
En la mayor parte de las temporadas el pico epidémico se produjo en diciembre, enero o febrero (cinco temporadas cada uno), habitualmente entre uno ($n = 12$) y dos ($n = 6$) meses tras el inicio de la epidemia, si bien en dos ocasiones se retrasó tres e incluso cuatro meses. Las epidemias tuvieron una forma asimétrica, dado que el pico máximo fue más cercano al inicio que al final de las epidemias en la primera parte del período de estudio. De hecho, en el primer sexenio del estudio (1995 - 2001) el periodo pre-pico duró de media 1,5 meses ($SD = 0,5$, rango 1 - 2), en tanto que el post-pico duró 4,0 meses ($SD = 2,2$, rango 1 - 7 meses). Sin embargo, en los últimos años (2009 - 2015) el

período post-pico tendió a acortarse, durando de media 1,2 meses (SD = 0,8, rango 0 - 2 meses).

La duración media del período epidémico fue de 5,1 meses (SD = 1,6) y mostró una tendencia al descenso a lo largo del estudio. En el sexenio inicial (1995 - 2001), las epidemias se prolongaron una media de 6,5 meses (SD = 2,2, rango 3 - 9 meses), siendo estos números de 3,8 (SD = 0,4, rango 3 - 4 meses) en el sexenio final (2009 - 2015). De modo correspondiente, en los primeros años del estudio (1995 - 2001) el periodo interepidémico fue en general corto (5,2 meses de media. SD = 1,6) y hasta la temporada 2003 - 2004, no hubo ningún mes del año en el que no se detectaran casos de GEA por RVA (96 meses seguidos con detecciones). Sin embargo, en temporadas posteriores el período interepidémico tendió a alargarse (8,7 meses de media en 2009 - 2015. SD = 1,4), observándose asimismo una tendencia al incremento en los períodos sin detección de RVA, destacando la temporada 2013 - 2014 en la que no se detectaron RVA en cuatro meses no consecutivos.

4.1.3 Relación temporal entre infección por rotavirus, gripe y temperatura media

La gripe ha sido clásicamente relacionada con el frío, de hecho se cree que el término influenza podría provenir de la expresión italiana *influenza di freddo*, es decir, influencia del frío. Del mismo modo, la estacionalidad de RVA es marcadamente invernal en aquellos países desarrollados con climas templados como el nuestro. Al comparar la temperatura media, la incidencia de gripe en el País Vasco y los casos de RVA de Gipuzkoa observamos que en nuestro entorno la infección por RVA está más estrechamente relacionada con el frío que la propia gripe (Figura 23). En general, el pico epidémico de RVA coincidió con el descenso de temperaturas típico del invierno de Gipuzkoa, normalmente con temperaturas por debajo de los 10 °C. Las excepciones fueron las temporadas 2001 – 2002 y 2014 – 2015 en las que la epidemia de RVA se desarrolló antes y un poco después del descenso de temperaturas, respectivamente.



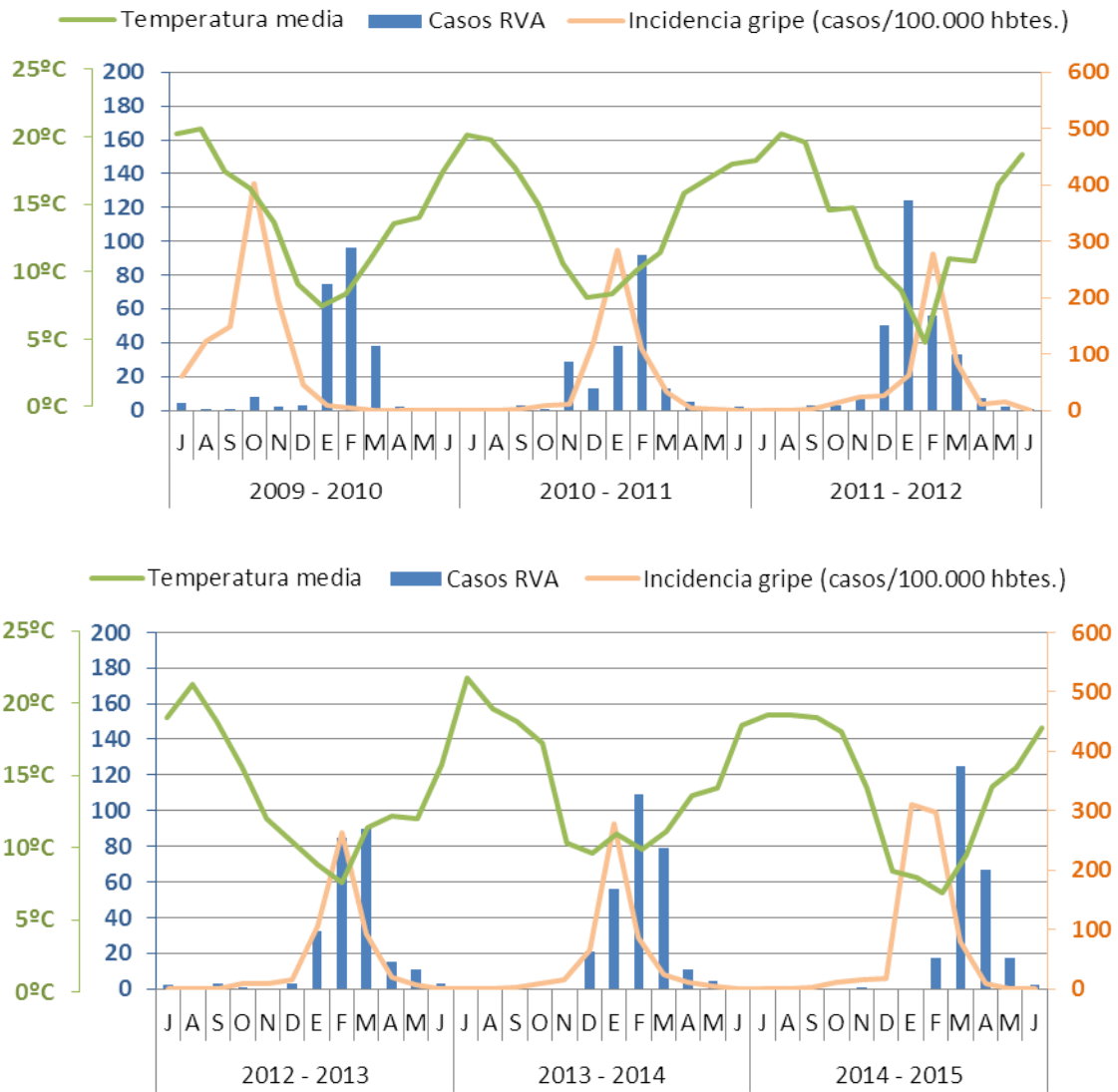


Figura 23.- Episodios de gastroenteritis causada por rotavirus en menores de 5 años de Gipuzkoa e incidencia de gripe en el País Vasco por mes y temporada epidémica (enero 2000 – junio 2015) en relación a la temperatura media (Fuente: estación metereológica de Lasarte-Oria. Euskalmet).

Debido a que la humedad en Gipuzkoa es normalmente de media mayor del 70%, no se observaron grandes variaciones mes a mes y por lo tanto, no se pudo encontrar relación entre la infección por RVA, gripe y humedad media.

4.1.4 Impacto de la infección por rotavirus

Como puede observarse en la Tabla 10, la incidencia de la infección por RVA mostró una relación inversa con la edad siendo en niños menores de 5 años de 1216,1/100.000 niños. Al alcanzar los dos años de edad, alrededor de uno de cada 19 niños de Gipuzkoa había solicitado asistencia médica a causa de una GEA por RVA que fue confirmada

virologicamente, cifra que se aproximó a uno de cada 16 al alcanzar los cinco años de edad.

Tabla 10.- Incidencia media anual de gastroenteritis por rotavirus (casos/100.000 habitantes) en menores de 5 años (julio de 2010 – junio de 2015).

Edad (años)	Casos RVA	Habitantes ¹	Incidencia	IC 95%
< 1	545	3982	2737,3	2519,8 - 2973,3
1 - < 2	518	4089	2533,6	2327,1 – 2758,2
2 - < 3	121	4087	592,1	496,0 - 707,1
3 - < 4	42	4177	201,1	149,0 - 271,7
4 - < 5	19	4141	91,8	59,0 - 143,3
TOTAL	1245	20476	1216,1	1150,8 – 1285,1

¹Habitantes por edad y año según Censo 2011

4.1.5 Infección por rotavirus en el ámbito rural y urbano

Pese a que en el País Vasco es difícil establecer una separación entre lo rural y lo urbano al estar ambos ambientes estrechamente relacionados, consideramos ámbito rural al conjunto de poblaciones con un menor número de población (< 10.000 habitantes) y mayor dispersión de la población en un entorno o territorio concreto y ámbito urbano a la capital y pueblos grandes donde hay una mayor población (\geq 10.000 habitantes) y mayor concentración de personas en un entorno concreto. Para analizar el impacto de la infección por RVA en estos dos ámbitos, inicialmente se analizó la incidencia de la infección en localidades de < 10.000, 10.000 – 50.000 y > 50.000 habitantes en el período 2010 - 2015 (cinco epidemias). La única población con más de 50.000 habitantes fue Donostia – San Sebastián. En el cálculo de la incidencia teniendo en cuenta el número de casos en niños respecto a la población global (niños y adultos), ésta fue menor en los niños de poblaciones de < 10.000 (1069,3/100.000 niños < 5 años) y de > 50.000 habitantes (1138,2/100.000 niños) que en niños de localidades intermedias (1397,6/100.000 niños), diferencia que alcanzó significación estadística ($p < 0,001$). La edad media de los niños con GEA por RVA fue similar en los tres tipos de localidades para el período considerado siendo de $15,1 \pm 10,1$ meses para las localidades con menos de 10.000 habitantes, de $15,5 \pm 10,0$ meses para las de 10.000 – 50.000 habitantes y de $14,8 \pm 10,3$ meses para la capital (Kruskal-Wallis test, $p = 0,291$). Sin embargo, al analizar el número de casos respecto al número de niños menores de 5 años por localidad, no se encontraron diferencias entre estas poblaciones.

RVA fue detectado en el 5,9% (519/8785) de los niños de localidades con < de 1.000 niños menores de 5 años lo cual fue similar a la proporción de niños infectados con RVA en la capital (5,7%,429/7538) ($p = 0,56$) o a la encontrada en niños de localidades donde habitaban 1.000 niños o más (6,2%, 726/11691) ($p = 0,37$).

4.1.6 Gastroenteritis de origen mixto (coinfecciones de rotavirus y otro/s enteropatógeno/s)

En el período 2008 - 2015, se detectó un enteropatógeno adicional en 130 de los 1759 casos en los que se había detectado RVA (7,4%). Entre los microorganismos coinfectantes destacaron *Campylobacter spp.* ($n = 49$), *Salmonella spp.* ($n = 7$), Adenovirus entérico ($n = 18$), Norovirus ($n = 15$) y Sapovirus ($n = 5$). Hubo seis episodios en los que se detectaron junto a RVA dos microorganismos coinfectantes; *Campylobacter* y Adenovirus entérico en un caso y Norovirus junto con *Salmonella*, *Campylobacter*, Sapovirus o Giardia (en dos ocasiones) en los otros cinco casos, si bien la detección sistemática de Astrovirus, Adenovirus y Sapovirus se emprendió en julio de 2013. El porcentaje de episodios con coinfecciones no varió en función de la necesidad o no de hospitalización, siendo 8,7% (13/149) entre los que requirieron hospitalización y 7,3% (117/1610) entre los no hospitalizados.

4.2 Infecciones graves por rotavirus que requirieron hospitalización en el período 2008 - 2014. Comparación con el período 1996 - 2008

Brevemente, se efectuó una búsqueda de los casos de GEA por RVA en niños menores de cinco años ingresados en el Hospital a partir de dos listados de pacientes obtenidos: uno del Servicio de Documentación Clínica del Hospital Universitario Donostia, que identificó a todos los pacientes a los que durante el período de estudio se adjudicó algún código de alta de GEA (para detalle del uso de estos códigos ver Material y Métodos Tabla 5 y Apéndice III) y otro del Servicio de Microbiología, que identificó a todos los casos de infección por RVA. Este estudio finalizó en 2014 en vez de en 2015 (año de finalización del período de estudio del resto de los resultados de esta Tesis) debido al plazo de tiempo que es necesario para obtener datos del Servicio de Documentación Clínica.

Los casos de GEA obtenidos a partir del Servicio de Documentación fueron revisados en los registros de Microbiología para comprobar si se les había solicitado coprocultivo

durante el ingreso, así como su resultado. Por otro lado, se comprobó en el programa informático de historias clínicas del Hospital si los casos positivos a RVA detectados a partir del Servicio de Microbiología, habían sido hospitalizados. Ambos listados de hospitalizaciones a causa de GEA por RVA fueron contrastados, obteniéndose el número final de casos hospitalizados a causa de GEA por RVA en el Hospital Universitario Donostia.

Los datos ofrecidos en este capítulo se obtuvieron prospectivamente en el período comprendido entre julio de 2008 y junio de 2014 y fueron comparados con los obtenidos previamente entre julio de 1996 y junio de 2008 ²⁶⁶, para formar una serie ininterrumpida de 18 años, lo que permite una valoración mejor de todos ellos.

En el período julio de 2008 – junio de 2014, a partir de los datos del Servicio de Documentación Clínica se identificaron 436 casos de GEA de los que, tras la revisión de historias clínicas se consideró que 343 (78,7%) fueron ingresados a causa de GEA adquirida en la comunidad. En los restantes casos el origen de la GEA fue otro, siendo todos ellos excluidos: 31 por ser de origen nosocomial, 50 por ser cuadros de tipo concomitante y 12 por corresponder a menores de un mes de vida. En 133 de los 343 pacientes hospitalizados a causa de GEA comunitaria, la causa fue RVA.

Por otra parte, la revisión de las historias clínicas de los casos detectados a partir del Servicio de Microbiología ofreció resultados muy similares, los 133 positivos a RVA mencionados en el párrafo anterior y un caso adicional, haciendo un total de 134 casos de hospitalización por GEA por RVA adquirido en la comunidad.

Los casos nosocomiales se distribuyeron de forma desigual a lo largo de las temporadas oscilando entre 1 (2009 - 2010) y 11 (2011 - 2012). En general se presentaron en forma de casos esporádicos a lo largo de las epidemias, si bien se detectaron ocasionalmente pequeños brotes de 3 - 6 casos.

El estudio por esta doble vía permitió comprobar que en los últimos 18 años (1996 - 2014) en el Hospital Universitario Donostia se realizó investigación de RVA a la práctica totalidad de los niños hospitalizados por GEA (95,9%, 1397/1457, ver detalles en apartado 4.2.2). RVA fue responsable de un 41% de los casos de GEA adquirida en la comunidad ocurridos en niños de 1 mes a < 5 años de edad que tuvieron que ser hospitalizados a causa de la enfermedad (2008 - 2014).

4.2.1 Porcentaje de niños hospitalizados por infección con rotavirus adquirida en la comunidad. Distribución por sexo y estacionalidad.

El porcentaje de hospitalización entre los niños menores de 5 años con GEA a los que se detectó RVA a lo largo del estudio prospectivo (2008 - 2014) fue de 8,8% (134/1527), similar al observado cuando se consideraron los casos del período anterior (estudio retrospectivo 1996 - 2008), siendo dicha cifra 9,1% (419/4582) (Chi cuadrado = 0,15, p = 0,70). El porcentaje osciló de unas temporadas a otras entre el 5,9% (temporada 2004 - 2005) y el 12,9% (temporada 2000 - 2001) (Tabla 11).

Tabla 11.- Porcentaje de niños hospitalizados por infección con rotavirus adquirida en la comunidad y G-tipos dominantes en cada temporada.

Temporada	Nº total rotavirus	Nº niños hospitalizados	% hospitalización	G-tipos hospitalizados ¹	G-tipos dominantes temporada ¹
1996 - 1997	423	43	10,2	G1 75%, G4 25%	G1 (63%)
1997 - 1998	420	45	10,7	G2 22%, G4 22%, G1 11%, Mixtos 11%	G2 (21%), G4 (34%)
1998 - 1999	442	44	10,0	G1 50%, G2 29%, G4 14%	G1 (55%)
1999 - 2000	492	51	10,4	G1 91%	G1 (88%)
2000 - 2001	396	51	12,9	G1 70%, G2 20%	G1 (42%), G2 (33%)
2001 - 2002	302	28	9,3	G1 100%	G1 (85%)
2002 - 2003	378	25	6,6	G1 70%, G3 10%, G9 10%	G1 (90%)
2003 - 2004	423	26	6,1	G1 46%, G2 39%	G2 (55%)
2004 - 2005	339	20	5,9	G3 40%, G1 30%, G9 10%, G12 10%	G1 (51%), G3 (32%)
2005 - 2006	349	29	8,3	G9 58%, G1 32%, G3 5%, G12 5%	G1 (44%), G9 (43%)
2006 - 2007	312	31	9,9	G3 43%, G9 33%, G1 24%	G1 (23%), G3 (29%), G9 (46%)
2007 - 2008	306	26	8,5	G2 54%, G1 46%	G1 (54%), G2 (36%)
2008 - 2009	283	18	6,4	G1 91%, G4 9%	G1 (86%)
2009 - 2010	231	23	10,0	G9 70%, G1 9%, G2 9%	G9 (72%)
2010 - 2011	198	23	11,6	G12 57%, G1 35%, G8 4%, Mixtos 4%	G1 (30%), G12 (59%)
2011 - 2012	287	29	10,1	G12 72%, G9 21%, G1 7%	G12 (75%)
2012 - 2013	246	19	7,7	G2 53%, G9 47%	G2 (48%), G9 (39%)
2013 - 2014	282	22	7,8	G1 59%, G4 27%, Mixtos 5%	G1 (59%)
TOTAL	6109	553	9,0	/	/

¹ Cálculos realizados sobre el total de cepas en las que se intentó el genotipado en cada temporada.

Por sexo, el porcentaje de hospitalización (2008 - 2014) de los varones fue de 8,2% (70/852), siendo ligeramente superior 9,5% (64/675) el de las mujeres, sin que esta diferencia fuera estadísticamente significativa (Chi cuadrado = 0,60, $p = 0,44$).

Los meses en los que hospitalizaron más niños a causa de infección por RVA adquirida en la comunidad coincidieron con, o correspondieron al, inmediatamente posterior a los de mayor intensidad en la circulación de RVA en cada temporada (Figura 24).

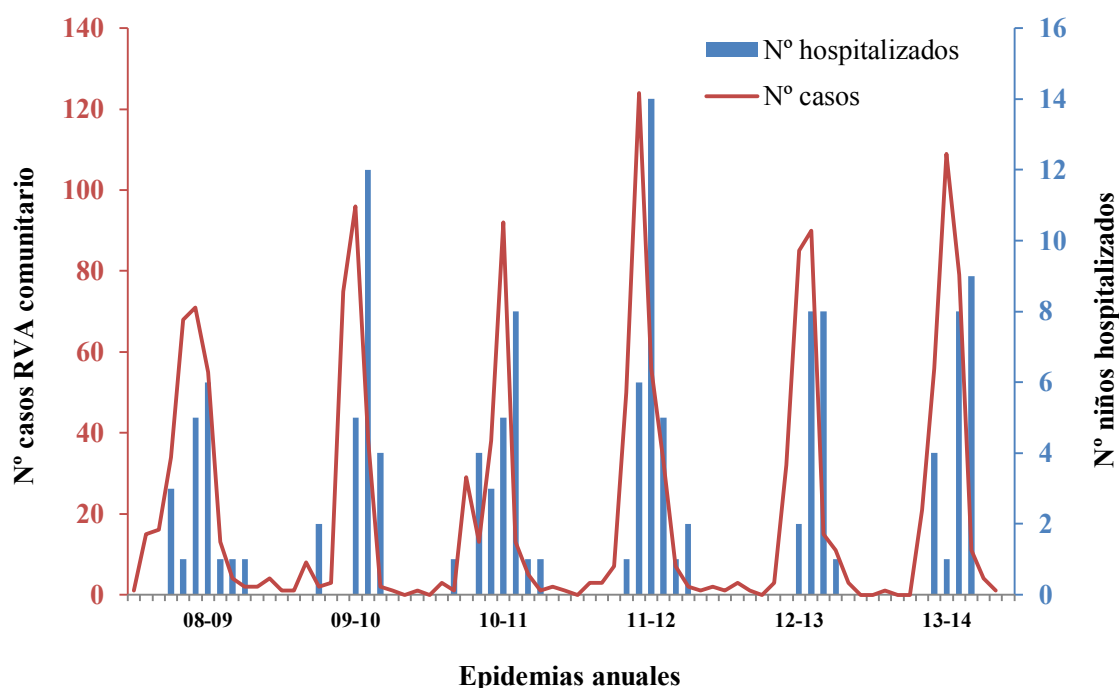


Figura 24.- Distribución mensual del número total de casos de infección por rotavirus detectados en niños menores de 5 años y la de aquellos que requirieron hospitalización a causa de esta infección (2008 - 2014).

4.2.2 Incidencia de hospitalización a causa de gastroenteritis aguda por rotavirus de origen comunitario

En el período de estudio prospectivo (julio de 2008 - junio de 2014) la tasa de hospitalización media anual en niños de 1 mes a < 5 años de edad por GEA adquirida en la comunidad (todas las causas) fue de 289 por 100.000 niños ($n = 343$) (Tabla 12). Esta incidencia varió durante las diferentes temporadas entre 362 casos/100.000 habitantes (IC95% 289 - 454) en la temporada 2011 - 2012 y 210 (IC95% 156 - 283) en la 2013 - 2014. Como se ha referido anteriormente, RVA fue responsable de un 41% de estos cuadros. Al analizar tanto las tasas de hospitalización a causa de GEA infecciosa de cualquier etiología como las de GEA debida a RVA se observó un mantenimiento de las tendencias decrecientes observadas en el período 1996 - 2008, reduciéndose la

incidencia en los 18 años de seguimiento más de la mitad (Chi cuadrado para tendencia lineal 199,4 y 73,2, respectivamente. Ambos $p < 0,001$). Sin embargo, este descenso pareció frenarse y llegar a una situación de estabilidad en la parte final del estudio, período en el que fueron hospitalizados cada año a causa de infección por RVA algo más de uno de cada 1.000 niños menores de 5 años de edad.

Tabla 12.- Incidencia media anual de hospitalización (casos/100.000 niños e intervalos de confianza 95%) por gastroenteritis aguda (todas las causas) y gastroenteritis debida a rotavirus en niños de 1 mes a < 5 años de edad de Gipuzkoa entre julio de 1996 y junio de 2014 (los datos obtenidos a partir de julio de 2008 proceden de este estudio y la incidencia se calculó en relación al censo del año 2011).

Períodos	Gastroenteritis aguda		Rotavirus investigados	Rotavirus positivos	
	Nº	Tasa (IC 95%)	Nº (%)	Nº (%)	Tasa ¹ (IC 95%)
Julio 96 - junio 99	312	667,3 (598,5 - 744,0)	295 (94,6)	132 (44,8)	298,4 (253,6 - 351,2)
Julio 99 - junio 02	346	697,0 (628,6 - 772,9)	337 (97,4)	130 (38,6)	269,4 (228,2 - 318,2)
Julio 02 - junio 05	239	444,0 (392,0 - 502,9)	232 (97,1)	71 (30,6)	135,4 (108,1 - 169,7)
Julio 05 - junio 08	217	375,7 (329,8 - 428,2)	206 (94,9)	86 (41,7)	156,0 (127,4 - 191,1)
Subtotal	1114	535,2 (505,2 - 567,0)	1070 (96,1)	419 (39,2)	209,3 (190,9 - 229,6)
Julio 08 - junio 11	179	301,8 (261,4 - 348,4)	171 (95,5)	64 (37,4)	112,5 (89,0 - 142,4)
Julio 11 - junio 14	164	275,7 ² (237,2 - 320,4)	156 (95,1)	70 (44,9)	124,0 ³ (99,1 - 155,1)
Subtotal	343	288,7 (260,2 - 320,4)	327 (95,4)	134 (41,0)	118,3 (100,5 - 139,1)
Total	1457	445,6 (423,6 - 468,6)	1397 (95,9)	553 (39,6)	176,2 (162,6 - 190,9)

¹Tasa corregida para el porcentaje de episodios en los que no se investigó la presencia de RVA.

²Chi cuadrado para tendencia lineal 199,4, $p < 0,001$.

³Chi cuadrado para tendencia lineal 73,2, $p < 0,001$.

La distribución por edad de los niños hospitalizados a causa de GEA debida a RVA fue similar en los dos períodos del estudio (1996 - 2008 y 2008 - 2014) (Tabla 13). Globalmente, el 87,2% ($n = 482$) de los casos correspondieron a niños entre 1 mes y < 2 años, siendo el tramo de 6 a < 12 meses el que concentró un número mayor de casos. El porcentaje de hospitalización disminuyó progresivamente con la edad, desde 14,8% en los menores de 6 meses de edad a 3,7% en los de 48 - < 60 meses (Chi cuadrado para tendencia = 43,37, $p < 0,001$).

Tabla 13.- Porcentaje de hospitalización en niños de 1 mes a < 5 años de edad con gastroenteritis debida a rotavirus adquirida en la comunidad de Gipuzkoa (1996 - 2014).

Edad (meses)	1996 - 2008			2008 - 2014			TOTAL		
	Nº RVA	Nº pacientes hospitalizados	%	Nº RVA	Nº pacientes hospitalizados	%	Nº RVA	Nº pacientes hospitalizados	%
1 - < 6	565	86	15,2	213	29	13,6	778	115	14,8
6 - < 12	1354	140	10,3	453	48	10,6	1807	188	10,4
12 - < 24	1787	135	7,6	646	44	6,8	2433	179	7,4
24 - < 36	591	46	7,8	143	9	6,3	734	55	7,5
36 - < 48	177	10	5,6	46	2	4,3	223	12	5,4
48 - < 60	81	2	2,5	26	2	7,7	107	4	3,7
Desconocida	27	0	0	0	0	0	27	0	0
TOTAL	4582	419	9,1	1527	134	8,8	6109	553	9,0

La incidencia de hospitalización a causa de GEA fue máxima en el primer año de vida (726,5/100.000 habitantes/año), disminuyendo progresivamente en los años siguientes, siendo 14 veces menor en los niños de 4 a < 5 años de edad. Una tendencia algo diferente se observó en el caso de RVA, ya que en los niños de 1 mes a < 6 meses de vida la incidencia de infección por RVA fue menor que en los de 6 a < 12 meses, a diferencia de lo observado en el total de las GEA (Tabla 14).

Tabla 14.- Incidencia anual de hospitalización (casos/100.000 niños e intervalos de confianza 95%) por gastroenteritis aguda y gastroenteritis debida a rotavirus en niños de entre 1 mes y < 5 años de edad de Gipuzkoa, entre julio de 2008 y junio de 2014, estratificada por edad.

Edad (meses)	Gastroenteritis aguda		Rotavirus investigados	Rotavirus positivos	
	Nº	Tasa (IC 95%)	Nº (%)	Nº (%)	Tasa ¹ (IC 95%)
1 - < 6	76	740,3 (594,0 - 923,0)	75 (98,7)	29 (38,7)	284,7 (200,0 - 406,2)
6 - < 12	85	714,7 (580,9 - 879,8)	82 (96,5)	48 (58,5)	414,2 (315,6 - 544,2)
12 - < 24	100	418,8 (345,6 - 507,7)	99 (99,0)	44 (44,4)	187,0 (140,4 - 249,4)
24 - < 36	47	190,4 (143,8 - 252,4)	43 (91,5)	9 (20,9)	39,7 (21,8 - 72,9)
36 - < 48	22	92,1 (61,6 - 138,2)	19 (86,4)	2 (10,5)	8,0 (2,5 - 28,9)
48 - < 60	13	52,0 (30,6 - 88,9)	9 (69,2)	2 (22,2)	12,0 (4,4 - 35,1)
TOTAL	343	288,7 (260,2 - 320,4)	327 (95,3)	134 (41,0)	118,3 (100,5 - 139,1)

¹Tasa corregida para el porcentaje de episodios en los que no se investigó la presencia de RVA.

4.2.3 Hospitalización y genotipos de rotavirus

No hemos encontrado ninguna asociación entre hospitalización y algún genotipo concreto de RVA o con cambio en el genotipo dominante (Tabla 11), y de hecho las epidemias con mayor (12,9% 2000 - 2001) y menor (5,9% 2004 - 2005) porcentaje de hospitalización fueron debidas al genotipo G1 (Chi cuadrado = 9,410, $p = 0,002$). Aunque la irrupción de genotipos nuevos como el G9 (temporadas 2005 - 2006 y 2006 - 2007) y G12 (temporadas 2010 - 2011 y 2011 - 2012) pareció asociarse a un aumento en el porcentaje de hospitalización respecto al observado en años precedentes, las diferencias interanuales observadas en estos casos no fueron estadísticamente significativas (Chi cuadrado = 1,167 y 0,158, $p = \text{NS}$ en ambos casos).

4.2.4 Comparación de la hospitalización a causa de gastroenteritis por rotavirus y por otros enteropatógenos

RVA fue el microorganismo más frecuentemente causante de hospitalización en cuadros de GEA infantil de origen comunitario, por delante de norovirus, *Salmonella* y *Campylobacter*. Estos microorganismos se detectaron en un 46,7% (RVA $n = 134$), 18,8% (norovirus $n = 54$), 15,0% (*Salmonella* $n = 43$) y 13,2% (*Campylobacter* $n = 38$) de los casos, respectivamente.

Cuando se analizó la hospitalización por edad en relación a los diferentes microorganismos causantes de GEA se observó que en números absolutos, RVA fue el principal causante de hospitalización por GEA en los menores de 2 años de edad (55,2%) de los cuadros con etiología conocida. En niños de 2 a 3 años de edad, rotavirus, norovirus y *Salmonella* ocasionaron el 22,5%, 27,5% y 27,5%, respectivamente de los casos hospitalizados. En los niños de 3 y 4 años de edad *Salmonella* fue la causa de la mitad de los cuadros de GEA que requirieron ingreso hospitalario (Figura 25).

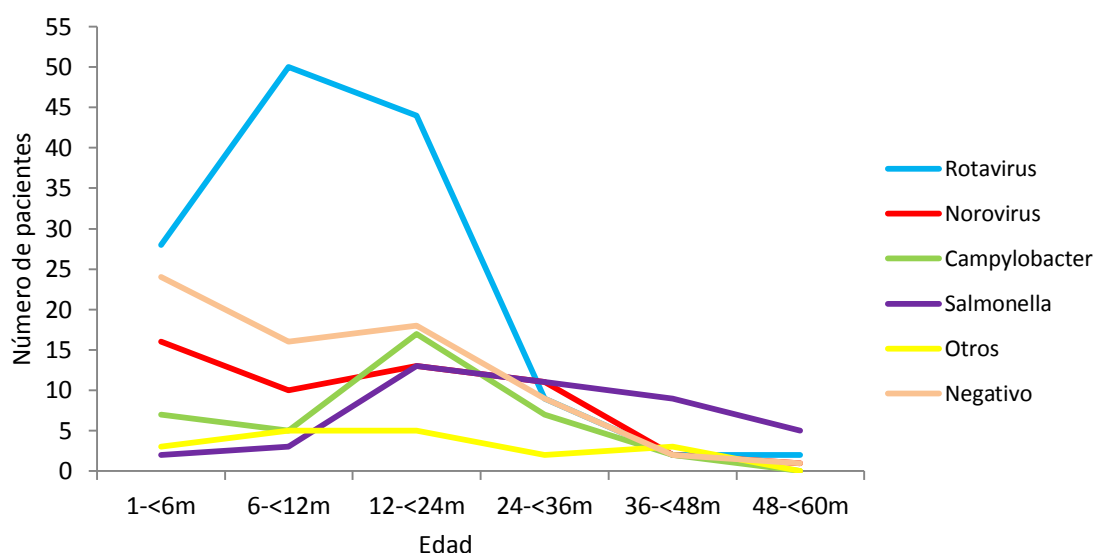


Figura 25.- Número de pacientes hospitalizados según su etiología y edad por gastroenteritis aguda adquirida en la comunidad de Gipuzkoa (julio de 2008 - junio de 2014).

4.3 Infecciones por rotavirus en niños de cinco o más años, jóvenes y adultos

En las dos últimas temporadas de estudio (2013 - 2014 y 2014 - 2015), y como un estudio adicional, se pudo analizar el papel de RVA en las GEA de personas de cinco o más años de edad, dado que se realizó el estudio de virus entéricos independientemente de la edad a todos los pacientes con GEA de los que se remitió al laboratorio una muestra de heces para investigación de enteropatógenos. El porcentaje de RVA positivos para los distintos tramos de edad considerados y la incidencia por 100.000 habitantes puede observarse en la Tabla 15.

Globalmente, se detectó RVA en el 1,3% (95/7346) de los episodios de GEA analizados en pacientes de cinco o más años de edad, sin que hubiera diferencias cuando se subdividió la muestra de población analizada en diferentes tramos de edad ni por sexos (1,2% en varones [43/3611] y 1,4% en mujeres [52/3735]). El análisis de la incidencia, sin embargo, mostró un incremento en las personas de mayor edad, -incidencia media anual 40,6/100.000 habitantes \geq 80 años de edad-, aunque ésta fue mucho menor a la observada en niños menores de cinco años. De los 95 episodios detectados, 22 (23,2%) fueron hospitalizados por GEA comunitaria debida a RVA de los cuales el 63,6% (n = 14) eran pacientes mayores de 65 años de edad. Tres casos adicionales correspondieron a infecciones nosocomiales.

Tabla 15.- Porcentaje de episodios de gastroenteritis positivos y tasa (incidencia media anual en casos/100.000 habitantes y sus intervalos de confianza 95%) de gastroenteritis por rotavirus en niños de cinco o más años de edad, adolescentes y adultos en Gipuzkoa en dos temporadas, 2013 – 2014 y 2014 – 2015.

Edad (años)	Episodios GEA	Rotavirus (+)	Porcentaje	Habitantes*	Tasa RVA (IC 95%)
5 - 14	1090	6	0,6	38547	7,8 (3,7 – 16,9)
15 - 29	738	5	0,7	52997	4,7 (2,1 – 11,0)
30 - 44	1181	23	1,9	101153	11,9 (8,0 – 17,7)
45 - 59	1261	16	1,3	89924	8,9 (5,5 – 14,4)
60 - 69	1073	17	1,6	47867	18,8 (11,9 – 29,7)
70 - 79	1011	10	1,0	33615	14,9 (8,2 – 27,4)
80 - 89	822	15	1,8	19128	39,2 (23,9 – 64,7)
≥ 90	170	3	1,8	3023	49,6 (18,0 – 144,9)
TOTAL	7346	95	1,3	386254	12,7 (10,4 – 15,5)

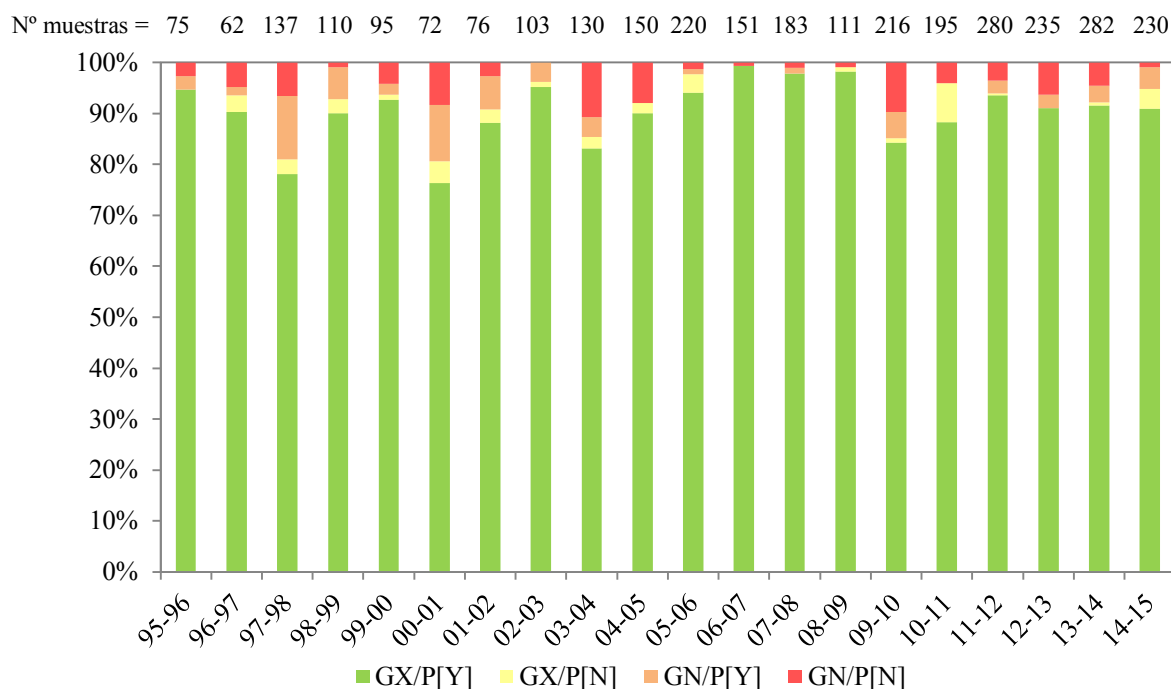
*Habitantes del área de referencia del Hospital por año según Censo 2011.

4.4 Circulación de genotipos de rotavirus en menores de 5 años (1995 - 2015)

4.4.1 Rentabilidad del genotipado de rotavirus

Se realizó el genotipado de los genes VP7 (G-tipo) y VP4 (P-tipo) de los virus causantes de 3.113 episodios, representando el 46,7% de los episodios y el 44,4% de las muestras de RVA detectadas en las dos décadas estudiadas (1995 - 2015). Se obtuvieron ambos genotipos (G- y P-tipo) en las muestras de 2.826 episodios (90,8%), de las cuales 76 (2,4%) presentaron G-tipo y/o P-tipo mixtos. Se obtuvo sólo el G-tipo en 60 muestras (1,9%), sólo el P-tipo en 98 muestras (3,1%) y no se obtuvo ni G- ni P-tipo en 129 muestras (4,1%).

A partir de la temporada 2009 - 2010, se realizó la detección del gen VP6 en todas las muestras que resultaron G- y P-tipo negativo. Entre las 69 muestras en esta situación del período 2009 - 2015, ninguna amplificó el gen VP6. Estos datos sugieren la presencia de cargas virales bajas en las muestras referidas, lo que es corroborado por los resultados del método molecular de detección de RVA empleado en la rutina diaria en las dos últimas temporadas (2013 - 2015), dado que la mayor parte (80%) de las muestras G- y P-negativas de estas temporadas fueron positivas en ciclos de PCR altos.



N = Negativo

Figura 26.- Rentabilidad (porcentaje de cepas con G- y/o P-tipo) del genotipado de rotavirus en 1995 – 2015 en Gipuzkoa.

Epidemia a epidemia, la rentabilidad del genotipado fue muy buena, detectándose un G- y/o P-tipo en al menos el 89,2% y un G- y P-tipo en al menos el 76,4% de las cepas de cada epidemia (Figura 26). Hasta la epidemia 2005 - 2006, la rentabilidad del genotipado de RVA (media 88,4%, rango 76,4 - 95,1%) fue menor y más variable que en epidemias posteriores, pero a partir de esa temporada y hasta la 2014 - 2015, se mantuvo por encima del 84% (media 92,8%, rango 84,3 - 99,3%). Estas diferencias están probablemente relacionadas con el manejo de las muestras antes y después de 2006, principalmente por el empleo en el primer período de tampones menos protectores de la muestra, como PBS en lugar de medio B199 y especialmente con un mayor tiempo de almacenamiento en congelador puesto que el genotipado se efectuó anualmente a partir del año 2006.

4.4.2 Genotipos detectados (1995 - 2015)

En cada temporada epidémica de RVA, se detectaron varios G-tipos (rango 3 - 6), siendo entre uno y tres los G-tipos dominantes. G1P[8] fue la combinación G/P con mayor presencia durante el periodo de estudio tanto en número total de cepas detectadas (37,5%; 1168/3113 cepas), como en número de temporadas en las que fue dominante

(n = 12) o co-dominante (n = 3). G9P[8] fue la segunda combinación más frecuentemente detectada (15,3%; 476/3113) siendo dominante en dos temporadas y co-dominante en otras dos, seguido de G12P[8] (13,1%; 409/3113) y de G2P[4] (11,4%; 355/2826) que dominaron en dos temporadas cada uno, si bien G12P[8] fue co-dominante en otra y G2P[4] en tres. Entre los genotipos principales, los menos frecuentemente detectados fueron G4P[8] (5,2%; 162/3113) que dominó en una temporada y fue co-dominante en otra y G3P[8] (4,5%; 140/3113) que no dominó en ninguna pero fue codominante en dos.

La combinación G/P más frecuente G1P[8] fue detectada en 19 de las 20 temporadas de estudio. Sólo en la temporada 2012 - 2013 no se detectó ninguna cepa de este genotipo aunque fue dominante en las dos temporadas siguientes (2013 - 2015). Este genotipo fue predominante durante períodos de tiempo prolongados y el único en hacerlo más de dos años consecutivos (dominante en todas las epidemias del quinquenio 1998 - 2003). Aunque de las primeras 14 temporadas del estudio, G1P[8] fue el RVA dominante en 10 y co-dominante en dos, solo dominó en dos temporadas del último sexenio y fue co-dominante en una (Figura 27, Tabla 16).

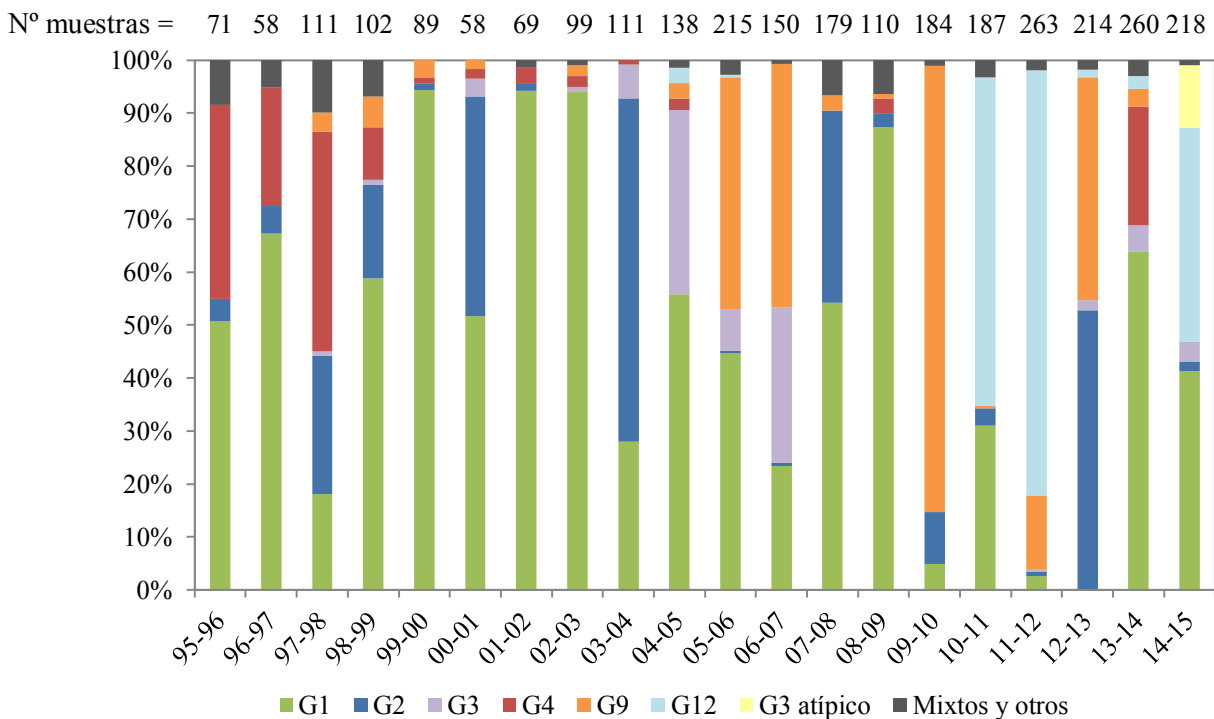


Figura 27.- Distribución porcentual de los G-tipos principales de rotavirus: G1 - G4, G9 y G12 en 1995 – 2015 en Gipuzkoa.

En cuanto al resto de combinaciones G/P principales, en general aparecieron intermitentemente, habiendo numerosas temporadas en las que algunos genotipos no fueron detectados y otras en las que se detectaron de forma esporádica. G9P[8] fue detectado por primera vez en Gipuzkoa en abril de 1998 (6 cepas) siendo esta una de las primeras detecciones realizadas en España de este genotipo, considerado inusual en aquél momento. Desde esa temporada se detectó circulación esporádica (9 temporadas) o epidémica (5 temporadas) de G9P[8] en 14 de las 17 temporadas siguientes. La circulación de G9P[8] mostró carácter epidémico por primera vez en las temporadas 2005 - 2006 y 2006 - 2007, más de siete años tras su introducción en Gipuzkoa, habiendo circulado epidémicamente en cinco de las nueve últimas temporadas de estudio, lo que apoya que, a lo largo de estos años, haya entrado a formar parte de los genotipos principales. Al igual que G9P[8], G2P[4] se detectó en la mayor parte de las epidemias vigiladas (17/20), mostrando con cierta frecuencia circulación epidémica (siete epidemias con más de 15 cepas detectadas en cada una).

G12P[8], considerado clásicamente como un genotipo inusual, fue detectado por primera vez en Gipuzkoa en diciembre de 2004 (3 cepas), siendo éstas las primeras detecciones de este genotipo efectuadas en España. G12P[8] fue dominante por primera vez en Gipuzkoa durante las temporadas 2010 - 2011 y 2011 - 2012, más de seis años tras su primera detección en Gipuzkoa, siendo 2010 - 2011 la primera epidemia referida por este genotipo en Europa ¹³⁸. En las temporadas siguientes (2012 - 2013 y 2013 - 2014) fue detectado esporádicamente y en la última temporada de estudio (2014 -2015) fue co-dominante junto con G1P[8]. Las principales características epidemiológicas de las infecciones causadas por las cepas G12P[8] en Gipuzkoa así como su análisis filogenético han sido objeto de un subestudio específico en esta Tesis Doctoral (ver punto 4.5).

El genotipo G4P[8] circuló ampliamente en el primer trienio del estudio (1995 - 1998), siendo dominante en 1997 - 1998, pero en los 15 años siguientes sólo se detectó circulación esporádica en algunas epidemias. No se detectó circulación de G4P[8] en el cuatrienio 2009 - 2013 que precedió a la temporada 2013 - 2014 en la que volvió a circular epidémicamente (58/282 episodios). El último de los genotipos actualmente considerados principales, G3P[8], fue el único que no llegó a ser dominante en ninguna temporada a lo largo de las dos décadas de vigilancia aunque sí fue co-dominante en dos y tuvo cierta presencia en los períodos 2004 - 2007, 2013 - 2014 así como en el año 2015.

En general, la circulación de los genotipos co-dominantes mostró entre ellos diferencias estacionales poco relevantes, siendo circulaciones coincidentes o estrechamente solapadas, como puede verse en los ejemplos mostrados en la Figura 28, sin repercusión en la curva epidémica anual que normalmente presenta un pico único y evidente (raramente bifásica). Excepcionalmente, la circulación presentó diferencias claras, como ocurrió en las temporadas 2005 - 2006 y 2010 - 2011. En el primer mes de la epidemia de 2005 – 2006 sólo circuló G1 y en los dos últimos meses sólo circuló G9 mientras que en la temporada 2010 - 2011, las cepas del genotipo G12 comenzaron a circular dos meses antes que las del genotipo G1 si bien en las fases posteriores de la epidemia ambas circulaciones se armonizaron.

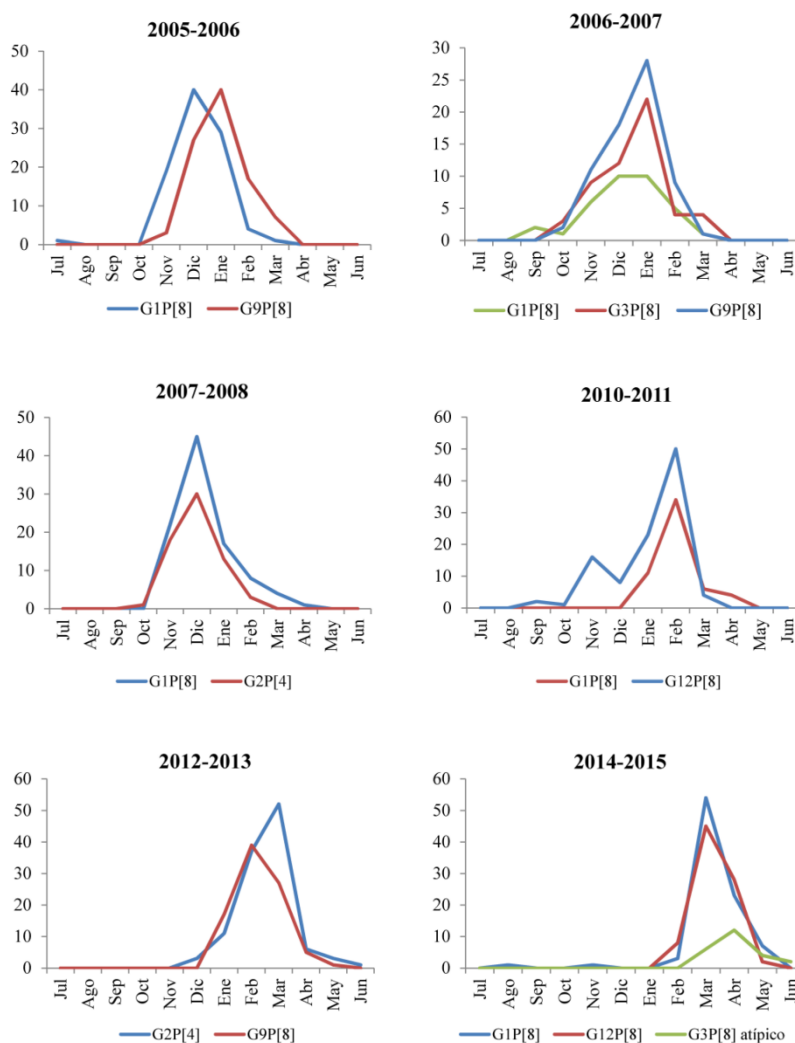


Figura 28.- Circulación mensual de genotipos en temporadas seleccionadas en las que dos o más genotipos circularon epidémicamente. Se seleccionaron las seis últimas epidemias con cepas co-dominantes. Aunque circuló ampliamente, la cepa G3P[8] atípica de la temporada 2014 – 2015 no puede ser considerada co-dominante.

La vigilancia de genotipos puso de manifiesto infecciones en general esporádicas por RVA fruto de recombinación entre los genotipos humanos principales (ej G1P[4]), así como infecciones por cepas de genotipos inusuales (Tabla 16), en general de origen zoonótico, que globalmente representaron un 1,4% de las cepas en las que se intentó el genotipado (45/3113). Para mayor detalle ver los apartados 4.4.4. y 4.4.5).

Tabla 16.- Genotipos (G- y P-tipo) de rotavirus detectados en niños menores de 5 años en Gipuzkoa en las epidemias ocurridas entre 1995 y 2015 (20 epidemias). El genotipo dominante ha sido sombreado en oscuro y los codominantes en color claro (o de menor intensidad).

Genotipos	Temporadas																				TOTAL
	95-96	96-97	97-98	98-99	99-00	00-01	01-02	02-03	03-04	04-05	05-06	06-07	07-08	08-09	09-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15	
G1P[8]	36	38	18	57	83	28	64	92	29	76	94	35	97	96	9	55	7	0	165	89	1168
G2P[4]	3	2	26	17	1	23	1	0	70	0	1	1	65	2	18	6	2	113	0	4	355
G3P[8]	0	0	1	0	0	2	0	1	7	48	13	44	0	0	0	0	0	4	13	7	140
G4P[8]	26	13	45	10	1	0	1	2	0	3	0	0	0	3	0	0	0	0	58	0	162
G9P[8]	0	0	3	6	3	1	0	2	0	3	94	69	5	1	153	1	37	89	9	0	476
Subtotal G- y P- tipos principales	65	53	93	90	88	54	66	97	106	130	202	149	167	102	180	62	46	206	245	100	2301
G1P[4]	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
G2P[8]	0	0	2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
G6P[14]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
G8P[4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
G8P[8]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
G8P[14]	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
G9P[4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
G12P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	104	211	3	5	83	409
G3P[8] atípico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	24
Subtotal G- y P- tipos inusuales	0	0	4	3	0	1	0	0	2	3	0	0	1	1	0	106	211	4	6	107	449
Subtotal G- y P-tipos	65	53	97	93	88	55	66	97	108	133	202	149	168	103	180	168	257	210	251	207	2750
G1+G2P[4]	0	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	9
G1+G2 P[4]+P[8]	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	5
G1+G3P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G1+G4P[8]	4	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	6	0	17
G1+G9P[8]	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	3	0	1	5	1	1	0	0	0	0	13
G1+G12P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	2	5
G2+G3P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G2+G4P[4]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G2+G9P[4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	4
G2+G9P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

G3+G4P[8]	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
G3+G9P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
G4+G9P[8]	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
G9+G12P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4
Subtotal G-tipos mixtos	4	3	10	6	0	0	1	1	0	2	5	1	9	6	2	3	5	3	7	2	70
G1P[4]+P[8]	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	4
G2P[4]+P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
G9P[4]+P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Subtotal P-tipos mixtos	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	6
Subtotal G y/o P mixtos	6	3	10	6	0	0	1	1	0	2	5	1	11	6	2	4	5	4	7	2	76
Total G/P-tipados	71	56	107	99	88	55	67	98	108	135	208	150	179	109	182	172	262	214	258	209	2826
G1P[N]	0	1	1	2	1	2	1	1	1	1	2	0	0	0	0	3	0	0	1	1	18
G2P[N]	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4
G3P[N]	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0	0	1	7
G4P[N]	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
G9P[N]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4
G12P[N]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	12	0	0	1	5	20
G3P[N] atípico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
G1+G9P[N]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Subtotal G-tipo P[N]	0	2	4	3	1	3	2	1	3	3	8	0	0	1	2	15	1	0	2	9	60
GNP[4]	0	0	6	1	1	4	1	0	4	0	0	0	1	0	2	0	0	1	1	0	22
GNP[8]	2	1	11	6	1	4	4	4	1	0	2	0	1	0	9	0	7	5	8	10	76
Subtotal GN P-tipo	2	1	17	7	2	8	5	4	5	0	2	0	2	0	11	0	7	6	9	10	98
G y P negativos*	2	3	9	1	4	6	2	0	14	12	3	1	2	1	21	8	10	15	13	2	129
Total cepas tipadas	75	62	137	110	95	72	76	103	130	150	220	151	183	111	216	195	280	235	282	230	3113
Muestra insuficiente o sin tipar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1	/	/	/	172	15	3	7	11	0	2	211
Episodios RVA	330	423	420	442	492	396	302	378	423	339	349	312	306	283	231	198	287	246	282	232	6671
Muestras RVA	373	430	442	462	523	424	313	392	433	355	364	324	328	331	239	212	302	249	289	233	7018

4.4.3 Comparación de las principales características epidemiológicas de las infecciones causadas por los G-tipos principales (periodo 1997 - 2015)

En este análisis se compararon las características de edad, sexo, origen rural/urbano, porcentaje de hospitalización y estancia media de las infecciones causadas por cepas de los genotipos G1, G2, G9 y G12. No se incluyeron los genotipos G3 y G4 por haberse obtenido un número pequeño de detecciones (< 6%).

La edad media de los pacientes infectados por RVA G1 fue $15,3 \pm 9,9$ meses; $n=1116$, similar a la de los niños infectados con RVA G2 ($16,4 \pm 10,9$ meses; $n = 359$), RVA G9 ($15,0 \pm 9,7$ meses; $n = 482$) y RVA G12 ($14,8 \pm 9,1$ meses, $n = 429$) (Kruskal-Wallis = 4,19, $p = 0,24$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la distribución por sexo entre los genotipos principales. Tampoco se encontraron diferencias significativas al analizar el origen rural o urbano de los diferentes genotipos estudiados (Chi cuadrado con 3gl = 6,65, $p = 0,08$) ni en relación al número de niños habitando diferentes poblaciones.

Excluyendo las infecciones por RVA mixtos, un total de 9,7% (108/1116) de los pacientes con RVA G1 fueron ingresados en el Hospital debido a GEA adquirida en la comunidad, siendo este porcentaje del 8,9% (32/359), 10,6% (51/482) y 10,3% (44/429) en pacientes con infecciones de G2, G9 y G12, respectivamente (Chi cuadrado = 0,76, $p = 0,859$). La estancia media en el Hospital de los pacientes ingresados por GEA causada por alguno de los cuatro G-tipos fue asimismo similar (G1: $5,4 \pm 4,5$; G2: $4,9 \pm 2,4$; G9: $5,2 \pm 2,3$; G12: $4,9 \pm 2,7$ días) (prueba de Kruskal-Wallis = 1,24, $p = 0,744$).

4.4.4 Infecciones por rotavirus con asociaciones inusuales de G- y P-tipo e infecciones simultáneas por varios genotipos de rotavirus

En los 20 años de genotipado (1995 - 2015) sólo el 0,3% de las cepas (9/3113) correspondieron a asociaciones inusuales de los genes VP7 y VP4, concretamente 5 cepas G2P[8], 3 G1P[4] y 1 G9P[4]. Estas asociaciones inusuales, que podrían corresponder a cepas recombinantes o a infecciones mixtas ocultas (en las que solo se pone de manifiesto el genotipo de genes opuestos) se detectaron en temporadas en las que circularon epidémicamente cepas G2P[4] y G1P[8] o G9P[8] sin ser necesariamente genotipos co-dominantes.

En los 20 años del periodo de estudio, se detectaron 76 infecciones mixtas que representaron el 2,4% de las cepas en las que se intentó el genotipado. En la Tabla 16

están detalladas estas cepas, siendo las más frecuentes G1+G4P[8], G1+G9P[8], G1+G2P[4], G1+G12P[8] y G1+G2P[4]+P[8].

4.4.5 Infecciones por rotavirus de G-tipos inusuales

Durante el periodo 1995 – 2015, 36 cepas (1,2%) pertenecieron a G-tipos inusuales que fueron G3 atípico (n = 26), G8 (n = 5), G6 (n = 4) y G10 (n = 1). Sorprendentemente, en el año 2015 emergió en nuestro entorno una cepa atípica del genotipo G3 con un gen VP7 de origen equino, causando 26 casos de GEA en niños menores de cinco años del área geográfica cubierta por esta Tesis Doctoral y 68 casos en la totalidad de Gipuzkoa. Por la excepcionalidad de esta cepa y su amplia circulación ese año, su análisis epidemiológico y molecular ha sido abordado separadamente (ver punto 4.6). Las cepas G6 y G10 se asociaron siempre con el genotipo VP4 P[14], P-tipo también considerado inusual, predominando entre las cepas G8 la asociación con P[8] y P[14]. Las principales características clínico-epidemiológicas de las infecciones causadas por estas cepas pueden verse en la Tabla 17.

Tabla 17.- Detección de genotipos inusuales de rotavirus en Gipuzkoa (se incluyen tres cepas detectadas en mayores de 5 años de edad).

FECHA	GENOTIPO	SEXO	EDAD	ENTORNO	MIXTO	CLÍNICA	HOSPITALIZACIÓN
15/09/1997	G8P[8]	V	15,4 m	San Sebastián	No	No consta	Sí, concomitante ¹
13/04/1999	G8P[14]	V	24,1 m	Rural (Andoain)	No	No consta	No
27/11/2007	G6P[14]	M	18,0 m	Rural (Oiarzun)	No	GEA	No
22/04/2009	G8P[14]	V	14,1 m	San Sebastián	No	No consta	No
31/12/2009	G6P[14]	V	13,5 a	San Sebastián	No	GEA	No
29/04/2011	G8P[8]	V	6,3 m	Urbano (Zarauz)	No	Diarrea	Sí
04/06/2011	G8P[4]	M	18,6 m	Urbano (Rentería)	No	GEA	Sí, concomitante ¹
11/11/2011	G6P[14]	V	12,9 a	San Sebastián	No	Diarrea	No
06/09/2013	G6P[14]	V	11,4 m	Urbano (Pasajes)	<i>C. jejuni</i>	Diarrea, vómitos y fiebre	No
24/07/2014	G10P[14]	M	62,9 a	Rural (Andoain)	No	Diarrea	Sí ²

¹ Concomitante indica que la infección no se considera causa del ingreso.

² Hipoglucemia en paciente con diabetes tipo II y tratamiento con sulfonilureas + GEA por RVA.

4.4.6 Re infecciones por rotavirus en niños menores de 5 años

Sólo un 1,2% de los episodios de GEA debida a RVA (70/5918) correspondieron a infecciones de repetición, que ocurrieron en 46 varones y 24 mujeres (datos del período 1997 - 2015, dado que no se dispuso de este dato en las epidemias 1995 - 1997). Todos los episodios de repetición fueron detectados en epidemias diferentes a las del primer episodio. Todos ellos fueron segundos episodios, no habiendo ningún niño en el que se detectaran tres o más episodios de infección por RVA. Los episodios de probable primoinfección ocurrieron en niños de $15,7 \pm 18,4$ meses mientras que las reinfecciones ocurrieron en niños de $33,8 \pm 12,7$ meses de edad media (rango 14,03 - 58,2) (test de Welch $t = 11,70$, $p < 0,001$).

El porcentaje de hospitalización fue de 9,0% (525/5848) entre las probables primoinfecciones y 2,9% (2/70) entre las reinfecciones (Chi cuadrado 2,48, $p = 0,115$). Los dos casos con reinfección por RVA que tuvieron que ingresar, estuvieron separados de la primera infección detectada por 12 y 18 meses y en uno de los ingresos hubo coinfección con *Campylobacter*.

Las reinfecciones fueron detectadas más frecuentemente en las temporadas 2000 - 2001, 2003 - 2004, 2007 - 2008 y 2012 - 2013, en las que RVA del genotipo G2P[4] circularon epidémicamente como genotipo dominante o co-dominante (Tabla 18).

Tabla 18.- Número de reinfecciones por rotavirus detectadas en cada temporada epidémica y G-tipos de rotavirus que circularon con mayor intensidad en 1997 – 2015 en Gipuzkoa.

Temporada	Nº reinfecciones	Genotipo (co-)dominante
1997-1998	0	G2, G4
1998-1999	4	G1
1999-2000	4	G1
2000-2001	14	G1, G2
2001-2002	1	G1
2002-2003	1	G1
2003-2004	8	G2
2004-2005	5	G1, G3
2005-2006	5	G1, G9
2006-2007	3	G1, G3, G9
2007-2008	8	G1, G2
2008-2009	1	G1
2009-2010	4	G9
2010-2011	2	G1, G12
2011-2012	0	G12
2012-2013	6	G2, G9
2013-2014	3	G1
2014-2015	1	G1, G12
TOTAL	70	-

En 43 niños se conocieron los G-tipos causantes de la primoinfección y de la reinfección, siendo el G-tipo causante de ambos episodios el mismo en cinco niños (11,6%), (en los cinco casos G1) y diferente en 38 (88,4%). El G-tipo más frecuentemente detectado en las primoinfecciones fue G1 (41,9%) seguido de G2 y G4 (16,3% en ambos casos) mientras que en las reinfecciones, el G-tipo más frecuentemente identificado fue G2 que se detectó en un 41,8% de los casos seguido de G1 (32,6%) y G9 (16,3%) (Tabla 19). De este modo, una mayor proporción de las infecciones por RVA G2 detectadas correspondían a reinfecciones (5,0%, 18/358) en comparación con G1 (1,3%, 14/1114) y G9 (1,5%, 7/481) (Chi cuadrado = 20,64, $p < 0,001$).

Tabla 19.- Detalle de los genotipos VP7 de los rotavirus causantes de reinfecciones en 1997 – 2015 en Gipuzkoa.

G-tipo primoinfección/reinfección	Nº
G1 a G2	8
G1 a G9	5
G2 a G1	4
G2 a G9	2
G2 a G12	1
G3 a G2	2
G4 a G1	3
G4 a G2	3
G4 a G3 equino	1
G8 a G1	1
G9 a G1	1
G9 a G2	3
G9 a G12	1
G12 a G2	2
G12 a G2+G9	1
Subtotal	38
G1 a G1	5
TOTAL	43

Tomando como base la constelación genómica habitual de cada genotipo, podemos considerar infecciones homotípicas las causadas por cepas con la misma constelación (aunque el genotipo VP7 sea diferente) y heterotípicas las causadas por cepas de constelación diferente. En 28 de las 43 parejas primo/reinfección estudiadas, la reinfección fue causada por una cepa de constelación diferente (reinfección heterotípica, 65,1%), más frecuentemente DS-1-like, siendo las primo- y re-infecciones restantes (34,9%, n = 15) causadas por cepas de constelación Wa-like de G-tipo igual o diferente (reinfección homotípica) (Tabla 20). El tiempo medio desde la primoinfección hasta la reinfección fue de 20,3 meses \pm 11,1 meses y no se observaron diferencias entre las reinfecciones de tipo hetero y homotípico (20,3 \pm 11,0 meses y 21,0 \pm 11,1 meses, respectivamente).

Tabla 20.- Reinfecciones hetero- y homotípicas.

Tipos reinfecciones*	N°
Wa-like a DS1-like	20
DS1-like a Wa-like	7
Animal-like a Wa-like	1
Subtotal heterotípico	28
Wa-like a Wa-like	15
Subtotal homotípico	15
TOTAL	43

*Constelación Wa-like: G1, G3, G4, G9 y G12, DS-1-like: G2 y G3 atípico y animal-like: G8.
Asumiendo la constelación más habitual de las cepas G8P[14] (I2-R2-C2-M2-A3/A11-N2-T6-E2-H3).

4.4.7 G-tipos de rotavirus circulantes en niños de cinco o más años, jóvenes y adultos

La detección de RVA en adultos se comenzó a efectuar de modo sistemático en la temporada 2013 – 2014, empleando métodos moleculares. El 15,6% (95/609) de las cepas de RVA detectadas durante las dos últimas temporadas de estudio afectaron a niños de cinco o más años, jóvenes o adultos. No destacó ningún G-tipo concreto siendo el dominante en los de cinco o más años el mismo que dominó en cada temporada en los menores de cinco años (G1 en 2013 - 2014 y G1 y G12 en la temporada 2014 - 2015) (Tabla 21).

Tabla 21.- G-tipos de rotavirus detectados en niños, jóvenes y adultos de Gipuzkoa en las temporadas 2013 – 2014 y 2014 – 2015 por grupos de edad.

Genotipos	2013-2014			2014-2015			TOTAL			
	< 5 a	5 – 15 a	> 15 a	< 5 a	5 – 15 a	> 15 a	< 5 a	5 - 15a	> 15 a	
Principales	G1	166	4	28	90	1	13	256	5	41
	G2	0	0	3	4	0	0	4	0	3
	G3	13	0	3	8	0	4	21	0	7
	G4	58	0	3	0	0	0	58	0	3
	G9	9	0	2	0	0	1	9	0	3
	G12	6	0	0	88	1	16	94	1	16
Atípicos y mixtos	G3 equino	0	0	0	26	0	2	26	0	2
	G6	1	0	0	0	0	1	1	0	1
	G10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G1+G4	6	0	1	0	0	0	6	0	1
	G1+G12	0	0	0	2	0	0	2	0	0
	G4+G9	1	0	0	0	0	0	1	0	0
TOTAL	260	4	40	218	2	37	478	6	77	
Negativo	22	0	6	12	0	2	34	0	8	
MI	0	0	2	2	0	2	2	0	4	

MI = Muestra insuficiente.

4.5. Rotavirus emergente G12P[8]

4.5.1 Circulación de rotavirus G12: epidemias, incidencia, sexo, edad y marco geográfico.

En la temporada 2010 – 2011 se observó, por primera vez en nuestra área geográfica, circulación epidémica de RVA G12, seis años tras las primeras y esporádicas detecciones en Gipuzkoa de este genotipo (temporada epidémica 2004 - 2005), y sin que se detectaran cepas G12 en las cuatro epidemias anteriores. Cepas de este genotipo circularon durante siete meses consecutivos de la epidemia 2010 - 2011 (septiembre - marzo), erigiéndose en el genotipo dominante. También en la temporada siguiente 2011 - 2012, G12 fue dominante, detectándose circulación durante seis meses consecutivos (noviembre – abril). En las dos temporadas siguientes (2012 - 2014), se detectaron casos esporádicos de infección por G12 y en la temporada 2014 - 2015 fue co-dominante junto con G1P[8] (Figura 29). Desde las primeras detecciones de este genotipo en Gipuzkoa (diciembre 2004), G12 se asoció en la casi totalidad de los casos al genotipo VP4 P[8] (Tabla 16).

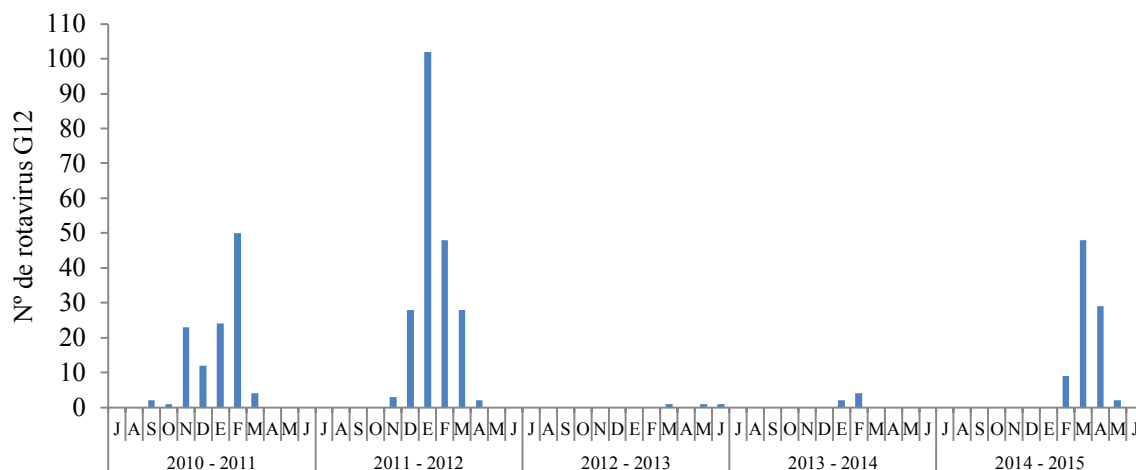


Figura 29.- Circulación de rotavirus G12 en Gipuzkoa, julio 2010 - junio 2015.

La incidencia de infección por RVA G12 en niños menores de cinco años fue de 565,4 (95% IC 471,8 - 677,7), de 1028,5 (95% IC 899,5 - 1176,1) y de 428,9 (95% IC 348,5 - 528,2) casos/100.000 habitantes en las temporadas 2010 - 2011, 2011 - 2012 y 2014 - 2015, respectivamente (Chi cuadrado = 59,60, $p < 0,001$) en las que fue dominante o co-dominante. No se detectaron diferencias significativas en la incidencia de la infección cuando la población fue dividida en niños que vivían en localidades de carácter rural, con < 10.000 habitantes, y de carácter urbano, tanto de 10.000 - 50.000 habitantes como de > 50.000 habitantes (la capital) (Tabla 22).

Tabla 22.- Incidencia anual de gastroenteritis por rotavirus G12 (casos/100.000 habitantes) en menores de cinco años según tamaño de la localidad de residencia. Los denominadores se establecieron a partir de datos del Instituto Vasco de Estadística (EUSTAT), Estadística municipal 2011.

Temporada	Población	Edad (años)				
		< 2	2 - < 3	< 3	3 - < 5	< 5
2010 - 2011	< 10.000	1342,9	182,1	942,5	0,0	565,1
	10.000 - 50.000	1137,8	65,7	783,1	100,0	513,4
	> 50.000	1351,4	321,3	996,5	64,6	617,6
	TOTAL	1268,3	191,6	902,7	60,8	565,4
2011 - 2012	< 10.000	1726,6	546,4	1319,5	94,1	828,8
	10.000 - 50.000	2243,2	591,7	1696,8	100,0	1066,2
	> 50.000	2601,4	321,3	1815,8	129,3	1130,1
	TOTAL	2241,1	479,0	1642,8	109,5	1028,5
2014 - 2015	< 10.000	1151,1	364,3	879,7	47,0	546,2
	10.000 - 50.000	487,6	394,5	456,8	33,3	289,6
	> 50.000	1114,9	257,1	819,3	0,0	486,2
	TOTAL	886,6	335,3	699,4	24,3	428,9

La circulación de G12 parece haber sido similar en otras áreas de la CAPV: en las temporadas 2008 - 2015, se dispuso de muestras procedentes de la OSI Goierri-Alto Urola, siendo G12 igualmente el genotipo dominante en 2010 – 2011 (67,4%, 29/43), 2011 – 2012 (76,0%, 38/50) y co-dominante junto a G3 en 2014 – 2015 (G12: 72,0%, 67/93 y G3: 42,9%, 24/56). Curiosamente, dos de las cepas G12 procedentes de esa zona de Gipuzkoa fueron asociadas al P-tipo P[4]. Además, en la temporada 2011 - 2012 dispusimos de 14 muestras positivas a RVA de Araba y 10 de Bizkaia para ser genotipadas y 10 (71,4%) y 8 (80,0%) respectivamente correspondieron al genotipo G12.

La distribución por sexos fue similar a la del resto de RVA (224 varones y 191 mujeres, razón 1,2). Por grupos de edad, la infección por RVA G12 se detectó en 52 niños < 6 meses (12,5%), 125 niños de 6 a < 12 meses (30,1%), 180 de 12 a < 24 meses (43,4%), 42 de 24 a < 36 meses (10,1%), 13 de 36 a < 48 meses (3,2%) y 3 de 48 a < 60 meses (0,7%). Por último y como se ha referido en el apartado 4.4.3, el porcentaje de niños que hospitalizaron a causa de GEA por RVA G12 fue similar al de otros genotipos de RVA.

4.5.2 Análisis filogenético de rotavirus G12P[8]

4.5.2.1 Metodología del análisis realizado: genes y cepas

Se efectuó el análisis de los genes VP7 y VP4 de un gran número de cepas del genotipo G12, habiéndose escogido estos genes porque constituyen la base del esquema habitual de genotipado y son además valorados en la mayoría de estudios vacunales. Por otra parte, se obtuvo el genoma completo de diez cepas G12, dos por cada temporada desde la primera epidemia (2010 – 2011) hasta el final del estudio (2014 – 2015), lo que permitió el análisis global de su genoma concatenado. Las cepas seleccionadas para el estudio del genoma completo fueron similares a las que circularon en cada temporada y pueden ser consideradas representativas de las mismas.

Para el estudio de los genes VP7 y VP4 se utilizaron tanto secuencias parciales (VP7 longitud 795 pb y VP4 longitud 610 pb) como secuencias completas (VP7 longitud 1062 pb y VP4 longitud 2359 pb). Las secuencias parciales se usaron para comparar de forma más económica muchas cepas G12 de las distintas epidemias entre sí (74 VP7 y 100 VP4). Las secuencias completas se utilizaron para analizar la evolución de las cepas G12 a lo largo de los años y efectuar comparaciones más detalladas de los 11 genes con los de cepas internacionales. En el cálculo de las identidades de secuencias

nucleotídicas VP7 se incluyeron las tres primeras cepas G12P[8] detectadas en Gipuzkoa en la temporada 2004 – 2005 aunque sólo se dispuso de secuencias cortas (336 - 343 pb).

4.5.2.2 Análisis filogenético del gen VP7 de rotavirus G12

Comparación de las cepas circulantes en las distintas epidemias en Gipuzkoa (análisis de las secuencias parciales de VP7)

El análisis filogenético mostró que las cepas de las diferentes epidemias constituyeron grupos diferentes (Figura 30), con la excepción de las de la epidemia de 2011 - 2012, que prolongaron su circulación en 2012 – 2013, si bien de modo residual, no siendo G12 el genotipo dominante en dicha epidemia. Todos los segmentos genómicos VP7 de las cepas G12 de Gipuzkoa pertenecieron al linaje III. La identidad nucleotídica de las cepas de las diferentes epidemias varió entre sí entre 95,7 y 98,7% (Tabla 23), y comparadas con las cepas representativas del linaje III de G12 la identidad nucleotídica varió entre 97,0 – 99,0% con la cepa Dhaka 25 y entre 96,7 y 98,5% con la cepa B4633. Sin embargo, la identidad nucleotídica entre las cepas circulantes dentro de cada epidemia fue $\geq 99,1\%$ lo que indica que, en relación a este gen, la circulación en cada epidemia fue clonal. La identidad de nucleótidos observada al comparar las tres cepas G12 detectadas en 2004 - 2005 con las del periodo 2010 – 2015 fue algo menor: 96,1 – 97,1% (longitud de secuencia comparada 336 – 343 pb).

Tabla 23.- Identities nucleotídicas de las secuencias parciales del gen VP7 de cepas de rotavirus G12P[8] detectadas en Gipuzkoa. Las secuencias correspondientes a las cepas detectadas en el periodo 2010 – 2015 tienen 795 pb de longitud y las cepas detectadas en 2004 – 2005 entre 336 y 343 pb.

Identidad de secuencia nucleotídica gen VP7 (%) del genotipo G12						
Temporadas de RVA	2004 – 2005 (n = 3)	2010 - 2011 (n = 17)	2011 - 2012 (n = 20)	2012 - 2013 (n = 3)	2013 - 2014 (n = 4)	2014 - 2015 (n = 30)
2004 - 2005	100					
2010 - 2011	96,4 - 96,8	99,7 - 100				
2011 - 2012	96,1 - 96,5	96,4 - 97,1	99,2 - 100			
2012 - 2013	96,4 - 96,5	96,7 - 97,1	99,4 - 100	99,9 - 100		
2013 - 2014	97,0 - 97,1	98,5 - 98,7	96,1 - 96,7	96,5 - 96,7	99,9 - 100	
2014 - 2015	96,4 - 97,1	97,9 - 98,4	95,7 - 97,0	96,1 - 96,9	98,1 - 98,6	99,1 - 100

Para conocer mejor la dinámica de la evolución del gen VP7 de G12 en el contexto de una epidemia se estudiaron en detalle 30 secuencias parciales de la epidemia de 2014 – 2015. Diez secuencias fueron únicas siendo 19, 3 y 2 secuencias idénticas entre sí. Se observaron entre 0 y 6 sustituciones nucleotídicas por secuencia (795 pb) que afectaron a 12 nucleótidos distribuidos de modo uniforme a lo largo del área secuenciada, siendo diez las sustituciones silentes (83,3%) y solo dos (194A>G y 407G>A), afectando cada una a una cepa, las que llevaron a sustitución de aminoácidos, mostrando por tanto la secuencia deducida de aminoácidos un nivel de conservación alto (Apéndice IV, Tabla AIV-1). Estas sustituciones no corresponden con los sitios antigénicos de la proteína VP7.

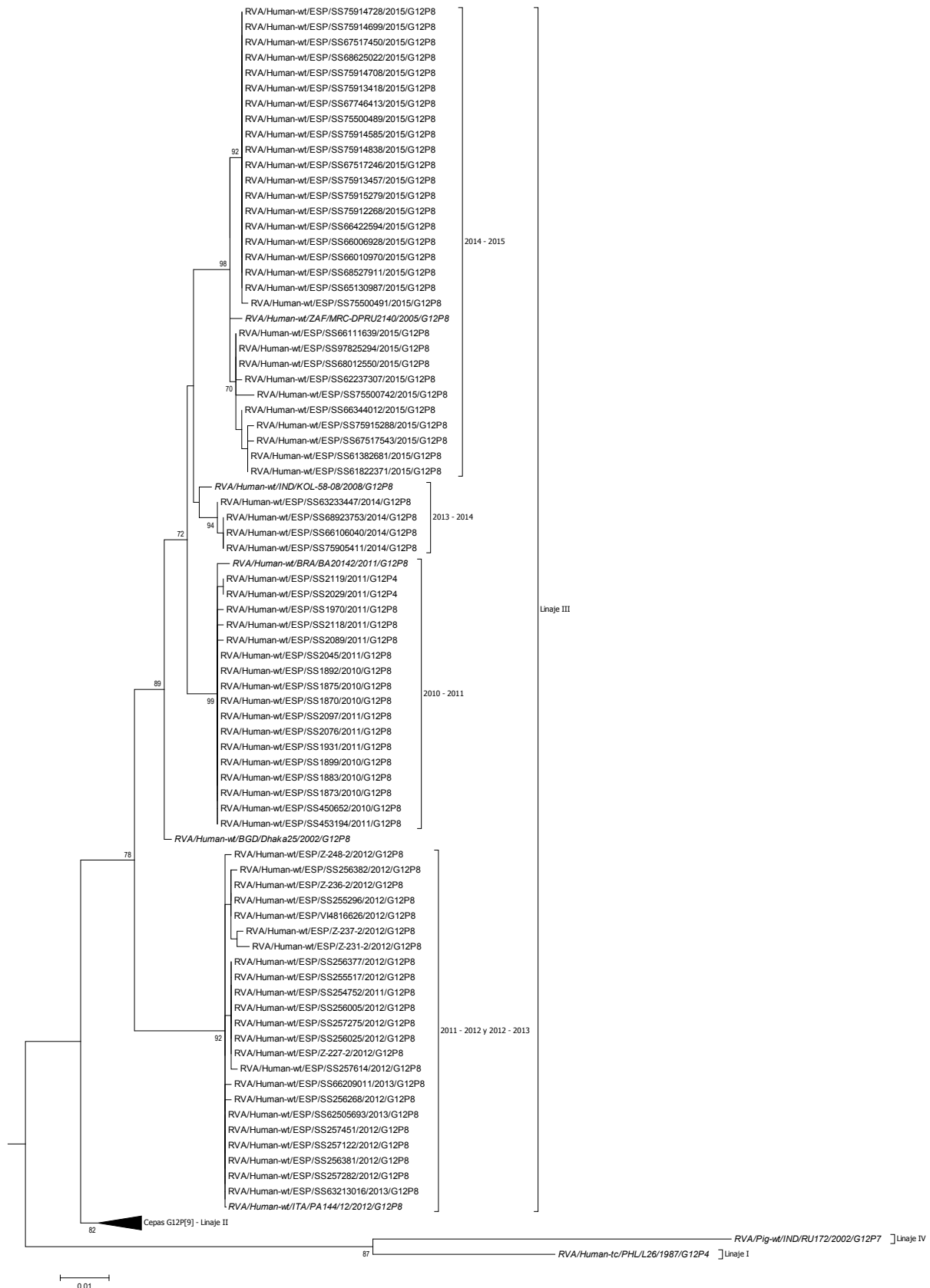


Figura 30.- Análisis filogenético del segmento genómico parcial VP7 de cepas de rotavirus G12P[8] detectadas en Gipuzkoa en 2010 – 2015 (795 pb). Se incluyen cepas representando los diferentes linajes de G12 así como las cepas más similares de la base de datos de GenBank marcadas en cursiva. No se muestran los valores de *bootstrap* menores del 70%. La barra de escala indica el número de sustituciones por posición de nucleótido. Los corchetes señalan las cepas G12P[8] de este estudio recogidas en 2010 – 2011, 2011 – 2012, 2012- 2013, 2013 – 2014 y 2014 – 2015.

Comparación del gen VP7 (secuencias completas) con cepas internacionales

La identidad nucleotídica de la secuencia completa del gen VP7 de estas cepas en relación a las internacionales más similares encontradas en GenBank y otras representativas del genotipo G12 se muestra en la Tabla AV-1 (Apéndice V). El análisis de este gen en su longitud total codificante (Figura 31) mostró resultados similares a los obtenidos con la secuencia parcial, pero con mayor discriminación. Las cepas de Gipuzkoa se dividieron en dos grandes clústeres, el primero compuesto por las que circularon en las temporadas 2010 – 2011, 2013 - 2014 y 2014 - 2015 (clúster A, identidad nucleotídica $\geq 98,5\%$) y el segundo por las detectadas en 2011 - 2012 y 2012 - 2013 (clúster B, identidad nucleotídica $\geq 99,8\%$). Las cepas del clúster A se dividieron a su vez en tres subclústeres en función de la temporada en la que fueron detectadas, conformando por el contrario las del B un único clúster que circuló durante dos epidemias consecutivas (2011 - 2013).

El gen VP7 de las cepas de la temporada 2010 - 2011 agrupó con el de cepas G12P[8] de Brasil (BA20142) y Tailandia (CU615-TK) (identidad nucleotídica 99,7 – 99,8%) detectadas en 2011 y 2009, respectivamente. Las cepas de las temporadas 2011 - 2012 y 2012 – 2013 (clúster B) mostraron mayor similitud con una cepa italiana G12P[8] (PA144/12) de 2012 y otra cepa G12P[6] originaria de Bangladesh de 2009 (Bang-129) (identidad nucleotídica 99,9 – 100,0% y 99,2 – 99,4%, respectivamente). Las cepas de la temporada 2013 - 2014 revelaron una estrecha relación con cepas G12P[8] de India (KOL-58-08) y Estados Unidos (VU08-09-6) detectadas en 2008 (identidad nucleotídica 99,3 – 99,4%). Por último, las cepas de la temporada 2014 – 2015 (última temporada de estudio) agruparon con cepas G12P[8] circulantes en diversas partes del mundo y diferentes años como Bután en 2010 (BTN-120), Estados Unidos en 2011 y 2013 (CNMC12 y VU12-13-84, respectivamente), Kenia en 2010 (KDH651), Sudáfrica en 2005 (MRC-DPRU2140), Uganda en 2011 (MRC-DPRU4620) y México en 2013 (SONMX-37) (identidad nucleotídica 99,4 – 99,8%).

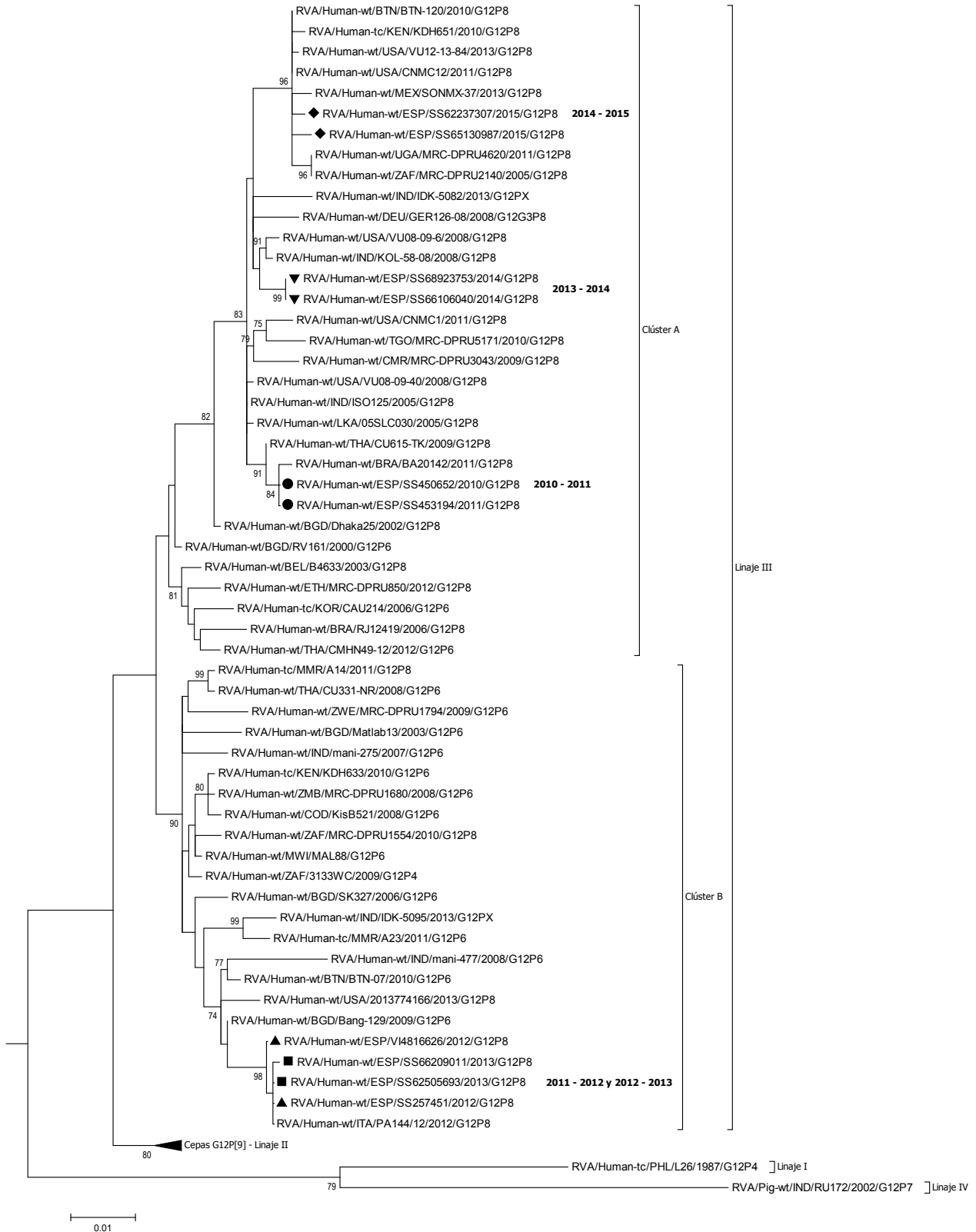


Figura 31.- Análisis filogenético del segmento genómico codificante de VP7 de cepas de rotavirus G12P[8] detectadas de pacientes con gastroenteritis aguda en Gipuzkoa durante cinco epidemias consecutivas (2010 - 2015) comparadas con otras cepas humanas y animales representativas de la base de datos de GenBank. No se muestran los valores de *bootstrap* menores del 70%. Las barras de escala indican el número de sustituciones por posición de nucleótido. Los círculos negros (●) señalan las cepas G12P[8] de este estudio recogidas en 2010 – 2011, los triángulos (▲) las de 2011 – 2012, los cuadrados (■) las de 2012 - 2013, los triángulos invertidos (▼) las de 2013 - 2014 y los rombos (◆) las de 2014 - 2015.

4.5.2.3 Análisis filogenético del gen VP4 de rotavirus G12

Comparación de las cepas circulantes en las distintas epidemias en Gipuzkoa (análisis de las secuencias parciales de VP4)

Las cepas de las diferentes epidemias constituyeron grupos diferentes, con la excepción de las de la epidemia de 2011 - 2012, que de modo similar a lo observado en el gen VP7, agruparon con las de la temporada 2012 – 2013. Por tanto, con la excepción citada (2011 - 2012) las variantes representativas de cada epidemia G12 no persistieron sobre el terreno más de una temporada (Figura 32). Este análisis global no varió cuando se valoraron simultáneamente las secuencias de los genes VP7 y VP4, base del esquema habitual de genotipado, de manera que las parejas de secuencias VP7/VP4 (salvo 2012 – 2013) fueron diferentes en cada epidemia.

Sin embargo, a diferencia de lo observado en el análisis del gen VP7, en el gen VP4 se detectaron algunas secuencias divergentes, que fueron minoritarias (4%) y similares a las encontradas en cepas locales de otros genotipos, generalmente coetáneas: en 2013 - 2014 una secuencia fue idéntica a la encontrada en una cepa G4P[8], en 2014 - 2015 otra secuencia fue idéntica a la encontrada en una cepa de G3P[8] atípico y otra fue muy similar a cepas G1P[8] y en 2012 - 2013 una secuencia fue muy similar a las encontradas en años previos en cepas G1P[8] y G9P[8]. Más allá de estas cepas no se encontró una relación entre las secuencias VP4 de las cepas G12 y las circulantes en el mismo período de otros genotipos con VP4 P[8], agrupando en general separadamente las cepas de los diferentes genotipos y epidemias (Apéndice VI, Figura AVI-1).

La identidad nucleotídica (Tabla 24) de las cepas de las diferentes epidemias entre sí varió entre 95,7 y 98,9%, y al compararlas con las cepas representativas de G12P[8] varió entre 97,0 y 98,7% respecto a la cepa Dhaka25 y entre 96,7 y 98,2% respecto a la cepa B4633. Sin embargo, sin considerar las pocas secuencias divergentes, la identidad nucleotídica entre las cepas circulantes dentro de cada epidemia fue $\geq 98,9\%$, parecida a la encontrada en el caso del gen VP7 ($\geq 99,1\%$). El análisis filogenético mostró que todos los segmentos genómicos VP4 de las cepas G12 de Gipuzkoa pertenecieron al linaje III.

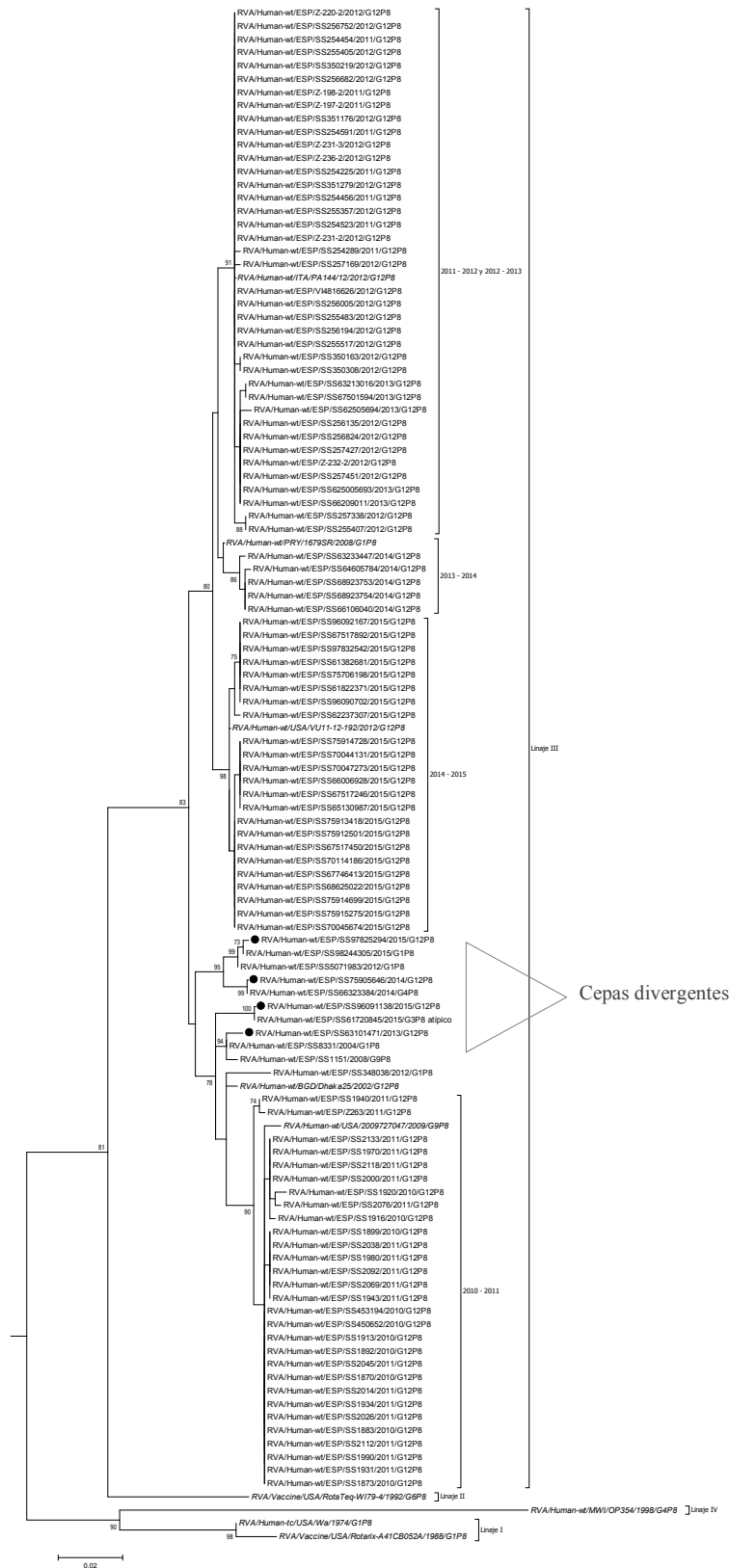


Figura 32.- Análisis filogenético del segmento genómico parcial VP4 (610 pb) de cepas de rotavirus G12P[8] detectadas en Gipuzkoa en 2010 – 2015. Se incluyen cepas representando los diferentes linajes de P[8] así como las cepas de mayor similitud de la base de datos de GenBank marcadas en cursiva. No se muestran los valores de *bootstrap* menores del 70%. La barra de escala indica el número de sustituciones por posición de nucleótido. Los corchetes señalan las cepas G12P[8] de este estudio recogidas en 2010 – 2011, 2011 – 2012, 2012 - 2013, 2013 - 2014 y 2014 – 2015. Los círculos (●) indican los VP4 de las cepas G12P[8] divergentes.

Tabla 24.- Identities nucleotídicas de las secuencias parciales (610 pb) del gen VP4 de cepas de rotavirus G12P[8] detectadas en Gipuzkoa.

Temporadas de RVA	Identidad de secuencia nucleotídica gen VP4 (%) del genotipo P[8]				
	2010 - 2011 (n = 29)	2011 - 2012 (n = 34)	2012 - 2013 (n = 6)	2013 - 2014 (n = 6)	2014 - 2015 (n = 25)
2010 - 2011	98,9 - 100,0				
2011 - 2012	96,2 - 97,2	99,5 - 100,0			
2012 - 2013	95,9 - 97,9	96,7 - 100,0	96,6 - 100,0		
2013 - 2014	95,7 - 96,9	96,7 - 98,9	96,6 - 98,7	96,7 - 100,0	
2014 - 2015	95,9 - 98,0	96,6 - 98,7	96,4 - 98,5	96,6 - 98,5	96,7 - 100,0

Comparación con cepas internacionales del gen VP4 (secuencias completas)

La identidad nucleotídica de la secuencia completa del gen VP4 de estas cepas en relación a las internacionales más similares del linaje III encontradas en GenBank y dos RVA G1P[8] detectados en Gipuzkoa en 2010 – 2011 se muestra en la Tabla AV-2 (Apéndice V). El análisis filogenético en comparación con cepas representativas de diferentes países y genotipos reveló que las cepas G12P[8] de este estudio se distribuyeron en dos grandes clústeres: el primero incluyó las cepas G12 de la temporada 2010 – 2011 (clúster A, identidad nucleotídica 100%) y el segundo las cepas G12 recogidas entre 2011 y 2015 (cuatro temporadas consecutivas) (clúster B, identidad nucleotídica $\geq 98,5\%$). En el árbol se conforma un tercer clúster que agrupa a dos cepas G1P[8] circulantes en Gipuzkoa de las que se dispuso también del genoma completo (clúster C, identidad nucleotídica 99,7%) (Figura 33).

Si se considera el segmento codificante del gen VP4 de las cepas G12, las de la temporada 2010 – 2011 (clúster A) mostraron gran similitud con cepas G9P[8] recogidas en Canadá (RT-073-09) y Estados Unidos (2009727047 y DC8) en 2009 (identidad nucleotídica 99,5 – 99,6%). Las cepas de las temporadas 2011 – 2012 y 2012 – 2013 (clúster B) formaron un único subclúster estando estrechamente relacionadas con una cepa italiana G12P[8] detectada en 2012 (PA144/12) y otras de Estados Unidos circulantes en 2013 (VU12-13-149 y 2013774164) (identidad nucleotídica 99,4 – 99,9%). Las cepas detectadas en 2013 - 2014 (clúster B) fueron muy similares a otras detectadas en Paraguay (1679SR, G1P[8]) y Bélgica (BE0258, G12P[8]) en 2008 (identidad nucleotídica 99,3 – 99,7%). Por último, las cepas de la temporada 2014 – 2015 (clúster B) agruparon con cepas G12P[8] recogidas en Estados Unidos en 2011 -

2012 (VU11-12-192 y CNMC13) (identidad nucleotídica 99,4 – 99,8%) y diferentes países de África como Kenia, Uganda y Sudáfrica (KDH651, MRC-DPRU4620 y MRC-DPRU71) en el periodo 2010 – 2012 (identidad nucleotídica 98,9 – 99,5%).

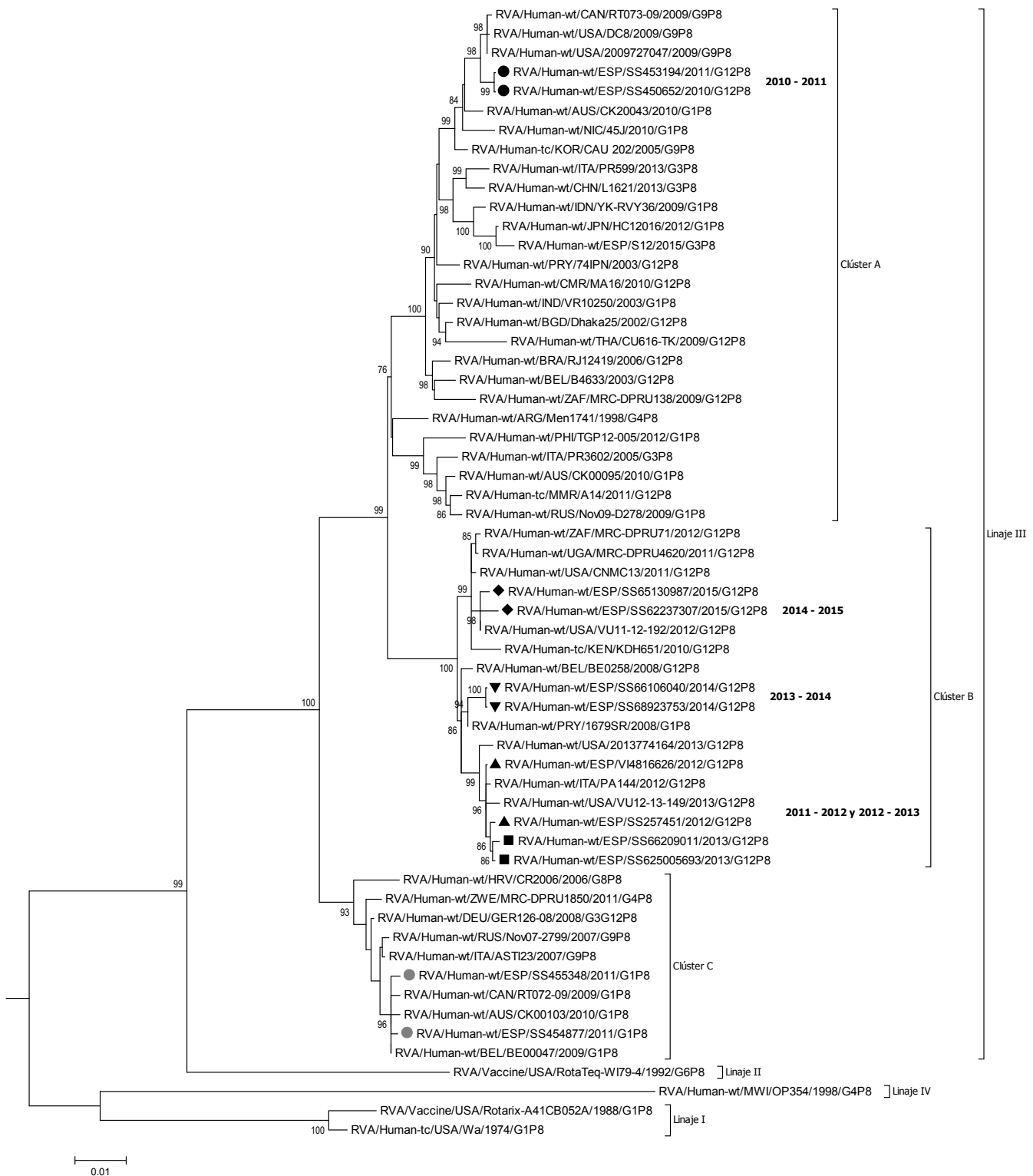


Figura 33.- Análisis filogenético del segmento genómico codificante de VP4 de cepas de rotavirus G1P[8] (temporada 2010 - 2011) y G12P[8] (periodo 2010 - 2015) detectadas en pacientes con gastroenteritis aguda en Gipuzkoa comparadas con otras cepas de la base de datos de GenBank. No se muestran los valores de *bootstrap* menores del 70%. Las barras de escala indican el número de sustituciones por posición de nucleótido. Los círculos grises (●) indican las cepas G1P[8] de este estudio detectadas en la temporada 2010 – 2011. Los círculos negros (●) señalan las cepas G12P[8] de este estudio recogidas en 2010 – 2011, los triángulos (▲) las de 2011 - 2012, los cuadrados (■) las de 2012 - 2013, los triángulos invertidos (▼) las de 2013 - 2014 y los rombos (◆) las de 2014 – 2015.

4.5.2.4 Análisis de los epítomos neutralizantes de las proteínas externas VP7 y VP4

Las diferencias aminoacídicas en los epítomos neutralizantes de las proteínas de superficie VP7 y VP4 (VP8* y VP5*) de las cepas de RVA G12P[8] circulantes en Gipuzkoa con los virus incluidos en la formulación de Rotarix[®] y RotaTeq[®] podrían disminuir la efectividad de estas vacunas. Para estudiar esas diferencias, se comparó la composición aminoacídica de los epítomos antigénicos de VP7 y VP4 de las cepas G12P[8] de nuestro territorio y las vacunales. La localización de estos epítomos ha sido determinada en estudios efectuados mediante mapeo de mutantes de escape a la neutralización e identificación de los aminoácidos expuestos en la superficie que muestran variabilidad intergenotípica entre los G- y P-tipos humanos prevalentes ^{41, 42, 80, 267}.

La proteína VP7 contiene dos epítomos, 7-1 y 7-2. El epítomo 7-1 se subdivide a su vez en 7-1a y 7-1b. A pesar de las diferencias observadas a nivel nucleotídico entre las cepas G12P[8] del periodo 2010 - 2015 de Gipuzkoa, no se observó ninguna diferencia entre los residuos antigénicos de éstas. Sin embargo, existen muchas diferencias entre los residuos antigénicos de las cepas de RVA G12 y de las cepas incluidas en Rotarix[®] y RotaTeq[®] (Figura 34). De los 29 residuos aminoacídicos de estos epítomos, solo 12 fueron completamente conservados entre todas las cepas de este estudio y las vacunales. Hubo ocho residuos antigénicos distribuidos a lo largo de los dos epítomos (7-1 y 7-2) que no coincidieron con ninguna de las cepas vacunales anteriormente mencionadas y nueve que coincidieron con los de alguna de las cepas incluidas en la vacuna RotaTeq[®] pero no con los de la cepa G1 de Rotarix[®].

VP7																													
Cepas	7-1a														7-1b						7-2								
	87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	201	211	212	213	238	242	143	145	146	147	148	190	217	221	264
G1P[8] (A41CB052A) Rotarix®	T	T	N	G	E	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	M	N	G
G1P[5] (WI79-9) RotaTeq®	T	T	N	G	D	W	K	D	Q	S	V	V	D	K	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	S	L	S	M	N	G
G2P[5] (SC2-9) RotaTeq®	A	N	S	D	E	W	E	N	Q	D	T	M	N	K	Q	D	V	S	N	S	R	D	N	T	S	D	I	S	G
G3P[5] (WI78-9) RotaTeq®	T	T	N	N	S	W	K	D	Q	D	A	V	D	K	Q	D	A	N	K	D	K	D	A	T	L	S	E	A	G
G4P[5] (BrB-9) RotaTeq®	S	T	S	T	E	W	K	D	Q	N	L	I	D	K	Q	D	T	A	D	T	R	A	S	G	E	S	T	S	G
G6P[8] (WI79-4) RotaTeq®	V	N	A	T	E	W	K	D	Q	D	A	V	E	K	Q	N	P	D	N	A	K	D	S	T	Q	S	T	T	G
SS450652/2010/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
SS453194/2011/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
SS257451/2012/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
VI4816626/2012/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
SS66209011/2013/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
SS62505693/2013/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
SS68923753/2014/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
SS66106040/2014/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
SS62237307/2015/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
SS65130987/2015/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
Dhaka25/2002/BGD/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
BA20144/2011/BRA/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	N	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G
PA144/12/2012/ITA/G12P[8]	S	T	T	P	D	W	T	N	Q	D	S	V	D	K	Q	D	V	T	N	N	Q	Q	N	S	L	S	E	A	G

Figura 34.- Alineamiento de los residuos antigénicos de VP7 de las cepas incluidas en Rotarix® y RotaTeq®, las cepas G12P[8] circulantes en Gipuzkoa durante el periodo 2010 – 2015 y cepas G12P[8] de GenBank. Los residuos antigénicos se dividen en dos epítotos (7-1 y 7-2). Los aminoácidos que difieren entre Rotarix® y RotaTeq® están marcados con negrita y sombreados en amarillo. Los residuos coloreados en verde son residuos que son diferentes de la cepa incluida en Rotarix® y los coloreados en gris son diferentes a los de todas las cepas incluidas en ambas vacunas.

La proteína VP4 da lugar a las subunidades VP8* y VP5* tras su escisión proteolítica con tripsina. La subunidad VP8* contiene cuatro epítomos antigénicos (8-1, 8-2, 8-3 y 8-4) y la subunidad VP5* cinco (5-1, 5-2, 5-3, 5-4 y 5-5). Al analizar estas subunidades, se observó que 27 de los 37 residuos aminoacídicos estaban totalmente conservados entre las cepas de este estudio y las correspondientes a Rotarix[®] y RotaTeq[®] (Figura 35). Las diferencias se localizaron en los epítomos antigénicos 8-1, 8-3 y 5-1. Solo tres residuos antigénicos fueron diferentes a los de ambas cepas vacunales, cuatro fueron diferentes a los de la cepa incluida en la vacuna Rotarix[®] y uno no coincidió con el de ninguna de las cepas de RotaTeq[®] (P-tipos P[5] y P[8]). Además, hubo una sustitución nucleotídica en el epítomo antigénico 8-1 (N150T) de las cepas de Gipuzkoa recogidas en la última temporada de estudio (2014 – 2015) que hizo que este residuo fuera diferente al de las cepas incluidas en ambas vacunas. Lo mismo ocurrió en el aminoácido de la posición 113 correspondiente al epítomo antigénico 8-3 de las cepas G12P[8] de Gipuzkoa de 2010 – 2011 y la cepa brasileña BA20144 de GenBank (N113D).

Cepas	VP8*																	VP5*																			
	8-1					8-2				8-3					8-4			5-1					5-2	5-3	5-4	5-5											
	100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89	384	386	388	393	394	398	440	441	434	459	429	306
G1P[8] (A41CB052A) Rotarix®	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	S	Y	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
G6P[8] (WI79-4) RotaTeq®	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	R	H	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
SS450652/2010/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
SS453194/2011/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
SS257451/2012/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
VI4816626/2012/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
SS66209011/2013/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
SS62505693/2013/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
SS68923753/2014/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
SS66106040/2014/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
SS62237307/2015/G12P[8]	D	G	S	T	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
SS65130987/2015/G12P[8]	D	G	S	T	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
Dhaka25/2002/BGD/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
BA20144/2011/BRA/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
PA144/12/2012/ITA/G12P[8]	D	G	S	N	S	N	A	N	L	N	G	E	R	N	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N	S	D	S	A	W	N	L	R	E	N	S	L
G1-G4P[5] RotaTeq®	G	T	I	G	R	I	T	N/K	Y	A	S	E	N	T	S	E	T	S	S	N	A	D	T	G	P	D	S	A	Q	W	K	T	R	E	R	R	M

Figura 35.- Alineamiento de los residuos antigénicos de VP4 de las cepas incluidas en Rotarix® y RotaTeq®, las cepas G12P[8] circulantes en Gipuzkoa durante el periodo 2010 – 2015 y cepas G12P[8] de GenBank. Los residuos antigénicos en VP8* se dividen en cuatro epítopos antigénicos (8-1/8-4) y los de VP5* en cinco (5-1/5-5). Los aminoácidos que difieren entre Rotarix® y RotaTeq® están marcados con negrita y sombreados en amarillo. Los residuos coloreados en verde son residuos que son diferentes de la cepa incluida en Rotarix®, los residuos coloreados en azul son diferentes de los de las cepas de RotaTeq® y los coloreados en gris son diferentes a los de todas las cepas incluidas en ambas vacunas.

4.5.2.5 Análisis filogenético del genoma completo (los 11 genes de rotavirus concatenados)

El análisis filogenético de la región codificante de los 11 genes de RVA concatenados mostró que las diez cepas G12P[8] de este estudio (Gipuzkoa 2010 – 2015) de las que se obtuvo el genoma completo agruparon con cepas G12 de esqueleto genético tipo Wa recogidas por todo el mundo, presentando dicha constelación genómica (G12-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) (Tabla AVII-1, Apéndice VII). Las cepas de Gipuzkoa mostraron entre sí una identidad nucleotídica $\geq 96,6\%$, y como era de esperar una menor identidad (93,3 - 93,9%) al compararlas con cepas contemporáneas del genotipo G1P[8] de nuestra área (94,4 - 95,1% excluyendo el gen VP7) (Tabla AV-3, Apéndice V).

Las cepas G12P[8] de Gipuzkoa se dividieron en dos grandes grupos (Figura 36): uno formado por las cepas de 2010 – 2014 (identidad nucleotídica 97,2 - 100%), y otro por las de 2014 – 2015 (identidad nucleotídica 99,4%). El primer grupo a su vez se subdividió en tres subgrupos, estando el primero formado por las cepas de 2010 – 2011 (identidad nucleotídica 99,9%), el segundo por las de 2013 – 2014 (identidad nucleotídica 100%) y el tercero por cepas de 2011 - 2012 y 2012 – 2013 (identidad nucleotídica 99,9%).

Las cepas G12P[8] de 2010 – 2011 mostraron gran similitud con la cepa CU616-TK que circuló esporádicamente en Tailandia en 2009 (identidad nucleotídica 99,1%)²⁶⁸. Las detectadas en las temporadas de 2011 – 2012 y 2012 – 2013 agruparon con una cepa italiana que circuló esporádicamente en 2012 siendo la primera detección de este genotipo en Sicilia (PA144/12) y otra de Estados Unidos detectada en 2013 (VU12-13-149) (identidad nucleotídica 99,9 y 99,6%, respectivamente)^{269,270}. Las cepas de 2014 – 2015 fueron muy similares a cepas recogidas en Estados Unidos (CNMC12, VU11-12-192 y VU12-13-84) en el periodo 2011 – 2013 (identidad nucleotídica 99,4 - 99,6%). Por último, las cepas recogidas en 2013 – 2014, a diferencia de las anteriores no epidémicas, fueron más “atípicas” presentando menor similitud con otras cepas internacionales, siendo la más próxima una cepa sudafricana (MRC-DPRU2140) del año 2005 (identidad nucleotídica 97,9%).

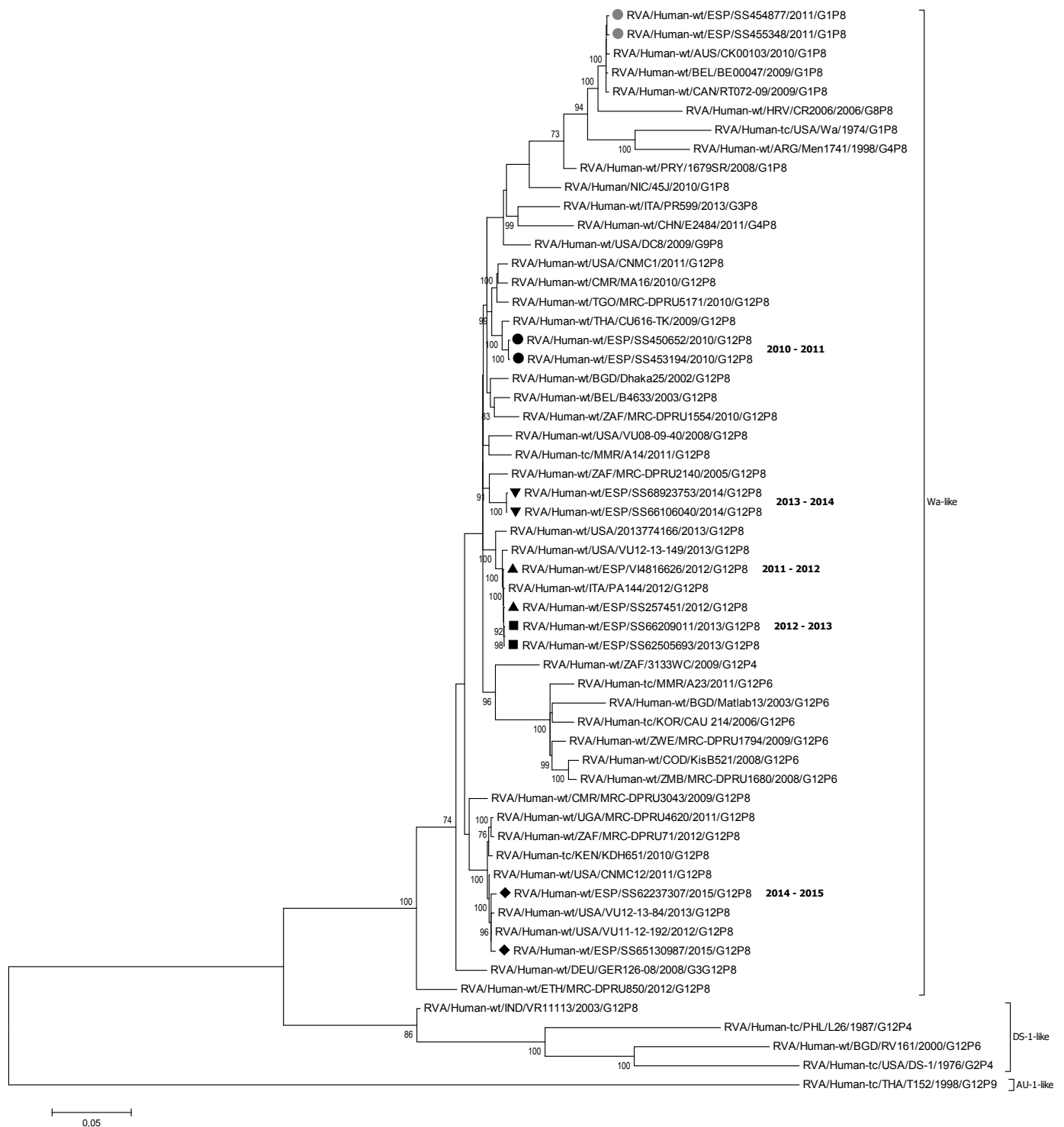


Figura 36.- Análisis filogenético de las regiones codificantes (ORF) correspondientes a los 11 segmentos génicos de cepas de rotavirus G1P[8] (temporada 2010 - 2011) y G12P[8] (periodo 2010 - 2015) detectadas en pacientes con gastroenteritis aguda en Gipuzkoa comparadas con otras cepas de la base de datos de GenBank. No se muestran los valores de *bootstrap* menores del 70%. Las barras de escala indican el número de sustituciones por posición de nucleótido. Los círculos grises (●) indican las cepas G1P[8] de este estudio detectadas en la temporada 2010 – 2011. Los círculos negros (●) señalan las cepas G12P[8] de este estudio recogidas en 2010 – 2011, los triángulos (▲) las de 2011 - 2012, los cuadrados (■) las de 2012 - 2013, los triángulos invertidos (▼) las de 2013 - 2014 y los rombos (◆) las de 2014 – 2015.

En la Tabla AV-4 del Apéndice V pueden verse en detalle las identidades de nucleótidos de los 11 segmentos génicos de las cepas obtenidas en las cinco temporadas entre 2010 y 2015. En líneas generales, los segmentos genómicos de las cepas G12P[8] detectadas en Gipuzkoa fueron bastante similares entre sí, especialmente VP2, VP3, VP4, NSP1, NSP2, NSP3 y NSP5 (identidad nucleotídica intragen 96,2 – 99,8%). Por el contrario, los genes VP1, VP6 y especialmente NSP4 difirieron en un 93,0 – 98,3%. Una búsqueda en “BLAST” del gen NSP4 (Tabla 25), reveló que las cepas de este estudio mostraron una gran similitud (99 - 100%) con cepas de origen humano de diferente genotipo (G1, G9 y G12), año de detección (2007 - 2014) y país (por ejemplo Estados Unidos, Brasil, Tailandia y Australia), lo que sugiere que el origen del gen NSP4 no es zoonótico.

Finalmente, al comparar gen a gen el genoma completo de las cepas G12P[8] detectadas en Gipuzkoa, se observó que las cepas de RVA G1P[8] de la temporada 2010 – 2011 así como las cepas G12P[8] de cada temporada fueron diferentes entre sí en todo su genoma no habiéndose encontrado indicios de recombinación entre ellas.

Tabla 25.- Resultados obtenidos al realizar una búsqueda en “BLAST” del gen NSP4 de las cepas disponibles en GenBank más similares a las cepas G12P[8] recogidas en Gipuzkoa en 2010 – 2015. En el resultado número 1 se muestran las cepas de máxima similitud.

Temporada	Gen NSP4 – Cepas más similares a las de Gipuzkoa		
	1	2	3
2010 - 2011	BA20144 G12P[8] 2011 Brasil	2007719825 G1P[8] 2007 USA	MRC-DPRU1381 G1P[8] 2007 Sudáfrica
2011 - 2013	Bang-144 G9P[8] 2008 Bangladesh ¹	PA144 G12P[8] 2012 Italia	BE00023 G1P[8] 2007 Bélgica
2013 - 2014	1755SR G1P[8] 2009 Paraguay	RT006-07 G1P[8] 2007 Canadá	ma19030 G1P[8] 2010 Brasil
2014 - 2015	ME650 G12P[8] 2014 Italia ²	CNMC12 G12P[8] 2011 USA ³	LKO13/311 G12P[6] 2012 India

¹ Similar a otras cepas bangladesís G1P[8] y G12P[6] de 2008.

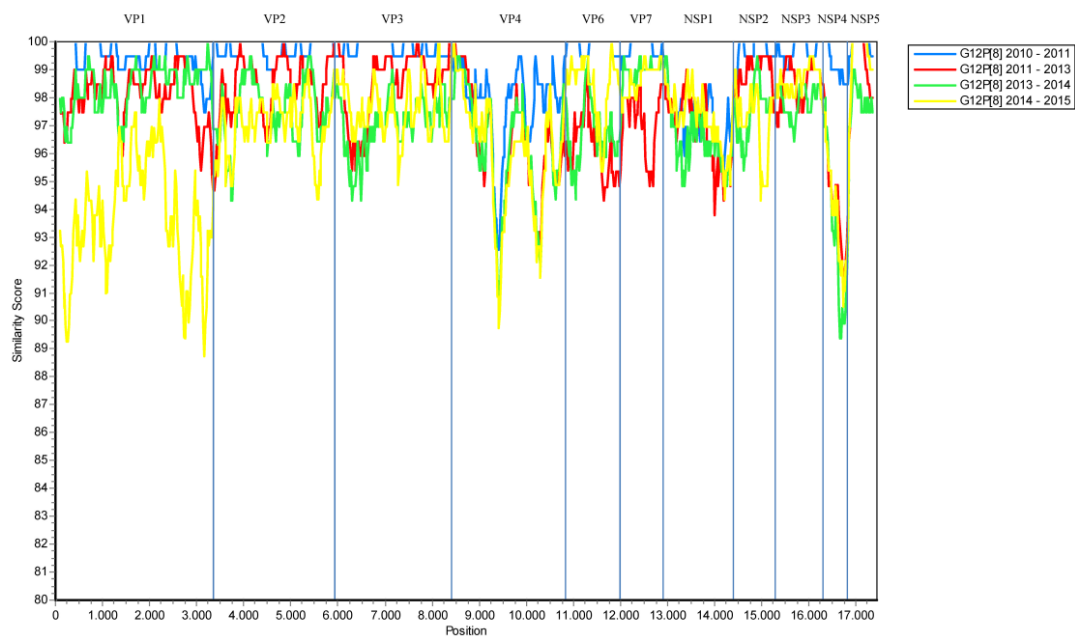
² Similar a otras cepas italianas G12P[8] de 2013.

³ Similar a otras cepas estadounidenses G12P[8] de 2012 y 2013.

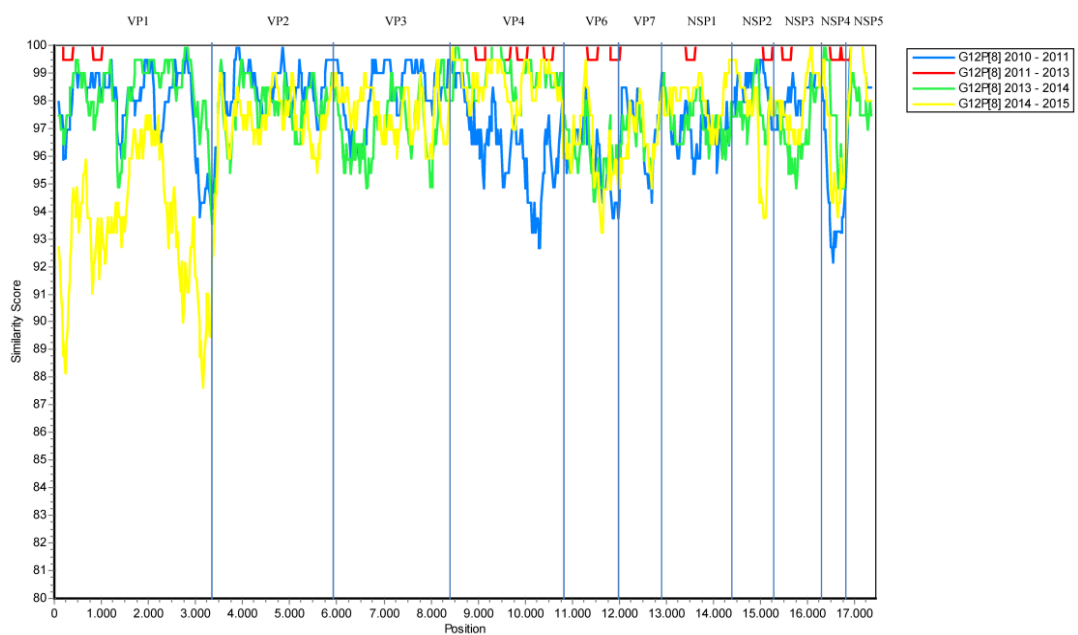
Los diagramas de similitud (Figura 37, diagramas A - D) representan la distancia genética a lo largo de los 11 genes (regiones codificantes) concatenados de las cepas G12P[8] detectadas en Gipuzkoa respecto a las cepas de mayor similitud de GenBank, tomadas como referencia. Las cepas G12P[8] de Gipuzkoa recogidas en 2010 – 2011 fueron bastante similares a la cepa tailandesa CU616-TK en todo su genoma excepto en los genes VP4 y NSP1 (diagrama A). Las cepas G12P[8] de 2011 – 2013 mostraron una

gran similitud con la cepa italiana detectada en 2012 PA144/12 en todos sus genes siendo los genes VP2, VP3, VP7 y NSP5 idénticos (diagrama B). Como cabía esperar, el diagrama de similitud de las cepas G12P[8] de 2013 – 2014 respecto a la cepa más similar hallada en GenBank muestra muy poca similitud en todo su genoma (diagrama C). Por el contrario, se observó una elevada similitud entre las cepas G12P[8] de 2014 – 2015 y las cepas detectadas en 2011 – 2013 en Estados Unidos (VU12-13-84, VU11-12-192 y CNMC12) siendo el segmento génico NSP5 idéntico (diagrama D).

A Query: Tailandia 2009_CU616-TK



B Query: Italia 2012_PA144



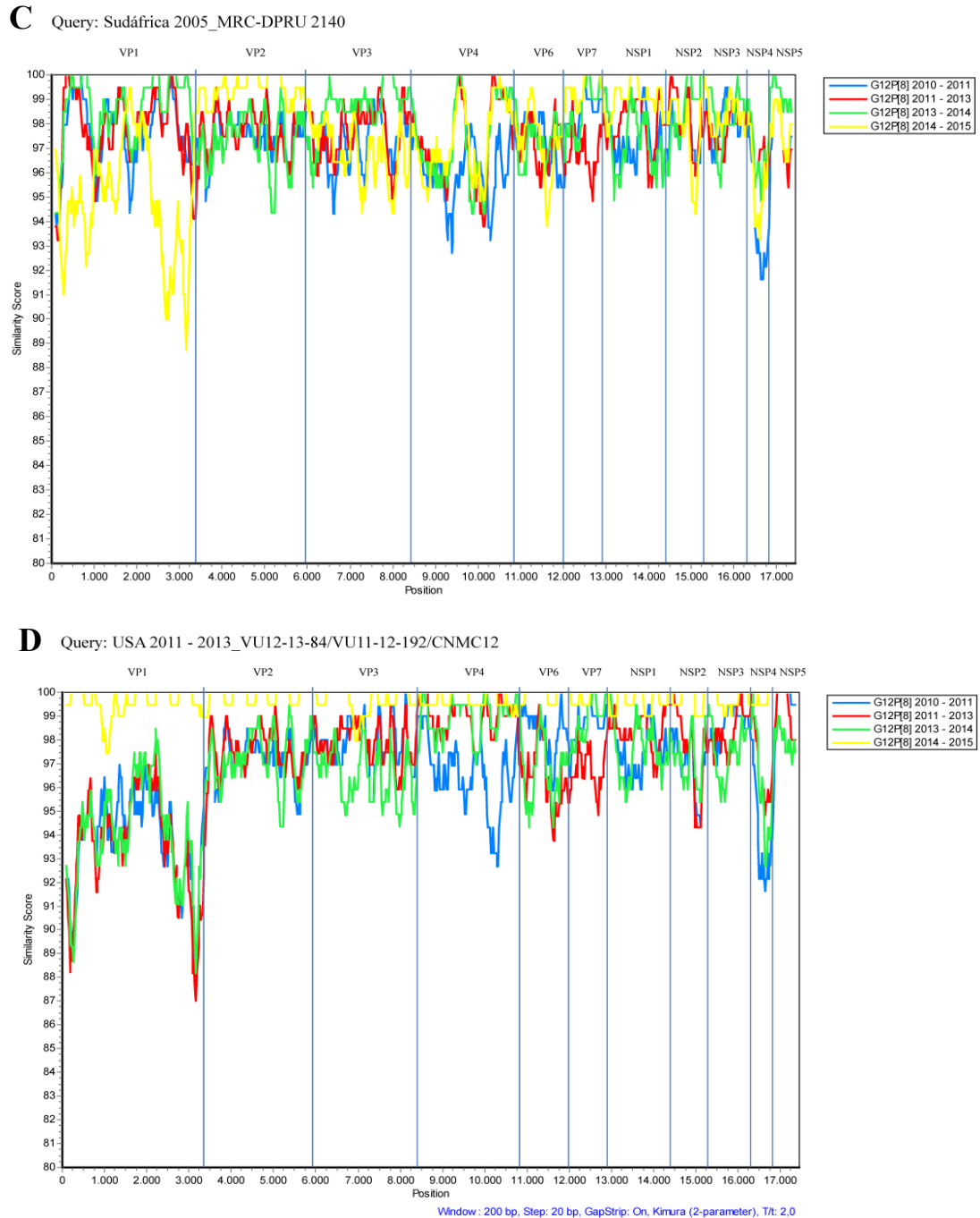


Figura 37.- Diagramas de similitud (SimPlot) de las regiones codificantes (ORF) correspondientes a los 11 segmentos genómicos concatenados de las cepas G12P[8] de rotavirus detectadas durante 2010 - 2015 en Gipuzkoa. Cada trazo de diferente color se corresponde con un grupo clonal de G12P[8] representado en la leyenda de la derecha e indica la distancia genética (%) de cada grupo respecto a la cepa de referencia a lo largo del genoma. Como cepa de referencia para cada grupo clonal se ha utilizado las cepas de mayor similitud de GenBank. Concretamente, la cepa CU616-TK para las cepas de 2010 – 2011 (diagrama A), PA144/12 para las cepas de 2011 – 2013 (diagrama B), MRC-DPRU2140 para las cepas de 2013 – 2014 (diagrama C) y VU12-13-84, VU11-12-192 y CNMC12 para las cepas de 2014 – 2015 (diagrama D). Las barras verticales de color azul separan los 11 genes.

4.6 Rotavirus G3 atípico de origen equino. Emergencia y circulación en 2015 en Gipuzkoa

4.6.1 Marco geográfico del estudio

Debido a lo inusual de su detección, la circulación de la cepa atípica de RVA G3 se estudió en la población de la práctica totalidad de Gipuzkoa (91%, excluyendo la OSI Alto Deba) aprovechando que, desde julio de 2014, todos los coprocultivos y estudios de enteropatógenos de dicho territorio se efectúan en el Servicio de Microbiología del HUD.

4.6.2 Genotipos circulantes de rotavirus en la temporada epidémica 2014 - 2015

De julio 2014 a junio 2015, se estudiaron un total de 8.806 episodios de GEA correspondientes a 7.913 niños y adultos encontrándose RVA en 464 episodios (5,3%) siendo todos ellos pacientes diferentes. De estos, 368 fueron niños < 5 años, 7 jóvenes \geq 5 – 15 años, 54 adultos > 15 – 65 años y 35 adultos > 65 años. La epidemia de RVA comenzó en febrero de 2015 alcanzando la máxima incidencia en marzo y finalizando en mayo (Figura 38).

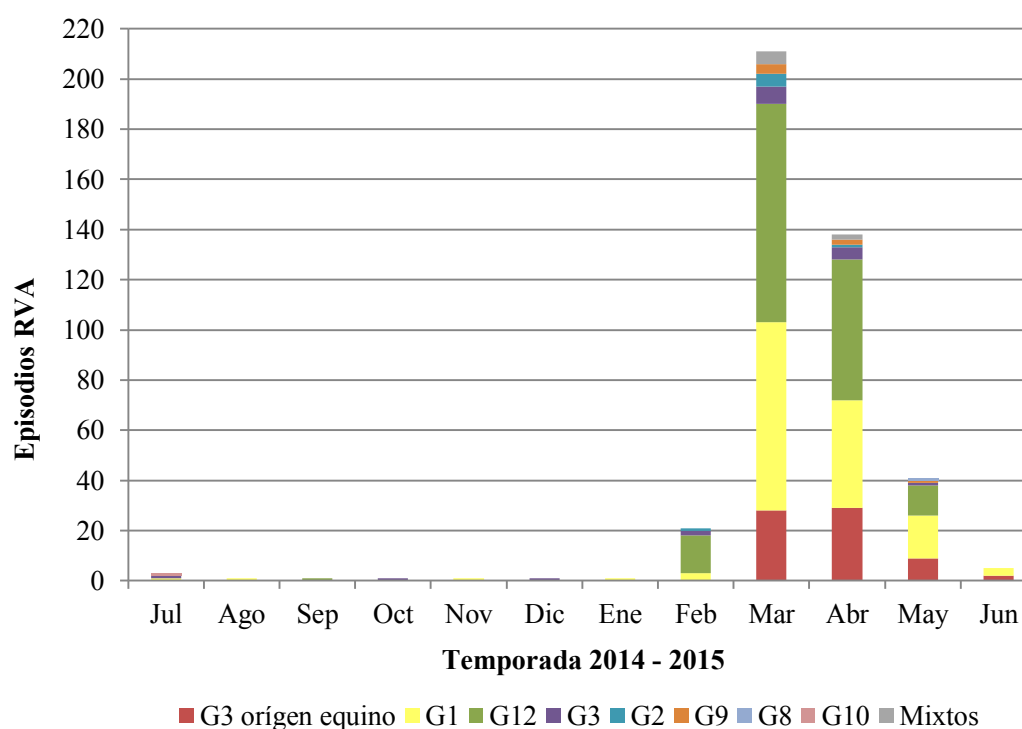


Figura 38.- Distribución mensual de los G-tipos de rotavirus detectados en Gipuzkoa en la temporada julio 2014 - junio 2015.

Se genotiparon (gen VP7) con éxito 425 de las 455 (93,4%) muestras positivas a RVA disponibles (Tabla 26). Siguiendo la metodología descrita en la presente Tesis Doctoral, para confirmar los genotipos asignados mediante RT-PCR una proporción de los amplicones obtenidos se secuenciaron y analizaron en la base de datos “BLAST”. De esta forma, e inesperadamente, algunas de las cepas asignadas como G12 mediante RT-PCR, se identificaron por secuenciación como G3 de origen equino. Por consiguiente, todos los amplicones VP7 de las cepas tipadas inicialmente como G12 en 2015 fueron secuenciados y analizados. Tras el análisis de las secuencias de estas cepas, 68 cepas clasificadas inicialmente como G12 mediante RT-PCR fueron re-clasificadas como G3. G12 continuó siendo el G-tipo dominante representando el 37,6% de las cepas circulantes seguido de G1 (31,9%) y de G3 de origen equino (14,9%) (Tabla 25). La identidad de secuencia nucleotídica del gen VP7 (longitud de secuencia 838 pb) entre las cepas G3 de origen equino fue $\geq 99,5\%$.

Tabla 26.- Distribución de las combinaciones G- y P-tipo de rotavirus detectadas en Gipuzkoa en la temporada julio 2014 – junio 2015.

G-/P-tipos	n	%
G12P[8]	163	35,8
G12P[N] ¹	8	1,8
G1P[8]	142	31,2
G1P[N]	3	0,7
G3P[8] atípico	66	14,5
G3P[N] atípico	2	0,4
G3P[8] común	17	3,7
G3P[N] común	1	0,2
G2P[4]	7	1,5
G9P[8]	7	1,5
G10P[14]	1	0,2
G8P[N]	1	0,2
Infecciones mixtas ²	7	1,5
GNP[8]	14	3,1
GNP[N]	16	3,5
Total	455	100

¹ N = no tipable.

² G1+G12P[8] (n = 6) y G2+G3P[8] atípico (n = 1).

Para investigar la razón por la que se produjo el error de G-tipado mediante PCR de las cepas G3 de origen equino, se realizó un alineamiento de secuencias VP7 correspondientes a cepas G3 de origen equino y cepas G3 comunes detectadas en Gipuzkoa en 2015, cepas representativas G3 y G12 de la base de datos de GenBank y los cebadores *forward* específicos de G3 y G12 (Figura 39). El alineamiento mostró un alto grado de identidad y potencial para reactividad cruzada entre el gen VP7 de las cepas G3 y el cebador *forward* G12, mientras que las cepas equinas G3 mostraron además siete u ocho discrepancias con el cebador *forward* G3.

	Alineamiento primer forward G3				Alineamiento primer forward G12			
	240	*	260	*	*	540	*	560
Primers	-----ACGAACTCAACACGAGAGG-----				GGTTATGTAATCCGATGGACC-----			
G3-equino_SS96217158_(n=37)*	TACTGCATACG.T.T.T.A.GA.AAACTTTTCT				CTGAATGAAT.A.TATTACTTTATA			
G3-equino_SS96096198_(n=2)*	TACTGCATACCT.T.T.T.A.GA.AAACTTTTCT				CTGAATGAAT.A.TATTACTTTATA			
G3-común_SS61718245_(n=1)*	ACCACCATAT.....G.....AAGTATTCCT				CTTAATGAGT.....T.....TATTACTTTATA			
G3-común_SS98243371_(n=8)*	CACACCATAT.....G.....AAGTATTCCT				CTTAATGAGT.....T.....TATTACGTTGTA			
2008747336_G3_Linaje_IIIa	CACACCATAT.....G.....AAGTATTCCT				CTTAATGAGT.....T.....TATTACTTTGTA			
T108_G3_Linaje_IIIb	CATACTATAT.....AAGTGTTTT				CTTAATGAAT.....T.....TACTACTTTATA			
YO_G3_Linaje_IIIc	CACACCATAT.....C.....AAGTATTCCT				CTTAATGAGT.....T.....TATTACTTTGTA			
RotaTeq-W178-8_G3_Linaje_IIIId	CACATCATAT.....G.....AAGTATTCCT				CTTAATGAGT.....T.....TACTACTTTGTA			
AU-1_G3_Linaje_IIIe	CACACCATAT.....G.....AAGTATTCCT				CTTAATGAGT.....T.....TATTACTTTGTA			
CP-1_G3_Linaje_IIf	TGCTCCATAT.A.G.A.A.AAGTGTTCCT				CTTAATGAGT.....C.....TATTACTTTGTA			
RV52-96_G3_Linaje_I	CACTGCATATG.T.T.C.AG.A.AGACTTTCCT				CTAAATGAGT.C.G.C.A.TATTACTCTATA			
G12_Dhaka25	TACCGTATATGTA.T.T.A.C.A.AGAATTTTAT				TTAAATGAAT.....TAACTTTGTA			

*Cepas de este estudio. Los números entre paréntesis indican el número total de cepas con secuencia idéntica (amplicones del primer round).

Figura 39.- Alineamiento múltiple de las secuencias del gen VP7 de cepas G3 de origen equino y G3 comunes de pacientes con gastroenteritis aguda en Gipuzkoa en 2015, otras cepas representativas G3 y un G12 estándar de la base de datos de GenBank y los cebadores *forward* específicos de G3 y G12 de EuroRotaNet. Las secuencias se alinearon utilizando Muscle en MEGA 6²⁶⁴ y se compararon con GeneDoc. Los puntos indican consenso con el cebador.

4.6.3 Distribución de las cepas de rotavirus G3 de origen equino

RVA G3 atípico de origen equino se detectó en Gipuzkoa en 68 (14,9%) pacientes. Esta cepa fue detectada por primera vez el 3 de marzo de 2015 (un mes después del comienzo de la epidemia estacional) en un niño de 14 meses de Irun y se diseminó por la provincia. Marzo y abril fueron los meses en los que el RVA G3 de origen equino circuló más (28 y 29 cepas detectadas cada mes, respectivamente) y en junio cuando se produjo la última detección (Figura 38). La cepa equina G3 infectó pacientes de entorno rural y urbano de un amplio rango de edad (80 días a 93 años, mediana 1,4 años) aunque el 70,6% (48/68) de los casos ocurrieron en niños menores de 3 años, de los que solo tres habían recibido las tres dosis de la vacuna de RVA (RotaTeq®). Siete pacientes (10,3%) hospitalizaron, una tasa similar a la observada para los genotipos G1 (n = 15, 10,3%) y G12 (n = 22, 12,9%) en la misma temporada (Chi cuadrado = 0,60, p = 0,74).

4.6.4. Genotipado basado en el genoma completo y análisis filogenético de rotavirus G3 atípico

Se secuenció el genoma completo de seis cepas G3 de origen equino, revelando el análisis de las secuencias obtenidas un esqueleto genético tipo DS-1: G3-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2. Las seis cepas fueron altamente similares entre sí en todos los segmentos genómicos excepto en el gen VP6. En base a las secuencias nucleotídicas completas de los 10 segmentos genómicos restantes (VP1 - VP4, VP7 y NSP1 - NSP5), las cepas G3P[8] atípicas de este estudio mostraron una identidad del 99,3 – 100%. Por el contrario, el análisis del gen VP6 de las cepas de Gipuzkoa reveló dos clústeres con identidades nucleotídicas entre 96,6 y 96,7%. Ambos clones fueron detectados casi simultáneamente (clúster A el 3 de marzo y B el 9 de marzo).

El análisis filogenético mostró que el gen VP7 de las cepas guipuzcoanas G3 atípicas perteneció a un clúster que en su mayoría comprende cepas de RVA animales (Figura 40). Las cepas tuvieron una identidad de secuencia nucleotídica del 98,8 - 99,9% con las cepas tailandesas SKT-281 y SKT-289 (G3-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) ²⁷¹, las cepas australianas D388, WAPC1740 y WAPC2016 (G3-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) ⁸¹ y las cepas japonesas, S13-30 y S13-45 (G3-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2), detectadas en Sendai en 2013 ⁷⁹. El gen VP7 de todas estas cepas humanas mostró la mayor identidad nucleotídica (90,7 - 91,4%) con una cepa equina (Erv105) detectada en un potro en India durante el periodo 2004 - 2005 ²⁷². Sin embargo, las cepas humanas más cercanas a las cepas guipuzcoanas G3 de origen equino mostraron identidades nucleotídicas del 86,8 - 88,0% (PA260-97, CMH222 y RCH272), habiendo sido estas cepas previamente descritas como resultado de un evento de transmisión interespecies ^{77, 273, 274}. En comparación a las cepas G3 comunes (tipo Wa) aisladas en nuestro entorno durante la misma temporada epidémica, la identidad de secuencia nucleotídica fue menor y osciló entre 80,6 - 80,7%.

Por otra parte, el análisis filogenético de los segmentos genómicos VP1 - VP4, NSP1 - NSP3 y NSP5 de las cepas G3 atípicas de Gipuzkoa reveló una estrecha relación (identidad nucleotídica > 98%) con los de las cepas de la región Asia-Pacífico: las cepas G3 mencionadas anteriormente, así como cepas G1P[8] detectadas en Japón (HC12016) ²⁷⁵ y Filipinas (cepas TGO12-004/012/016/045, números de acceso de GenBank: KP007159 - KP007169 y KP007181 - KP007211) en 2012 y Tailandia (SSKT-41) en 2013 ⁶⁸ (Figura 40 y 41).

Para adquirir conocimiento sobre el origen del segundo clúster de VP6 y del segmento génico NSP4 de las cepas atípicas G3P[8] de este estudio, y dado que paradójicamente tenían un esqueleto DS-1, se amplificaron adicionalmente los genes VP6 y NSP4 de todas las cepas G2P[4] (tipo DS-1) detectadas en la temporada 2014 – 2015 en Gipuzkoa (n = 7). Entre los genes VP6 de las cepas de Gipuzkoa, uno de los clústeres (clúster B) fue distinto de aquellos de las cepas Asia-Pacífico y se agrupó con los correspondientes a cepas G2P[4] tipo DS-1 puras detectadas en diversas partes del mundo y también en Gipuzkoa (cepa SS96085815) durante la misma temporada (identidad nucleotídica 99,4%; longitud de la secuencia analizada 1247 pb) (Figura 40). Los segmentos genómicos codificantes de VP6 de las seis cepas G2P[4] de Gipuzkoa restantes (cepa representativa SS98244980) fueron casi idénticos entre sí y mostraron una identidad nucleotídica menor (98,2 - 98,5%) con los de las cepas G3 atípicas del clúster B. El gen NSP4 de las cepas atípicas G3 de Gipuzkoa fue diferente de aquellos correspondientes a cepas locales G2P[4] y a cepas G3 de la región Asia-Pacífico y mostró la mayor similitud con cepas G2P[4] tipo DS-1 clásicas detectadas en Australia e Indonesia y las cepas recombinantes intergenogrupo G1P[8] tipo DS-1 referidas anteriormente (Figura 40).

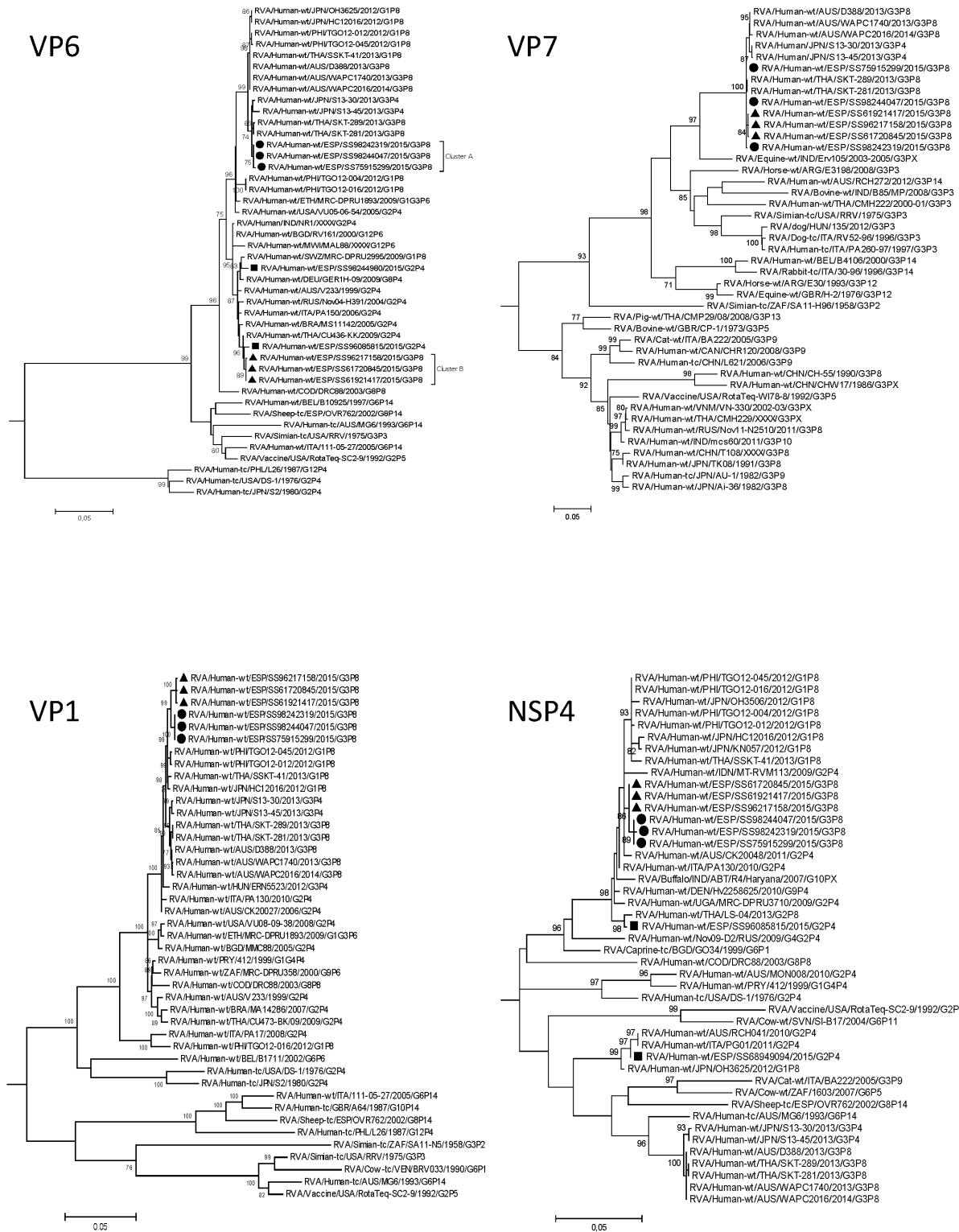


Figura 40.- Análisis filogenético de los segmentos genómicos codificantes de VP6, VP7, VP1 y NSP4 de cepas de rotavirus G3P[8] con esqueleto genético tipo DS-1 detectadas en pacientes con gastroenteritis aguda en Gipuzkoa en 2015 comparadas con otras cepas humanas y animales representativas de la base de datos de GenBank. No se muestran los valores de *bootstrap* menores del 70%. Las barras de escala indican el número de sustituciones por posición de nucleótido. Los círculos (●) y triángulos (▲) señalan los dos clústeres de las cepas atípicas G3P[8] de este estudio. Los cuadrados (■) indican las cepas G2P[4] de Gipuzkoa. Árbol filogenético de VP6: Las dos cepas G2P[4] (SS98244980 y SS96085815) cubren el 97,0% y 97,7% de la región codificante, respectivamente. Se incluyó en los árboles la cepa prototipo Wa como outgroup excepto en el árbol del gen VP7 en el que se utilizó la cepa prototipo DS-1.

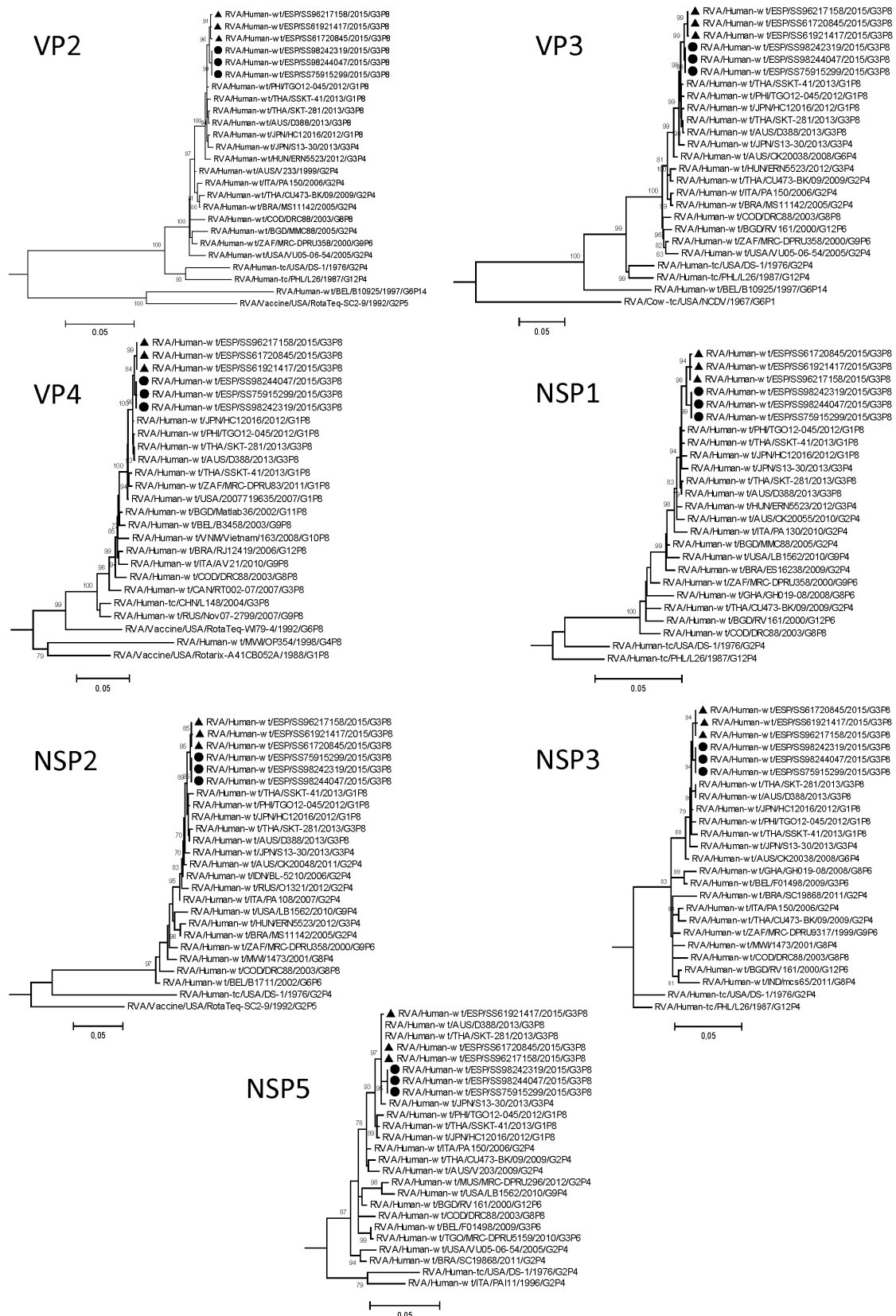


Figura 41.- Análisis filogenético del segmento genómico codificante completo de VP2 - VP4, NSP1 - NSP3 y NSP5 de rotavirus G3P[8] con esqueleto genético tipo DS-1 detectadas en Gipuzkoa en 2015, comparadas con otras cepas representativas humanas y animales de la base de datos de GenBank. No se muestran los valores de *bootstrap* menores del 70%. Las barras de escala indican el número de sustituciones por posición de nucleótido. Los círculos (●) y triángulos (▲) indican los dos clústeres de las cepas atípicas G3P[8] de este estudio. Se incluyó en los árboles la cepa prototipo Wa como outgroup excepto en el árbol del gen VP4 en el que se utilizó la cepa prototipo DS-1.

5. DISCUSIÓN

5.1 Características epidemiológicas e impacto de la infección por rotavirus

Los objetivos principales de la presente Tesis Doctoral han sido conocer (1) las características epidemiológicas más relevantes y el impacto de la infección por RVA en la población de Gipuzkoa y (2) los genotipos de RVA circulantes a lo largo de dos décadas, sus fluctuaciones y principales características, así como efectuar un análisis molecular tanto del genotipo G12, que está ganando protagonismo en los últimos años en el mundo hasta el punto de ser ya considerado por muchos el sexto genotipo principal, como de las cepas de genotipos inusuales. El estudio epidemiológico ha permitido además poner en contexto y valorar más adecuadamente los resultados moleculares. El largo período que cubre el estudio (hasta dos décadas) así como el gran número de muestras incluidas (66.877), de episodios de infección detectados (6.671) y genotipados (3.113) favorece la obtención de resultados sólidos. Como limitación principal destacamos el hecho de que no haya sido un estudio prospectivo, sino que se nutrió de los pacientes que acudieron al Sistema Sanitario Público en demanda de asistencia médica, en su mayor parte por GEA, por lo que puede haber una tendencia a reflejar los casos más graves.

Llama la atención el descenso ocurrido en la primera década del presente siglo en el número de episodios de infección por RVA detectados, descenso que se estabilizó desde 2011. El descenso no fue fruto de una caída del número de niños en la zona de estudio, que por el contrario aumentó paulatinamente entre 1996, año en el que según censo vivían 15.700 menores de cinco años, y 2011, año en el que este número alcanzó los 20.732. Tampoco parece que fuera la causa la vacunación frente a RVA dado que el inicio del descenso antecedió en un lustro al de la vacunación en España (2006) y la cobertura alcanzada por la vacuna en Gipuzkoa ha sido baja, no rebasando ningún año el 20% de su población diana. Asumiendo que el comportamiento de los pediatras a la hora de solicitar al laboratorio análisis de enteropatógenos no ha variado substancialmente a lo largo del estudio, la evolución observada sugiere un descenso bien en la incidencia de la infección, por razones como mejoras en el nivel de higiene, o bien específicamente en el de la diarrea grave por RVA, entendiendo como tal la que requiere consulta médica. En este sentido, hay constancia de que el uso de soluciones de rehidratación oral se extendió ampliamente al final del siglo pasado y principio del presente en Gipuzkoa, lo que pudo permitir que un número creciente de casos de GEA infantil fueran tratados adecuadamente en Atención Primaria o por los propios padres en

el domicilio familiar, evitándose de esta forma que llegaran a una situación de deterioro que justificara la solicitud de asistencia médica y/o estudio microbiológico ²⁶⁶. Es conocido que la rehidratación oral ha desempeñado un papel importante en el descenso observado en la mortalidad y prevalencia de la diarrea a nivel mundial en las últimas décadas ^{276, 277}.

La infección por RVA en Gipuzkoa presentó características epidemiológicas similares a las referidas en series amplias previamente publicadas: incidencia elevada, mayor en los niños de 6 a < 24 meses de edad, papel preponderante entre los enteropatógenos, estacionalidad invernal, e impacto importante en términos de hospitalización en la población infantil ^{269, 278-280}. La incidencia de infección en los menores de cinco años (1216 casos/100.000 habitantes) fue algo mayor que la referida en un estudio de ámbito nacional efectuado en Alemania en el período 2001 – 2008 (1150 casos/100.000 hbtes) ²⁷⁹. La incidencia rebasó los 2500 casos/100.000 niños en Gipuzkoa en los dos primeros años de vida. Estos resultados, obtenidos en estudios de vigilancia “pasiva”, constatan que la incidencia de la infección infantil por RVA es elevada. Al alcanzar los dos años de edad, alrededor de uno de cada 19 niños de nuestro territorio había solicitado asistencia médica a causa de una GEA por RVA que fue confirmada virológicamente, cifra que se aproximó a uno de cada 16 al alcanzar los cinco años de edad. Como se discutirá en mayor detalle más adelante (ver punto 5.2), RVA fue la primera causa de hospitalización por GEA en los primeros años de vida.

El porcentaje de muestras analizadas que resultaron positivas fue del 10,5% (30% en el periodo invernal), siendo similar en ambos sexos, aunque la relación de casos por sexos fue algo mayor para los varones (relación varón/mujer 1,3). El dimorfismo sexual tiene influencia en la determinación de la respuesta inmune contribuyendo a las diferencias que se observan en ambos sexos en la patogénesis de las enfermedades infecciosas, la respuesta a las vacunas virales y la prevalencia de enfermedades autoinmunes. Previamente se ha referido que la susceptibilidad a, e intensidad de muchas infecciones virales es algo mayor en varones ^{281, 282}. A tenor de los resultados obtenidos en este y otros estudios ^{279, 280}, la infección por RVA no es una excepción.

El porcentaje de muestras positivas fue mayor en niños de 6 a < 24 meses de edad. Estos datos están en concordancia con los observados en el resto de Europa ⁵⁷. Los niños menores de seis meses de edad parecen ser menos susceptibles a la infección por RVA debido probablemente al papel protector de los anticuerpos maternos transferidos en la placenta y mediante la lactancia materna ^{283, 284}. Por otro lado, la mayor parte de

los niños de 24 meses o más ya se han infectado con RVA al menos una vez por lo que el número de niños susceptibles a la enfermedad (GEA) disminuye a partir de esa edad, dado que las reinfecciones son mayoritariamente leves o asintomáticas ^{6, 192}.

En Gipuzkoa es difícil establecer una separación entre el entorno rural y urbano debido a que ambos ambientes están estrechamente relacionados. Pese a que al analizar los casos de RVA respecto a la población total observamos diferencias en la incidencia de la infección entre las poblaciones de tipo rural y urbano, cuando el análisis se efectuó según el número de niños que habitaban en dichas poblaciones no encontramos ninguna diferencia entre ellas.

Por último, todos los años se produjo una importante epidemia de predominio claramente invernal, duración prolongada (3 - 9 meses) y extensión global y prácticamente simultánea por el territorio vigilado. La estacionalidad invernal es la habitualmente observada en países de clima templado o frío y nivel de desarrollo elevado ¹⁰. Sin embargo, llama la atención que la estacionalidad de la epidemia anual de RVA en Gipuzkoa, mostró variaciones importantes en la última parte del estudio, observándose un retraso en el inicio de la misma que pasó de noviembre - diciembre a diciembre - febrero. Además, se observó un acortamiento de la duración de la onda epidémica, que se redujo casi a la mitad del primero al último sexenio del estudio (6,5 versus 3,8 meses respectivamente) debido a un acortamiento del período post-pico, que podría ser consecuencia del inicio retrasado de las últimas epidemias y por tanto de la mayor cercanía del mismo a los meses cálidos. La tendencia se mantuvo en la epidemia 2015 - 2016, fuera del período de estudio de esta Tesis, epidemia que empezó en Gipuzkoa en el mes de febrero y alcanzó el pico máximo en marzo. No obstante, sería necesario un período de observación más prolongado para confirmar estos cambios. En Europa, la actividad de RVA alcanza su pico máximo más tempranamente en los países del Sur (Italia y España) a finales de diciembre o principios de enero y posteriormente en el Norte (Escocia, Dinamarca y Finlandia) a mediados o finales de marzo ^{57, 285, 286}. Los resultados de este estudio sugieren que la estacionalidad de RVA en Gipuzkoa se ha retrasado en los últimos años y tiende a parecerse más a la de los países del norte de Europa. Esto podría estar relacionado con factores climáticos, poblacionales, así como con la vacunación.

Algunos estudios indican que complejas interacciones de factores climáticos locales podrían estar asociadas con los patrones estacionales de las infecciones por RVA ²⁸⁷⁻²⁸⁹. La infección por RVA en Gipuzkoa estuvo durante el período de estudio relacionada

con la temperatura incluso más que la propia gripe. En general, el pico epidémico de RVA coincidió con la bajada de temperaturas del invierno, normalmente con temperaturas por debajo de los 10 °C. Las excepciones fueron las temporadas 2001 – 2002 y 2014 – 2015 en las que la epidemia de RVA se desarrolló antes y un poco después del descenso de temperaturas, respectivamente. También en Australia se ha asociado un aumento de las hospitalizaciones por diarrea debida a RVA con temperaturas más bajas y humedad relativa menor durante la semana previa ²⁹⁰. Igualmente, en Gran Bretaña y Países Bajos, la temperatura ambiente fue asociada inversamente a la transmisión y enfermedad de RVA aunque no se encontró un efecto de la humedad o de las precipitaciones ²⁹¹. En España, un estudio realizado en Mallorca ²⁹² observó una asociación negativa entre la actividad de RVA y la temperatura media ambiental y positiva con la presión atmosférica, velocidad del viento y radiación solar siendo la temperatura media el factor independiente más importante, con un pico de actividad alrededor de los 9 °C, y de la misma manera que en Gran Bretaña y Países Bajos, no se encontró relación con la humedad relativa y precipitaciones. En concreto, una tendencia a otoños e inviernos con temperaturas más cálidas, como se espera se produzcan en el contexto del cambio climático (http://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/cambio_climat) podrían causar retrasos en el desencadenamiento de las epidemias anuales, en áreas templadas como la Cornisa Cantábrica, al retrasarse la llegada del período frío.

Se ha sugerido que la dinámica habitual de la epidemia de RVA podría estar dirigida por la acumulación de individuos totalmente susceptibles (ej. recién nacidos) en la población y la vacunación reduciría su número retrasando así la actividad de RVA y alterando su patrón estacional ²⁹³. En concordancia con esta hipótesis, algunos países con cobertura vacunal frente a RVA elevada han observado cambios en el ciclo epidémico de RVA con retrasos en el inicio de las epidemias. Es el caso de Estados Unidos, donde se observó una reducción progresiva de las infecciones por RVA y cambios en la estacionalidad, con epidemias más cortas y de inicio tardío, temporadas sin epidemia definida o epidemias con dos picos de actividad ²⁹⁴. Otros países como Austria, Bélgica y Brasil han observado también retrasos en el inicio de la epidemia de uno o dos meses ²⁹⁵⁻²⁹⁷. En España, la cobertura vacunal aumentó de 17% en 2007 a 38% en 2009 ²¹⁴, llegando a alcanzar el 51% en Galicia en 2008 – 2009 ²⁹⁸, pero siendo muy heterogénea en las distintas regiones ²⁹⁹. Sin embargo, debido a la detección de circovirus en ambas vacunas en 2010, se suspendió la comercialización de RotaTeq[®] de

junio a noviembre de 2010 y la de Rotarix[®] desde marzo de 2010 hasta mediados de 2016 lo que hizo que la cobertura vacunal a nivel nacional descendiera al 19% en 2010²³⁷. En Galicia se tardó tres años (2010 – 2012) en volver a los niveles de cobertura vacunal previos a la suspensión²³⁷. La cobertura vacunal de las vecinas Portugal (30%) y Francia (5% - 47%) ha sido también moderada o baja, heterogénea por regiones y similar a la de España^{212, 300-303}. Aunque parece difícil que coberturas vacunales bajas, como la alcanzada en Gipuzkoa (siempre < 20%) justifiquen estos cambios (retraso en la epidemia), no podemos descartar que la situación referida en este amplio territorio (España, Portugal, Francia) con cobertura regionalmente heterogénea y relativamente elevada en algunas regiones, pueda influir en la circulación de RVA en áreas cercanas, aunque su cobertura sea baja. De hecho, en los Países Bajos, donde la vacunación frente a RVA aún no ha sido implementada, se observó una incidencia de infección por RVA excepcionalmente baja en la temporada 2013 – 2014 que fue atribuida a una tasa de nacimientos baja, un invierno suave, una elevada incidencia de RVA en la temporada anterior y a la introducción de vacunación frente a RVA en los países vecinos (Alemania, Bélgica). Algo similar ocurrió en Francia donde por primera vez desde 1992 no se alcanzó el umbral epidémico de GEA en el invierno de 2013 – 2014 siendo sugerida una baja transmisión de RVA en ambos países³⁰³.

Por último, algunos estudios han señalado un papel para la tasa de natalidad en el desencadenamiento de las epidemias de RVA^{285, 304, 305}, de manera que en países en los que la tasa de natalidad es mayor, el inicio de la temporada suele ser más temprano, la estacionalidad menos acusada e incluso la circulación tiene lugar a lo largo de todo el año. Como antes se ha referido, en Gipuzkoa han ocurrido cambios en el censo de población infantil en los últimos años, pero no parecen de magnitud suficiente como para justificar una menor circulación o más dificultad en la circulación de RVA. De hecho, la tasa de natalidad osciló en el período de estudio sólo moderadamente, entre 7,9 y 10,4/1.000 habitantes entre 1995 y 2014 (Fuente: Eustat).

Por tanto, parece plausible que la climatología haya sido un factor fundamental en las modificaciones observadas en la estacionalidad de las epidemias de RVA en Gipuzkoa, aunque para poder afirmarlo con rotundidad, se requerirían estudios más concretos. Al efecto climatológico, hay que añadir el posible impacto de las coberturas vacunales incluso en áreas cercanas a la monitorizada.

5.2 Infecciones graves por rotavirus que requirieron hospitalización en niños de 1 mes a < 5 años

Analizar la información proporcionada por los hospitales que rutinariamente realizan detección de RVA se ha considerado una de las mejores formas de vigilar la incidencia e impacto de la enfermedad grave por RVA y de valorar los efectos de la inmunización³⁰⁶⁻³⁰⁹. La metodología empleada en el presente estudio para valorar la hospitalización causada por enfermedad grave por RVA avala que los resultados obtenidos son sólidos. En primer lugar, la búsqueda de casos se efectuó por dos vías: obteniendo (1) la relación de casos hospitalizados (> 24h) con códigos de alta relativos a GEA y (2) la relación de pacientes en los que se detectó RVA en el laboratorio y que habían sido hospitalizados. El cotejo de los resultados de ambas vías permitió comprobar que su concordancia era alta (99%). En segundo lugar, las historias clínicas de los casos así detectados que presentaban el código de alta de RVA en posición secundaria fueron revisadas y excluidos aquellos en los que la detección de RVA se consideró incidental (infecciones concomitantes, no consideradas la causa del ingreso), al igual que los nosocomiales, todos los cuales representaron en conjunto el 21% de los casos, mejorando la “especificidad” de los resultados. Por último, se realizó coprocultivo a casi el 96% de los niños hospitalizados por GEA, dado que es la práctica habitual en el HUD, porcentaje mayor que el recogido en otros estudios similares^{280, 309-312} y que es alcanzado normalmente solo en estudios prospectivos³¹³. Es frecuente que en muchos hospitales no se realice la detección de RVA sistemáticamente en los pacientes con GEA ya que a menudo no es útil para el tratamiento y requiere un gasto económico³⁰⁹. El impacto de la infección por RVA en niños de 1 mes a < 5 años de edad fue importante, siendo la primera causa de hospitalización a causa de GEA, en concreto un 41% de los casos en el período 2008 - 2014. Este porcentaje coincide con los obtenidos en otros estudios de diferentes países de nivel socioeconómico elevado, que en Europa Occidental se han situado más frecuentemente entre el 30% y el 60%^{279, 307, 314-321}. Sin embargo, entre los menores de cinco años, el impacto de la infección por RVA fue muy diferente en los diferentes subgrupos de edad. En primer lugar, el riesgo de hospitalización por GEA debida a RVA mostró una relación inversa con la edad, siendo mayor en los menores de seis meses de vida (riesgo de hospitalización 13,6%), que a pesar de no ser el grupo con mayor incidencia de infección (ver pág. 136) mostró ser el más vulnerable a enfermedad grave en caso de ser infectado. Y en segundo lugar, la mayor parte de las hospitalizaciones debidas a GEA por RVA (87%) ocurrieron en

niños < 2 años, siendo el tramo de 6 a < 12 meses el de mayor incidencia. Este porcentaje está dentro del rango observado en la mayor parte de los estudios realizados en países europeos en el presente siglo, representando los menores de dos años el 53% de los casos hospitalizados a causa de GEA por RVA detectados en los primeros cinco años de vida en Grecia ²⁸⁰, el 62% en Italia ³¹⁵, el 73,9% en Alemania ²⁷⁹, el 82% en Dinamarca ³¹³ y el 82,4% en un estudio que agrupó a cinco países europeos ^{314, 320}. El importante descenso que sucedió a partir del tercer año de vida en el número de niños hospitalizados a causa de GEA por RVA explica que a partir de esa edad (36 meses) en Gipuzkoa fuera mayor el número de hospitalizaciones a causa de otro enteropatógeno destacado en España como es *Salmonella spp.* (Resultados, Figura 25), lo que también ha sido referido en otras regiones del país ^{322, 323}.

En Gipuzkoa, la tasa de incidencia media anual de hospitalización a causa de GEA por RVA adquirida en la comunidad en 2008 - 2014 en los menores de cinco años de edad fue de 118 casos por 100.000 niños, con un máximo de 414 casos por 100.000 niños en el segundo semestre de vida. Al llegar a la edad de cinco años, en torno a uno de cada 69 niños ha sido hospitalizado a causa de GEA y uno de cada 169 a causa de una GEA debida a RVA. Esta tasa es algo menor a la referida en la era prevacunal (2000 - 2006) en Estados Unidos (150 casos/100.000 niños < 5 años) ³²⁴, a la observada en un estudio italiano realizado en 2000 - 2007 (196 casos/100.000 niños ≤ 5 años) ³²⁵, y al valor medio obtenido para 16 países europeos de ingresos altos (190 casos/100.000 niños < 5 años) ³²¹, siendo la diferencia mayor con los resultados obtenidos en otros estudios como es el caso de Alemania con 302 casos/100.000 ³²⁶, Italia (2005 - 2012) con 296 casos/100.000 ³¹⁵, Dinamarca con 380 casos/100.000 ³¹³, Suecia con 388 casos/100.000 ³¹⁸, Noruega con 400 casos/100.000 ³¹¹ u Holanda con 510 casos/100.000 ³¹⁰.

La incidencia de hospitalización por GEA debida a RVA es un indicador fundamental de la carga de enfermedad para los sistemas sanitarios, y a diferencia del porcentaje de detección, no depende de las tendencias estacionales en la incidencia de otros enteropatógenos, permitiendo así monitorizar su evolución en el tiempo. Sin embargo, las diferencias observadas entre estudios acerca de la carga de RVA deben ser valoradas con precaución dado que los resultados no son en muchos casos directamente comparables ³²¹. Las estrategias de hospitalización varían, como los modelos de Sistema Sanitario, de unos países a otros; la metodología varía entre estudios empleándose como fuente de datos los códigos de alta de los Servicios Administrativos del Hospital o

declaraciones de laboratorios; las prácticas de codificación varían entre países e incluso dentro de un país entre hospitales; los criterios para considerar un caso de GEA atribuible a RVA en base a los códigos de alta y su posición no son homogéneos; muchos estudios no excluyen infecciones concomitantes que no son la causa del ingreso; otros estudios no discriminan entre pacientes hospitalizados en planta (ingreso > 24h) y aquellos vigilados y/o tratados de su deshidratación en Unidades de Observación de los Servicios de Urgencias de Pediatría (< 24h); y como ya se ha comentado, la frecuencia en la realización de pruebas virológicas utilizadas en los diferentes estudios varía considerablemente. Un ejemplo de esta situación son los resultados de dos estudios nacionales efectuados en Alemania en períodos y grupos de población parecidos ^{279, 326}, que emplearon diferente metodología y en los que se obtuvieron tasas de incidencia sensiblemente diferentes, de 510 y 302/100.000 niños respectivamente. Independientemente de estas consideraciones, el principal valor de estos estudios, más allá de las diferencias encontradas entre ellos, es que han documentado que la carga de enfermedad que RVA impone a la población infantil y los Sistemas Sanitarios es elevada también en la generalidad de los países de ingresos elevados.

Como es de esperar, los estudios efectuados en la era postvacunal de aquellos países que han introducido la vacunación en sus programas nacionales de inmunización, demuestran descensos importantes en la incidencia de hospitalización, a pesar del poco tiempo transcurrido desde la introducción de la vacuna. Así por ejemplo en Estados Unidos, Australia y Bélgica se han referido, a los pocos años de la introducción de la vacuna, descensos del 63 - 94%, 76% y 87% en la hospitalización de los menores de cinco años de edad a causa de GEA por RVA ³²⁷⁻³²⁹. En conjunto, en los países con programa de vacunación frente a RVA, se ha mostrado una disminución del 49 - 94% en las hospitalizaciones debidas a GEA por RVA en los menores de 5 años de edad ^{224, 328}. A este importante efecto hay que sumar un descenso en las hospitalizaciones asociadas a diarrea de cualquier causa, así como en la diarrea por RVA en grupos de edad no vacunados, posiblemente por un efecto de rebaño ^{330, 331}. Las diferencias referidas en estos estudios en la disminución de las hospitalizaciones en los países de nivel socioeconómico elevado dependen probablemente del tiempo de implantación de, y de la cobertura alcanzada por, los programas de vacunación en unos y otros países en el momento de recoger los datos.

En España, la tasa de incidencia de hospitalización por GEA debida a RVA ha variado según la región y el periodo de tiempo estudiado, siendo las tasas referidas en Cataluña y Mallorca similares a la de Gipuzkoa (Tabla 27). A nivel nacional, se han referido tasas de incidencia de hospitalización de 250/100.000 niños < 5 años en 1994 ³³², de 104/100.000 niños ≤ 5 años en 1999 – 2000 ³³³, 135/100.000 niños en 2001 – 2005 ³³⁴ y de 235/100.000 niños en 2005 - 2009 ²¹⁴. A nivel regional la variación ha sido algo mayor, oscilando en el presente siglo entre 104/100.000 niños en 2003 – 2008 ³³⁵ en Cataluña y 298/100.000 en 2003 – 2007 en Galicia ²³⁷. La excepción son los resultados del estudio efectuado en 2000 – 2004 en Castilla y León en el que se comunicó una incidencia de 480/100.000 niños ³³⁶. Las diferencias observadas entre las diferentes regiones entre sí y con los resultados de Gipuzkoa probablemente sean debidas a las variaciones antes referidas en la metodología de los estudios, a los años en los que éstos han sido realizados (ver párrafo siguiente) y a la mayor o menor cobertura por regiones de la vacuna en los estudios efectuados a partir del año 2006, año en que se autorizó la venta de la vacuna en España.

Tabla 27.- Incidencia media anual de hospitalización (casos/100.000 niños) por gastroenteritis debida a rotavirus en estudios efectuados en España en el período 1993 – 2014.

Periodo	Ámbito geográfico	Población de estudio	Incidencia de hospitalización	Referencia
1993 - 1996	Gipuzkoa	1 m - < 5 años	311	337
1994	España	< 5 años	250	332
1996 - 2002	Gipuzkoa	1 m - < 5 años	282	266
1999 - 2000	España	≤ 5 años	104	333
1999 - 2000	Cataluña	< 5 años	125	338
1999 - 2000	Madrid	≤ 5 años	120	339
2000 - 2004	Castilla y León	< 5 años	480	336
2000 - 2010	Mallorca	< 5 años	136	292
2001 - 2005	España	≤ 5 años	135	334
2002 - 2008	Gipuzkoa	1 m - < 5 años	147	266
2003 - 2005	Castilla-La Mancha	< 5 años	225	340
2003 - 2007	Galicia	< 5 años	298	237
2003 - 2008	Cataluña	< 5 años	104	335
2005 - 2009	España	< 5 años	235	214
2007 - 2009	Castilla-La Mancha	< 5 años	184	340
2008 - 2014	Gipuzkoa	1 m - < 5 años	118	Presente Tesis
2009 - 2010	Galicia	< 5 años	165	237
2010 - 2011	Galicia	< 5 años	291	237
2011 - 2012	Galicia	< 5 años	286	237

Cuando se compararon por trienios las tasas de hospitalización a causa de GEA debida a RVA en Gipuzkoa desde 1996 hasta 2014 (un período de observación de casi 20 años), se observó una tendencia decreciente, desde 298 casos/100.000 niños en 1996 – 1999 hasta 124 en 2011 – 2014, una reducción del 58%. Un estudio previo realizado en Gipuzkoa en 1993 – 1996 mostró una tasa de incidencia aún más elevada (311 casos/100.000 niños de 1 mes a < 5 años) ³³⁷. El descenso ha sido más acusado en los primeros años del presente siglo, atenuándose y llegando a una situación de estabilidad en la parte final del estudio, y parece fiable, dado que la metodología del estudio fue la misma entre 1993 y 2014. El descenso en la incidencia de hospitalización a causa de RVA es groseramente paralelo a la tendencia descendente observada también en Gipuzkoa en la incidencia global de las infecciones por RVA (comentado en pág. 135), reforzando su validez. Resulta difícil comparar estos resultados con los obtenidos en otros países o regiones, dado que poco/as han monitorizado uniformemente la incidencia de hospitalización por GEA debida a RVA durante periodos prolongados. La tendencia decreciente observada en este estudio contrasta con la situación descrita en la era prevacunal en Tennessee (Estados Unidos) 1995 - 2004 ³⁴¹ o Suecia 1993 - 1996 versus 2007 – 2008 ³¹⁸ donde las hospitalizaciones asociadas a RVA permanecieron relativamente estables.

En Gipuzkoa, la incidencia de hospitalización por GEA debida a RVA disminuyó de forma paralela a la de hospitalización por GEA global, cambiando esta última de 667 casos/100.000 niños de 1 mes a < de 5 años a 276 entre 1996 y 2014. Desconocemos los motivos subyacentes a esta tendencia que sugiere la puesta en marcha en este período de factores que ejercieron influencia sobre patógenos concretos (ej medidas para evitar las infecciones por *Salmonella* en establecimientos de restauración) y/o factores más globales, actuando simultáneamente sobre la GEA independientemente de su etiología. También en Italia, entre 2005 y 2012 se observó un descenso progresivo en las hospitalizaciones por GEA (todas las causas) ³¹⁵. Como se ha apuntado antes (pág. 135), el descenso observado en Gipuzkoa tanto en la incidencia de hospitalización por GEA como en la de hospitalización por GEA debida a RVA, podría estar relacionado parcialmente con la mejora de las medidas higiénicas y especialmente con el rápido aumento del uso de terapia de rehidratación oral en niños con GEA. De hecho, la venta de soluciones de rehidratación oral en las farmacias y parafarmacias se cuadruplicó en Gipuzkoa entre 2001 y 2004 ²⁶⁶. Al igual que en Gipuzkoa, el uso de rehidratación oral también aumentó en Francia, especialmente después de 1996 ³⁴². La eficacia de las

soluciones de rehidratación oral ha mejorado además con el tiempo, al reducir su osmolaridad^{190, 343}. Estas consideraciones sugieren que incluso en los países desarrollados esta medida terapéutica ha podido reducir el impacto de la diarrea grave independientemente del enteropatógeno responsable. La posible influencia de la vacunación en el descenso de la hospitalización a causa de GEA por RVA en Gipuzkoa parece mínima porque las vacunas frente a RVA se comercializaron cuando el grueso del descenso de la incidencia ya se había producido (2006) y su cobertura ha sido baja (< 20% anual).

El descenso en la incidencia de hospitalización por GEA debida a RVA se ha detenido en los últimos trienios, igual que el descenso en la incidencia de GEA por RVA de origen comunitario en base a los diagnósticos de laboratorio (ver págs. 135 – 136). A pesar de las reducciones observadas, el impacto actual de la infección por RVA en la población infantil sigue siendo elevado y RVA responsable de cerca de la mitad de las hospitalizaciones a causa de GEA en menores de cinco años. Parece poco probable que se produzcan nuevas mejoras en la incidencia de enfermedad grave por RVA sin la implantación de un programa de vacunación con cobertura elevada.

5.3 Circulación de genotipos de rotavirus en menores de cinco años

Durante 1995 – 2015, se procedió al genotipado del 46,7% de los episodios de GEA debida a RVA detectados en Gipuzkoa, obteniéndose el G- y P-tipo en algo más del 90%, lo que indica una excelente rentabilidad de la técnica de genotipado empleada. Un 5,1% adicional de las cepas fueron tipadas sólo parcialmente siendo los G o P-tipos asociados a estas cepas representativos de aquellos genotipos observados en las cepas completamente genotipadas (con G- y P-tipo). El tipado falló en el 4,1% de las cepas, probablemente en relación a muestras con cargas virales bajas, bien por razones clínicas (proceder de pacientes con infección en fase avanzada), metodológicas (muestras almacenadas inadecuadamente previamente a su envío al laboratorio), técnicas (ej dilución excesiva durante el proceso de preparación de la muestra en el laboratorio) etc. De hecho, la mayor parte de las muestras G- y P-negativas en las últimas dos temporadas, en las que el cribado se realizó mediante PCR, fueron positivas sólo en ciclos de PCR altos. Ocasionalmente, el fallo del tipado podría indicar la presencia de genotipos inusuales para los que no se incluyeron cebadores específicos en el protocolo. Sin embargo, el hecho de que en las muestras con G- y P- tipo negativos no amplificara

el gen VP6 indica que esta eventualidad es poco probable. La proporción de cepas no tipadas o tipadas parcialmente se ha mantenido constante y baja durante todo el periodo de vigilancia lo que sugiere que incluso si todas o algunas de estas cepas representaran genotipos inusuales, hasta la fecha no se habrían diseminado indicando un impacto muy limitado en la epidemiología de las infecciones por RVA en nuestro territorio.

En Gipuzkoa, las combinaciones G/P más frecuentemente detectadas durante 1995 – 2015 por orden de frecuencia fueron G1P[8] (41,3%), G9P[8] (16,8%), G12P[8] (14,5%), G2P[4] (12,6%), G4P[8] (5,7%) y G3P[8] (5,0%). Estos genotipos representaron el 95,9% de las cepas caracterizadas (con G- y P-tipo) o el 98,5% excluyendo las infecciones mixtas con distintos RVA. Como era esperable, estos genotipos fueron también los más frecuentes en España (Tabla 28) y a nivel mundial (Figura 42), oscilando la prevalencia combinada de los seis genotipos comunes en 2007 - 2012 entre el 63% en África y el 97% en Europa ³⁴⁴. El análisis de la serie de dos décadas de vigilancia de Gipuzkoa permitió observar cómo en las distintas epidemias fueron apareciendo unos y otros genotipos, así como su diferente predominio. En otras regiones de España, la información disponible sobre la prevalencia de los diferentes genotipos de RVA es escasa, focalizada en gran parte en Madrid y Valencia, con estudios fuera de estas regiones cortos en el tiempo, pero valorada en conjunto ofrece una panorámica de los genotipos circulantes en el país (Tabla 28) y permite su comparación con los datos de Gipuzkoa. Aunque los genotipos predominantes fueron los mismos en España, se observó heterogeneidad en unas y otras regiones en varias temporadas, una situación diferente a la de otros virus con epidemias periódicas como el de la gripe, lo que sugiere el desarrollo de “epidemias paralelas” en diferentes áreas geográficas, más que una epidemia uniforme en todo el país. Así por ejemplo en el cuatrienio 1996 – 2000, G1 o G4 fueron los virus predominantes en diferentes regiones, en 2003 – 2004 G2 fue predominante en Gipuzkoa y apenas detectado en Valencia y otras regiones, una situación que se reprodujo en 2010 – 2011 con G12. En 2006 – 2007, G9 predominó en la mayor parte del país, a excepción del área Sudoriental (Granada, Sevilla y Cáceres) donde fue G1 el principal. Por el contrario, en otras temporadas G1 fue predominante en todas las regiones analizadas (ej temporadas 2004 – 2005, 2007 – 2009), una situación no observada con otros genotipos, si bien no se ha efectuado un análisis molecular comparativo de las cepas para saber si fue la misma cada epidemia. De hecho, en un estudio en el que realizó un análisis filogenético de 15 cepas G1P[8] recogidas en diferentes regiones de Italia en el periodo 2010 – 2014

se observó una elevada heterogeneidad genética entre ellas ³⁴⁵. Algo similar ocurrió en Estados Unidos donde el análisis filogenético de más de 50 cepas G3P[8] detectadas en 1974 y 1991 reveló que variantes de RVA genéticamente distintas con el mismo G- y P-tipo pueden co-circular ⁸⁰.

Tabla 28.- G-tipos de rotavirus en estudios efectuados en diferentes regiones de España (exceptuando Gipuzkoa) por temporada disponibles en la literatura científica. El guión (-) indica que no hay información disponible.

Periodo	Gipuzkoa G-tipo dominante	Región	G1	G2	G3	G4	G9	G12	Otros	Mixtos	No tipados	Total	Fuente
1996 - 1997	G1	Madrid y Barcelona	68	0	1,9	28,9	0	0	0	1,2	0	322	346
		Valencia	9,1	9,1	1,8	60,0	-	-	-	1,8	18,2	55	347
1997 - 1998	G4	Valencia	62,3	0	0	16,4	-	-	-	3,3	18,0	61	347
1998 - 1999	G1	Valencia	65,5	10,3	6,9	13,8	-	-	-	0	3,4	29	347
		Madrid	17,7	1,4	0,7	68,8	10,7	-	-	0,7	0	141	348
1999 - 2000	G1	Madrid	26,8	9,3	11,6	39,5	12,8	-	-	0	0	86	348
2000 - 2001	G1	Madrid	70,5	23,5	0	2,5	3	-	-	0,5	0	200	348
2001 - 2002	G1	Madrid	78,6	16,8	0	1,3	2	-	-	1,3	0	149	348
2002 - 2003	G1	España*	79	16,0	0	0	3	-	-	2,0	0	102	349
2003 - 2004	G2	España*	79,5	1	17	0	1	-	-	1,5	0	141	349
		Valencia	81	0	0	12,7	-	-	-	0	6,3	63	350
2004 - 2005	G1	Valencia	60,8	2,6	6,2	0,5	28,4	-	1,5	0	0	612	351
		España*	50,0	11,0	7,0	26,0	5,4	-	-	0,6	0	105	349
2005 - 2006	G1 y G9	Albacete	22,8	1,3	43,0	0	27,8	-	-	5,1	0	79	352
		Cáceres	10,3	3,4	23	1,2	41,4	-	-	19,5	1,2	87	352
		León	13,8	6,9	13,8	0	41,4	-	-	3,4	20,7	29	352
		Madrid	13,1	7,9	19,1	0,7	46,7	-	-	10,5	2,0	152	352
		Valencia	73,4	0	0	0	13,3	-	-	13,3	0	15	352
		Valencia y Castellón	13,1	1,4	0,5	0	81,2	0	0	2,3	1,4	213	353
2006 - 2007	G9	Albacete	14,3	2,9	0	0	82,9	0	0	0	-	35	354
		Cáceres	70,3	0	8,1	0	16,2	0	0	5,4	-	37	354
		Granada	54,5	0	0	0	36,4	0	0	9,1	-	22	354
		Lérida	24,1	13,8	0	10,3	48,3	0	0	3,4	0	29	354
		Segovia	5,3	0	5,3	0	84,2	0	0	5,3	0	19	354
		Sevilla	74,3	2,9	1,4	0	18,6	0	0	2,9	-	70	354
		Zamora	11,1	3,7	0	0	85,2	0	0	0	0	27	354
		Zaragoza	34,3	0	0	0	54,3	0	0	11,4	-	35	354
				Valencia y Castellón	20,5	4,7	1,6	0	64,7	0	0	5,8	2,6
		Valencia	9,5	1,6	11,1	0	63,5	0	12,7	1,6	0	63	354

		Valencia	10,8	3,9	4,9	0	68,6	-	-	4,9	6,9	102	355
		Madrid	25,2	8,7	0	0	61,7	0	0	4,3	0	115	354
		Valencia y Madrid	32,4	0,9	2,9	0,4	50,2	0		13,2		544	57
2007 - 2008	G1	Albacete	72,5	2,0	0	0	19,6	0	0	5,9	-	51	354
		Barcelona	85,7	7,1	7,1	0	0	0	0	0	0	14	354
		Cáceres	73,3	6,7	6,7	0	6,7	0	0	6,7	-	15	354
		Granada	85,7	0	0	0	14,3	0	0	0	-	7	354
		Lérida	83,3	0	0	0	0	0	0	16,7	0	12	354
		Segovia	41,2	0	0	0	35,3	0	0	23,5	0	17	354
		Sevilla	98,4	1,6	0	0	0	0	0	0	-	62	354
		Zamora	88,9	0	0	0	11,1	0	0	0	0	18	354
		Zaragoza	85,7	2,9	0	0	2,9	5,7	0	2,9	-	35	354
		Valencia y Castellón	68,8	4,3	6,5	1,4	7,2	0,7	0,7	4,3	5,8	138	353
		Valencia	50,0	8,3	8,3	0	33,3	0	0	0	0	12	354
		Madrid	76,9	1,3	7,7	0	7,7	0	2,6	3,8	0	78	354
		Valencia y Madrid	70,7	1,1	3,8	0,3	5,6	0,2		18,4		662	57
2008 - 2009	G1	Valencia y Madrid	65,0	10,2	3,0	7,6	3,4	0		10,8		537	57
2009 - 2010	G9	Valencia y Madrid**	70,2	16,7	0,0	5,4	2,4	0,5		4,8		372	57
2003 - 2010	-	Valencia y Cataluña	52,5	8,2	2,7	3,2	22,3	-	1,0	4,8	4,0	1544	356
2010	-	Madrid	56,0	16,0	0	2,0	8,0	2,0	2,0	8,0	6,0	50	357
2011	-	Madrid	64,2	11,9	0	0	4,5	7,5	0	0	11,9	67	357
2010 - 2011	G12	Valencia**	58,1	11,4	19,5	0,0	2,6	0,0		8,3		568	57
2011 - 2012	G12	Valencia**	43,4	7,6	4,3	5,4	8,0	18,6		12,7		1213	57
2012 - 2013	G2	Valencia**	35,7	2,6	12,3	1,7	19,6	5,1		23,0		235	57
2013 - 2014	G1	Valencia**	38,0	8,4	11,8	4,1	16,9	14,1		6,6		439	57
2014 - 2015	G1 y G12	Valencia**	3,2	4,0	0,0	1,6	50,4	27,2		13,6		125	57

* Regiones en las que se efectuó el estudio no determinadas.

** Porcentajes deducidos de la base de datos de EuroRotaNet tras restar los datos de Gipuzkoa (la base original recoge datos sin especificar origen geográfico).

En el presente estudio, en cada temporada epidémica fueron detectados varios G-tipos, siendo entre uno y tres los dominantes. G1P[8] fue la combinación G/P más frecuente tanto en número total de cepas detectadas (41,3%) como en número de temporadas en las que fue dominante o co-dominante (15/20). Este genotipo fue predominante durante períodos de tiempo prolongados y fue detectado en todas las temporadas epidémicas del periodo 1995 - 2015 excepto en 2012 - 2013. RVA G1P[8] fue también la cepa de RVA circulante más común en España (50% si exceptuamos Gipuzkoa) y a nivel mundial representando entre el 20,4% y el 49,5% de las genotipadas entre 1996 y 2012 en las seis regiones de la OMS ^{62, 344}. Esta combinación predominó en todas las regiones del mundo en 2007 – 2012 excepto en Latinoamérica en la que G2P[4] fue relativamente más común. Aunque la más frecuente también en África, G1P[8] representó algo menos del 21% de todas las cepas circulantes de RVA debido a la mayor diversidad de combinaciones G/P existente en ese continente ^{62, 108, 344, 358}. En el conjunto de Europa, G1P[8] fue el genotipo de RVA más prevalente año tras año representando casi el 50% de las cepas mientras que la prevalencia de los otros genotipos comunes varió significativamente de una temporada a otra ²⁵⁹. Algunos estudios han relacionado la prevalencia prolongada de las cepas G1P[8] con su deriva antigénica (*drift*) que puede dar lugar a diferentes linajes de genes y los cambios intratípicos (*shift*) que derivan en nuevas combinaciones de variantes diferentes de VP7 G1 y VP4 P[8] cocirculantes ^{345, 359, 360}. Sin embargo, en el último sexenio del presente estudio se observó cierta tendencia al descenso en la frecuencia de detección de cepas G1P[8] posiblemente debida a la irrupción de nuevos genotipos emergentes como G9 y G12. De hecho, en el último quinquenio G12 fue más frecuentemente detectado en Gipuzkoa que G1. Esta tendencia al descenso debería ser interpretada con cautela ya que podría ser fruto de la fluctuación natural de los genotipos, puesto que durante las dos últimas temporadas de estudio G1P[8] volvió a circular ampliamente en Gipuzkoa, siendo dominante en 2013 – 2014 y co-dominante junto con G12P[8] en 2014 – 2015. Por el contrario, en 2014 – 2015 G1P[8] sólo dominó en 5 de los 14 países participantes en EuroRotaNet ⁵⁷.

En cuanto al resto de combinaciones G/P principales (G9P[8], G12P[8], G2P[4], G4P[8] y G3P[8]), en general aparecieron de modo más irregular, habiendo numerosas temporadas en las que algunos genotipos no fueron detectados y otras en las que lo fueron de forma esporádica (Tabla 16). Las cepas G9P[8] y G2P[4], fueron detectadas en la mayoría de las temporadas siendo dominantes o codominantes en 4 y 5 de las 20 monitorizadas, respectivamente. Según la información disponible, las primeras

detecciones de G9P[8] en España tuvieron lugar en 1998 en Madrid y Gipuzkoa, cuando aún era considerado un genotipo inusual en el mundo ^{101, 348}. En los años siguientes su circulación en Gipuzkoa fue esporádica. Sin embargo, circuló ampliamente durante 1998 – 2000 en Madrid (> 10%) y fue la segunda cepa más frecuentemente detectada en 2004 – 2005 en Valencia (28,4%) ^{348, 351}. RVA G9 circuló extensamente en España en la temporada siguiente (2005 – 2006), documentándose su presencia en todas las provincias vigiladas: Albacete, Cáceres, León, Madrid, Valencia, Castellón, y también en Gipuzkoa (G-tipo codominante junto con G1, > 40% de las cepas detectadas cada uno) siendo el genotipo causante de la epidemia de RVA siguiente (2006 – 2007) en la mayoría de estas regiones además de en Lérida, Segovia, Zamora y Zaragoza ^{259, 352-355}. Desde entonces se ha detectado en la mayor parte de los estudios efectuados, bien de modo epidémico (Gipuzkoa 2009 – 2010 y Valencia 2014 - 2015) o esporádico. Por ejemplo, en Gipuzkoa, se detectó su presencia durante la década 2004 – 2014 en todas las epidemias. Con la excepción de la circulación observada en Madrid en 1998 – 2000 (\approx 12%), la circulación epidémica de G9 en España parece haber sido más tardía que en otros países del mundo como por ejemplo Tailandia en el que se documentó ya en 1996 – 1997 y 2000 – 2001, Japón en 1998 – 2000, Italia y Camerún en 1999 – 2000, Brasil en 1999 – 2002, en Bélgica y Estados Unidos en 2000 – 2003, o Australia en 1999 – 2003 ^{110, 361-371}. Los resultados de Gipuzkoa y los de los estudios efectuados en España son un ejemplo más del sorprendente cambio de papel de este genotipo a lo largo de los años, habiendo pasado de ser inusual desde su detección inicial en 1983 en Estados Unidos ¹⁰⁹ y 1985 en Japón ³⁷², a desaparecer durante una década para emerger a mediados de los noventa ³⁷³ y convertirse desde principios del siglo XXI en uno de los genotipos principales de RVA, el segundo tras G1 en la mayor parte del mundo ^{57, 62, 88, 374}.

Desde la primera epidemia causada por RVA G12P[8] en 2010 – 2011 en Gipuzkoa, este genotipo ha sido detectado con elevada frecuencia en nuestro territorio siendo el tercer genotipo más frecuente durante los 20 años de vigilancia a pesar de haber circulado epidémicamente tan solo en el último quinquenio del estudio. Por estas razones, los resultados en relación a este genotipo han sido objeto de discusión en un apartado específico (ver apartado 5.7).

El genotipo G2P[4] fue detectado en Gipuzkoa esporádicamente en casi todas las temporadas, igual que en la mayor parte de los estudios efectuados en España, circulando ampliamente cada tres a cinco temporadas, y llegando a ser predominante en

las temporadas 2003 - 2004 y 2012 - 2013 (2/20) en nuestro territorio. Esta situación es similar a la referida en la época prevacunal en la mayor parte de los países del mundo, como Japón donde G2P[4] fue predominante en 1990 - 1991 y en 2000 - 2001, en Italia en 1996, en Guinea-Bissau en 1996 - 1998, en Zambia en 1997 - 1999, en Burkina-Faso en 1998 - 1999, en Corea del Sur en 2000 - 2001, en Nicaragua en 2001, en Vietnam en 2002 - 2003, Sudáfrica en 2003, en Madagascar en 2004 - 2005, en Bangladesh en 2004 - 2006, en Argentina en 2004 y 2007, en Paraguay en 2005 o en Honduras en 2006 ^{269, 358, 375-386}. En Europa G2 circuló ampliamente en países como Hungría en 1995 - 1999, en Irlanda en 1997 - 1999 y en Croacia en 2005 - 2006. Además, en Estados Unidos G2 representó más del 15% de las cepas genotipadas en 1998 - 2000 ^{98, 362, 387, 388}. Sin embargo, tras la introducción de la vacuna Rotarix[®] en los programas nacionales de inmunización, varios países como Austria, Bélgica, Brasil y Australia (regiones australianas que usan esta vacuna) observaron un incremento notable en la prevalencia del genotipo G2P[4] ^{297, 389, 390}. Se desconoce si una inmunidad heterotípica reducida generada por esta vacuna monovalente G1P[8] y por tanto, un mecanismo de selección asociado a la vacuna es responsable de este fenómeno o si el predominio sostenido de las cepas G2P[4] se debe simplemente a fluctuaciones naturales de las cepas de RVA en la población ³⁹¹. Parece que la segunda hipótesis va adquiriendo peso ya que en los últimos años de vigilancia la circulación de cepas en los países que utilizaban Rotarix[®] ha cambiado nuevamente y las cepas G2P[4] han dejado de ser predominantes ²³¹. Asimismo, un estudio realizado en el nordeste de Brasil observó que la incidencia de RVA G2 disminuía progresivamente desde 2011 y que otros RVA como G8P[4], G8P[6] y G3P[8] eran cada vez más frecuentes sugiriendo que es probable que la variación continúe tras la introducción de la vacuna independientemente del mecanismo que subyace a estos cambios ³⁹². Además otros países con baja cobertura vacunal de Rotarix[®] y países que utilizan RotaTeq[®] también han comunicado una prevalencia sostenida de cepas G2P[4] ³⁴⁴.

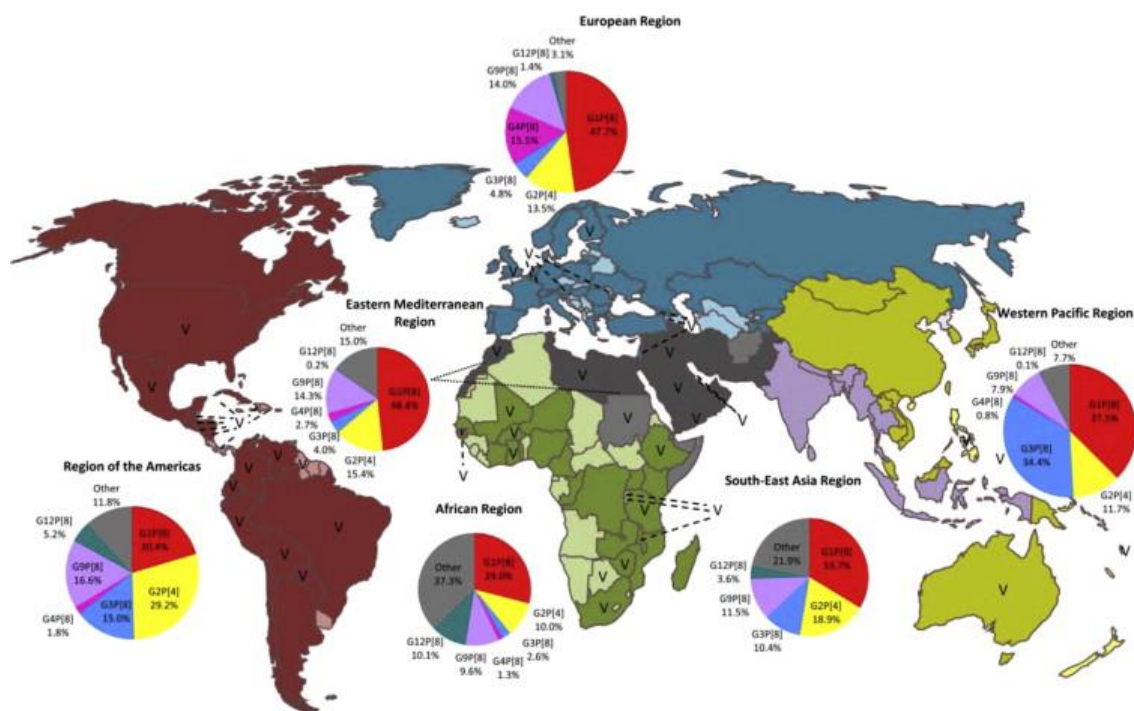


Figura 42. - Distribución geográfica de las cepas de rotavirus entre 2007 y 2012. Los diferentes colores en el mapa indican las regiones definidas por la OMS. Los colores oscuros muestran los países que proporcionan datos de regiones específicas. No se han incluido las cepas parcialmente tipadas ni las infecciones mixtas. La “V” señala los países con programa de inmunización frente a rotavirus en 2007 - 2012. Fuente: ³⁴⁴.

Por el contrario, la detección de G4P[8] fue infrecuente y su circulación prácticamente limitada a los primeros años de estudio siendo codominante en 1995 – 1996 y dominante en 1997 – 1998. En España, este genotipo circuló ampliamente o fue el principal causante de epidemias en diferentes regiones antes del año 2001 (Madrid, Valencia, Barcelona, Gipuzkoa), no siendo detectado en muchos estudios posteriores. En 1996 – 1999 G4P[8] fue detectado con cierta frecuencia en el Sudeste asiático, la región del Mediterráneo oriental y Europa descendiendo marcadamente su circulación en el periodo 2000 – 2003 en todo el mundo y reemergiendo en 2004 – 2007 principalmente en Europa ⁶². A partir de este período, G4P[8] ha sido predominante en pocos países, la mayoría de ellos europeos, (por ejemplo Alemania, Eslovenia, Estonia, Finlandia, Grecia, Hungría o Rusia) y típicamente durante una única epidemia con pocas excepciones como Grecia donde representó el 47,1% de las cepas genotipadas en 2008 – 2015 ^{57, 393-395}. En 2013 – 2014, G4P[8] volvió a circular ampliamente en Gipuzkoa (20,6%) aunque no llegó a ser codominante. Este incremento coincidió con un nuevo aumento observado en la detección de este genotipo a nivel europeo a partir de la epidemia 2013 – 2014 (Figura 43), siendo el genotipo predominante en Grecia,

Hungría y Países Bajos en la temporada 2014 – 2015 (75%, 79% y 56%, respectivamente) ⁵⁷. En otras partes del mundo como Estados Unidos, Latinoamérica o Australia cepas G4P[8] fueron en general inusuales y en algunas temporadas no fueron detectadas ^{88, 362, 364, 365, 367, 368, 396-408}. En los estudios efectuados en Asia o África en este siglo, G4P[8] tampoco parece haber tenido un protagonismo destacado ^{374, 409, 410}.

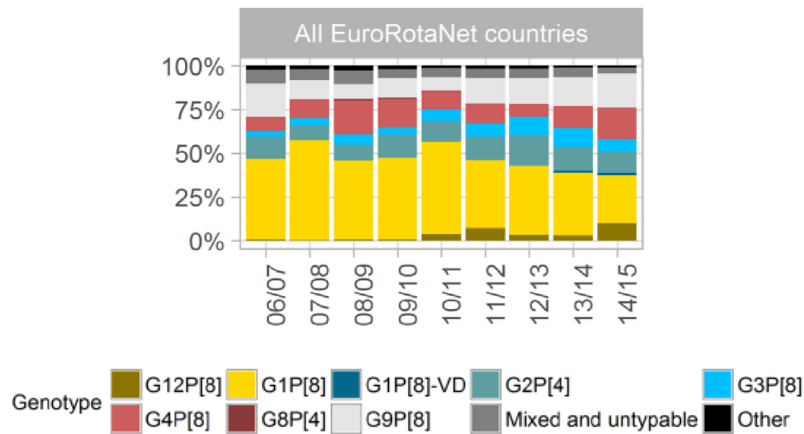


Figura 43.- Distribución de los genotipos de rotavirus recogidos en los países participantes en EuroRotaNet entre septiembre 2006 y agosto 2015. VD significa derivado de la vacuna.

El último de los genotipos principales, G3P[8], no fue dominante en Gipuzkoa ninguna temporada entre 1995 y 2015 y tan solo codominó en 2004 – 2005 y 2006 – 2007. Sin embargo, en 2014 – 2015 circuló epidémicamente una cepa atípica de origen equino que fue motivo de un estudio más detallado (ver apartado 5.8). Tampoco en España se ha observado circulación importante de este genotipo siendo pocos los estudios en los que representó más del 10% de las cepas genotipadas, destacando la temporada 2005 – 2006, donde fue el genotipo dominante en Albacete ³⁵². Interesantemente, al igual que con el genotipo G2P[4] y la vacuna Rotarix[®], se ha observado un aumento de la prevalencia de cepas G3P[8] en Estados Unidos y regiones de Australia que utilizan RotaTeq[®] en los programas nacionales de inmunización ³⁸⁹, que podría ser fruto de déficits en la inmunidad heterotípica o de fluctuaciones naturales. A favor de esta última hipótesis está el hecho de que G3P[8], genotipo dominante en el periodo 2007 – 2011, fue reemplazado por G12P[8] en 2012 en Estados Unidos ^{396, 397} y que el aumento de cepas G3P[8] observado en 2008 - 2010 cesó en las regiones de Australia mencionadas predominando G1P[8] en 2010 – 2011, G2P[4] en 2012, G3P[8] en 2013 y nuevamente G1P[8] en 2014 ⁴⁰³⁻⁴⁰⁸. Por el contrario, en Nicaragua no se observó un cambio hacia el predominio de G3P[8] tras la introducción de la vacuna RotaTeq[®] ⁴¹¹, siendo en

2012 – 2013 G12P[8] muy prevalente ⁴¹². Por otra parte, G3P[8] también fue prevalente en países sin programa de vacunación como Alemania, Argentina e Isla Reunión así como algunos países del Sudeste asiático (por ejemplo Tailandia, China, Japón o Vietnam) donde ha sido prevalente durante años consecutivos ⁴¹³⁻⁴²³. G3P[8] tuvo cierta presencia en África en el periodo 1996 – 1999 que disminuyó en años posteriores a la vez que aumentó la detección de cepas G8 siendo en la actualidad poco común en este continente. En 2000 – 2003, este genotipo reemergió solo en el Pacífico occidental representando casi el 40% de las cepas genotipadas en el periodo 2004 – 2012 ^{62, 344}. G3P[8] también circuló ampliamente en las Américas y el Sudeste asiático (15% y 10%, respectivamente) en 2007 – 2012 ³⁴⁴. Sin embargo, en Europa, G3 representó el 7% de las cepas genotipadas en 2006 - 2015 siendo su circulación en general bastante escasa y casi inexistente en países como Hungría, Grecia y Eslovenia. Bélgica es el país europeo en el que G3 fue más frecuente siendo dominante en 2010 – 2011 y codominante en 2013 – 2014 y 2014 – 2015. También fue codominante en 2013 – 2014 en Reino Unido ⁵⁷.

Al comparar las características principales (edad, sexo, porcentaje de hospitalización y estancia media) de las infecciones causadas por los G-tipos más frecuentemente detectados en Gipuzkoa (G1, G2, G9 y G12), no se observaron diferencias. El hecho de que el porcentaje de hospitalización para los diferentes G-tipos fuera similar sugiere que la gravedad de la enfermedad de RVA no está relacionada con el G-tipo causante ^{314, 351}. Asimismo, en un estudio reciente realizado en Francia que analizó los aspectos clínicos y los genotipos de los niños menores de 5 años que acudieron a los servicios de urgencias por GEA debida a RVA no se encontraron diferencias en las manifestaciones clínicas ni en la gravedad entre las GEA causadas por los diferentes genotipos de RVA ⁴²⁴. Sin embargo, hay estudios que relacionan una mayor patogenicidad con ciertos genotipos ^{425, 426} siendo este tema actualmente aún motivo de controversia. Esta mayor patogenicidad podría estar relacionada con la introducción de nuevos genotipos frente a los cuales la población no tiene inmunidad ⁴²⁵ y podría ser, por lo tanto, un fenómeno transitorio.

En resumen, la vigilancia durante veinte años de los genotipos circulantes en Gipuzkoa ha puesto de manifiesto el predominio del genotipo G1P[8] durante amplias partes de este período, y la emergencia de las cepas G9P[8] y G12P[8] que de ser consideradas inusuales han alcanzado por su frecuencia la categoría de genotipos principales desde la primera y segunda décadas de este siglo, respectivamente, siendo los principales

protagonistas de varias epidemias desde 2005. G2P[4] circula casi todos los años, siendo periódicamente dominante o codominante. Finalmente G3P[8] y G4P[8] circulan de modo más esporádico e irregular, siendo raramente dominantes o codominantes.

5.4 Circulación de genotipos inusuales de rotavirus

En Gipuzkoa, menos del 2% de las cepas en las que se intentó el genotipado durante el periodo 1995 – 2015 tuvieron un G- y/o P-tipo inusual siendo éstos por orden de frecuencia G3 de origen equino, P[14], G8, G6 y G10. Debido a la amplia circulación de una cepa de origen equino en 2015 en Gipuzkoa, que constituyó el 72,2% de las cepas inusuales globalmente identificadas, sus resultados se han discutido extensamente en el punto 5.8. Además de esta cepa, durante los 20 años de vigilancia de RVA que cubre el presente estudio, se detectaron las combinaciones G/P inusuales G6P[14] (n = 4), G8P[14] (n = 2), G8P[8] (n = 2), G8P[4] (n = 1), y G10P[14] (n = 1). Considerando su origen desde un punto de vista genético, cepas de RVA como G6P[14], G8P[14] y G10P[14] podrían tener un origen zoonótico directo ¹²⁴ mientras que cepas como G8P[8] y G8P[4] podrían representar reordenamientos entre RVA de origen animal y humano ⁵⁵.

Ocasionalmente, RVA con G- y/o P-tipos inusuales como G5, G6, G8, G10, G11, G14, G20, G24, G26, P[1]-[3], P[5], P[7], P[9]-[11], P[14], P[15], P[19], P[24], P[25] y P[28] son identificados en humanos, especialmente en países en vías de desarrollo ^{50, 54}. En Europa la detección de RVA con genes y constelaciones inusuales ha sido esporádica y restringida geográficamente. En conjunto representan solo una pequeña proporción del total (1,0%) sin evidencia de transmisión constante persona a persona ^{57, 259}. Una situación similar se ha observado en Estados Unidos o Australia y en menor medida en países asiáticos desarrollados como Japón ^{396, 408, 409} donde estas cepas normalmente representan menos del 2,5% de las genotipadas. También en Latinoamérica en general han sido poco frecuentes con la particularidad de la detección de cepas G5 que representan en algunos estudios hasta el 3% del total de las cepas genotipadas ⁸⁸, si bien en la era postvacunal, cepas G8P[4] y G8P[6] han sido detectadas con relativa mayor frecuencia en Brasil ³⁹². Por el contrario en África o Asia -especialmente en el Sudeste (arco desde India hasta Vietnam y Filipinas)-, las cepas inusuales representaron más del 20% y 16% de las genotipadas, respectivamente ^{374, 409, 427}.

Mucha información aporta evidencia de que los animales pueden actuar como una fuente de material genético aumentando la diversidad de las cepas de RVA humanas². De hecho, se cree que la mayoría de estas cepas inusuales han sido introducidas en la población humana a partir de animales mediante transmisión interespecies, unida en ocasiones a eventos de reordenamiento genético^{2, 104, 172}. Las introducciones zoonóticas directas tienen generalmente poco impacto en términos epidemiológicos ya que la escasa eficacia de replicación en humanos y la falta de transmisión persona a persona limita su circulación¹⁷⁶. Sin embargo, la co-circulación con cepas de RVA humano comunes podría dar lugar a reordenamientos genéticos y distintos grados de adaptación al huésped humano resultando en la emergencia de nuevas cepas con capacidad de transmisión interhumana como la cepa G3 de origen equino detectada en Japón, Australia, Gipuzkoa y Hungría a partir del 2013 (ver punto 5.8), e incluso convertirse en genotipos humanos principales como previamente se ha visto con RVA G9²⁵⁶. El gran número de cepas de RVA inusuales detectadas en los países en vías de desarrollo podría ser debido a coinfecciones frecuentes como consecuencia de contacto y/o convivencia estrecha con animales de granja, con tasas de infección y transmisibilidad elevadas por vivir en condiciones de hacinamiento y bajo nivel de higiene^{2, 50}.

En Europa, las cepas inusuales más frecuentemente detectadas durante el periodo 2006 – 2013 fueron G10 y G6, detectadas también en este estudio. La mayoría de las cepas de RVA G10 fueron halladas junto con P[8] mientras que la mayoría de las cepas G6 se asociaron a P[9] seguido de P[14] y P[8]²⁵⁹. Sorprendentemente, cepas de RVA como G8P[4] y G8P[8], consideradas inusuales en Europa y otras Regiones desarrolladas y también detectadas en Gipuzkoa, son comúnmente identificadas en África aunque en menor medida que RVA G8P[6]^{76, 86} y no son consideradas en ese marco geográfico por tanto “inusuales”. Excepcionalmente, RVA G8P[4] representó el 5% y el 9% de las cepas genotipadas en Reino Unido en 2008 – 2009 y 2009 – 2010, respectivamente⁴²⁸.

Las cepas inusuales G6P[14], G8P[14] y G10P[14] detectadas en Gipuzkoa durante el periodo de estudio tuvieron en común el gen VP4 P[14]. Desde su descubrimiento⁴²⁹, este P-tipo ha sido detectado esporádicamente en humanos, asociado sobre todo a G6 y en menor medida a G8, G10, G1 o G3. P[14] también ha sido detectado en conejos y en mamíferos del orden *Artiodactyla* como ovejas, cabras, antílopes, vacas o guanacos, principalmente asociado a G6, G8 o G10⁹⁵. Un estudio sobre este P-tipo sugirió que el P[14] humano y el P[14] de los mamíferos pertenecientes al orden *Artiodactyla* comparten un origen común y que las ovejas probablemente juegan un papel clave en la

transmisión interespecies responsable de la introducción de P[14] en la población humana. Es probable que ovejas, (o cabras o vacas) sean el reservorio principal de las cepas de RVA P[14] en el mundo ya que estos animales viven cerca de los humanos, más que antílopes y guanacos ⁹⁵. En algunas localidades de Gipuzkoa se puede encontrar un gran número de granjas con animales pertenecientes al orden *Artiodactyla* siendo especialmente frecuentes las explotaciones de ovejas. Sin embargo, el bajo número de cepas inusuales detectadas en el estudio y las especiales características del País Vasco con un estrecho contacto entre entorno rural y urbano, impidieron estudiar en detalle el origen de las cepas humanas P[14] de Gipuzkoa. Otro dato de interés es la detección en 2002 de una cepa de RVA G8P[14] en un cordero con GEA en Zaragoza ⁴³⁰.

El genotipo G6, detectado en cinco casos de GEA en Gipuzkoa, en cuatro de ellos asociado a P[14] (Tabla 17), es el G-tipo más frecuente en ganado vacuno aunque también ha sido encontrado en otros rumiantes ⁹⁵. La primera cepa humana de RVA G6P[14] fue detectada en 1987 - 1988 en un niño con GEA en Italia ⁹⁰ y posteriormente han sido referidas en Australia ⁹¹, Bélgica ⁹⁵, Egipto ⁹⁹, Hungría ⁹⁷, India ⁹³, Malawi ¹⁰⁰, España ¹⁰¹ y Tailandia ¹⁰². Todas las cepas G6P[14] detectadas en humanos hasta la fecha son de pacientes con GEA lo que podría sugerir que son virulentas en humanos pero tienen habilidad limitada para la transmisión inter-humana dado su patrón de detección esporádico a nivel mundial. En concordancia con esta idea, los casos de Gipuzkoa fueron esporádicos y ocurrieron en años diferentes. Las cepas humanas G6P[14] podrían haberse originado mediante reordenamientos genómicos entre cepas de RVA que predominantemente circulan en artiodáctilos antes de ser transmitidas a los humanos ^{91, 93, 95, 98, 99, 102, 431-435}. Sin embargo, la información disponible sobre genotipos de RVA en algunos artiodáctilos como ovejas, es aún muy escasa por lo que es difícil confirmar esta hipótesis. De hecho, aparte de en los humanos, la combinación G6P[14] ha sido identificada solo en cabras y antílope sable ⁹⁵.

Por otra parte, en este estudio se detectó una cepa G6 en un niño con GEA que había recibido dos semanas antes la primera dosis de la vacuna RotaTeq[®]. Dado que la vacuna RotaTeq[®] se compone de las cinco cepas recombinantes humano-bovinas G1P[5], G2P[5], G3P[5], G4P[5] y G6P[8] no podemos descartar que la PCR de genotipado detectara el VP7 G6 correspondiente a la cepa vacunal WC3 de origen bovino. De hecho, el análisis de la secuencia parcial del gen VP7 en el programa “BLAST” (347 nucleótidos) mostró una identidad nucleotídica con la cepa vacunal WC3 prácticamente

total. Sin embargo, para poder confirmar el origen vacunal de la cepa G6 sería necesario analizar el genoma o en su defecto el gen VP7 completo. Varios estudios han informado sobre la detección de cepas de origen vacunal en niños previamente vacunados con y sin síntomas de GEA (> 15%). Sin embargo, G6 ha sido raramente detectado en estos estudios ^{436, 437}.

RVA G8 fue descrito por primera vez en humanos en Indonesia (1979 - 1981) ^{106, 107} y posteriormente en ganado bovino ⁴³⁸. Se cree que el ganado bovino podría ser el huésped natural para las cepas de RVA G8 ¹⁰³. De hecho, varios estudios han sugerido que las cepas G8 humanas de África son fruto de una recombinación entre RVA humanos y de ganado bovino ⁴³⁹⁻⁴⁴¹. Numerosos trabajos han detectado G8 en combinación con P[1], P[2], P[4], P[6], P[8], P[10] o P[14] en humanos de diferentes países ^{76, 391}. De estas cepas, solo G8P[4], G8P[8] y principalmente, G8P[6] son comúnmente identificadas en África, donde representan alrededor del 10% de las cepas genotipadas ^{108, 374} pudiendo ser este porcentaje mayor en algunos países (27% en Malawi en 1997 - 2007) ⁴⁴². Estas cepas suelen poseer un esqueleto genético tipo DS-1, adaptado a los humanos ¹⁶⁷. Parece lógico que las cepas detectadas en Gipuzkoa con asignación G8P[8] y G8P[4] podrían ser fruto de importación desde África o más raramente Sudamérica, con transmisión posterior muy limitada. Por el contrario, las cepas G8P[14] podrían ser fruto de transmisión directa desde un reservorio zoonótico ocurrida a nivel local. Su esqueleto suele ser de tipo *Artiodactyla* (G8-P[14]-I2-(R2/R5)-C2-M2-(A3/A11)-N2-T6-(E2/E12)-H3), poco eficaz en la replicación en humanos y en la transmisión interhumana. RVA G8P[14], ha sido identificado en varios huéspedes como vacas (Japón e India), ovejas (España) y guanacos (Argentina) y en humanos en países como Egipto, Italia, Bélgica, Australia, Hungría, India, Dinamarca, Taiwan, Estados Unidos, Guatemala y algunos de África ^{374, 443, 444}.

RVA G10P[14], genotipo del que se detectó por primera vez una cepa en Gipuzkoa en 2014, es raramente identificado como fuente de infección de humanos. De hecho tras la revisión efectuada para esta Tesis, solo se han informado 16 infecciones adicionales causadas por esta cepa ocurriendo una de ellas en Reino Unido, otra en Tailandia y cinco en Eslovenia ^{95, 115}, entre 1987 y 2007; más recientemente en 2009, RVA G10P[14] fue identificado en un niño en Italia ¹²⁴, en 2011 en cinco niños y 1 adulto en el norte de Australia ¹²² y en 2014 en dos niños en India ⁴⁴⁵. El análisis del genoma completo de cepas G10P[14] obtenidas en el mundo reveló una constelación genómica de tipo *Artiodactyla* (G10-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3) sugiriendo eventos

de transmisión interespecies^{122, 124, 445}. A excepción del gen VP7, la constelación es consistente con los diferentes RVA G6P[14] y G8P[14] identificados en el mundo G6/G8-P[14]-I2-(R2/R5)-C2-M2-(A3/A11)-N2-T6-(E2/E12)-H3. El análisis del genoma completo de estas cepas sugiere que se han producido reordenamientos genéticos entre cepas de RVA de diferentes miembros del orden *Artiodactyla* en diferentes ocasiones y que los humanos podrían ser huéspedes accidentales⁹⁵. La mayoría de estas infecciones esporádicas son una ruta sin salida para estas cepas inusuales. Actualmente, las infecciones con este tipo de cepas continúan siendo raras y no están asociadas con grandes brotes ni con transmisión significativa y continua entre humanos. Asimismo, su aparición es independiente de la vacunación frente a RVA ya que han estado presentes en países en los que estas vacunas no se utilizan o incluso antes de la introducción de los programas de inmunización²⁵⁹. Solo cepas nuevas que tengan el *fitness* necesario podrían convertirse en patógenos humanos importantes, lo que está probablemente relacionado con su esqueleto genético. Es sabido que la mayoría de las cepas de RVA humano poseen esqueletos relativamente conservados, tipo Wa o DS-1. Además de poseer un esqueleto adaptado a humanos que permita la transmisión persona a persona, las cepas nuevas deberían tener mutaciones (VP7, VP4...) que les permitan escapar a la inmunidad heterotípica.

5.5 Re infecciones por rotavirus en niños menores de cinco años

Tan solo un 1,2% de los episodios de GEA por RVA estudiados en Gipuzkoa correspondieron a infecciones de repetición confirmadas virológicamente (70/5918), lo que indica que, en nuestro medio, las reinfecciones sintomáticas por RVA (aquellas que llevan a la búsqueda de asistencia médica) son raras. El análisis de las reinfecciones por RVA efectuado en este estudio tiene limitaciones, dado que no fue prospectivo sino basado en niños que demandaron atención médica por padecer GEA moderada o grave, por lo que no incluyó las infecciones más leves ni las asintomáticas, más frecuentes en el contexto de reinfecciones¹⁹². Más raramente, niños que no hayan acudido al médico en la primoinfección podrían haberlo hecho en la reinfección si hubiera sido suficientemente sintomática. Esta situación es posible si la primoinfección ocurre a edades muy tempranas (primeras semanas o meses de vida)⁴⁴⁶, lo que es poco frecuente en países desarrollados. Por tanto, el estudio subestima las reinfecciones causadas por RVA y podría raramente haber catalogado como primoinfección algún caso de

reinfección. Sin embargo, no fue objetivo de esta Tesis Doctoral conocer el peso de las reinfecciones en el total de infecciones causadas por RVA, sino más bien, aprovechando la detección de un cierto grupo de ellas, comparar el papel de los distintos genotipos como causa de primo versus reinfecciones en una población mayoritariamente infectada de modo natural, aspecto sobre el que la información existente es muy escasa.

Como era esperable, en el presente estudio se observó una aparente disminución de la gravedad en las segundas infecciones siendo el porcentaje de hospitalización de 2,9% (2/70) frente al 9,0% (525/5848) entre las primoinfecciones. Si bien la diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0,115$), esto fue debido probablemente a ser insuficiente el número de reinfecciones estudiadas. Es de destacar que en este estudio no se detectó ningún niño con tercera infección por RVA (todas las reinfecciones fueron segundas infecciones), lo que refuerza el papel protector de infecciones previas para infecciones subsecuentes de expresión clínica moderada o grave. De hecho, solo un 0,4% (2/527) de los niños ingresados a causa de una GEA de origen comunitario por RVA lo fueron a causa de una reinfección confirmada virológicamente. Las reinfecciones no ocurrieron en la misma temporada, estando separadas de las primoinfecciones de media 20 meses. Los resultados coinciden globalmente con los obtenidos en un estudio prospectivo ya clásico realizado en México en el que se monitorizaron 200 niños desde el nacimiento hasta los dos años de vida mediante visitas a domicilio en las que se efectuaba semanalmente seguimiento clínico y recogida de muestra de heces. Independientemente de la edad, niños con 1, 2 ó 3 infecciones previas mostraron progresivamente un menor riesgo de diarrea o de infección subsecuente por RVA que los niños que no habían tenido infecciones previas. Infecciones posteriores fueron significativamente menos graves que la primera infección, y las segundas infecciones fueron más probablemente causadas por otro G-tipo ¹⁹². Otros estudios encontraron resultados en la misma línea ^{194, 248, 447-449}. La protección conferida puede ser menor si las primoinfecciones se producen en el período neonatal ²⁴⁸ y/o en entornos en los que la diversidad y/o los inóculos virales (carga viral) de las cepas de RVA circulantes son elevados ^{194, 446}, situaciones observadas más frecuentemente en países en vías de desarrollo.

En este estudio, G1 fue el G-tipo más frecuentemente detectado en primoinfecciones (41,9%), mientras que en reinfecciones lo fue G2 (41,9%), un porcentaje superior al esperable ya que este genotipo causó el 11,7% del total de las primoinfecciones (Chi cuadrado = 33,21, $p < 0,001$). Se detectaron reinfecciones más frecuentemente los años

en que G2 circuló epidémicamente y una proporción mayor de cepas G2 se detectó en el contexto de reinfecciones (5%) que en el caso de los restantes genotipos (< 2%). Resultados similares fueron referidos en el estudio mexicano ¹⁹² quienes encontraron que RVA G1 y G3 fueron la causa más frecuente de primoinfección mientras que G2 fue la causa más frecuente de reinfección. En los estudios de Gipuzkoa y México solo en el 11,6% y el 9,1% respectivamente de los casos el genotipo causante de la primera y segunda infección por RVA fue el mismo, siendo en 6 de 7 casos recogidos entre ambos estudios G1 el causante. Los datos sugieren que no sólo el genotipo VP7 sino el tipo de constelación genómica tienen importancia ya que en el 65% de las parejas de episodios de primoinfección y reinfección de Gipuzkoa estuvieron implicadas en uno de los dos episodios cepas G2 y/o con constelación tipo DS-1-like o animal cuando sería esperable un porcentaje claramente menor (no mayor del 25%).

La escasez de reinfecciones detectadas en este estudio, en una población infantil amplia y vigilada durante dos décadas con una incidencia elevada de infección por RVA, apoyan la existencia de una fuerte respuesta inmune a la infección, que confiere protección frente a infecciones subsecuentes graves. La respuesta parece ser homotípica y heterotípica tanto frente a genotipos parcial como completamente diferentes (diferente constelación) y, aunque fuerte en todos los casos, parece ser algo más débil en el tercero, lo que sugiere el elevado porcentaje de reinfecciones causadas por G2. Aunque inmunidad de origen natural y de origen vacunal pueden presentar diferencias, es llamativo que las observaciones efectuadas en este estudio concuerdan con deducciones efectuadas en base a consideraciones biológicas y teóricas que hipotetizaron que tras la introducción de la vacunación masiva empleando la vacuna monovalente G1P[8] se produciría un aumento relativo (que no en la incidencia) de la circulación de G2P[4] ³⁸⁹, lo que parece haber ocurrido en varios países tras la introducción de la vacunación ^{297, 390, 450, 451}.

5.6 Gastroenteritis debida a rotavirus en niños de cinco años o más, jóvenes y adultos

La GEA debida a RVA es considerada una enfermedad predominantemente infantil. Su impacto, epidemiología y características clínicas en adultos son poco conocidas debido a que la GEA en los adultos es en general autolimitada no necesitando en muchos casos asistencia médica, y a que son pocos los laboratorios que examinan RVA en heces de

adultos. Sin embargo, infecciones por RVA se siguen produciendo a lo largo de la vida ya que la inmunidad generada por infecciones previas parece no conferir protección completa ^{7, 452, 453}.

En este estudio, el 1,3% de los episodios de diarrea analizados durante 2013 – 2015 en pacientes de 5 o más años de edad fue causado por RVA (3,4% de los analizados en el periodo invernal). Esta proporción fue similar a la referida en adultos de Estados Unidos en la época invernal del periodo 2005 - 2010 (entre 1,9 y 5%) ^{452, 453} pero menor a la detectada en otro estudio efectuado también en USA en el que se refirió la detección de RVA en el 18% de los cuadros de GEA en adultos atendidos en Servicios de Urgencias Hospitalarios, especialmente en invierno y primavera ^{454, 455}; En Alemania RVA fue detectado en el 15% de los adultos hospitalizados con GEA comunitaria ⁴⁵⁶. Los resultados obtenidos en los diferentes estudios efectuados en adultos han sido muy variables, más que en la población infantil, debido a la existencia de importantes diferencias en el diseño (efectuados sobre pacientes con diarrea comunitaria, atendidos en Urgencias, u hospitalizados), en el tipo de pacientes (casos esporádicos, brotes, inmunodeprimidos, ancianos), en los métodos diagnósticos, etc. Además, hay una menor tendencia por parte de los facultativos a solicitar coprocultivo a este grupo etario ⁴⁵⁷. Sin embargo, el presente estudio analizó a la totalidad de los adultos con GEA a los que se solicitó coprocultivo en el territorio bajo vigilancia incluyendo pacientes del ámbito comunitario, hospitalario y residencias, y en ese sentido, el numerador (casos de infección por RVA) es más próximo a la realidad que en estudios sobre grupos concretos. En Gipuzkoa, el 23,2% de los adultos con GEA por RVA fue hospitalizado, dato similar al encontrado en un estudio prospectivo realizado en Dinamarca durante el periodo 2005 – 2009 (22%) ⁴⁵⁸.

Debido a las características del estudio (búsqueda de RVA en todos los pacientes adultos con GEA a los que se solicitó coprocultivo), se pudo efectuar una estimación de la incidencia de la GEA por RVA en los diferentes tramos de la edad adulta. La incidencia global y en todos los tramos de edad fue muy inferior a la encontrada en la población infantil. Concretamente, la incidencia media anual de GEA debida a RVA en adultos fue de 13 casos por 100.000 habitantes, más de 200 veces menor que la observada en menores de 2 años de edad, y casi 10 veces menor que la observada en niños de 4 a 5 años de edad. Entre los mayores de cinco años de edad, sólo se observó un aumento en la tasa de incidencia en las personas mayores de 80 años de edad, grupo de edad en el que la incidencia se cuadruplicó, alcanzando 41/100.000 habitantes, cifra

sin embargo también claramente menor a la observada en la población infantil. Este incremento probablemente estuvo en relación con la inmunosenescencia, aunque otros factores como el vivir en instituciones (residencias) o una vigilancia posiblemente más estrecha también pudieron contribuir a ello.

En este estudio no se observaron diferencias en la estacionalidad de la infección por RVA respecto a la edad, si bien solo se analizaron los datos de dos temporadas (periodo 2013 – 2015). Los hallazgos de algunos estudios han sugerido que la enfermedad causada por RVA en adultos no presenta estacionalidad tan marcada como en la infancia ⁴⁵⁹. En Japón se observó que la distribución estacional de las infecciones por RVA en adultos no reproducía las que ocurrían en niños ya que las infecciones en adultos ocurrían a lo largo de todo el año ⁴⁶⁰. En otro trabajo más reciente efectuado en Estados Unidos en el que se estudiaron las hospitalizaciones por GEA debida a RVA en adultos durante un año se observó una marcada estacionalidad que se correlacionaba con la encontrada en niños, pero en adultos, RVA no desaparecía completamente en verano y otoño como sí lo hacía entre los niños ⁴⁵². Estas observaciones han llevado a sugerir que los adultos podrían ser el reservorio local persistente durante los meses de verano del cual emerge RVA cada invierno - primavera para dar lugar a la extensa enfermedad pediátrica ³⁰⁴. Sin embargo, los hallazgos del presente estudio no mostraron diferencia en la estacionalidad entre niños y adultos (Figura 44), lo que sugiere que las diferencias, de existir serían pequeñas y por tanto de difícil detección.

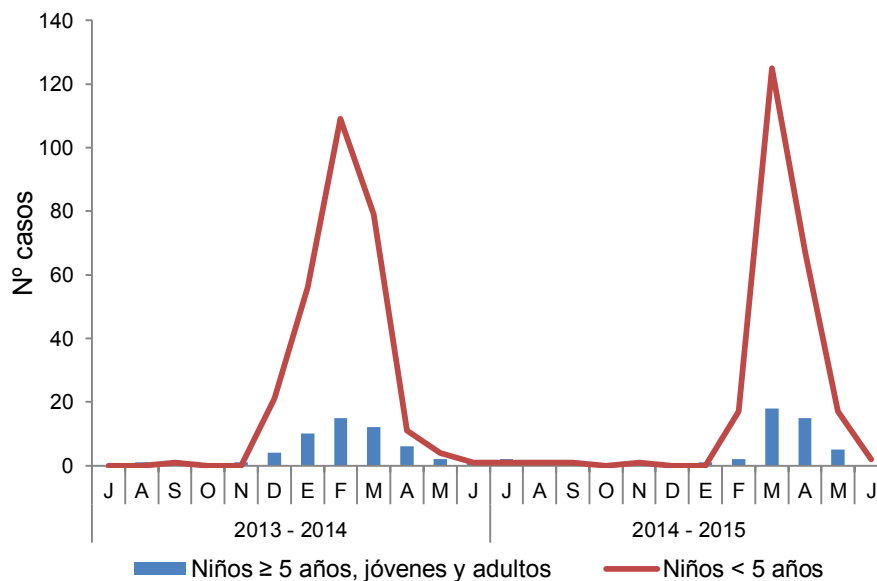


Figura 44.- Distribución mensual de los casos de infección por rotavirus en niños menores de 5 años y en niños de 5 años o más de edad, jóvenes y adultos de Gipuzkoa (2013 - 2015).

No se detectaron brotes de infección por RVA en los dos años de vigilancia en adultos. Sin embargo, en marzo de 2016 (fuera del período de recogida de datos de esta Tesis Doctoral) se detectó un brote causado por una cepa G12P[8] en una residencia de ancianos de Gipuzkoa con una tasa de ataque del 17% (n = 20), siendo la mediana de edad 87 años y todos los casos leves, con una duración de síntomas de entre 1 y 4 días, sin que ninguno precisara ingreso hospitalario. De hecho, es sabido que RVA es causa de brotes de GEA^{94, 461-464} siendo la segunda causa de brotes de GEA en residencias de ancianos, tras norovirus⁴⁶¹. En los dos años de estudio en los que se analizó la circulación de RVA en adultos, así como en el brote anteriormente referido, los genotipos que causaron las infecciones en adultos fueron esencialmente los mismos que en la población infantil (principalmente G1 y G12). Hay pocos estudios que hayan correlacionado los genotipos de RVA circulantes en niños y adultos. Algunos de ellos encontraron diferencias observando una mayor prevalencia en adultos de cepas G2P[4]⁴⁶⁵⁻⁴⁶⁷ o de G2P[4] y G9P[8]^{256, 362}. Por el contrario, como en el nuestro, otros estudios no encontraron diferencias entre la distribución de genotipos detectados en adultos y niños más allá de la amplia variabilidad propia de RVA observada año a año^{453, 458, 468}. Probablemente, los datos existentes son insuficientes aún para obtener conclusiones definitivas.

En resumen, los resultados de este estudio, indican que el impacto de la infección en adultos es mucho menor que en población infantil, aunque se incrementa en ancianos. Además, no observamos diferencias en la estacionalidad ni en la distribución de genotipos con las observadas en la población infantil. Debido a la escasez de los estudios efectuados en adultos, tanto para el conocimiento de su epidemiología (incidencia, estacionalidad...), como de los genotipos causales, es importante continuar con la vigilancia de RVA en este grupo de edad mediante la realización de estudios prospectivos. Resultaría de especial interés conocer si realmente la población adulta podría ser uno de los reservorios de este virus en el periodo interepidémico.

5.7 Rotavirus emergente G12P[8]

5.7.1 Estudio epidemiológico

RVA G12 fue detectado de manera esporádica por primera vez en Gipuzkoa en 2004 y 2005, siendo estas las primeras detecciones de este genotipo referidas en España¹⁰¹. No hubo más detecciones de G12 en Gipuzkoa hasta la epidemia de 2010 – 2011 en la que

fue dominante. La epidemia de 2010 – 2011 de Gipuzkoa fue la primera constatada por G12 en Europa y sus principales características fueron semejantes a las de las epidemias anteriores causadas por otros genotipos, con similar patrón estacional y grupo de edad afectado, duración prolongada (7 meses) y amplia diseminación geográfica por el territorio vigilado. La incidencia de RVA G12 en la epidemia de 2010 – 2011 en menores de 5 años fue de 565 casos/100.000 habitantes, y la tasa de hospitalización similar a la observada en temporadas previas, en las que RVA G1 y G9 fueron dominantes ¹³⁸. En la epidemia siguiente (2011 – 2012), G12 fue nuevamente dominante, alcanzando una incidencia de casi el doble (1028 casos/100.000 habitantes). Por el contrario, en las dos temporadas posteriores, 2012 – 2013 y 2013 – 2014, su circulación fue esporádica, si bien reemergió en la última temporada de estudio, 2014 – 2015, como genotipo co-dominante (429 casos/100.000 habitantes) junto con G1P[8]. En conjunto, en el período 2010 – 2015, RVA G12 fue el genotipo más frecuentemente detectado en Gipuzkoa, seguido por G1 (34,7% y 26,3% de las cepas analizadas, respectivamente). Estos datos sugieren que las cepas G12P[8] detectadas en Gipuzkoa en 2010 – 2011, 2011 – 2012 y 2014 - 2015 alcanzaron el *fitness* suficiente para diseminarse mediante transmisión entre humanos a lo largo del territorio convirtiéndose en la principal causa de las correspondientes epidemias de RVA. Por el contrario, las cepas G12P[8] detectadas esporádicamente en 2004 y 2005 y 2013 - 2014 fueron resultado de introducciones cuya diseminación falló. La irrupción de RVA G12 en Gipuzkoa puede ser enmarcada en la tendencia de creciente circulación que este genotipo ha mostrado en Europa, si bien con la característica de su excepcional intensidad. En base a datos de EuroRotaNet, la tasa de detección de las cepas G12 en el continente aumentó desde 3,9% en 2010 – 2011 (primer año en que este porcentaje rebasó el 1%) a 7,4% en 2011 – 2012 y 10% en 2014 – 2015 ⁵⁷.

En general, no se detectaron diferencias significativas en la incidencia de la infección por RVA G12 en Gipuzkoa cuando la población fue dividida en niños que vivían en localidades de carácter rural y urbano, lo que concuerda con lo recientemente referido en un estudio italiano ⁴⁶⁹. No se observaron diferencias en la distribución por sexo, ni tampoco por edad o tasa de hospitalización, cuando fueron comparadas con las del resto de genotipos de RVA, lo que sugiere que no hay diferencias en la gravedad de las infecciones causadas por RVA G12 con respecto a los restantes genotipos principales de RVA. En este sentido, estudios recientes en Francia ⁴²⁴ e Italia ⁴⁷⁰ no encontraron diferencias en las manifestaciones clínicas ni en la gravedad de las infecciones causadas

por G12 respecto a otros genotipos e incluso en Níger se ha comunicado una gravedad ligeramente menor ⁴⁷¹. Sin embargo, en Nicaragua se ha referido una tasa de hospitalización mayor ⁴¹², que podría en ocasiones observarse en el momento en que un nuevo genotipo de RVA (o una nueva cepa) irrumpe en una población no inmune y que ha sido referida también en un estudio efectuado en tres países latinoamericanos, en los años de introducción del genotipo G9 ⁴²⁶.

RVA G12 fue detectado por primera vez en Filipinas en 1987 – 1988 ¹³⁰, en niños menores de 2 años con diarrea. Sorprendentemente, no se identificaron nuevas cepas de este genotipo hasta una década más tarde, concretamente en 1998 – 1999 en Tailandia ¹³¹, Estados Unidos ⁹⁴ y Argentina ¹³². En los primeros años de este siglo, cepas G12 fueron detectadas con frecuencia remarcable casi exclusivamente en países del subcontinente indio, como Nepal (Kathmandu, 33,0% en 2003 – 2007) ¹³⁵, India (Delhi 14,4% en 2000 – 2007) ¹³⁴ y Bangladesh (Dhaka, 9,6% en 2005 – 2006) ¹³³, habiéndose señalado el Sudeste de Asia como el probable origen de este genotipo ¹³⁶. También se detectaron cepas G12 en Japón en 2001 ⁴⁷² y en Korea en 2003 ⁸⁶.

Por otro lado, en algunos países del cono Sur americano se observó circulación temprana y esporádica de G12, concretamente en Argentina donde las cepas G12 representaron el 6,7% de las genotipadas en 1999 – 2003 ¹³², así como en Brasil en 2003 ⁴⁷³ y en Paraguay en 2006 - 2007 ⁴⁷⁴. Las cepas latinoamericanas y también las detectadas inicialmente en USA presentaron una estrecha relación genética con algunas asiáticas, por lo que se sugirió que su presencia en América era consecuencia de importación y diseminación desde el Sudeste de Asia ^{136, 141}. En África las primeras cepas G12 se detectaron en Sudáfrica en 2004, observándose igualmente una estrecha relación con cepas detectadas en Asia (India) ⁴⁷⁵. También en Australia se detectaron cepas G12 tempranamente, concretamente en la temporada 2005 – 2006, representando algo más del 1% de las genotipadas ⁴⁰⁰. En Europa, los primeros RVA G12 fueron detectados de manera esporádica en Reino Unido (2002) y Bélgica (2003), mostrando fuerte similitud con cepas de Bangladesh ¹³⁶, donde probablemente estaba su origen. Entre 2004 y 2006, se detectaron cepas G12 en un número mayor de países europeos, incluida España (Gipuzkoa) ¹⁰¹, Francia ⁴⁷⁶, Eslovenia ⁴⁷⁷ y Hungría ⁴⁷⁸, siempre de forma esporádica y representando < 7% de las cepas genotipadas. Asimismo, en un estudio realizado en el Oeste de Europa en 2004 – 2005, cepas G12 fueron detectadas en tan solo dos de los siete países participantes (Italia y Suecia) ³²⁰ y aunque lo fueron en 15 de los 16 incluidos en la red europea de vigilancia de RVA (EuroRotaNet) en

2006 – 2009, las infecciones atribuidas a G12 solo excedieron el 5% en uno (Finlandia, 6,8%)⁵⁵ (Figura 45).

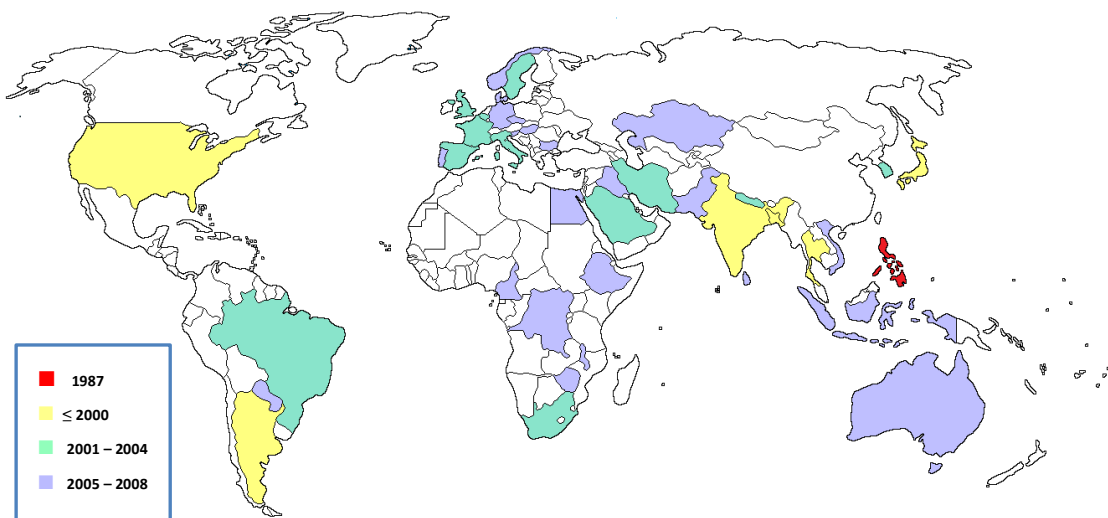


Figura 45.- Detección de cepas del genotipo G12 en humanos, 1987 - 2008.

Las cepas de RVA G12 emergentes detectadas en este período inicial (1987-2008) exhibieron una amplia variedad de arquitecturas genéticas, encontrándose cepas asignadas a las tres constelaciones genotípicas de RVA mayoritarias en humanos: AU-1-like, DS-1-like y Wa-like (Tabla 29)^{136, 152, 153, 420, 479}. La cepa filipina original L26 (1987) se asoció al VP4 P[4] y poseía siete genes propios de la constelación DS-1-like. La cepa tailandesa T152 (1998) por el contrario presentaba una constelación AU-1-like y se asoció a P[9]. Las primeras cepas bangladesís (ej. RV161-00, año 2000) se asociaron a P[6] y presentaban una constelación DS-1-like pero en los años inmediatamente posteriores se detectaron cepas como Dhaka 25-02 (2002) asociadas a P[8] y con mayoría de genes de la constelación Wa-like. El análisis del genoma completo de estas cepas históricas puso de manifiesto que las cepas emergentes eran diferentes en los 11 segmentos génicos, mostrando combinaciones variadas resultado de las múltiples recombinaciones que las habían originado¹³⁶.

Tabla 29.- Rotavirus genotipo VP7 G12: Asociaciones con distintos alelos de VP4 detectados en humanos en sus 30 años de historia. La asociación G12P[7] no detectada en humanos ha sido incluida en la tabla por ser la prototipo del linaje IV de VP7 y por ello estar presente en los árboles filogenéticos de muchos trabajos.

Alelo VP4	Constelación; linaje VP7	Comentarios
P[4]	DS-1-like (parcial); linaje I	La cepa original L26 (Filipinas). Única cepa conocida del linaje I
	Cepas actuales: Wa-like, linaje III,	Esporádicas a nivel mundial, especialmente Asia y África
P[6]	Wa-like; linaje III	Distribución mundial. Circulación epidémica en la región Sur de África y subcontinente indio
P[7]	Wa-like (excepto VP6 I5); linaje IV	Cepa de origen porcino RU172 (India). Única cepa conocida del linaje IV.
P[8]	Wa-like; linaje III	Distribución mundial. Principal responsable de las epidemias actuales.
P[9]	AU-1-like; linaje II	Circulante en Asia y en América Cono Sur) período 1999-2010. Circulación posterior muy esporádica.

Nota: En animales se han detectado otras asociaciones tales como G12P[5] en ganado vacuno ¹⁴³.

La obtención de resultados epidemiológicos y moleculares, que indicaban un aumento progresivo en la frecuencia de detección de cepas G12 en el mundo, amplía diversidad genética, hizo a algunos investigadores sugerir que G12 podía pronto convertirse en uno de los genotipos principales de RVA ^{136, 140}. Esta hipótesis se ha confirmado en los últimos años (a partir de 2008), en los que RVA G12 ha sido detectado en un número cada vez mayor de países (Figura 46) y se está encontrando con creciente frecuencia como genotipo dominante en epidemias anuales. Podríamos por tanto hablar de dos períodos diferentes: uno inicial, en el que la circulación de G12 a nivel mundial fue, con la excepción del subcontinente indio, principalmente esporádica (1998 - 2008) y otro a partir del período 2008 - 2010, en el que comenzó a ser dominante en epidemias en distintas regiones del planeta y que se asoció a diseminación de cepas con constelación Wa-like.

Desde 2010 – 2011, en Europa, la detección de cepas G12, principalmente asociadas al VP4 P[8], ha aumentado claramente alcanzándose en 2014 – 2015, como antes se ha

referido, el 10% de las cepas genotipadas, constatándose su detección en la mayor parte de los países con vigilancia ⁵⁷. En el Reino Unido, mientras que en 2011 – 2012, con un porcentaje de G12 del 4,8%, el 40% de estas cepas provenían de una única región escocesa en la que fue dominante, en 2012 – 2013 (porcentaje 7%) se distribuyeron por todo el país sin llegar a predominar en ninguna región y en 2014 – 2015 fueron codominantes (20%) con G2P[4] ⁵⁷. En España, son escasos los datos sobre los genotipos de RVA circulantes y tras la primera detección de RVA G12 en 2004 – 2005 en Gipuzkoa, solo hubo detecciones esporádicas en humanos y animales hasta el invierno de 2010 – 2011 en que fue dominante en la epidemia invernal de la CAPV (Tabla 30).

Tabla 30.- Detecciones de rotavirus del genotipo G12 en España en publicaciones científicas.

C. A. /provincia	Temporada	Circulación	Origen	VP4	Observaciones	Fuente
Gipuzkoa	2004-2005 2005-2006	Esporádica	Humano	P[8] P[X]	3 cepas+1 G12P[X] 1 cepa	Presente trabajo, 101
Aragón	2005-2006	¿?	Porcino	P[8]	8 cepas	480
Valencia	2006-2007	Esporádica	Humano	P[8]	1 cepa (mixto con G3)	355
Zaragoza	2007-2008	Esporádica	Humano	P[X]	2 cepas	354
Valencia/Castellón	2007-2008	Esporádica	Humano	P[8]	1 cepa	353
Valencia/Madrid	2008-2009	Esporádica	Humano	P[6]	1 cepa	4º informe EuroRotaNet
Valencia	2010-2011	Esporádica	Humano	P[8]	1 cepa	6º informe EuroRotaNet
Gipuzkoa	2010-2011	Epidémica Esporádica	Humano	P[8] P[4]	65% 2 cepas	138
Madrid	2010 2011	Esporádica	Humano	P[6] P[8]	1 cepa 5 cepas	357
Valladolid/Barcelona/ Zaragoza/Valencia	2011-2012 2013-2014	Epidémica	Humano	P[8]	13,3% 15,3%	299, 481
Gipuzkoa	2011-2012 2012-2013 2013-2014 2014-2015	Epidémica Esporádica Esporádica Epidémica	Humano	P[8]	81,4% 3 cepas 7 cepas+1 G12P[X] 42,4%	Presente trabajo

A partir de 2010, además de los datos de Gipuzkoa que mostraron circulación intensa durante varias epidemias, se documentaron incrementos en la prevalencia de cepas G12 en la Comunidad Autónoma de Madrid, 5,1% en 2010 y 2011 ³⁵⁷ cuando no se habían detectado cepas G12 apenas tres años antes ³⁵⁴ y en un estudio colaborativo efectuado por laboratorios en Valladolid, Zaragoza, Barcelona y Valencia donde se obtuvieron prevalencias cercanas al 15% en 2011 – 2012 ²⁹⁹ y 2013 – 2014 ⁴⁸¹.

En otros continentes los datos obtenidos en esta última época (de 2008 en adelante) constatan igualmente un incremento en la detección de cepas del genotipo G12. En Asia, cepas G12 asociadas a P[6] y P[8] y más raramente P[4] han sido identificadas en un gran número de países además de los antes referidos, como Myanmar ⁴⁸², Vietnam ⁴⁸³, Bhutan ⁴⁸⁴, Pakistán ⁴⁸⁵, Arabia Saudí ⁴⁸⁶ o Iraq ⁴⁸⁷ entre otros (Figura 46). En África se ha comunicado la detección de cepas G12 en países de todas las regiones del continente como Túnez ⁴⁸⁸, Camerún ⁴⁸⁹, Nigeria ⁴⁹⁰, República Democrática del Congo ^{491, 492}, Kenia ⁴⁹³ o Malawi ⁴⁹⁴, entre otros. El estudio panafricano (16 países) que estudió los genotipos de RVA obtenidos en el período 2007 - 2011, constató un incremento global de las cepas G12 al 6,3% ³⁷⁴, respecto al porcentaje obtenido en 2006 – 2008 de 2% ⁴¹⁰. Ambos estudios documentaron que cepas asociadas a P[6] circulaban preferentemente en el Sur de África mientras que las que lo hacían en el África Subsahariana y Centroáfrica se asociaban preferentemente a P[8]. En los países del cono Sur americano las cepas G12P[9] circulantes de forma esporádica con anterioridad a 2008 (prevalencia < 7%), fueron en gran parte reemplazadas por cepas G12P[8], que emergieron con fuerza a partir de ese año. RVA G12 se ha detectado en años recientes en países como Argentina ⁴²⁰, Brasil ⁴⁶⁸, Uruguay ⁴⁹⁵, Perú ⁴⁹⁶, Nicaragua ⁴¹² o México ⁴⁹⁷, siendo dominante en algunas epidemias. En Norteamérica, G12P[8] fue el genotipo dominante en Estados Unidos en 2012 y 2013 representando el 70% y 68% de las cepas genotipadas ³⁹⁶. Por último en Australia cepas G12P[8], detectadas esporádicamente desde 2005 - 2006, se hicieron dominantes durante al menos dos epidemias consecutivas (2013 y 2014) ⁴⁰⁸.

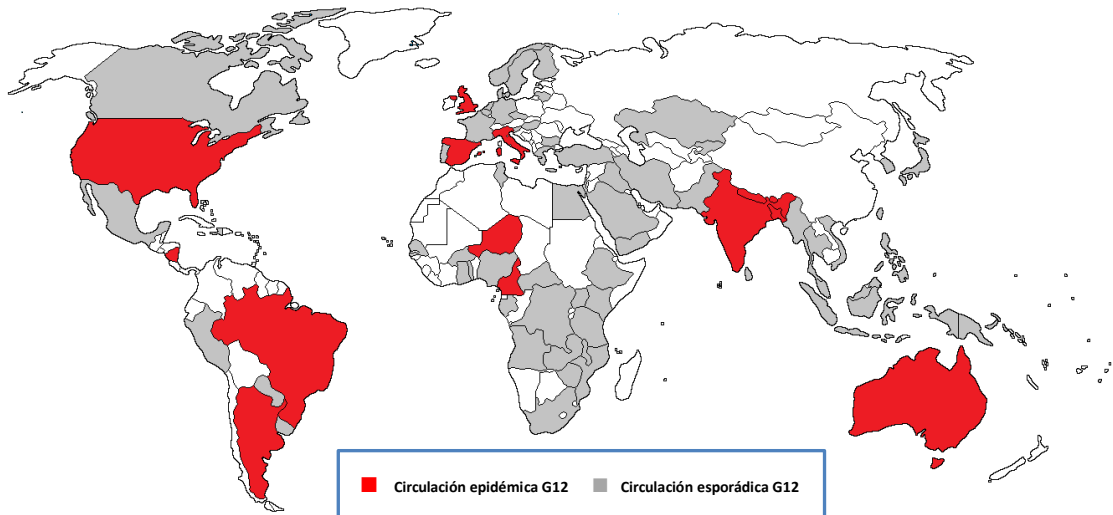


Figura 46.- Países en los que se ha comunicado la detección de rotavirus G12 en humanos y en los que se ha referido circulación epidémica (dominante o codominante en epidemias anuales) de este genotipo (estudios que aportan datos hasta 2015).

El análisis, en base a la literatura médica existente de las epidemias en las que cepas G12 han sido dominantes muestra que, fuera del subcontinente indio ^{133, 134} solo se han documentado dos temporadas epidémicas en las que predominara RVA G12 previas a la ocurrida en 2010 – 2011 en Gipuzkoa. La primera tuvo lugar en Rochester (Nueva York, Estados Unidos) en 2007 ⁵⁸ y la segunda en Argentina en 2008 – 2009 ⁴²⁰ ambas debidas a G12P[8], observándose en Argentina que las cepas G12P[8] fueron altamente prevalentes en diferentes regiones del país. Recientemente, se están documentando en todos los continentes epidemias en las que G12, en general asociado a P[8] y en menor medida a P[6], es el genotipo dominante o codominante como se ha referido en Nepal 2005 – 2007 ¹³⁵ y 2011 ⁴⁹⁸, Níger 2011 – 2012 ⁴⁷¹, Nicaragua 2012 y 2013 ⁴¹², Brasil 2014 ⁴⁶⁸, USA 2012 y 2013 ³⁹⁶, Italia 2012 – 2013 ⁴⁶⁹, Reino Unido 2014 ⁵⁷, España 2010 – 2012 y 2014 – 2015 (presente trabajo) o Australia 2013 y 2014 ⁴⁰⁸. Como sucedió en Gipuzkoa en 2010 – 2011 y en 2011 – 2012, cepas G12 han sido dominantes durante al menos dos epidemias consecutivas en varias regiones ^{408, 412}.

Se ha sugerido que la expansión reciente de cepas G12 y su capacidad para erigirse en genotipo dominante puede estar asociada a su inclusión en un esqueleto Wa-like (P[8] o P[6]) a diferencia de las primeras cepas G12 que emergieron y se dispersaron a nivel global, incluidas en esqueletos DS-1-like o AU-1-like ¹³⁶. La inclusión en un esqueleto Wa-like les confiere ventaja desde un punto de vista evolutivo ya que, al ser esta una constelación muy estable y pertenecer a ella la mayor parte de los genotipos principales (ej G1), aumentan las posibilidades de recombinación entre las cepas G12 y las de otros

genotipos, y por tanto las de generar cepas G12 que repliquen de modo más eficiente o cambien su virulencia ⁴⁹⁹.

En resumen, el genotipo G12 ha pasado en pocos años de ser considerado una mera anécdota durante la década posterior a su detección original en Filipinas, a un genotipo inusual pero emergente durante la década siguiente en la que se constató su dispersión global desde su origen en Asia detectándose de forma esporádica ⁵⁵, y a un genotipo principal durante la tercera década en la que se ha constatado su papel relevante en numerosas temporadas epidémicas en regiones de los cinco continentes ³⁴⁴. En este sentido la expansión de G12 y el camino recorrido hasta entrar a formar parte de los genotipos principales tiene un paralelismo importante al recorrido por G9 unos años antes ¹³⁶. Analizar la emergencia y dispersión del genotipo G12 en el mundo no es fácil debido principalmente a que la vigilancia de los genotipos circulantes no ha sido homogénea a lo largo del tiempo y ha aumentado con los años debido en gran parte al interés despertado por el desarrollo e introducción de las vacunas frente a RVA. Por otra parte, algunos estudios antiguos no usaban cebadores que permitieran la amplificación de este genotipo. Por estas razones, los datos disponibles representan un mínimo sobre la realidad. Sin embargo, la información generada globalmente es coherente y permite obtener conclusiones sobre estos aspectos.

5.7.2 Estudio molecular

Desde las primeras detecciones de este genotipo en Gipuzkoa (diciembre 2004), G12 se asoció en la casi totalidad de los casos al genotipo VP4 P[8], y solo se asoció a VP4 P[4] en dos casos procedentes de la zona Goierri – Alto Urola en la temporada 2010 - 2011. A pesar de ello, todas las cepas G12 de Gipuzkoa pertenecieron al linaje III siendo el gen VP7 de las dos cepas G12P[4] casi idéntico al del resto de cepas de su misma temporada, lo que sugiere que ocurrió una recombinación entre las cepas G12P[8] y otra cepa localmente circulante del alelo VP4 P[4]. El genotipo VP7 G12 se divide en cuatro linajes. Los linajes I y IV contienen cada uno una única cepa, la cepa prototipo G12P[4] L26 de Filipinas ¹³⁰ y la cepa porcina G12P[7] RU172, aislada en la India en 2002 ¹⁴², respectivamente. El linaje II consta de cepas G12P[9] que circularon ampliamente por Asia y Sudamérica entre 1998 y 2008 y por último el linaje III, cuyo ancestro común más reciente se remonta a 1995 (1992 - 1998), contiene la mayoría de las cepas G12 actualmente circulantes, asociadas habitualmente a P[6] o P[8] ¹⁴⁰. En

Europa, como en Gipuzkoa, el P-tipo P[8] ha sido el más frecuentemente asociado con G12, más frecuentemente que P[6] y especialmente que P[9] y P[4] ⁵⁵.

El análisis molecular de los segmentos genómicos VP7 y VP4 de las cepas G12P[8] de Gipuzkoa mostró una elevada homogeneidad en las secuencias G y P de cada temporada, sugiriendo la introducción de una única cepa G12P[8] por temporada en la población local. Solo las cepas G12P[8] detectadas en 2011 – 2012 circularon también en 2012 - 2013, si bien la detección de cepas G12 en esa temporada fue esporádica. Entre las cepas G12 de Gipuzkoa hubo cuatro cepas con VP4 P[8] dispares que no agruparon con los P[8] de su temporada correspondiente siendo todos ellos muy similares o idénticos a otros VP4 P[8] de cepas locales con G-tipo diferente, lo que sugiere que esas cuatro cepas adquirieron el gen VP4 P[8] de otras cepas cocirculantes de Gipuzkoa mediante reordenamiento genético. A pesar de ello, todos los VP4 P[8] de este estudio pertenecieron al linaje III. El reordenamiento genético del segmento genómico VP4 P[8] es fácilmente detectable debido a la cocirculación de diferentes VP4 P[8] de distinto genotipo en un mismo entorno. Por el contrario, los reordenamientos del gen VP7 son indetectables con el sistema de vigilancia actual en el sentido de que para su detección sería necesario analizar el genoma completo o al menos genes adicionales de las cepas con constelación tipo Wa circulantes.

Al igual que en este trabajo, muchos estudios han informado sobre casos de GEA por RVA asociados a la combinación G/P, G12 - linaje III P[8] - linaje III en todo el mundo ^{139, 469, 484, 493, 500-502}.

Diferentes estudios de análisis de genoma completo de cepas G12 de diferentes partes del mundo indican que la gran mayoría de las cepas G12 circulantes en la actualidad poseen una constelación genotípica tipo Wa (genogrupo 1) ^{136, 499, 503}, probablemente porque la mayor parte de ellas está en combinación con P[8]. Así, el análisis del genoma completo de las cepas G12P[8] de Gipuzkoa detectadas en 2010 – 2011, 2011 – 2012, 2012 – 2013, 2013 – 2014 y 2014 – 2015 reveló una constelación genotípica tipo Wa (G12-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1). Por otra parte, estudios moleculares han sugerido que las cepas G12P[8] podrían haber sido formadas por la introducción de un gen VP7 G12 en una cepa común globalmente con constelación de tipo Wa ⁴⁹⁹. Debido a la creencia de que la constelación genotípica tipo Wa es una de las constelaciones estables de las cepas de RVA humano, este esqueleto genético podría haber conferido una ventaja evolutiva a las cepas G12, haciendo que sea posible una diseminación global sorprendentemente rápida ^{150, 172, 503}.

Las diferencias observadas en los genes VP7 y VP4 de las cepas guipuzcoanas G12P[8] de cada temporada se mantuvieron al analizar el genoma completo. En el análisis filogenético, el genoma completo de las cepas G12P[8] de Gipuzkoa mostró un patrón de agrupamiento estacional, excepto, como antes se ha señalado, en el caso de las cepas recogidas en 2011 – 2012 y 2012 – 2013 que se agruparon en un único clúster indicando que solo un clon circuló en ambas temporadas. Además, no se detectó ninguna recombinación entre ninguno de los 11 genes de las diferentes cepas a parte de los cuatro VP4 P[8] anteriormente mencionados. Por lo tanto, la circulación de RVA G12P[8] en Gipuzkoa parece haber sido fruto de la introducción de diferentes cepas G12P[8] en las temporadas 2010 – 2011, 2011 – 2013, 2013 – 2014 y 2014 – 2015, y clonal dentro de ellas. Estas cepas circulan habitualmente una temporada para desaparecer tras su finalización.

No se pudo establecer el origen de los cuatro clones diferentes que se introdujeron en las cinco temporadas en las que circuló RVA G12 en Gipuzkoa (2010 - 2015) ya que tanto el segmento genómico VP7 y VP4 así como las 11 regiones codificantes concatenadas mostraron una estrecha relación filogenética con cepas de diferentes partes del mundo recogidas en diferentes años. En general, las cepas G12P[8] de la temporada 2010 – 2011 guardaron una estrecha relación con la cepa tailandesa CU616-TK de 2009; las cepas de 2011 – 2013 con cepas de diferentes partes de Estados Unidos recogidas en 2013 (por ejemplo VU12-13-149) y especialmente con una cepa italiana detectada en 2012 (PA144/12); las cepas de 2013 – 2014 con la cepa MRC-DPRU2140 de Sudáfrica del año 2005; y las cepas de la temporada 2014 – 2015 con cepas detectadas en Estados Unidos en el periodo 2011 – 2013 (CNMC12, VU11-12-192 y VU12-13-84), en Kenia en 2010 (KDH651) así como en Uganda (MRC-DPRU4620) y Sudáfrica (MRC-DPRU71) en 2011 y 2012, respectivamente. La falta de secuencias de genoma completo de RVA G12P[8] disponibles en GenBank hace que sea difícil encontrar el origen de los diferentes clones de RVA G12P[8] de Gipuzkoa.

Los datos sugieren circulación global intensa en diversas partes del mundo de cepas de RVA G12, que han sido fuente de numerosas introducciones en Gipuzkoa y otras regiones. Esta rápida circulación está sin duda favorecida por los cada vez más frecuentes movimientos internacionales de la población (comercio, turismo, inmigración, refugiados...). Estos cambios poblacionales favorecen la generación de nuevas cepas de RVA, debido a que aumentan la probabilidad de que se produzcan

coinfecciones, que ponen en contacto cepas diferentes de RVA, siendo este un virus para el que la recombinación genética es uno de los principales mecanismos de evolución.

5.8 Rotavirus G3 atípico de origen equino

En la presente Tesis Doctoral se describe la emergencia de una cepa de RVA atípica G3P[8] con esqueleto genético tipo DS-1 y VP7 de origen equino que contribuyó a la epidemia estacional en Gipuzkoa de marzo a junio de 2015. Las principales características de las infecciones causadas por este RVA como la edad de los pacientes afectados, su amplia distribución en el territorio, el patrón estacional y la tasa de hospitalización no fueron diferentes de las típicamente asociadas con otros genotipos de RVA en nuestro entorno ¹⁰¹. Estas cepas G3 de origen equino fueron inicialmente tipadas erróneamente como G12 mediante la multiplex RT-PCR habitualmente utilizada. Aunque todas las cepas G3 tuvieron un grado de identidad similar con el cebador G12, incluso estando dos de las divergencias presentes en el extremo 3' (extremo de la extensión), la falta de complementariedad con el cebador G3 resultó en la unión del cebador G12 preferentemente con las cepas G3 de tipo equino, mientras que en el caso de las cepas comunes G3 humanas, contra las cuales el cebador G3 mostró una mejor correspondencia, se obtuvo un amplicón específico de G3. Varios estudios han informado sobre diferentes eventos de variación natural que han tenido impacto en la eficacia del genotipado de RVA ⁵⁰⁴⁻⁵⁰⁷. Estas observaciones subrayan la importancia de secuenciar regularmente cepas de diferentes genotipos para confirmar los resultados obtenidos mediante multiplex RT-PCR.

Las cepas de RVA G3 poseen la variedad de huéspedes más amplia, habiendo sido detectadas en muchas especies animales incluyendo huéspedes humanos, caninos, felinos, bovinos, ovinos, porcinos, equinos, aviares, simios, murinos y lepóridos ^{2, 43, 77}. Entre las cepas de RVA de origen humano, las cepas G3 son más frecuentemente asociadas con P[8] y esqueleto genético tipo Wa ⁸⁰. McDonald y colaboradores (2009) analizaron el genoma completo de 51 cepas G3P[8] detectadas en Estados Unidos entre 1974 y 1991 y encontraron que todas las cepas pertenecieron al genogrupo Wa a pesar de que otras cepas de tipo DS-1 co-circularon durante ese periodo. Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó el genoma completo de 15 cepas italianas recogidas durante los periodos 2004 – 2005 y 2008 – 2013 ⁵⁰⁸. Inesperadamente, las cepas atípicas analizadas en esta Tesis fueron caracterizadas como G3P[8] en combinación con un

esqueleto genético tipo DS-1 completo. Esta asociación inusual solo ha sido previamente detectada en Tailandia en 2013 ²⁷¹, Australia como cepa dominante en 2013 y como la tercera en 2014 ⁸¹ y más recientemente en Hungría de forma esporádica en 2015 ⁸³ (cepas no incluidas en el análisis filogenético). Por otro lado, el análisis filogenético del segmento génico VP7 reveló que las cepas atípicas G3P[8] de Gipuzkoa, así como las de Tailandia, Australia y las cepas japonesas G3P[4] compartieron la mayor identidad de secuencia nucleotídica (90,7 – 91,4%) con una cepa equina (Erv105) detectada en un potro en India ²⁷². En base a estas observaciones, estas cepas han sido designadas como cepas recombinantes humano-equinas ^{79, 81, 83, 271}. Ha habido otros informes esporádicos de cepas G3 con esqueleto genético tipo DS-1 en humanos, resultantes de un reordenamiento intergenogrupo, en combinación con P[4] o P[6] ^{105, 509-511}.

Los segmentos genómicos VP1 - VP4, NSP1 - NSP3 y NSP5 de las cepas atípicas G3 con esqueleto genético DS-1 de Gipuzkoa compartieron una identidad nucleotídica muy elevada con varias cepas asiáticas recombinantes intergenogrupo G1P[8], las cepas tailandesas y australianas G3P[8] y las japonesas G3P[4] anteriormente referidas. No existía evidencia de cepas G1P[8] con esqueleto genético tipo DS-1 hasta que Kuzuya y colaboradores (2014) informaron en enero de 2012 sobre la presencia de cepas recombinantes dobles G1P[8] (genes VP6, NSP4 y NSP5) en Okayama, Japón. El nuevo recombinante intergenogrupo G1P[8] co-circuló junto con cepas G1P[8] tipo Wa puras durante la temporada de 2011 – 2012 representando el 74,1% de todas las cepas G1P[8] ⁴¹⁶. Más tarde, en la misma temporada, cepas de RVA G1P[8] con esqueleto genético tipo DS-1 fueron detectadas en diferentes regiones de Japón ^{69, 275}. Por tanto, esta cepa recombinante nueva se propagó con éxito a regiones lejanas de Japón y predominó, al menos en alguna de ellas, durante la temporada 2011 – 2012. En 2013, las cepas recombinantes intergenogrupo G1P[8] emergieron también al menos en Tailandia ⁶⁸ y causaron brotes de GEA en la ciudad de Osaka, Japón ²⁷⁵.

Las cepas de este estudio fueron muy similares en todos los segmentos génicos excepto en el gen VP6 que dividió las cepas en dos clústeres sugiriendo un reordenamiento adicional con cepas G2P[4] locales. Debido al hecho de que el RVA del clúster B fue detectado inmediatamente después del inicio de la circulación del G3P[8] atípico, dos clones fueron responsables de la propagación de esta cepa en nuestro entorno. Por último, el origen del gen NSP4 de las cepas de RVA atípicas G3P[8] de Gipuzkoa fue menos claro debido a la estrecha relación observada entre las cepas de estudio y algunas

cepas G2P[4] tipo DS-1 puras de diversos orígenes geográficos como Australia e Indonesia.

Los resultados de este estudio sugirieron que la cepa atípica G3P[8] con esqueleto genético tipo DS-1, que circuló en Gipuzkoa en 2015, podría haberse originado mediante eventos de reordenamiento implicando a las cepas recombinantes intergenogrupo G1P[8] y a las recombinantes humano-equinas G3P[4] identificadas en Asia, y para al menos un subconjunto también pudo producirse un reordenamiento con cepas locales tipo DS-1 puras. La falta de detección de cepas G1P[8] con esqueleto genético tipo DS-1 y de cepas japonesas G3P[4] en nuestro entorno sugiere que la cepa G3P[8] atípica se originó en otro lugar mediante reordenamiento y posteriormente fue importada a Gipuzkoa. Esto fue apoyado por la detección de cepas con la misma constelación genotípica en Tailandia y Australia en 2013 ^{81, 271}. Con la excepción del gen VP6 de las cepas del clúster B, todos los segmentos génicos mostraron la mayor similitud con cepas aisladas en Japón, Tailandia, Australia y Filipinas, lo que apunta al Este asiático y el Pacífico como posible origen. Sorprendentemente, la emergencia de esta cepa atípica en Gipuzkoa coincidió con unas jornadas gastronómicas japonesas impartidas en Hondarribia por cocineros provenientes de Tsuruoka (Yamagata) (Figura 47) siendo el primer caso del brote detectado en Irun (municipio colindante con Hondarribia sin solución de continuidad).

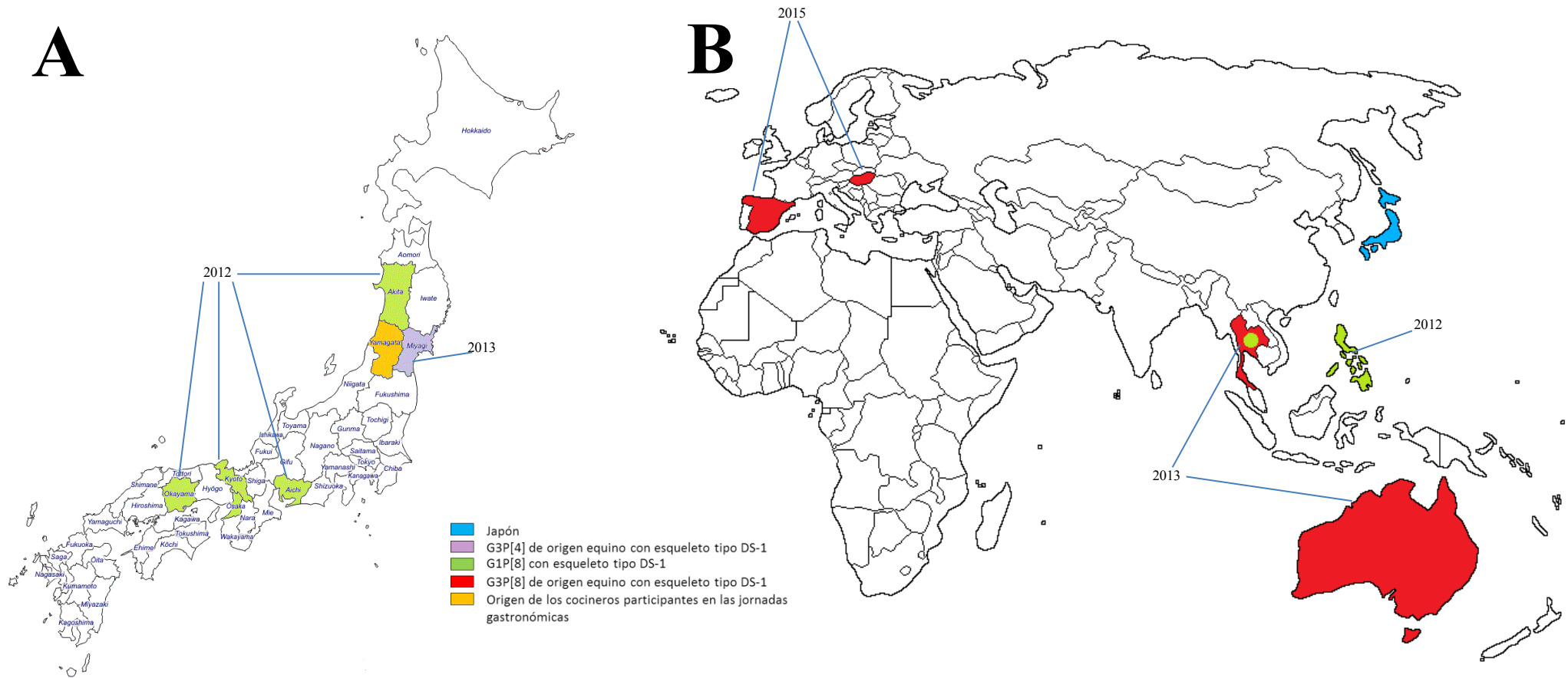


Figura 47.- Distribución de cepas G3P[8] de origen equino con constelación tipo DS-1 en el mundo. A) Mapa de las prefecturas de Japón, B) Mapa de África, Europa, Asia y Oceanía. El color violeta indica el origen de las cepas de origen equino G3P[4] con esqueleto genético tipo DS-1 (prefectura Miyagi). El verde indica las prefecturas de Japón y países donde se detectaron las cepas G1P[8] con esqueleto genético tipo DS-1 (Okayama, Kyoto, Osaka, Aichi y Akita en Japón, Tailandia y Filipinas). El color rojo señala los países en los que las cepas G3P[8] de origen equino con constelación tipo DS-1 han sido detectadas hasta el momento. El color naranja indica la prefectura (Yamagata) que es el origen de los cocineros que participaron en las sesiones de *Showcooking* y cenas gastronómicas.

Como colofón, el estudio demuestra que RVA recombinantes humano-equinos atípicos G3P[8] con esqueleto genético tipo DS-1, detectados en el Este asiático y Australia desde 2013, fueron asociados en 2015 con un 14,9% de los casos de GEA por RVA en una población no vacunada en el País Vasco, mostrando transmisión eficiente persona a persona. Además, que recombinantes intergenogrupo similares al descrito en este trabajo (G3P[8] de origen equino) y otros como los G1P[8] tipo DS-1, detectados en el Este de Asia desde 2012, podrían propagarse sin ser reconocidos en otros países ya que el G-/P-tipado, que es el sistema de clasificación más ampliamente utilizado para la vigilancia de RVA, no es capaz de identificar este tipo de reordenamientos intergenogrupo. Todo ello destaca la importancia de confirmar los resultados de tipado obtenidos por RT-PCR mediante secuenciación y de genotipar otro gen o genes distintos al G y P para permitir la identificación de eventos de transmisión interespecies o de reordenamiento. Aún se desconoce si la emergencia global de estas nuevas cepas recombinantes podría tener implicaciones en la efectividad de la vacuna de RVA.

6. CONCLUSIONES

- 1.- Rotavirus fue una causa importante de enfermedad a lo largo de todo el período de estudio, siendo la causa del 10,5% de las gastroenteritis agudas en niños menores de 5 años, porcentaje que ascendió al 30% en el período invernal.
- 2.- La incidencia media anual de la gastroenteritis aguda por rotavirus en los menores de cinco años de edad fue elevada (superior a 1000 casos/100.000 niños), observándose la mayor incidencia en los niños menores de 2 años de edad. Para su segundo cumpleaños, uno de cada 19 niños ha padecido una gastroenteritis por rotavirus confirmada virológicamente.
- 3.- Rotavirus se detectó esporádicamente en adultos, con una estacionalidad similar a la observada en población infantil, pero en contraste con lo observado en ésta, la incidencia de la infección entre los 5 y 30 años de edad no alcanzó los 10 casos/100.000 habitantes (cien veces menor que la observada en menores de 5 años). En adultos mayores de 79 años la tasa superó ligeramente los 40 casos/100.000 habitantes.
- 4.- El impacto de la infección por rotavirus en el Sistema Sanitario fue importante. Rotavirus fue la primera causa de hospitalización debida a gastroenteritis aguda en los menores de 5 años de edad, siendo el grupo etario más afectado el de 6 a 24 meses. En los menores de 5 años, la incidencia de hospitalización fue mayor de 100 casos/100.000 niños, siendo esta tasa cuatro veces más elevada en los de 6 a 12 meses de edad.
- 5.- La carga de la enfermedad, incluyendo la debida a las infecciones graves, disminuyó a lo largo del periodo de estudio.
- 6.- Las epidemias de gastroenteritis aguda por rotavirus estuvieron directamente relacionadas con el frío, comenzando habitualmente al final del otoño o inicio del invierno. En el último quinquenio y probablemente en relación con cambios en la climatología local, se produjo un retraso en su comienzo así como un acortamiento en la duración de las mismas, siendo más prolongados los períodos en los que no se detectó rotavirus circulante.

7.- Al analizar los genotipos de rotavirus no encontramos diferencias entre los detectados en niños menores de cinco años, niños mayores o adultos. Las infecciones de repetición fueron raras, siendo el G-tipo causante de la primoinfección y de la reinfección diferente en el 90% de los casos, y transcurriendo de media entre ambos episodios cerca de 20 meses. También fueron relativamente raras las infecciones mixtas, las cuales representaron poco más del 2% de los casos.

8.- En cada temporada epidémica se detectó la circulación de varios G-tipos, siendo uno o dos dominantes. G1P[8] fue el más frecuente siendo la causa de más de un tercio de los casos, seguido por los genotipos emergentes G9P[8] y G12P[8]. G1P[8] fue detectado todas las temporadas excepto una, mientras que el resto de los genotipos circularon de modo más intermitente, habiendo numerosas temporadas en las que algunos genotipos no fueron detectados.

9.- En el último quinquenio del estudio (período 2010 - 2015), rotavirus G12 fue el más frecuentemente detectado en Gipuzkoa, representando el 35% de los casos, siendo dominante en las temporadas 2010 - 2011, 2011 - 2012 y codominante en 2014 - 2015. El análisis del genoma completo de las cepas G12P[8] mostró escasa diversidad genética entre las cepas causantes de cada brote epidémico pero importantes diferencias entre las cepas de uno y otro brote, sugiriendo que las cepas epidémicas eran fruto de introducciones anuales.

10.- Entre los genotipos inusuales destacaron una cepa G3P[8] atípica con gen VP7 de origen equino y constelación tipo DS-1 y cepas con el P-tipo P[14], asociado a mamíferos artiodáctilos. La cepa atípica G3P[8] circuló en Gipuzkoa en la primavera de 2015 ocasionando más de 65 casos de gastroenteritis aguda. Los estudios filogenéticos sugirieron que esta cepa llegó a nuestro territorio procedente de Asia o Australia. El P-tipo P[14] se encontró en varias cepas asociado a G6, G8 y G10.

7. REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. Attoui H, Mertens P, Becnel J et al. Reoviridae. In: King A, Adams M, Carstens E *et al* eds. Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Waltham, MA, USA: Elsevier Academic Press, 2012; 497-650.
2. Martella V, Banyai K, Matthijnssens J et al. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2010; 140: 246-55.
3. Estes M, Greenberg HB. Rotaviruses. In: Knipe DN, Howley PM eds. Fields Virology. Philadelphia, PA: Lippincott-Williams and Wilkins Publishers, 2013; 1347–1401.
4. Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M et al. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol.* 2012; 157: 1177-82.
5. WHO. Rotavirus vaccines. WHO position paper - January 2013. *Wkly Epidemiol Rec.* 2013; 88: 49-64.
6. Velazquez FR. Protective effects of natural rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28: S54-6.
7. Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4: 91-9.
8. Ramani S, Sankaran P, Arumugam R et al. Comparison of viral load and duration of virus shedding in symptomatic and asymptomatic neonatal rotavirus infections. *J Med Virol.* 2010; 82: 1803-7.
9. Hoffmann T, Iturriza M, Faaborg-Andersen J et al. Prospective study of the burden of rotavirus gastroenteritis in Danish children and their families. *Eur J Pediatr.* 2011; 170: 1535-9.
10. Patel MM, Pitzer VE, Alonso WJ et al. Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2013; 32: e134-47.
11. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12: 136-41.
12. WHO. WHO estimate for January 2012. 2012: http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/rotavirus_estimates/en/index.html.

13. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 565-72.
14. Alvarez Aldean J, Aristegui J, Lopez-Belmonte JL et al. Economic and psychosocial impact of rotavirus infection in Spain: A literature review. *Vaccine.* 2014; 32: 3740-51.
15. Diez-Domingo J, Surinach NL, Alcalde NM et al. Burden of paediatric rotavirus gastroenteritis (RVGE) and potential benefits of a universal rotavirus vaccination programme with a pentavalent vaccine in Spain. *BMC Public Health.* 2010; 10: 469,2458-10-469.
16. Light JS, Hodes HL. Isolation from cases of infantile diarrhea of a filtrable agent causing diarrhea in calves. *J Exp Med.* 1949; 90: 113-35.
17. Mebus CA, Wyatt RG, Sharpee RL et al. Diarrhea in gnotobiotic calves caused by the reovirus-like agent of human infantile gastroenteritis. *Infect Immun.* 1976; 14: 471-4.
18. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973; 2: 1281-3.
19. Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Virus particles in gastroenteritis. *The Lancet.* 302: 1497.
20. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH et al. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet.* 1974; 1: 149-51.
21. Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet.* 1973; 2: 1497.
22. Flewett TH, Bryden AS, Davies H et al. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet.* 1974; 2: 61-3.
23. Walker-Smith J. Rotavirus gastroenteritis. *Arch Dis Child.* 1978; 53: 355-62.
24. Matthews RE. Third report of the international committee on taxonomy of viruses. classification and nomenclature of viruses. *Intervirology.* 1979; 12: 129-296.
25. Woode GN, Bridger JC, Jones JM et al. Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice, and foals. *Infect Immun.* 1976; 14: 804-10.

26. Beards GM, Brown DW. The antigenic diversity of rotaviruses: Significance to epidemiology and vaccine strategies. *Eur J Epidemiol.* 1988; 4: 1-11.
27. Urasawa T, Urasawa S, Taniguchi K. Sequential passages of human rotavirus in MA-104 cells. *Microbiol Immunol.* 1981; 25: 1025-35.
28. Vesikari T. Rotavirus vaccines against diarrhoeal disease. *Lancet.* 1997; 350: 1538-41.
29. McClain B, Settembre E, Temple BR et al. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 2010; 397: 587-99.
30. Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR et al. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *Embo J.* 2011; 30: 408-16.
31. Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med.* 2012; 13: 85-97.
32. Desselberger U. Genome rearrangements of rotaviruses. *Arch Virol Suppl.* 1996; 12: 37-51.
33. Kapikian A, Chanock R. Rotaviruses. In: Fields B, Knipe D, Howley P eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Press, 1996; 1657-1708.
34. Desselberger U, McCrae MA. The rotavirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994; 185: 31-66.
35. Gonzalez RA, Torres-Vega MA, Lopez S et al. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol.* 1998; 143: 981-96.
36. Estes M, Kapikian A. Rotaviruses. In: Knipe D, Griffin D, Lamb R et al eds. *Fields Virology*. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Wolters Kluwer Health; Lippincott, Williams and Wilkins, 2007; 1917-1975.
37. Lu X, McDonald SM, Tortorici MA et al. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure.* 2008; 16: 1678-88.
38. Liu M, Mattion NM, Estes MK. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology.* 1992; 188: 77-84.
39. Yeager M, Dryden KA, Olson NH et al. Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol.* 1990; 110: 2133-44.

40. Arias CF, Romero P, Alvarez V et al. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol.* 1996; 70: 5832-9.
41. Dormitzer PR, Sun ZY, Wagner G et al. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *Embo J.* 2002; 21: 885-97.
42. Aoki ST, Settembre EC, Trask SD et al. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing fab. *Science.* 2009; 324: 1444-7.
43. Matthijssens J, Ciarlet M, McDonald SM et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG). *Arch Virol.* 2011; 156: 1397-413.
44. Trojnar E, Sachsenroder J, Twardziok S et al. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol.* 2013; 94: 136-42.
45. Sachsenroder J, Braun A, Machnowska P et al. Metagenomic identification of novel enteric viruses in urban wild rats and genome characterization of a group A rotavirus. *J Gen Virol.* 2014; 95: 2734-47.
46. De Grazia S, Giammanco GM, Doro R et al. Identification of a multi-reassortant G12P[9] rotavirus with novel VP1, VP2, VP3 and NSP2 genotypes in a child with acute gastroenteritis. *Infect Genet Evol.* 2015; 35: 34-7.
47. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res.* 2014; 190: 75-96.
48. Mihalov-Kovacs E, Gellert A, Marton S et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21: 660-3.
49. Trojnar E, Otto P, Roth B et al. The genome segments of a group D rotavirus possess group A-like conserved termini but encode group-specific proteins. *J Virol.* 2010; 84: 10254-65.
50. Doro R, Farkas SL, Martella V et al. Zoonotic transmission of rotavirus: Surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015; 13: 1337-50.
51. Coulson BS. VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies. *Arch Virol Suppl.* 1996; 12: 113-8.

-
52. Gentsch JR, Glass RI, Woods P et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 1365-73.
53. Gouvea V, Glass RI, Woods P et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 276-82.
54. Ward ML, Mijatovic-Rustempasic S, Roy S et al. Molecular characterization of the first G24P[14] rotavirus strain detected in humans. *Infect Genet Evol.* 2016; 43: 338-42.
55. Iturriza-Gomara M, Dallman T, Banyai K 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: 895-909.
56. Payne DC, Staat MA, Edwards KM et al. Direct and indirect effects of rotavirus vaccination upon childhood hospitalizations in 3 US counties, 2006-2009. *Clin Infect Dis.* 2011; 53: 245-53.
57. Hungerford D, Iturriza-Gomara M. EuroRotaNet: Annual report 2015. 2016.
58. Payne DC, Szilagyi PG, Staat MA et al. Secular variation in United States rotavirus disease rates and serotypes: Implications for assessing the rotavirus vaccination program. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28: 948-53.
59. WHO. Rotavirus vaccines: An update. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009; 84: 533-40.
60. Zuridah H, Kirkwood CD, Bogdanovic-Sakran N et al. Circulating human group A rotavirus genotypes in Malaysia. *J Med Virol.* 2010; 82: 707-11.
61. O'Ryan M. The ever-changing landscape of rotavirus serotypes. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28: S60-2.
62. Banyai K, Laszlo B, Duque J et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 1: A122-30.
63. Jere KC, Sawyerr T, Seheri LM et al. A first report on the characterization of rotavirus strains in Sierra Leone. *J Med Virol.* 2011; 83: 540-50.
64. Binka E, Vermund SH, Armah GE. Rotavirus diarrhea among children less than 5 years of age in urban Ghana. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30: 716-8.

65. Armah GE, Steele AD, Esona MD et al. Diversity of rotavirus strains circulating in West Africa from 1996 to 2000. *J Infect Dis.* 2010; 202 Suppl: S64-71.
66. WHO. Global rotavirus information and surveillance bulletin. Reporting period: January through December 2010. *World Health Organization.* 2011; 4.
67. Wyatt RG, James WD, Bohl EH et al. Human rotavirus type 2: Cultivation in vitro. *Science.* 1980; 207: 189-91.
68. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R et al. Emergence and characterization of unusual DS-1-like G1P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Thailand. *PLoS One.* 2015; 10: e0141739.
69. Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N et al. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol.* 2014; 28: 426-33.
70. Abdel-Haq NM, Thomas RA, Asmar BI et al. Increased prevalence of G1P[4] genotype among children with rotavirus-associated gastroenteritis in metropolitan Detroit. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2680-2.
71. Ghosh S, Urushibara N, Chawla-Sarkar M et al. Whole genomic analyses of asymptomatic human G1P[6], G2P[6] and G3P[6] rotavirus strains reveal intergenogroup reassortment events and genome segments of artiodactyl origin. *Infect Genet Evol.* 2013; 16: 165-73.
72. Kalica AR, Greenberg HB, Espejo RT et al. Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. *Infect Immun.* 1981; 33: 958-61.
73. Clark HF, Lawley D, DiStefano D et al. An unusual outbreak of rotavirus genotype G2P[6] during the 2005-2006 epidemic season in philadelphia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 70: 218-22.
74. Fischer TK, Eugen-Olsen J, Pedersen AG et al. Characterization of rotavirus strains in a danish population: High frequency of mixed infections and diversity within the VP4 gene of P[8] strains. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1099-104.
75. Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: Implications for vaccine development. *J Infect Dis.* 1996; 174 Suppl 1: S30-6.

-
76. Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: Implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis.* 2005; 192 Suppl 1: S146-59.
77. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S et al. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol.* 2006; 78: 986-94.
78. Degiuseppe JI, Parra GI, Stupka JA. Genetic diversity of G3 rotavirus strains circulating in Argentina during 1998-2012 assessed by full genome analyses. *PLoS One.* 2014; 9: e110341.
79. Malasao R, Saito M, Suzuki A et al. Human G3P[4] rotavirus obtained in Japan, 2013, possibly emerged through a human-equine rotavirus reassortment event. *Virus Genes.* 2015; 50: 129-33.
80. McDonald SM, Matthijnsens J, McAllen JK et al. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: Balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000634.
81. Cowley D, Donato CM, Roczo-Farkas S et al. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J Gen Virol.* 2016; 97: 403-10.
82. Arana A, Montes M, Jere KC et al. 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.
83. Doro R, Marton S, Bartokne AH et al. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 - is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2016; 63: 243-55.
84. Mukherjee A, Ghosh S, Bagchi P et al. Full genomic analyses of human rotavirus G4P[4], G4P[6], G9P[19] and G10P[6] strains from north-eastern India: Evidence for interspecies transmission and complex reassortment events. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 1343-6.
85. Nagesha HS, Holmes IH. Direct serotyping of porcine rotaviruses using VP7-specific monoclonal antibodies by an enzyme immunoassay. *J Med Virol.* 1991; 35: 206-11.

86. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005; 15: 29-56.
87. Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MC et al. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1408-9.
88. Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A et al. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2011; 21: 89-109.
89. Li DD, Duan ZJ, Zhang Q et al. Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China. *J Clin Virol.* 2008; 42: 141-8.
90. Gerna G, Sarasini A, Parea M et al. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 9-16.
91. Palombo EA, Bishop RF. Genetic and antigenic characterization of a serotype G6 human rotavirus isolated in Melbourne, Australia. *J Med Virol.* 1995; 47: 348-54.
92. Kelkar SD, Ayachit VL. Circulation of group A rotavirus subgroups and serotypes in Pune, India, 1990-1997. *J Health Popul Nutr.* 2000; 18: 163-70.
93. Mullick S, Mukherjee A, Ghosh S et al. Genomic analysis of human rotavirus strains G6P[14] and G11P[25] isolated from Kolkata in 2009 reveals interspecies transmission and complex reassortment events. *Infect Genet Evol.* 2013; 14: 15-21.
94. Griffin DD, Nakagomi T, Hoshino Y 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; 294: 256-69.
95. Matthijnsens J, Potgieter CA, Ciarlet M et al. Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order artiodactyla? *J Virol.* 2009; 83: 2917-29.
96. Rahman M, De Leener K, Goegebuer T et al. Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] rotavirus. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2088-95.
97. Banyai K, Gentsch JR, Glass RI et al. Detection of human rotavirus serotype G6 in Hungary. *Epidemiol Infect.* 2003; 130: 107-12.

-
98. Banyai K, Gentsch JR, Glass RI et al. Eight-year survey of human rotavirus strains demonstrates circulation of unusual G and P types in Hungary. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 393-7.
99. El Sherif M, Esona MD, Wang Y et al. Detection of the first G6P[14] human rotavirus strain from a child with diarrhea in Egypt. *Infect Genet Evol.* 2011; 11: 1436-42.
100. Jere KC. Personal communication. Institute of Infection and Global Health. University of Liverpool. 2016.
101. Cilla G, Montes M, Gomariz M et al. Rotavirus genotypes in children in the Basque Country (Northern Spain) over a 13-year period (July 1996-June 2009). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29: 955-60.
102. Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R et al. Whole genomic analysis of an unusual human G6P[14] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea in Thailand: Evidence for bovine-to-human interspecies transmission and reassortment events. *PLoS One.* 2015; 10: e0139381.
103. Browning GF, Snodgrass DR, Nakagomi O et al. Human and bovine serotype G8 rotaviruses may be derived by reassortment. *Arch Virol.* 1992; 125: 121-8.
104. Papp H, Laszlo B, Jakab F et al. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet Microbiol.* 2013; 165: 190-9.
105. Heylen E, Zeller M, Ciarlet M et al. Comparative analysis of pentavalent rotavirus vaccine strains and G8 rotaviruses identified during vaccine trial in Africa. *Sci Rep.* 2015; 5: 14658.
106. Hasegawa A, Inouye S, Matsuno S et al. Isolation of human rotaviruses with a distinct RNA electrophoretic pattern from Indonesia. *Microbiol Immunol.* 1984; 28: 719-22.
107. Matsuno S, Hasegawa A, Mukoyama A et al. A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J Virol.* 1985; 54: 623-4.
108. Todd S, Page NA, Duncan Steele A et al. Rotavirus strain types circulating in Africa: Review of studies published during 1997-2006. *J Infect Dis.* 2010; 202 Suppl: S34-42.
109. Clark HF, Hoshino Y, Bell LM et al. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol.* 1987; 25: 1757-62.

110. Arista S, Vizzi E, Migliore MC et al. High incidence of G9P[8] rotavirus infections in Italian children during the winter season 1999-2000. *Eur J Epidemiol.* 2003; 18: 711-4.
111. Jain S, Vashist J, Changotra H. Rotaviruses: Is their surveillance needed? *Vaccine.* 2014; 32: 3367-78.
112. Teodoroff TA, Tsunemitsu H, Okamoto K et al. Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: Close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1377-84.
113. Santos N, Lima RC, Nozawa CM et al. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: Evidence for natural human-porcine genetic reassortment. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 2734-6.
114. Woode GN, Kelso NE, Simpson TF et al. Antigenic relationships among some bovine rotaviruses: Serum neutralization and cross-protection in gnotobiotic calves. *J Clin Microbiol.* 1983; 18: 358-64.
115. Steyer A, Bajzelj M, Iturriza-Gomara M et al. Molecular analysis of human group A rotavirus G10P[14] genotype in Slovenia. *J Clin Virol.* 2010; 49: 121-5.
116. Ramani S, Iturriza-Gomara M, Jana AK et al. Whole genome characterization of reassortant G10P[11] strain (N155) from a neonate with symptomatic rotavirus infection: Identification of genes of human and animal rotavirus origin. *J Clin Virol.* 2009; 45: 237-44.
117. Armah GE, Hoshino Y, Santos N et al. The global spread of rotavirus G10 strains: Detection in Ghanaian children hospitalized with diarrhea. *J Infect Dis.* 2010; 202 Suppl: S231-8.
118. Beards G, Xu L, Ballard A et al. A serotype 10 human rotavirus. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 1432-5.
119. Das M, Dunn SJ, Woode GN et al. Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (I321) have high levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 bovine rotavirus. *Virology.* 1993; 194: 374-9.
120. Iturriza Gomara M, Kang G, Mammen A et al. Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2541-7.

-
121. Coluchi N, Munford V, Manzur J et al. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1709-14.
122. Cowley D, Donato CM, Roczo-Farkas S et al. Novel G10P[14] rotavirus strain, Northern territory, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19: 1324-7.
123. Matsushima Y, Nakajima E, Nguyen TA et al. Genome sequence of an unusual human G10P[8] rotavirus detected in Vietnam. *J Virol.* 2012; 86: 10236-7.
124. Medici MC, Tummolo F, Bonica MB et al. Genetic diversity in three bovine-like human G8P[14] and G10P[14] rotaviruses suggests independent interspecies transmission events. *J Gen Virol.* 2015; 96: 1161-8.
125. Mukherjee A, Nayak MK, Roy T et al. Detection of human G10 rotavirus strains with similarity to bovine and bovine-like equine strains from untypable samples. *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 467-70.
126. Ruiz AM, Lopez IV, Lopez S et al. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. *J Virol.* 1988; 62: 4331-6.
127. Rahman M, Matthijnssens J, Nahar S et al. Characterization of a novel P[25],G11 human group a rotavirus. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3208-12.
128. Shim JO, Baek IH, Le VP et al. Molecular characterization of rotavirus diarrhea among children in South Korea: Detection of an unusual G11 strain. *Arch Virol.* 2011; 156: 887-92.
129. Matthijnssens J, Rahman M, Ciarlet M et al. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16: 625-30.
130. Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N et al. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: Implication for new G serotype specificity. *J Virol.* 1990; 64: 5640-4.
131. Pongsuwanna Y, Guntapong R, Chiwakul M et al. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1390-4.
132. Castello AA, Arguelles MH, Rota RP 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: 2046-50.

133. Ahmed K, Ahmed S, Mitui MT et al. Molecular characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh. *Virus Genes*. 2010; 40: 347-56.
134. Sharma S, Ray P, Gentsch JR et al. Emergence of G12 rotavirus strains in Delhi, India, in 2000 to 2007. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 1343-8.
135. Sherchand JB, Nakagomi O, Dove W et al. Molecular epidemiology of rotavirus diarrhea among children aged *J Infect Dis*. 2009; 200 Suppl 1: S182-7.
136. Rahman M, Matthijnssens J, Yang X et al. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J Virol*. 2007; 81: 2382-90.
137. Kokkinos PA, Ziros PG, Monini M et al. Rare types of rotaviruses isolated from children with acute gastroenteritis in Patras, Greece. *Intervirology*. 2013; 56: 237-41.
138. Cilla G, Montes M, Gomariz M et al. Rotavirus genotypes in children in the Basque Country (North of Spain): Rapid and intense emergence of the G12[P8] genotype. *Epidemiol Infect*. 2013; 141: 868-74.
139. Mijatovic-Rustempasic S, Teel EN, Kerin TK et al. Genetic analysis of G12P[8] rotaviruses detected in the largest U.S. G12 genotype outbreak on record. *Infect Genet Evol*. 2014; 21: 214-9.
140. Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M et al. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol*. 2010; 27: 2431-6.
141. Castello AA, Nakagomi T, Nakagomi O et al. Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: High similarity with Japanese and Korean G12 strains. *J Med Virol*. 2009; 81: 371-81.
142. Ghosh S, Varghese V, Samajdar S et al. Molecular characterization of a porcine group A rotavirus strain with G12 genotype specificity. *Arch Virol*. 2006; 151: 1329-44.
143. Midgley SE, Banyai K, Buesa J et al. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet Microbiol*. 2012; 156: 238-45.
144. Ndze VN, Achidi EA, Papp H et al. Shared G12 VP7 gene among human and bovine rotaviruses detected in Cameroonian villages. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2013; 60: 21-8.

-
145. Weinberg GA, Teel EN, Mijatovic-Rustempasic S et al. Detection of novel rotavirus strain by vaccine postlicensure surveillance. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19: 1321-3.
146. Solberg OD, Hasing ME, Trueba G et al. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology.* 2009; 385: 58-67.
147. Abe M, Ito N, Masatani T et al. Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. *J Gen Virol.* 2011; 92: 952-60.
148. My PV, Rabaa MA, Donato C et al. Novel porcine-like human G26P[19] rotavirus identified in hospitalized paediatric diarrhoea patients in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J Gen Virol.* 2014; 95: 2727-33.
149. Matthijssens J, Ciarlet M, Rahman M et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008; 153: 1621-9.
150. Matthijssens J, Ciarlet M, Heiman E 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: 3204-19.
151. Nakagomi O, Nakagomi T, Akatani K et al. Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization. *Mol Cell Probes.* 1989; 3: 251-61.
152. Heiman EM, McDonald SM, Barro M et al. Group A human rotavirus genomics: Evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J Virol.* 2008; 82: 11106-16.
153. Jere KC, Mlera L, O'Neill HG et al. Whole genome analyses of African G2, G8, G9, and G12 rotavirus strains using sequence-independent amplification and 454(R) pyrosequencing. *J Med Virol.* 2011; 83: 2018-42.
154. Gauchan P, Sasaki E, Nakagomi T et al. Whole genotype constellation of prototype feline rotavirus strains FRV-1 and FRV64 and their phylogenetic relationships with feline-like human rotavirus strains. *J Gen Virol.* 2015; 96: 338-50.
155. Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol.* 2004; 78: 10213-20.
156. Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B et al. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio.* 2010; 1: 10.1128/mBio.00265-10.

157. Ousingsawat J, Mirza M, Tian Y et al. Rotavirus toxin NSP4 induces diarrhea by activation of TMEM16A and inhibition of Na^+ absorption. *Pflugers Arch*. 2011; 461: 579-89.
158. Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10: 165-77.
159. Ruiz MC, Abad MJ, Charpilienne A et al. Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *J Gen Virol*. 1997; 78 (Pt 11): 2883-93.
160. McDonald SM, Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends Microbiol*. 2011; 19: 136-44.
161. Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. Rotavirus replication: Plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J Virol*. 2004; 78: 7763-74.
162. Au KS, Mattion NM, Estes MK. A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Virology*. 1993; 194: 665-73.
163. Blackhall J, Fuentes A, Magnusson G. Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology*. 1996; 225: 181-90.
164. Iturriza-Gomara M, Cubitt D, Steele D et al. Characterisation of rotavirus G9 strains isolated in the UK between 1995 and 1998. *J Med Virol*. 2000; 61: 510-7.
165. Maunula L, Von Bonsdorff CH. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: Analysis of Finnish rotavirus strains. *J Virol*. 2002; 76: 11793-800.
166. Iturriza-Gomara M, Isherwood B, Desselberger U et al. Reassortment in vivo: Driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol*. 2001; 75: 3696-705.
167. Nakagomi T, Doan YH, Dove W et al. G8 rotaviruses with conserved genotype constellations detected in Malawi over 10 years (1997-2007) display frequent gene reassortment among strains co-circulating in humans. *J Gen Virol*. 2013; 94: 1273-95.
168. Navarro A, Trask SD, Patton JT. Generation of genetically stable recombinant rotaviruses containing novel genome rearrangements and heterologous sequences by reverse genetics. *J Virol*. 2013; 87: 6211-20.

169. Schnepf N, Deback C, Dehee A et al. Rearrangements of rotavirus genomic segment 11 are generated during acute infection of immunocompetent children and do not occur at random. *J Virol.* 2008; 82: 3689-96.
170. Matthijnssens J, Mino S, Papp H et al. Complete molecular genome analyses of equine rotavirus A strains from different continents reveal several novel genotypes and a largely conserved genotype constellation. *J Gen Virol.* 2012; 93: 866-75.
171. Maestri RP, Kaiano JH, Neri DL et al. Phylogenetic analysis of probable non-human genes of group A rotaviruses isolated from children with acute gastroenteritis in Belem, Brazil. *J Med Virol.* 2012; 84: 1993-2002.
172. Ghosh S, Kobayashi N. Whole-genomic analysis of rotavirus strains: Current status and future prospects. *Future Microbiol.* 2011; 6: 1049-65.
173. Matthijnssens J, De Grazia S, Piessens J et al. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infect Genet Evol.* 2011; 11: 1396-406.
174. 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: 2630-5.
175. Park SI, Matthijnssens J, Saif LJ et al. Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in South Korea. *Vet Microbiol.* 2011; 152: 55-66.
176. Cook N, Bridger J, Kendall K et al. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect.* 2004; 48: 289-302.
177. Ward RL, Bernstein DI, Young EC et al. Human rotavirus studies in volunteers: Determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis.* 1986; 154: 871-80.
178. Kang G, Iturriza-Gomara M, Wheeler JG et al. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: Correlation with clinical severity in children in South India. *J Med Virol.* 2004; 73: 118-22.
179. Richardson S, Grimwood K, Gorrell R et al. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *Lancet.* 1998; 351: 1844-8.

180. Tuladhar E, Hazeleger WC, Koopmans M et al. Residual viral and bacterial contamination of surfaces after cleaning and disinfection. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78: 7769-75.
181. Parashar UD, Nelson EA, Kang G. Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *Bmj.* 2013; 347: f7204.
182. Blutt SE, Matson DO, Crawford SE et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med.* 2007; 4: e121.
183. Gilger MA, Matson DO, Conner ME et al. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J Pediatr.* 1992; 120: 912-7.
184. Ramig RF. Systemic rotavirus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5: 591-612.
185. Rath BA, Gentsch J, Seckinger J et al. Rotavirus encephalitis with basal ganglia involvement in an 8-month-old infant. *Clin Pediatr (Phila).* 2013; 52: 260-4.
186. Dickey M, Jamison L, Michaud L et al. Rotavirus meningoencephalitis in a previously healthy child and a review of the literature. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28: 318-21.
187. Zheng BJ, Chang RX, Ma GZ et al. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *J Med Virol.* 1991; 34: 29-37.
188. Marti I, Cilla G, Gomariz M et al. Rotavirus and seizures. A well-defined uncommon association. *An Pediatr (Barc).* 2010; 73: 70-3.
189. Fischer Walker CL, Fontaine O, Young MW et al. Zinc and low osmolarity oral rehydration salts for diarrhoea: A renewed call to action. *Bull World Health Organ.* 2009; 87: 780-6.
190. Telmesani AM. Oral rehydration salts, zinc supplement and rota virus vaccine in the management of childhood acute diarrhea. *J Family Community Med.* 2010; 17: 79-82.
191. WHO. Oral rehydration salts. Production of the new ORS. 2006.
192. Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ et al. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996; 335: 1022-8.
193. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr Opin Virol.* 2012; 2: 419-25.

-
194. Gladstone BP, Ramani S, Mukhopadhyaya I et al. Protective effect of natural rotavirus infection in an Indian birth cohort. *N Engl J Med*. 2011; 365: 337-46.
195. Vesikari T, Kapikian AZ, Delem A et al. A comparative trial of rhesus monkey (RRV-1) and bovine (RIT 4237) oral rotavirus vaccines in young children. *J Infect Dis*. 1986; 153: 832-9.
196. Christy C, Madore HP, Pichichero ME et al. Field trial of rhesus rotavirus vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J*. 1988; 7: 645-50.
197. Vesikari T. Trials of oral bovine and rhesus rotavirus vaccines in Finland: A historical account and present status. *Arch Virol Suppl*. 1996; 12: 177-86.
198. Jiang B, Wang Y, Glass RI. Does a monovalent inactivated human rotavirus vaccine induce heterotypic immunity? Evidence from animal studies. *Hum Vaccin Immunother*. 2013; 9: 1634-7.
199. Wen X, Cao D, Jones RW et al. Construction and characterization of human rotavirus recombinant VP8* subunit parenteral vaccine candidates. *Vaccine*. 2012; 30: 6121-6.
200. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM et al. 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: S65-72.
201. Dennehy PH. Rotavirus vaccines: An overview. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21: 198-208.
202. CDC. Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children. recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 1999; 48: 1-23.
203. CDC. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--United States, 1998-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1999; 48: 577-81.
204. Peter G, Myers MG, National Vaccine Advisory Committee et al. Intussusception, rotavirus, and oral vaccines: Summary of a workshop. *Pediatrics*. 2002; 110: e67.
205. BATTERY JP, DANCHIN MH, LEE KJ et al. Intussusception following rotavirus vaccine administration: Post-marketing surveillance in the national immunization program in Australia. *Vaccine*. 2011; 29: 3061-6.

206. Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006; 354: 11-22.
207. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2006; 354: 23-33.
208. Armah GE, Kapikian AZ, Vesikari T 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: 423-31.
209. Tate JE, Curns AT, Cortese MM et al. Burden of acute gastroenteritis hospitalizations and emergency department visits in US children that is potentially preventable by rotavirus vaccination: A probe study using the now-withdrawn Rotashield vaccine. *Pediatrics.* 2009; 123: 744-9.
210. WHO. Meeting of the immunization strategic advisory group of experts, April 2009--conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009; 84: 220-36.
211. Vesikari T, Van Damme P, Giaquinto C et al. European society for paediatric infectious diseases consensus recommendations for rotavirus vaccination in Europe: Update 2014. *Pediatr Infect Dis J.* 2015; 34: 635-43.
212. Perez N, Giaquinto C, Du Roure C et al. Rotavirus vaccination in Europe: Drivers and barriers. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14: 416-25.
213. PATH. Rotavirus vaccine introductions: Worldwide, PATH. 2016.
214. Gil-Prieto R, Gonzalez-Escalada A, Alvaro-Meca A et al. Impact of non-routine rotavirus vaccination on hospitalizations for diarrhoea and rotavirus infections in Spain. *Vaccine.* 2013; 31: 5000-4.
215. Ward RL, Bernstein DI. Rotarix: A rotavirus vaccine for the world. *Clin Infect Dis.* 2009; 48: 222-8.
216. O'Ryan M. Rotarix (RIX4414): An oral human rotavirus vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2007; 6: 11-9.
217. WHO. Rotarix package insert. 2009.

218. Matthijnssens J, Joelsson DB, Warakomski DJ et al. Molecular and biological characterization of the 5 human-bovine rotavirus (WC3)-based reassortant strains of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq. *Virology*. 2010; 403: 111-27.
219. Heaton PM, Ciarlet M. Vaccines: The pentavalent rotavirus vaccine: Discovery to licensure and beyond. *Clin Infect Dis*. 2007; 45: 1618-24.
220. WHO. RotaTeq package insert. 2008.
221. Karafillakis E, Hassounah S, Atchison C. Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in Europe, 2006-2014. *Vaccine*. 2015; 33: 2097-107.
222. Giaquinto C, Dominiak-Felden G, Van Damme P et al. Summary of effectiveness and impact of rotavirus vaccination with the oral pentavalent rotavirus vaccine: A systematic review of the experience in industrialized countries. *Hum Vaccin*. 2011; 7: 734-48.
223. Rha B, Tate JE, Payne DC et al. Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in the United States - 2006-2012. *Expert Rev Vaccines*. 2014; 13: 365-76.
224. Yen C, Tate JE, Hyde TB et al. Rotavirus vaccines: Current status and future considerations. *Hum Vaccin Immunother*. 2014; 10: 1436-48.
225. Glass RI, Parashar U, Patel M et al. Rotavirus vaccines: Successes and challenges. *J Infect*. 2014; 68 Suppl 1: S9-18.
226. Patel M, Shane AL, Parashar UD et al. Oral rotavirus vaccines: How well will they work where they are needed most? *J Infect Dis*. 2009; 200 Suppl 1: S39-48.
227. Patel M, Steele AD, Parashar UD. Influence of oral polio vaccines on performance of the monovalent and pentavalent rotavirus vaccines. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 1: A30-5.
228. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM et al. Jennerian and modified jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine. *Arch Virol Suppl*. 1996; 12: 163-75.
229. Bar-Zeev N, Kapanda L, Tate JE et al. Effectiveness of a monovalent rotavirus vaccine in infants in Malawi after programmatic roll-out: An observational and case-control study. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15: 422-8.

230. Groome MJ, Page N, Cortese MM 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: 1096-104.
231. Leshem E, Lopman B, Glass R et al. Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14: 847-56.
232. Buttery JP, Kirkwood CD. What can rotavirus vaccines teach us about rotavirus? *Lancet Infect Dis.* 2014; 14: 786-8.
233. Braeckman T, Van Herck K, Meyer N et al. Effectiveness of rotavirus vaccination in prevention of hospital admissions for rotavirus gastroenteritis among young children in Belgium: Case-control study. *Bmj.* 2012; 345: e4752.
234. Matthijnsens J, Zeller M, Heylen E et al. Higher proportion of G2P[4] rotaviruses in vaccinated hospitalized cases compared with unvaccinated hospitalized cases, despite high vaccine effectiveness against heterotypic G2P[4] rotaviruses. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: O702-10.
235. McClenahan SD, Krause PR, Uhlenhaut C. Molecular and infectivity studies of porcine circovirus in vaccines. *Vaccine.* 2011; 29: 4745-53.
236. Kuehn BM. FDA: Benefits of rotavirus vaccination outweigh potential contamination risk. *Jama.* 2010; 304: 30-1.
237. Martinon-Torres F, Aramburo A, Martinon-Torres N et al. A reverse evidence of rotavirus vaccines impact. *Hum Vaccin Immunother.* 2013; 9: 1289-91.
238. Bouzon Alejandro M, Diez Domingo J, Martinon-Torres F. Circovirus and impact of temporary withdrawal of rotavirus vaccines in Spain. *Hum Vaccin.* 2011; 7: 798-9.
239. Rippinger CM, Patton JT, McDonald SM. Complete genome sequence analysis of candidate human rotavirus vaccine strains RV3 and 116E. *Virology.* 2010; 405: 201-13.
240. Li D, Xu Z, Xie G et al. Genotype of rotavirus vaccine strain LLR in China is G10P[15]. *Bing Du Xue Bao.* 2015; 31: 170-3.
241. Cunliffe NA, Bresee JS, Hart CA. Rotavirus vaccines: Development, current issues and future prospects. *J Infect.* 2002; 45: 1-9.

-
242. Fu C, Wang M, Liang J et al. Effectiveness of lanzhou lamb rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis requiring hospitalization: A matched case-control study. *Vaccine*. 2007; 25: 8756-61.
243. Fu C, Tate JE, Jiang B. Effectiveness of lanzhou lamb rotavirus vaccine against hospitalized gastroenteritis: Further analysis and update. *Hum Vaccin*. 2010; 6: 953.
244. Fu C, He Q, Xu J et al. Effectiveness of the lanzhou lamb rotavirus vaccine against gastroenteritis among children. *Vaccine*. 2012; 31: 154-8.
245. Dang DA, Nguyen VT, Vu DT et al. A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 1: A114-21.
246. Bhandari N, Rongsen-Chandola T, Bavdekar A et al. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian children in the second year of life. *Vaccine*. 2014; 32 Suppl 1: A110-6.
247. Albert MJ, Unicomb LE, Barnes GL et al. Cultivation and characterization of rotavirus strains infecting newborn babies in Melbourne, Australia, from 1975 to 1979. *J Clin Microbiol*. 1987; 25: 1635-40.
248. Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E et al. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med*. 1983; 309: 72-6.
249. Bines JE, Danchin M, Jackson P et al. Safety and immunogenicity of RV3-BB human neonatal rotavirus vaccine administered at birth or in infancy: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15: 1389-97.
250. Dhingra MS, Kundu R, Gupta M et al. Evaluation of safety and immunogenicity of a live attenuated tetravalent (G1-G4) bovine-human reassortant rotavirus vaccine (BRV-TV) in healthy indian adults and infants. *Vaccine*. 2014; 32 Suppl 1: A117-23.
251. Zade JK, Kulkarni PS, Desai SA et al. Bovine rotavirus pentavalent vaccine development in india. *Vaccine*. 2014; 32 Suppl 1: A124-8.
252. Boom R, Sol CJ, Salimans MM et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990; 28: 495-503.

253. Iturriza-Gomara M, Cubitt D, Desselberger U et al. Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3796-8.
254. Iturriza-Gomara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: Keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol.* 2004; 31: 259-65.
255. Simmonds MK, Armah G, Asmah R et al. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *J Clin Virol.* 2008; 42: 368-73.
256. Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW et al. Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 4394-401.
257. Iturriza Gomara M, Wong C, Blome S et al. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: Correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol.* 2002; 76: 6596-601.
258. Chitambar SD, Arora R, Chhabra P. Molecular characterization of a rare G1P[19] rotavirus strain from india: Evidence of reassortment between human and porcine rotavirus strains. *J Med Microbiol.* 2009; 58: 1611-5.
259. Iturriza-Gómara M. EuroRotaNet: 7th year report. 2014.
260. Maes P, Matthijnssens J, Rahman M et al. RotaC: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 238,2180-9-238.
261. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 10881-90.
262. Nicholas KB, Nicholas H, Deerfield D. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *Embnew.News.* 1997; 4: .
263. Kearse M, Moir R, Wilson A et al. Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012; 28: 1647-9.
264. Tamura K, Stecher G, Peterson D et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30: 2725-9.

265. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.* 1999; 73: 152-60.
266. Cilla G, Gomariz M, Montes M et al. Incidence of hospitalization due to community-acquired rotavirus infection: A 12-year study (1996-2008). *Epidemiol Infect.* 2010; 138: 1235-41.
267. Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BV et al. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature.* 2004; 430: 1053-8.
268. Theamboonlers A, Maiklang O, Thongmee T et al. Complete genotype constellation of human rotavirus group A circulating in Thailand, 2008-2011. *Infect Genet Evol.* 2014; 21: 295-302.
269. De Grazia S, Bonura F, Colomba C et al. Data mining from a 27-years rotavirus surveillance in Palermo, Italy. *Infect Genet Evol.* 2014; 28: 377-84.
270. De Grazia S, Doro R, Bonura F et al. Complete genome analysis of contemporary G12P[8] rotaviruses reveals heterogeneity within Wa-like genomic constellation. *Infect Genet Evol.* 2016; 44: 85-93.
271. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R et al. Reassortment of human and animal rotavirus gene segments in emerging DS-1-like G1P[8] rotavirus strains. *PLoS One.* 2016; 11: e0148416.
272. Gulati BR, Deepa R, Singh BK et al. Diversity in Indian equine rotaviruses: Identification of genotype G10,P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 972-8.
273. De Grazia S, Martella V, Giammanco GM et al. Canine-origin G3P[3] rotavirus strain in child with acute gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 1091-3.
274. Donato CM, Manuelpillai NM, Cowley D et al. Genetic characterization of a novel G3P[14] rotavirus strain causing gastroenteritis in 12 year old Australian child. *Infect Genet Evol.* 2014; 25: 97-109.
275. Yamamoto SP, Kaida A, Kubo H et al. Gastroenteritis outbreaks caused by a DS-1-like G1P[8] rotavirus strain, Japan, 2012-2013. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20: 1030-3.

276. Bado AR, Susuman AS, Nebie EI. Trends and risk factors for childhood diarrhea in sub-Saharan countries (1990-2013): Assessing the neighborhood inequalities. *Glob Health Action*. 2016; 9: 30166.
277. Santosham M, Chandran A, Fitzwater S et al. Progress and barriers for the control of diarrhoeal disease. *Lancet*. 2010; 376: 63-7.
278. Diez-Domingo J, Baldo JM, Patrzalek M et al. Primary care-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis among children aged less than 5 years in six European countries. *Eur J Pediatr*. 2011; 170: 213-22.
279. Koch J, Wiese-Posselt M. Epidemiology of rotavirus infections in children less than 5 years of age: Germany, 2001-2008. *Pediatr Infect Dis J*. 2011; 30: 112-7.
280. Konstantopoulos A, Tragiannidis A, Fouzas S et al. Burden of rotavirus gastroenteritis in children *BMJ Open*. 2013; 3: e003570,2013-003570.
281. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016.
282. Ruggieri A, Anticoli S, D'Ambrosio A et al. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. *Ann Ist Super Sanita*. 2016; 52: 198-204.
283. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR et al. Rotavirus. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4: 561-70.
284. Linhares AC, Bresee JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 2000; 8: 305-31.
285. Atchison C, Iturriza-Gomara M, Tam C et al. Spatiotemporal dynamics of rotavirus disease in Europe: Can climate or demographic variability explain the patterns observed. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29: 566-8.
286. Turcios RM, Curns AT, Holman RC et al. Temporal and geographic trends of rotavirus activity in the United States, 1997-2004. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25: 451-4.
287. Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ et al. Rotavirus gastroenteritis and weather. *J Clin Microbiol*. 1982; 16: 478-82.
288. Haffejee IE. The epidemiology of rotavirus infections: A global perspective. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1995; 20: 275-86.

-
289. Levy K, Hubbard AE, Eisenberg JN. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: A systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2009; 38: 1487-96.
290. D'Souza RM, Hall G, Becker NG. Climatic factors associated with hospitalizations for rotavirus diarrhoea in children under 5 years of age. *Epidemiol Infect.* 2008; 136: 56-64.
291. Atchison CJ, Tam CC, Hajat S et al. Temperature-dependent transmission of rotavirus in Great Britain and the Netherlands. *Proc Biol Sci.* 2010; 277: 933-42.
292. Hervas D, Hervas-Masip J, Rosell A et al. Are hospitalizations for rotavirus gastroenteritis associated with meteorologic factors? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33: 1547-53.
293. Curns AT, Panozzo CA, Tate JE et al. Remarkable postvaccination spatiotemporal changes in United States rotavirus activity. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30: S54-5.
294. Aliabadi N, Tate JE, Haynes AK et al. Sustained decrease in laboratory detection of rotavirus after implementation of routine vaccination-United States, 2000-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015; 64: 337-42.
295. Hanquet G, Ducoffre G, Vergison A et al. Impact of rotavirus vaccination on laboratory confirmed cases in Belgium. *Vaccine.* 2011; 29: 4698-703.
296. Luchs A, Cilli A, Morillo SG et al. Rotavirus genotypes circulating in Brazil, 2007-2012: Implications for the vaccine program. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015; 57: 305-13.
297. Paulke-Korinek M, Kollaritsch H, Aberle SW et al. Sustained low hospitalization rates after four years of rotavirus mass vaccination in Austria. *Vaccine.* 2013; 31: 2686-91.
298. Martinon-Torres F, Martinon-Torres N, Bouzon Alejandro M et al. Acute gastroenteritis hospitalizations among children aged < 5 years before and after introduction of rotavirus vaccines: A hospital-based surveillance study in Galicia, Spain. *Hum Vaccin Immunother.* 2012; 8: 946-52.
299. Buesa J, Martinez-Costa C. Rotavirus infections, vaccines and virus variability. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014; 32: 277-9.
300. Gagneur A, Nowak E, Lemaitre T et al. Impact of rotavirus vaccination on hospitalizations for rotavirus diarrhea: The IVANHOE study. *Vaccine.* 2011; 29: 3753-9.

301. Marlow R, Ferreira M, Cordeiro E et al. Case control study of rotavirus vaccine effectiveness in Portugal during 6 years of private market use. *Pediatr Infect Dis J.* 2015; 34: 509-12.
302. Roue JM, Nowak E, Le Gal G et al. Impact of rotavirus vaccine on premature infants. *Clin Vaccine Immunol.* 2014; 21: 1404-9.
303. Hahne S, Hooiveld M, Vennema H et al. Exceptionally low rotavirus incidence in the Netherlands in 2013/14 in the absence of rotavirus vaccination. *Euro Surveill.* 2014; 19: 20945.
304. Pitzer VE, Viboud C, Simonsen L et al. Demographic variability, vaccination, and the spatiotemporal dynamics of rotavirus epidemics. *Science.* 2009; 325: 290-4.
305. Pitzer VE, Viboud C, Lopman BA et al. Influence of birth rates and transmission rates on the global seasonality of rotavirus incidence. *J R Soc Interface.* 2011; 8: 1584-93.
306. Atchison CJ, Lopman BA, Harris CJ et al. Clinical laboratory practices for the detection of rotavirus in England and Wales: Can surveillance based on routine laboratory testing data be used to evaluate the impact of vaccination? *Euro Surveill.* 2009; 14: 19217.
307. CDC. Rotavirus surveillance - worldwide, 2001-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2008; 57: 1255-1257.
308. Chang HG, Glass RI, Smith PF et al. Disease burden and risk factors for hospitalizations associated with rotavirus infection among children in New York state, 1989 through 2000. *Pediatr Infect Dis J.* 2003; 22: 808-14.
309. Patel MM, Tate JE, Selvarangan R et al. Routine laboratory testing data for surveillance of rotavirus hospitalizations to evaluate the impact of vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26: 914-9.
310. Bruijning-Verhagen P, Sankatsing V, Kunst A et al. Rotavirus-related hospitalizations are responsible for high seasonal peaks in all-cause pediatric hospitalizations. *Pediatr Infect Dis J.* 2012; 31: e244-9.
311. Bruun T, Salamanca BV, Bekkevold T et al. Burden of rotavirus disease in Norway: Using national registries for public health research. *Pediatr Infect Dis J.* 2016; 35: 396-400.
312. Payne DC, Staat MA, Edwards KM et al. Active, population-based surveillance for severe rotavirus gastroenteritis in children in the United States. *Pediatrics.* 2008; 122: 1235-43.

-
313. Fischer TK, Rungoe C, Jensen CS et al. The burden of rotavirus disease in Denmark 2009-2010. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30: e126-9.
314. Forster J, Guarino A, Perez N et al. Hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis among European children younger than 5 years of age. *Pediatrics.* 2009; 123: e393-400.
315. Mattei A, Sbarbati M, Fiasca F et al. Temporal trends in hospitalization for rotavirus gastroenteritis: A nationwide study in Italy, 2005-2012. *Hum Vaccin Immunother.* 2016; 12: 534-9.
316. Mirzayeva R, Cortese MM, Mosina L et al. Rotavirus burden among children in the newly independent states of the Former Union of Soviet Socialist Republics: Literature review and first-year results from the rotavirus surveillance network. *J Infect Dis.* 2009; 200 Suppl 1: S203-14.
317. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 304-6.
318. Rinder M, Tran AN, Bennet R et al. Burden of severe rotavirus disease leading to hospitalization assessed in a prospective cohort study in Sweden. *Scand J Infect Dis.* 2014; 46: 294-302.
319. Soriano-Gabarro M, Mrukowicz J, Vesikari T et al. Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25: S7-S11.
320. Van Damme P, Giaquinto C, Huet F et al. Multicenter prospective study of the burden of rotavirus acute gastroenteritis in Europe, 2004-2005: The REVEAL study. *J Infect Dis.* 2007; 195 Suppl 1: S4-S16.
321. Williams CJ, Lobanov A, Pebody RG. Estimated mortality and hospital admission due to rotavirus infection in the WHO European region. *Epidemiol Infect.* 2009; 137: 607-16.
322. Bellido-Blasco JB, Celades-Porcar ME, Tirado-Balaguer MD et al. Infectious diarrhea study in Castellon, Spain (EDICS): Population incidence of sporadic cases in 2004 and comparison with the year 2000. *Med Clin (Barc).* 2006; 127: 448-50.

323. Redondo-Gonzalez O, Tenias-Burillo JM. A multifactorial regression analysis of the features of community-acquired rotavirus requiring hospitalization in Spain as represented in the minimum basic data set. *Epidemiol Infect.* 2016; 144: 2509-16.
324. Desai R, Curns AT, Steiner CA et al. All-cause gastroenteritis and rotavirus-coded hospitalizations among US children, 2000-2009. *Clin Infect Dis.* 2012; 55: e28-34.
325. Saia M, Giliberti A, Callegaro G et al. Hospitalisation for rotavirus gastroenteritis in the paediatric population in the Veneto region, Italy. *BMC Public Health.* 2010; 10: 636,2458-10-636.
326. Kowalzik F, Zepp F, Hoffmann I et al. Disease burden of rotavirus gastroenteritis in children residing in Germany: A retrospective, hospital-based surveillance. *Pediatr Infect Dis J.* 2016; 35: 97-103.
327. David RL, Kirk MD. Rotavirus gastroenteritis hospitalisations following introduction of vaccination, Canberra. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2014; 38: E3-8.
328. Leshem E, Tate JE, Steiner CA et al. Acute gastroenteritis hospitalizations among US children following implementation of the rotavirus vaccine. *Jama.* 2015; 313: 2282-4.
329. Sabbe M, Berger N, Blommaert A et al. Sustained low rotavirus activity and hospitalisation rates in the post-vaccination era in Belgium, 2007 to 2014. *Euro Surveill.* 2016; 21: 10.2807/1560,7917.ES.2016.21.27.30273.
330. Chang HG, Smith PF, Tserenpuntsag B et al. Reduction in hospitalizations for diarrhea and rotavirus infections in New York state following introduction of rotavirus vaccine. *Vaccine.* 2010; 28: 754-8.
331. Paulke-Korinek M, Kundi M, Rendi-Wagner P et al. Herd immunity after two years of the universal mass vaccination program against rotavirus gastroenteritis in Austria. *Vaccine.* 2011; 29: 2791-6.
332. Visser LE, Cano Portero R, Gay NJ et al. Impact of rotavirus disease in Spain: An estimate of hospital admissions due to rotavirus. *Acta Paediatr Suppl.* 1999; 88: 72-6.
333. Gil A, Carrasco P, Jimenez R et al. Burden of hospitalizations attributable to rotavirus infection in children in Spain, period 1999-2000. *Vaccine.* 2004; 22: 2221-5.

334. Lopez-de-Andres A, Jimenez-Garcia R, Carrasco-Garrido P et al. Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in Spain, 2001-2005. *BMC Public Health*. 2008; 8: 109,2458-8-109.
335. Garcia-Basteiro AL, Bosch A, Sicuri E et al. Hospitalizations due to rotavirus gastroenteritis in Catalonia, Spain, 2003-2008. *BMC Res Notes*. 2011; 4: 429,0500-4-429.
336. Luquero Alcalde FJ, Eiros Bouza JM, Rubio AP et al. Gastroenteritis by rotavirus in Spanish children. Analysis of the disease burden. *Eur J Pediatr*. 2008; 167: 549-55.
337. Cilla G, Perez-Trallero GE, Pineiro LD et al. Hospitalizations for rotavirus gastroenteritis in gipuzkoa (basque country), Spain. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5: 834-5.
338. Gil A, Bayas J, Anegón M et al. Admisiones hospitalarias atribuibles a infección por rotavirus en Cataluña (período 1999-2000). *Vacunas*. 2005; 6: 123-7.
339. Gil de Miguel A, Carrasco Garrido P, Esteban Hernandez J et al. Burden of hospitalizations attributable to rotavirus infection in children in the Autonomous Region of Madrid, Spain, period 1999-2000. *An Pediatr (Barc)*. 2006; 64: 530-5.
340. Redondo O, Cano R, Simon L. Decline in rotavirus hospitalizations following the first three years of vaccination in Castile-La Mancha, Spain. *Hum Vaccin Immunother*. 2015; 11: 769-75.
341. Pont SJ, Carpenter LR, Griffin MR et al. Trends in healthcare usage attributable to diarrhea, 1995-2004. *J Pediatr*. 2008; 153: 777-82.
342. Martinot A, Pruvost I, Aurel M et al. Improvement in the management of acute diarrhoea in France? *Arch Pediatr*. 2007; 14 Suppl 3: S181-5.
343. Hahn S, Kim Y, Garner P. Reduced osmolarity oral rehydration solution for treating dehydration due to diarrhoea in children: Systematic review. *Bmj*. 2001; 323: 81-5.
344. Doro R, Laszlo B, Martella V et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect Genet Evol*. 2014; 28: 446-61.
345. Ianiro G, Delogu R, Fiore L et al. Genetic variability of VP7, VP4, VP6 and NSP4 genes of common human G1P[8] rotavirus strains circulating in Italy between 2010 and 2014. *Virus Res*. 2016; 220: 117-28.

346. Wilhelmi I, Mier C, Roman E et al. The molecular epidemiology of the rotavirus in Spanish children. The rotavirus study group (GER). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1999; 17: 509-14.
347. Buesa J, de Souza CO, Asensi M et al. VP7 and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from children with gastroenteritis over a 3-year period in Valencia, Spain. *Eur J Epidemiol*. 2000; 16: 501-6.
348. Sanchez-Fauquier A, Wilhelmi I, Colomina J et al. Diversity of group A human rotavirus types circulating over a 4-year period in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 1609-13.
349. Sánchez-Fauquier A. Changing epidemiology of rotavirus diarrhea in Spain. 1st European rotavirus biology meeting; apr 24–26; paris, france. In: 2005.
350. Diez-Domingo J, Martin IO, Sanz AB et al. Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Valencia, Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25: 455-7.
351. Van Damme P, Giaquinto C, Maxwell M et al. Distribution of rotavirus genotypes in Europe, 2004-2005: The REVEAL study. *J Infect Dis*. 2007; 195 Suppl 1: S17-25.
352. Sanchez-Fauquier A, Montero V, Moreno S et al. Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 1536-41.
353. Tellez Castillo CJ, Montava Vilaplana R, Fernandez Jimenez M et al. Predominance of G9 rotavirus in Valencia and Castellon between 2005 and 2007. *An Pediatr (Barc)*. 2010; 72: 49-54.
354. Sanchez-Fauquier A, Montero V, Colomina J et al. Global study of viral diarrhea in hospitalized children in Spain: Results of structural surveillance of viral gastroenteritis net work (VIGESS-net) 2006-2008. *J Clin Virol*. 2011; 52: 353-8.
355. Gutierrez-Gimeno MV, Martin-Moreno JM, Diez-Domingo J et al. Nosocomial rotavirus gastroenteritis in Spain: A multicenter prospective study. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29: 23-7.
356. Fernández-Jiménez M, Téllez-Castillo C, Carmona Vicente N et al. Vigilancia epidemiológica de rotavirus y emergencia de genotipos poco comunes en la comunidad valenciana y cataluña de 2003 a 2010 *XI Congreso Nacional De Virología. Granada*. 2011.

357. Sanchez-Fauquier A, Gonzalez-Galan V, Arroyo S et al. Monitoring of children with acute gastroenteritis in Madrid, Spain, during 2010-2011: Rotavirus genotype distribution after the vaccines introduction. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32: 280-4.
358. Steele AD, Ivanoff B. Rotavirus strains circulating in Africa during 1996-1999: Emergence of G9 strains and P[6] strains. *Vaccine*. 2003; 21: 361-7.
359. Arista S, Giammanco GM, De Grazia S et al. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. *J Virol*. 2006; 80: 10724-33.
360. Banyai K, Gentsch JR, Martella V et al. Trends in the epidemiology of human G1P[8] rotaviruses: A Hungarian study. *J Infect Dis*. 2009; 200 Suppl 1: S222-7.
361. Esona MD, Mijatovic-Rustempasic S, Foytich K et al. Human G9P[8] rotavirus strains circulating in Cameroon, 1999-2000: Genetic relationships with other G9 strains and detection of a new G9 subtype. *Infect Genet Evol*. 2013; 18: 315-24.
362. Gentsch JR, Hull JJ, Teel EN et al. G and P types of circulating rotavirus strains in the United States during 1996-2005: Nine years of prevaccine data. *J Infect Dis*. 2009; 200 Suppl 1: S99-S105.
363. Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L et al. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol*. 2006; 78: 273-80.
364. Kirkwood C, Bogdanovic-Sakran N, Clark R et al. Report of the Australian rotavirus surveillance program, 2001/2002. *Commun Dis Intell Q Rep*. 2002; 26: 537-40.
365. Kirkwood CD, Bogdanovic-Sakran N, Clark R et al. Report of the Australian rotavirus surveillance program 2002-03. *Commun Dis Intell Q Rep*. 2003; 27: 492-5.
366. Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103: 745-53.
367. Masendycz P, Bogdanovic-Sakran N, Palombo E et al. Annual report of the rotavirus surveillance programme, 1999/2000. *Commun Dis Intell*. 2000; 24: 195-8.
368. Masendycz P, Bogdanovic-Sakran N, Kirkwood C et al. Report of the Australian rotavirus surveillance program, 2000/2001. *Commun Dis Intell Q Rep*. 2001; 25: 143-6.

369. Rahman M, Matthijnsens J, Goegebuer T et al. Predominance of rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999-2003. *J Clin Virol.* 2005; 33: 1-6.
370. Zhou Y, Supawadee J, Khamwan C et al. Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand from 1995 to 1997. *J Med Virol.* 2001; 65: 619-28.
371. Zhou Y, Li L, Okitsu S et al. Distribution of human rotaviruses, especially G9 strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol Immunol.* 2003; 47: 591-9.
372. Nakagomi T, Ohshima A, Akatani K et al. Isolation and molecular characterization of a serotype 9 human rotavirus strain. *Microbiol Immunol.* 1990; 34: 77-82.
373. Hoshino Y, Honma S, Jones RW et al. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. *Virology.* 2005; 332: 177-88.
374. Seheri M, Namarude L, Peenze I et al. Update of rotavirus strains circulating in Africa from 2007 through 2011. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33 Suppl 1: S76-84.
375. Adiku TK, Dove W, Grosjean P et al. Molecular characterization of rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Madagascar during 2004-2005. *J Infect Dis.* 2010; 202 Suppl: S175-9.
376. Amarilla A, Espinola EE, Galeano ME et al. 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: CR333-7.
377. Bourdett-Stanziola L, Ortega-Barria E, Espinoza F et al. Rotavirus genotypes in Costa Rica, Nicaragua, Honduras and the Dominican Republic. *Intervirology.* 2010; 53: 390-3.
378. Espinoza F, Bucardo F, Paniagua M et al. Shifts of rotavirus g and p types in Nicaragua--2001-2003. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25: 1078-80.
379. Esteban LE, Rota RP, Gentsch JR et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004-2007: Reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. *J Med Virol.* 2010; 82: 1083-93.

380. Fischer TK, Steinsland H, Molbak K et al. Genotype profiles of rotavirus strains from children in a suburban community in Guinea-Bissau, Western Africa. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 264-7.
381. Fischer TK, Page NA, Griffin DD et al. Characterization of incompletely typed rotavirus strains from Guinea-Bissau: Identification of G8 and G9 types and a high frequency of mixed infections. *Virology.* 2003; 311: 125-33.
382. Nakagomi T, Chang BR, Nakagomi O. Rotavirus hospitalization and molecular epidemiology in Northern Japan, 1987-1996. *Vaccine.* 2009; 27 Suppl 5: F93-6.
383. Paul SK, Kobayashi N, Nagashima S et al. Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9 and G12 in Bangladesh: Evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults. *Arch Virol.* 2008; 153: 1999-2012.
384. Seheri LM, Page N, Dewar JB et al. Characterization and molecular epidemiology of rotavirus strains recovered in Northern Pretoria, South Africa during 2003-2006. *J Infect Dis.* 2010; 202 Suppl: S139-47.
385. Than VT, Kim W. Prevalence of rotavirus genotypes in South Korea in 1989-2009: Implications for a nationwide rotavirus vaccine program. *Korean J Pediatr.* 2013; 56: 465-73.
386. Trinh QD, Pham NT, Nguyen TA et al. Sequence analysis of the VP7 gene of human rotaviruses G2 and G4 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam during 2001-2003. *J Med Virol.* 2010; 82: 878-85.
387. O'Halloran F, Lynch M, Cryan B et al. Molecular characterization of rotavirus in Ireland: Detection of novel strains circulating in the population. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3370-4.
388. Tcheremenskaia O, Marucci G, De Petris S et al. Molecular epidemiology of rotavirus in Central and Southeastern Europe. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2197-204.
389. Matthijnssens J, Nakagomi O, Kirkwood CD et al. Group A rotavirus universal mass vaccination: How and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? *Expert Rev Vaccines.* 2012; 11: 1347-54.
390. Pitzer VE, Bilcke J, Heylen E et al. Did large-scale vaccination drive changes in the circulating rotavirus population in Belgium? *Sci Rep.* 2015; 5: 18585.

391. Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M et al. Rotavirus disease and vaccination: Impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009; 4: 1303-16.
392. Gurgel RQ, Alvarez Ade J, Rodrigues A et al. Incidence of rotavirus and circulating genotypes in Northeast Brazil during 7 years of national rotavirus vaccination. *PLoS One.* 2014; 9: e110217.
393. Soeorg H, Tamm E, Huik K et al. Group A rotavirus genotypes circulating prior to implementation of a national immunization program in Estonia. *Hum Vaccin Immunother.* 2012; 8: 465-9.
394. Trimis G, Koutsoumbari I, Kottaridi C et al. Hospital-based surveillance of rotavirus gastroenteritis in the era of limited vaccine uptake through the private sector. *Vaccine.* 2011; 29: 7292-5.
395. Zhirakovskaia EV, Aksanova RK, Gorbunova MG et al. Genetic diversity of group A rotavirus isolates found in Western Siberia in 2007-2011. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* 2012; (4): 33-41.
396. Bowen MD, Mijatovic-Rustempasic S, Esona MD et al. Rotavirus strain trends during the postlicensure vaccine era: United States, 2008-2013. *J Infect Dis.* 2016.
397. Hull JJ, Teel EN, Kerin TK et al. United States rotavirus strain surveillance from 2005 to 2008: Genotype prevalence before and after vaccine introduction. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30: S42-7.
398. Kirkwood C, Bogdanovic-Sakran N, Bishop R et al. Report of the Australian rotavirus surveillance program 2003-2004. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2004; 28: 481-5.
399. Kirkwood CD, Bogdanovic-Sakran N, Cannan D et al. National rotavirus surveillance program annual report, 2004-05. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2006; 30: 133-6.
400. Kirkwood CD, Cannan D, Bogdanovic-Sakran N et al. National rotavirus surveillance program annual report, 2005-06. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2006; 30: 434-8.
401. Kirkwood CD, Cannan D, Bogdanovic-Sakran N et al. Australian rotavirus surveillance program: Annual report, 2006-07. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2007; 31: 375-9.
402. Kirkwood CD, Cannan D, Boniface K et al. Australian rotavirus surveillance program annual report, 2007/08. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2008; 32: 425-9.

-
403. Kirkwood CD, Boniface K, Bishop RF et al. Australian rotavirus surveillance program annual report, 2008/2009. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2009; 33: 382-8.
404. Kirkwood CD, Boniface K, Bishop RF et al. Australian rotavirus surveillance program: Annual report, 2009/2010. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2010; 34: 427-34.
405. Kirkwood CD, Roczo S, Boniface K et al. Australian rotavirus surveillance program annual report, 2010/11. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2011; 35: 281-7.
406. Kirkwood CD, Roczo-Farkas S, Australian Rotavirus Surveillance Group. Australian rotavirus surveillance program annual report, 2013. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2014; 38: E334-42.
407. Kirkwood CD, Roczo-Farkas S, Bishop RF et al. Australian rotavirus surveillance program annual report, 2012. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2014; 38: E.
408. Kirkwood CD, Roczo-Farkas S, Australian Rotavirus Surveillance Group. Australian rotavirus surveillance program annual report, 2014. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2015; 39: E337-46.
409. Kawai K, O'Brien MA, Goveia MG et al. Burden of rotavirus gastroenteritis and distribution of rotavirus strains in Asia: A systematic review. *Vaccine.* 2012; 30: 1244-54.
410. Mwenda JM, Ntoto KM, Abebe A et al. Burden and epidemiology of rotavirus diarrhea in selected African countries: Preliminary results from the African rotavirus surveillance network. *J Infect Dis.* 2010; 202 Suppl: S5-S11.
411. Khawaja S, Cardellino A, Mast TC. Hospital-based surveillance and analysis of genotype variation in Nicaragua after the introduction of the pentavalent rotavirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33: e25-8.
412. Bucardo F, Mercado J, Reyes Y et al. Large increase of rotavirus diarrhoea in the hospital setting associated with emergence of G12 genotype in a highly vaccinated population in Nicaragua. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21: 603.e1,603.e7.
413. Breiman RF, Zaman K, Armah G et al. Analyses of health outcomes from the 5 sites participating in the Africa and Asia clinical efficacy trials of the oral pentavalent rotavirus vaccine. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 1: A24-9.

414. Caillere N, Vilain P, Brottet E et al. A major outbreak of gastroenteritis in Reunion Island in 2012: First identification of G12 rotavirus on the island. *Euro Surveill.* 2013; 18: 20476.
415. Kamiya H, Nakano T, Kamiya H et al. Rotavirus-associated acute gastroenteritis hospitalizations among Japanese children aged. *Jpn J Infect Dis.* 2011; 64: 482-7.
416. Kuzuya M, Fujii R, Hamano M et al. Prevalence and molecular characterization of G1P[8] human rotaviruses possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan. *J Med Virol.* 2014; 86: 1056-64.
417. Maiklang O, Vutithanachot V, Vutithanachot C et al. Prevalence of group A genotype human rotavirus among children with diarrhea in Thailand, 2009-2011. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2012; 43: 904-16.
418. Ngo TC, Nguyen BM, Dang DA et al. Molecular epidemiology of rotavirus diarrhoea among children in Haiphong, Vietnam: The emergence of G3 rotavirus. *Vaccine.* 2009; 27 Suppl 5: F75-80.
419. Pietsch C, Schuster V, Liebert UG. A hospital based study on inter- and intragenotypic diversity of human rotavirus A VP4 and VP7 gene segments, Germany. *J Clin Virol.* 2011; 50: 136-41.
420. Stupka JA, Degiuseppe JI, Parra GI et al. Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008-2009: Whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains. *J Clin Virol.* 2012; 54: 162-7.
421. Thongprachum A, Chan-it W, Khamrin P et al. Reemergence of new variant G3 rotavirus in Japanese pediatric patients, 2009-2011. *Infect Genet Evol.* 2013; 13: 168-74.
422. Wang YH, Kobayashi N, Zhou X et al. Phylogenetic analysis of rotaviruses with predominant G3 and emerging G9 genotypes from adults and children in Wuhan, China. *J Med Virol.* 2009; 81: 382-9.
423. Wang YH, Zhou X, Ghosh S et al. Prevalence of human rotavirus genotypes in Wuhan, China, during 2008-2011: Changing trend of predominant genotypes and emergence of strains with the P[8]b subtype of the VP4 gene. *Arch Virol.* 2011; 156: 2221-31.

424. de Rougemont A, Kaplon J, Fremy C et al. Clinical severity and molecular characteristics of circulating and emerging rotaviruses in young children attending hospital emergency departments in France. *Clin Microbiol Infect.* 2016.
425. Cascio A, Vizzi E, Alaimo C et al. Rotavirus gastroenteritis in Italian children: Can severity of symptoms be related to the infecting virus? *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 1126-32.
426. Linhares AC, Verstraeten T, Wolleswinkel-van den Bosch J et al. Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 312-4.
427. Mwenda JM, Tate JE, Parashar UD et al. African rotavirus surveillance network: A brief overview. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33 Suppl 1: S6-8.
428. Iturriza-Gomara M, Gray J. EuroRotaNet: 5thYear report. 2012.
429. Gerna G, Sears J, Hoshino Y et al. Identification of a new VP4 serotype of human rotaviruses. *Virology.* 1994; 200: 66-71.
430. Ciarlet M, Hoffmann C, Lorusso E et al. Genomic characterization of a novel group A lamb rotavirus isolated in Zaragoza, Spain. *Virus Genes.* 2008; 37: 250-65.
431. Arista S, Vizzi E, Alaimo C et al. Identification of human rotavirus strains with the P[14] genotype by PCR. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 2706-8.
432. Banyai K, Bogdan A, Domonkos G et al. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. *J Med Virol.* 2009; 81: 362-70.
433. Banyai K, Martella V, Molnar P et al. Genetic heterogeneity in human G6P[14] rotavirus strains detected in Hungary suggests independent zoonotic origin. *J Infect.* 2009; 59: 213-5.
434. De Grazia S, Martella V, Rotolo V et al. Molecular characterization of genotype G6 human rotavirus strains detected in Italy from 1986 to 2009. *Infect Genet Evol.* 2011; 11: 1449-55.
435. Diwakarla S, Clark R, Palombo EA. Expanding distribution of human serotype G6 rotaviruses in Australia. *Microbiol Immunol.* 2002; 46: 499-502.
436. Donato CM, Ch'ng LS, Boniface KF et al. Identification of strains of RotaTaq rotavirus vaccine in infants with gastroenteritis following routine vaccination. *J Infect Dis.* 2012; 206: 377-83.

437. Markkula J, Hemming M, Vesikari T. Detection of vaccine-derived rotavirus strains in nonimmunocompromised children up to 3-6 months after RotaTeq(R) vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2015; 34: 296-8.
438. Snodgrass DR, Fitzgerald T, Campbell I et al. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 504-7.
439. Adah MI, Nagashima S, Wakuda M et al. Close relationship between G8-serotype bovine and human rotaviruses isolated in Nigeria. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3945-50.
440. Cunliffe NA, Gentsch JR, Kirkwood CD et al. Molecular and serologic characterization of novel serotype G8 human rotavirus strains detected in Blantyre, Malawi. *Virology.* 2000; 274: 309-20.
441. Jere KC, Mlera L, O'Neill HG et al. Whole genome sequence analyses of three african bovine rotaviruses reveal that they emerged through multiple reassortment events between rotaviruses from different mammalian species. *Vet Microbiol.* 2012; 159: 245-50.
442. Cunliffe NA, Ngwira BM, Dove W et al. Epidemiology of rotavirus infection in children in Blantyre, Malawi, 1997-2007. *J Infect Dis.* 2010; 202 Suppl: S168-74.
443. Gautam R, Mijatovic-Rustempasic S, Roy S et al. Full genomic characterization and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain detected in a sample from Guatemala. *Infect Genet Evol.* 2015; 33: 206-11.
444. Mijatovic-Rustempasic S, Roy S, Sturgeon M et al. Full-genome sequence of the first G8P[14] rotavirus strain detected in the United States. *Genome Announc.* 2015; 3: 10.1128/genomeA.00677-15.
445. Mandal P, Mullick S, Nayak MK et al. Complete genotyping of unusual species A rotavirus G12P[11] and G10P[14] isolates and evidence of frequent in vivo reassortment among the rotaviruses detected in children with diarrhea in Kolkata, India, during 2014. *Arch Virol.* 2016.
446. Banerjee I, Gladstone BP, Le Fevre AM et al. Neonatal infection with G10P[11] rotavirus did not confer protection against subsequent rotavirus infection in a community cohort in Vellore, South India. *J Infect Dis.* 2007; 195: 625-32.

447. Moulton LH, Staat MA, Santosham M et al. The protective effectiveness of natural rotavirus infection in an American Indian population. *J Infect Dis.* 1998; 178: 1562-6.
448. O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK et al. Molecular epidemiology of rotavirus in children attending day care centers in Houston. *J Infect Dis.* 1990; 162: 810-6.
449. Ward RL, Bernstein DI. Protection against rotavirus disease after natural rotavirus infection. US rotavirus vaccine efficacy group. *J Infect Dis.* 1994; 169: 900-4.
450. Montenegro FM, Falbo AR, Germano EM et al. Reduction in rotavirus disease and sustained predominance of G2P[4] rotavirus strain following introduction of rotavirus vaccine in Recife, Brazil. *J Trop Pediatr.* 2015; 61: 206-9.
451. Snelling TL, Andrews RM, Kirkwood CD et al. Case-control evaluation of the effectiveness of the G1P[8] human rotavirus vaccine during an outbreak of rotavirus G2P[4] infection in Central Australia. *Clin Infect Dis.* 2011; 52: 191-9.
452. Anderson EJ, Katz BZ, Polin JA et al. Rotavirus in adults requiring hospitalization. *J Infect.* 2012; 64: 89-95.
453. Anderson EJ, Shippee DB, Weinrobe MH et al. Indirect protection of adults from rotavirus by pediatric rotavirus vaccination. *Clin Infect Dis.* 2013; 56: 755-60.
454. Anderson EJ, Shippee DB, Tate JE et al. Clinical characteristics and genotypes of rotavirus in adults. *J Infect.* 2015; 70: 683-7.
455. Bresee JS, Marcus R, Venezia RA et al. The etiology of severe acute gastroenteritis among adults visiting emergency departments in the United States. *J Infect Dis.* 2012; 205: 1374-81.
456. Jansen A, Stark K, Kunkel J et al. Aetiology of community-acquired, acute gastroenteritis in hospitalised adults: A prospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2008; 8: 143,2334-8-143.
457. Scallan E, Jones TF, Cronquist A et al. Factors associated with seeking medical care and submitting a stool sample in estimating the burden of foodborne illness. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; 3: 432-8.
458. Dorleans F, Falkenhorst G, Bottiger B et al. A case-control study of risk factors for rotavirus infections in adults, Denmark, 2005-2009. *Epidemiol Infect.* 2016; 144: 560-6.

459. Cox MJ, Medley GF. Serological survey of anti-group A rotavirus IgM in UK adults. *Epidemiol Infect.* 2003; 131: 719-26.
460. Nakajima H, Nakagomi T, Kamisawa T et al. Winter seasonality and rotavirus diarrhoea in adults. *Lancet.* 2001; 357: 1950.
461. Barret AS, Jourdan-da Silva N, Ambert-Balay K et al. Surveillance for outbreaks of gastroenteritis in elderly long-term care facilities in France, november 2010 to may 2012. *Euro Surveill.* 2014; 19: 20859.
462. Luque Fernandez MA, Galmes Truyols A, Herrera Guibert D et al. Cohort study of an outbreak of viral gastroenteritis in a nursing home for elderly, Majorca, Spain, february 2008. *Euro Surveill.* 2008; 13: 19070.
463. Pacilli M, Cortese MM, Smith S et al. Outbreak of gastroenteritis in adults due to rotavirus genotype G12P[8]. *Clin Infect Dis.* 2015; 61: e20-5.
464. Trop Skaza A, Beskovnik L, Zohar Cretnik T. Outbreak of rotavirus gastroenteritis in a nursing home, Slovenia, December 2010. *Euro Surveill.* 2011; 16: 19837.
465. Cardemil CV, Cortese MM, Medina-Marino A et al. Two rotavirus outbreaks caused by genotype G2P[4] at large retirement communities: Cohort studies. *Ann Intern Med.* 2012; 157: 621-31.
466. Tatte VS, Gentsch JR, Chitambar SD. Characterization of group A rotavirus infections in adolescents and adults from Pune, India: 1993-1996 and 2004-2007. *J Med Virol.* 2010; 82: 519-27.
467. Tatte VS, Chothe NS, Chitambar SD. Characterisation of rotavirus strains identified in adolescents and adults with acute gastroenteritis highlights circulation of non-typeable strains: 2008-2012. *Vaccine.* 2014; 32 Suppl 1: A68-74.
468. Luchs A, Cilli A, Morillo SG et al. Detection of the emerging rotavirus G12P[8] genotype at high frequency in Brazil in 2014: Successive replacement of predominant strains after vaccine introduction. *Acta Trop.* 2016; 156: 87-94.
469. Delogu R, Ianiro G, Camilloni B et al. Unexpected spreading of G12P[8] rotavirus strains among young children in a small area of Central Italy. *J Med Virol.* 2015; 87: 1292-302.

470. Giammanco GM, Bonura F, DI Bernardo F et al. Introduction and prolonged circulation of G12 rotaviruses in Sicily. *Epidemiol Infect.* 2016; 144: 1943-50.
471. Page AL, Jusot V, Mamaty AA et al. Rotavirus surveillance in urban and rural areas of Niger, April 2010-March 2012. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20: 573-80.
472. Shinozaki K, Okada M, Nagashima S et al. Characterization of human rotavirus strains with G12 and P[9] detected in Japan. *J Med Virol.* 2004; 73: 612-6.
473. Pietruchinski E, Benati F, Lauretti F et al. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: Distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. *J Med Virol.* 2006; 78: 1241-9.
474. Martinez M, Amarilla AA, Galeano ME et al. Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asuncion, Paraguay, 2006-2007. *Arch Virol.* 2010; 155: 525-33.
475. Page NA, de Beer MC, Seheri LM et al. The detection and molecular characterization of human G12 genotypes in South Africa. *J Med Virol.* 2009; 81: 106-13.
476. de Rougemont A, Kaplon J, Pillet S et al. Molecular and clinical characterization of rotavirus from diarrheal infants admitted to pediatric emergency units in France. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30: 118-24.
477. Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Bufon TL et al. Rotavirus genotypes in Slovenia: Unexpected detection of G8P[8] and G12P[8] genotypes. *J Med Virol.* 2007; 79: 626-32.
478. Banyai K, Bogdan A, Kisfali P et al. Emergence of serotype G12 rotaviruses, Hungary. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 916-9.
479. Ghosh S, Kobayashi N, Nagashima S et al. Full genomic analysis and possible origin of a porcine G12 rotavirus strain RU172. *Virus Genes.* 2010; 40: 382-8.
480. Halaihel N, Masia RM, Fernandez-Jimenez M et al. Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs. *Epidemiol Infect.* 2010; 138: 542-8.
481. Buesa J, Vila-Vicente S, Fernández-Jimenez M et al. Emergence and evolution of G12P[8] rotavirus strains in Spain. The 6th European Rotavirus Biology Meeting (ERBM), may 17-20, 2015. Dijon (France). In: 2015.

482. Ide T, Komoto S, Higo-Moriguchi K et al. Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Myanmar. *PLoS One*. 2015; 10: e0124965.
483. Tra My PV, Rabaa MA, Vinh H et al. The emergence of rotavirus G12 and the prevalence of enteric viruses in hospitalized pediatric diarrheal patients in Southern Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85: 768-75.
484. Wangchuk S, Mitui MT, Tshering K et al. Dominance of emerging G9 and G12 genotypes and polymorphism of VP7 and VP4 of rotaviruses from Bhutanese children with severe diarrhea prior to the introduction of vaccine. *PLoS One*. 2014; 9: e110795.
485. Alam MM, Malik SA, Shaukat S et al. Genetic characterization of rotavirus subtypes in Pakistan-first report of G12 genotype from Pakistan under WHO-Eastern Mediterranean region. *Virus Res*. 2009; 144: 280-4.
486. Aly M, Al Khairy A, Al Johani S et al. Unusual rotavirus genotypes among children with acute diarrhea in Saudi Arabia. *BMC Infect Dis*. 2015; 15: 192,015-0923-y.
487. Ahmed S, Klena J, Albana A et al. Characterization of human rotaviruses circulating in Iraq in 2008: Atypical G8 and high prevalence of P[6] strains. *Infect Genet Evol*. 2013; 16: 212-7.
488. Mouna BH, Hamida-Rebai MB, Heylen E et al. Sequence and phylogenetic analyses of human rotavirus strains: Comparison of VP7 and VP8(*) antigenic epitopes between Tunisian and vaccine strains before national rotavirus vaccine introduction. *Infect Genet Evol*. 2013; 18: 132-44.
489. Ndze VN, Papp H, Achidi EA et al. One year survey of human rotavirus strains suggests the emergence of genotype G12 in Cameroon. *J Med Virol*. 2013; 85: 1485-90.
490. Oluwatoyin Japhet M, Adeyemi Adesina O, Famurewa O et al. Molecular epidemiology of rotavirus and norovirus in Ile-Ife, Nigeria: High prevalence of G12P[8] rotavirus strains and detection of a rare norovirus genotype. *J Med Virol*. 2012; 84: 1489-96.
491. Pukuta ES, Esona MD, Nkongolo A et al. Molecular surveillance of rotavirus infection in the Democratic Republic of the Congo August 2009 to June 2012. *Pediatr Infect Dis J*. 2014; 33: 355-9.

492. Heylen E, Batoko Likele B, Zeller M et al. Rotavirus surveillance in Kisangani, the Democratic Republic of the Congo, reveals a high number of unusual genotypes and gene segments of animal origin in non-vaccinated symptomatic children. *PLoS One*. 2014; 9: e100953.
493. Komoto S, Wandera Apondi E, Shah M et al. Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Kenya: Identification of porcine-like NSP4 genes. *Infect Genet Evol*. 2014; 27: 277-93.
494. Cunliffe NA, Ngwira BM, Dove W et al. Serotype G12 rotaviruses, Lilongwe, Malawi. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15: 87-90.
495. Tort LF, Victoria M, Lizasoain AA et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus among children admitted to hospital in Salto, Uruguay, 2011-2012: First detection of the emerging genotype G12. *J Med Virol*. 2015; 87: 754-63.
496. Espejo PW, Peralta FO, Pacheres HC et al. Diarrhoea caused by rotavirus in a regional Peruvian hospital: Determination of circulating genotypes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014; 108: 425-30.
497. Gonzalez-Ochoa G, J G, Calleja-Garcia PM et al. Detection of emerging rotavirus G12P[8] in Sonora, Mexico. *Acta Virol*. 2016; 60: 136-42.
498. Ansari S, Sherchand JB, Rijal BP et al. Characterization of rotavirus causing acute diarrhoea in children in Kathmandu, Nepal, showing the dominance of serotype G12. *J Med Microbiol*. 2013; 62: 114-20.
499. Freeman MM, Kerin T, Hull J et al. Phylogenetic analysis of novel G12 rotaviruses in the United States: A molecular search for the origin of a new strain. *J Med Virol*. 2009; 81: 736-46.
500. Langa JS, Thompson R, Arnaldo P et al. Epidemiology of rotavirus A diarrhea in Chokwe, Southern Mozambique, from February to September, 2011. *J Med Virol*. 2016.
501. da Silva MF, Fumian TM, Santos de Assis RM et al. VP7 and VP8* genetic characterization of group A rotavirus genotype G12P[8]: Emergence and spreading in the Eastern Brazilian coast in 2014. *J Med Virol*. 2016.

502. Ndze VN, Esona MD, Achidi EA et al. Full genome characterization of human rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010-2011: Diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect Genet Evol.* 2014; 28: 537-60.
503. Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol.* 2012; 2: 426-33.
504. Adah MI, Rohwedder A, Olaleyle OD et al. Nigerian rotavirus serotype G8 could not be typed by PCR due to nucleotide mutation at the 3' end of the primer binding site. *Arch Virol.* 1997; 142: 1881-7.
505. Aladin F, Nawaz S, Iturriza-Gomara M et al. Identification of G8 rotavirus strains determined as G12 by rotavirus genotyping PCR: Updating the current genotyping methods. *J Clin Virol.* 2010; 47: 340-4.
506. Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW et al. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: Implications for reverse transcription-PCR genotyping. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 898-901.
507. Mitui MT, Chandrasena TN, Chan PK et al. Inaccurate identification of rotavirus genotype G9 as genotype G3 strains due to primer mismatch. *Virol J.* 2012; 9: 144,422X-9-144.
508. Medici MC, Tummolo F, Martella V et al. Whole genome sequencing reveals genetic heterogeneity of G3P[8] rotaviruses circulating in Italy. *Infect Genet Evol.* 2016; 40: 253-61.
509. Doro R, Mihalov-Kovacs E, Marton S et al. Large-scale whole genome sequencing identifies country-wide spread of an emerging G9P[8] rotavirus strain in Hungary, 2012. *Infect Genet Evol.* 2014; 28: 495-512.
510. Heylen E, Zeller M, Ciarlet M et al. Complete genetic characterization of human G2P[6] and G3P[6] rotavirus strains. *Infect Genet Evol.* 2013; 13: 27-35.
511. Ianiro G, Delogu R, Fiore L et al. Genomic characterization of uncommon human G3P[6] rotavirus strains causing diarrhea in children in Italy in 2009. *Infect Genet Evol.* 2015; 33: 143-9.

8. APÉNDICES

Apéndice I

Cobertura vacunal frente a rotavirus en Gipuzkoa

Tabla AI-1.- Unidades de la vacuna frente a rotavirus RotaTeq[®] dispensadas por las tres distribuidoras farmacéuticas principales a las farmacias de Gipuzkoa en 2013, 2014 y 2015 y número de niños nacidos vivos (Fuente: Eustat) para el cálculo de la cobertura vacunal.

Año	Distribuidora farmacéutica			Total unidades RotaTeq [®]	Vacunación completa (3 dosis)	Nacimientos Gipuzkoa	Cobertura vacunal
	1	2	3				
2013	874	94	33	1001	334	6287	5,3%
2014	753	41	21	815	272	6361	4,3%
2015	883	60	20	963	321	6359	5,1%

Apéndice II

Epidemias de rotavirus

Tabla AII-1.-Características de las epidemias por rotavirus ocurridas en el periodo 1995 - 2015 en Gipuzkoa (I).

TEMPORADA	Nº CASOS	GENOTIPO DOMINANTE	DURACIÓN (meses)	INICIO	PICO MÁXIMO (nº casos)	FINAL
1995 - 1996	330	G1, G4	7	Noviembre	Enero (104)	Mayo
1996 - 1997	423	G1	9	Noviembre	Diciembre (88)	Julio
1997 - 1998	420	G4	5	Diciembre	Febrero (158)	Abril
1998 - 1999	442	G1	3	Enero	Febrero (191)	Marzo
1999 - 2000	492	G1	7	Octubre	Noviembre (135)	Abril
2000 - 2001	396	G1	8	Septiembre	Noviembre (87)	Abril
2001 - 2002	302	G1	5	Septiembre	Octubre (81)	Enero
2002 - 2003	378	G1	4	Noviembre	Diciembre (157)	Febrero
2003 - 2004	423	G2	5	Diciembre	Enero (181)	Abril
2004 - 2005	339	G1	6	Noviembre	Diciembre (108)	Abril
2005 - 2006	349	G1, G9	5	Noviembre	Diciembre (131)	Marzo
2006 - 2007	312	G9	5	Noviembre	Enero (93)	Marzo
2007 - 2008	306	G1	4	Noviembre	Diciembre (141)	Febrero
2008 - 2009	283	G1	6	Septiembre	Enero (71)	Febrero
2009 - 2010	231	G9	3	Enero	Febrero (96)	Marzo
2010 - 2011	198	G12	4	Noviembre	Febrero (92)	Febrero
2011 - 2012	287	G12	4	Diciembre	Enero (124)	Marzo
2012 - 2013	246	G2, G9	4	Enero	Marzo (90)	Abril
2013 - 2014	282	G1	4	Diciembre	Febrero (109)	Marzo
2014 - 2015	232	G1, G12	4	Febrero	Marzo (125)	Mayo

Tabla AII-1.-Características de las epidemias por rotavirus ocurridas en el periodo 1995 - 2015 en Gipuzkoa (II).

TEMPORADA	MESES PRE- PICO MÁXIMO	MESES POST-PICO MÁXIMO	MESES SIN RVA	MESES CON < 5 RVA	MESES CON >100 RVA
1995 - 1996	2	4	0	3	1
1996 - 1997	1	7	0	0	0
1997 - 1998	2	2	0	2	1
1998 - 1999	1	1	0	4	2
1999 - 2000	1	5	0	3	2
2000 - 2001	2	5	0	1	0
2001 - 2002	1	3	0	1	0
2002 - 2003	1	2	0	5	2
2003 - 2004	1	3	3	5	2
2004 - 2005	1	4	0	5	2
2005 - 2006	1	3	2	5	2
2006 - 2007	2	2	2	6	0
2007 - 2008	1	2	2	6	1
2008 - 2009	4	1	0	5	0
2009 - 2010	1	1	1	8	0
2010 - 2011	3	0	1	6	0
2011 - 2012	1	2	1	6	1
2012 - 2013	1	1	1	7	0
2013 - 2014	2	1	4	7	1
2014 - 2015	1	2	3	8	1

Apéndice III

Códigos de diagnóstico al alta (CIE9-MC) utilizados en los niños hospitalizados a causa de gastroenteritis por rotavirus

Con el fin de conocer la validez de los datos ofrecidos por el Servicio de Documentación Clínica del Hospital (ver punto 4.2), analizamos en los pacientes hospitalizados a causa de RVA los códigos de diagnóstico al alta utilizados. En el periodo 1996 - 2014, el primer código de diagnóstico al alta (CIE9-MC) relacionado con GEA por RVA más utilizado fue el específico de esta infección 008.61-rotavirus (77,0%) observándose una mejora en la utilización del citado código según avanzaba el estudio. En concreto, se utilizó el código específico 008.61 en un 73,5% (308/419) de los casos de GEA por RVA en 1996 - 2008 frente a un 88,1% (118/134) en el periodo 2008 - 2014 (Chi cuadrado = 11,34, p = 0,0008). En la práctica totalidad de los restantes hospitalizados a causa de GEA por RVA (19,9% [110/553]) se utilizó como código principal de GEA el inespecífico 558.9 (gastroenteritis y colitis no infecciosas y no especificada). El uso de otros códigos como primer código relacionado con GEA fue excepcional y limitado a los códigos 78703, 009.0 y 009.1 (inespecíficos), 008.63 (virus de Norwalk) y 008.43 (*Campylobacter*) (Material y Métodos Tabla 5), y que fueron empleados en seis o menos ocasiones cada uno.

En el periodo 2008 - 2014, en un 85,8% (n = 115) de las hospitalizaciones a causa de GEA por RVA el código relacionado con GEA se encontraba en la primera posición, en un 9,9% (n = 13) en la segunda y solo en seis casos se encontró en otra posición lo cual indica un uso correcto de los códigos de alta en los pacientes hospitalizados a causa de RVA.

Apéndice IV

Sustituciones nucleotídicas observadas en la secuencia parcial del gen VP7 de las cepas de rotavirus genotipo G12

Tabla AIV-1.- Sustituciones nucleotídicas de la secuencia parcial VP7 (795pb) de las cepas G12 detectadas en Gipuzkoa en la epidemia 2014 – 2015. Se analizaron 30 cepas.

Sustituciones de nucleótidos	Nº (%) de secuencias	Tipo de mutación	Sustituciones de aminoácidos
159T>C	1 (3,3)	Silente	
194A>G	1 (3,3)	Traduce	K49R
294C>T	4 (13,3)	Silente	
345A>G	10 (33,3)	Silente	
407G>A	1 (3,3)	Traduce	S120N
447G>A	10 (33,3)	Silente	
504C>T	5 (16,7)	Silente	
618A>G	1 (3,3)	Silente	
639C>T	1 (3,3)	Silente	
684T>C	10 (33,3)	Silente	
876A>G	1 (3,3)	Silente	
890C>T	1 (3,3)	Silente	

Apéndice V

Tablas de identidad nucleotídica

Tabla AV-1.- Identidad nucleotídica del segmento génico VP7 (ORF) de las cepas G12P[8] de Gipuzkoa y de las cepas más similares de la base de datos Genbank. En gris claro están marcados los porcentajes de identidad de las cepas de este estudio y mediante recuadros y negrita los porcentajes de identidad de las cepas de este estudio respecto a las más similares de GenBank.

CEPAS	2010 - 2011		2011 - 2012		2012 - 2013		2013 - 2014		2014 - 2015	
	SS450652	SS453194	SS257451	VI4816626	SS66209011	SS62505693	SS68923753	SS66106040	SS62237307	SS65130987
SS450652										
SS453194	100,0									
SS257451	97,2	97,2								
VI4816626	97,1	97,1	99,9							
SS66209011	97,1	97,1	99,9	99,8						
SS62505693	97,2	97,2	100,0	99,9	99,9					
SS68923753	98,9	98,9	96,9	96,8	96,8	96,9				
SS66106040	98,9	98,9	96,9	96,8	96,8	96,9	100,0			
SS62237307	98,6	98,6	96,8	96,7	96,7	96,8	98,7	98,7		
SS65130987	98,5	98,5	96,5	96,4	96,4	96,5	98,8	98,8	99,5	
BA20142	99,8	99,8	97,0	96,9	96,9	97,0	98,7	98,7	98,4	98,3
CU615-TK	99,7	99,7	97,1	97,0	97,0	97,1	99,0	99,0	98,7	98,6
PA144/12	97,2	97,2	100,0	99,9	99,9	100,0	96,9	96,9	96,8	96,5
Bang-129	97,3	97,3	99,3	99,4	99,2	99,3	97,0	97,0	96,9	96,6
KOL-58-08	99,1	99,1	97,1	97,0	97,0	97,1	99,4	99,4	98,9	98,8
VU08-09-6	99,0	99,0	97,0	96,9	96,9	97,0	99,3	99,3	98,8	98,7
BTN-120	98,8	98,8	96,8	96,7	96,7	96,8	98,9	98,9	99,8	99,7
CNMC12	98,8	98,8	96,8	96,7	96,7	96,8	98,9	98,9	99,8	99,7
VU12-13-84	98,7	98,7	96,7	96,6	96,6	96,7	98,8	98,8	99,7	99,6
KDH651	98,6	98,6	96,6	96,5	96,5	96,6	98,7	98,7	99,6	99,5
MRC-DPRU2140	98,5	98,5	96,7	96,6	96,6	96,7	98,6	98,6	99,5	99,4
MRC-DPRU4620	98,5	98,5	96,7	96,6	96,6	96,7	98,6	98,6	99,5	99,4
SONMX-37	98,5	98,5	96,5	96,4	96,4	96,5	98,8	98,8	99,5	99,4

Tabla AV-2.- Identidad nucleotídica del segmento génico VP4 (ORF) de las cepas G12P[8] y G1P[8] de Gipuzkoa y de las cepas más similares de la base de datos Genbank. En gris claro están marcados los porcentajes de identidad de las cepas G12P[8] de este estudio, en color gris oscuro los de las cepas G1P[8] de Gipuzkoa y mediante recuadros y negrita los porcentajes de identidad de las cepas de este estudio respecto a las ceepas más similares de GenBank.

CEPAS	2010 - 2011		2011 - 2012		2012 - 2013		2013 - 2014		2014 - 2015		G1 2010 - 2011	
	SS450652	SS453194	SS257451	VI4816626	SS66209011	SS62505693	SS68923753	SS66106040	SS62237307	SS65130987	SS454877	SS455348
SS450652												
SS453194	100,0											
SS257451	96,4	96,4										
VI4816626	96,5	96,5	99,8									
SS66209011	96,3	96,3	99,7	99,7								
SS62505693	96,3	96,3	99,8	99,8	99,8							
SS68923753	96,4	96,4	98,9	99,1	98,8	98,9						
SS66106040	96,4	96,4	98,9	99,1	98,8	98,9	100,0					
SS62237307	96,2	96,2	98,6	98,8	98,5	98,6	98,7	98,7				
SS65130987	96,4	96,4	98,7	98,8	98,6	98,7	98,8	98,8	99,5			
SS454877	96,3	96,3	96,1	96,1	96,0	96,0	96,1	96,1	96,3	96,3		
SS455348	96,2	96,2	96,1	96,2	96,0	96,1	96,2	96,2	96,2	96,3	99,7	
RT073-09	99,5	99,5	96,3	96,5	96,3	96,3	96,4	96,4	96,2	96,3	96,3	96,3
2009727047	99,6	99,6	96,4	96,6	96,4	96,4	96,5	96,5	96,3	96,4	96,3	96,3
DC8	99,6	99,6	96,3	96,5	96,3	96,3	96,4	96,4	96,2	96,4	96,3	96,3
PA144/12	96,4	96,4	99,7	99,9	99,7	99,7	99,0	99,0	98,7	98,8	96,0	96,1
VU12-13-149	96,4	96,4	99,6	99,7	99,5	99,6	98,8	98,8	98,5	98,6	95,9	95,9
1679SR	96,8	96,8	99,2	99,4	99,1	99,2	99,7	99,7	99,0	99,2	96,5	96,5
BE0258	96,7	96,7	99,1	99,3	99,1	99,1	99,3	99,3	98,9	99,1	96,4	96,4
VU11-12-192	96,6	96,6	98,8	99,0	98,8	98,8	99,0	99,0	99,7	99,8	96,4	96,5
CNMC13	96,7	96,7	98,9	99,1	98,8	98,9	99,1	99,1	99,4	99,6	96,5	96,6
KDH651	96,2	96,2	98,5	98,6	98,4	98,5	98,6	98,6	98,9	99,1	96,0	96,1
MRC-DPRU4620	96,6	96,6	98,9	99,1	98,8	98,9	99,1	99,1	99,4	99,5	96,5	96,5
MRC-DPRU71	96,6	96,6	98,8	99,0	98,8	98,8	99,0	99,0	99,3	99,5	96,5	96,5
BE1128	96,3	96,3	96,2	96,3	96,1	96,2	96,3	96,3	96,3	96,4	99,9	99,8
RT072-09	96,2	96,2	96,2	96,3	96,1	96,2	96,3	96,3	96,3	96,4	99,7	99,7
CK00103	96,2	96,2	96,0	96,1	95,9	96,0	96,1	96,1	96,1	96,2	99,7	99,7
BE00047	96,3	96,3	96,2	96,3	96,1	96,2	96,3	96,3	96,3	96,4	99,9	99,8

Tabla AV-3.- Identidad nucleotídica de los 11 genes concatenados (ORF) de las cepas G12P[8] y G1P[8] de Gipuzkoa, de las cepas más similares de la base de datos Genbank y de las cepas representativas de G12P[8] Dhaka25 y B4633. En gris claro están marcados los porcentajes de identidad de las cepas G12P[8] de este estudio, en color gris oscuro los de las cepas G1P[8] de Gipuzkoa y mediante recuadros y negrita los porcentajes de identidad de las cepas de este estudio respecto a las ceepas más similares de GenBank.

CEPAS	2010 - 2011		2011 - 2012		2012 - 2013		2013 - 2014		2014 - 2015		G1 2010 - 2011	
	SS450652	SS453194	SS257451	VI4816626	SS66209011	SS62505693	SS68923753	SS66106040	SS62237307	SS65130987	SS454877	SS455348
SS450652												
SS453194	99,9											
SS257451	97,6	97,5										
VI4816626	97,6	97,6	99,9									
SS66209011	97,6	97,5	99,9	99,9								
SS62505693	97,6	97,5	99,9	99,9	99,9							
SS68923753	97,3	97,2	97,7	97,7	97,7	97,7						
SS66106040	97,3	97,2	97,7	97,7	97,7	97,7	100,0					
SS62237307	96,7	96,6	96,9	96,9	96,9	96,9	96,7	96,7				
SS65130987	96,7	96,6	96,8	96,9	96,8	96,8	96,7	96,7	99,4			
SS454877	93,4	93,4	93,4	93,4	93,3	93,4	93,4	93,4	93,8	93,9		
SS455348	93,4	93,4	93,4	93,4	93,3	93,4	93,4	93,4	93,8	93,9	99,7	
CU616-TK	99,1	99,1	97,6	97,6	97,6	97,6	97,3	97,2	96,6	96,6	93,4	93,4
PA144/12	97,6	97,6	99,9	99,9	99,9	99,9	97,7	97,7	96,9	96,8	93,4	93,4
VU12-13-149	97,5	97,4	99,6	99,6	99,5	99,6	97,5	97,5	96,9	96,9	93,3	93,3
MRC-DPRU2140	97,2	97,2	97,5	97,5	97,5	97,5	97,9	97,9	97,4	97,4	93,8	93,9
CNMC12	96,9	96,8	97,1	97,1	97,1	97,1	96,9	96,9	99,5	99,5	94,0	94,0
VU11-12-192	96,8	96,7	97,0	97,1	97,0	97,0	96,8	96,8	99,6	99,6	94,0	94,0
VU12-13-84	96,7	96,6	96,9	96,9	96,9	96,9	96,7	96,7	99,4	99,5	93,8	93,9
RT072-09	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,4	93,8	93,9	99,7	99,7
CK00103	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3	93,4	93,4	93,7	93,8	99,6	99,7
BE00047	93,4	93,4	93,3	93,4	93,3	93,4	93,4	93,4	93,8	93,8	99,7	99,7
Dhaka25	97,7	97,6	97,4	97,4	97,4	97,4	97,5	97,5	96,5	96,4	93,3	93,3
B4633	97,4	97,3	97,3	97,3	97,3	97,3	97,5	97,5	96,3	96,3	93,3	93,4

Tabla AV-4.- Identidad de secuencia nucleotídica (%) de la región codificante de cada uno de los 11 segmentos génicos (VP1 – VP4, VP6, VP7 y NSP1 – NSP5) correspondientes a 12 cepas G12P[8] y G1P[8] detectadas en Gipuzkoa en el periodo 2010 – 2015 y 2010 – 2011, respectivamente. Cada temporada incluye dos cepas.

VP1 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	99,9					
G12P[8] 2011 - 2012	97,9 - 98,0	99,9				
G12P[8] 2012 - 2013	97,9 - 98,0	99,8 - 99,9	100,0			
G12P[8] 2013 - 2014	98,2 - 98,3	98,3	98,3	100,0		
G12P[8] 2014 - 2015	93,9 - 94,0	93,8	93,7 - 93,8	94,1 - 94,2	99,4	
G1P[8] 2010 - 2011	93,8 - 93,9	93,7 - 93,8	93,7	94,1	96,3 - 96,4	100,0

VP2 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	99,9					
G12P[8] 2011 - 2012	98,2 - 98,3	100,0				
G12P[8] 2012 - 2013	98,2	99,9	99,9			
G12P[8] 2013 - 2014	97,4	97,6	97,5	100,0		
G12P[8] 2014 - 2015	96,9 - 97,1	96,8 - 97,1	96,8 - 97,0	96,6 - 96,8	99,3	
G1P[8] 2010 - 2011	96,9 - 97,3	97,1 - 97,3	97,1 - 97,2	97,0 - 97,1	97,7 - 98,2	99,3

VP3 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	99,9					
G12P[8] 2011 - 2012	98,2 - 98,3	99,9				
G12P[8] 2012 - 2013	98,2 - 98,4	99,8 - 100,0	99,9			
G12P[8] 2013 - 2014	96,8 - 96,9	97,0 - 97,1	97,0 - 97,1	100,0		
G12P[8] 2014 - 2015	97,4 - 97,6	97,6 - 97,7	97,6 - 97,7	96,3 - 96,5	99,4	
G1P[8] 2010 - 2011	91,0	91	91,0 - 91,1	91,0 - 91,1	90,7 - 90,9	99,8

VP4 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	100,0					
G12P[8] 2011 - 2012	96,4 - 96,5	99,8				
G12P[8] 2012 - 2013	96,3	99,7 - 99,8	99,8			
G12P[8] 2013 - 2014	96,4	98,9 - 99,1	98,8 - 98,9	100,0		
G12P[8] 2014 - 2015	96,2 - 96,4	98,6 - 98,8	98,5 - 98,7	98,7 - 98,8	99,5	
G1P[8] 2010 - 2011	96,2 - 96,3	96,1 - 96,2	96,0 - 96,1	96,1 - 96,2	96,2 - 96,3	99,7

VP6 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	99,7					
G12P[8] 2011 - 2012	95,8 - 96,2	99,9				
G12P[8] 2012 - 2013	95,8 - 96,1	99,9 - 100,0	100,0			
G12P[8] 2013 - 2014	96,2 - 96,6	96,3 - 96,4	96,4	100,0		
G12P[8] 2014 - 2015	97,9 - 98,3	96,5 - 96,6	96,5 - 96,6	96,7 - 96,8	99,7	
G1P[8] 2010 - 2011	94,9 - 95,3	96,1 - 96,2	96,1 - 96,2	95,6	95,5 - 95,6	99,9

VP7 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	100,0					
G12P[8] 2011 - 2012	97,1 - 97,2	99,9				
G12P[8] 2012 - 2013	97,1 - 97,2	99,8 - 100,0	99,9			
G12P[8] 2013 - 2014	98,9	96,8 - 96,9	96,8 - 96,9	100,0		
G12P[8] 2014 - 2015	98,5 - 98,6	96,4 - 96,8	96,4 - 96,8	98,7 - 98,8	99,5	
G1P[8] 2010 - 2011	74,2 - 74,5	74,5 - 74,9	74,5 - 74,8	74,3 - 74,6	73,9 - 74,4	99,6

NSP1 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	99,9					
G12P[8] 2011 - 2012	96,7 - 96,9	99,8				
G12P[8] 2012 - 2013	96,9 - 97,0	99,8 - 99,9	100,0			
G12P[8] 2013 - 2014	97,1 - 97,3	97,1 - 97,3	97,3	99,9		
G12P[8] 2014 - 2015	96,9 - 97,2	97,9 - 98,2	97,9 - 98,2	96,9 - 97,3	99,0	
G1P[8] 2010 - 2011	95,6 - 95,7	95,5 - 95,7	95,6 - 95,8	95,2 - 95,4	95,3 - 95,8	99,6

NSP2 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	99,9					
G12P[8] 2011 - 2012	98,5 - 98,7	99,9				
G12P[8] 2012 - 2013	98,6 - 98,7	99,9 - 100,0	100,0			
G12P[8] 2013 - 2014	97,4 - 97,6	97,7 - 97,9	97,8 - 97,9	99,9		
G12P[8] 2014 - 2015	97,1 - 97,4	97,2 - 97,5	97,3 - 97,5	97,2 - 97,5	99,4	
G1P[8] 2010 - 2011	89,6 - 89,9	89,7 - 89,9	89,7 - 89,8	89,5 - 89,7	89,4 - 89,7	99,5

NSP3 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	99,7					
G12P[8] 2011 - 2012	98,4 - 98,5	99,8				
G12P[8] 2012 - 2013	98,5 - 98,6	99,9	100,0			
G12P[8] 2013 - 2014	97,6 - 97,7	97,1	97,2	100,0		
G12P[8] 2014 - 2015	98,4 - 98,6	98,1 - 98,2	98,2 - 98,3	97,1 - 97,2	99,5	
G1P[8] 2010 - 2011	95,3 - 95,4	94,7	94,9	96	94,5 - 94,6	100,0

NSP4 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	99,8					
G12P[8] 2011 - 2012	93,8 - 94,1	99,8				
G12P[8] 2012 - 2013	93,9 - 94,1	99,8 - 100,0	100,0			
G12P[8] 2013 - 2014	93,0 - 93,2	97,3 - 97,5	97,5	100,0		
G12P[8] 2014 - 2015	93,6 - 93,8	96,0 - 96,6	96,2 - 96,6	95,6 - 96,0	99,6	
G1P[8] 2010 - 2011	93,9 - 94,3	91,9 - 92,2	92,0 - 92,2	91,1 - 91,3	91,5 - 91,7	99,8

NSP5 (ORF)	G12P[8] 2010 -2011	G12P[8] 2011 - 2012	G12P[8] 2012 - 2013	G12P[8] 2013 - 2014	G12P[8] 2014 - 2015	G1P[8] 2010 - 2011
G12P[8] 2010 -2011	100,0					
G12P[8] 2011 - 2012	99,2 - 99,3	99,8				
G12P[8] 2012 - 2013	99,3	99,8 - 100	100,0			
G12P[8] 2013 - 2014	98	97,8 - 98,0	98	100,0		
G12P[8] 2014 - 2015	99,5 - 99,8	98,7 - 99,2	98,8 - 99,2	97,5 - 97,8	99,7	
G1P[8] 2010 - 2011	97,8	97,3 - 97,5	97,5	98,1	97,3 - 97,6	100,0

Apéndice VI

Comparación de las secuencias parciales del gen VP4 de las cepas del genotipo G12 y de otros genotipos con gen VP4 P[8] (G1, G3, G4, G9)

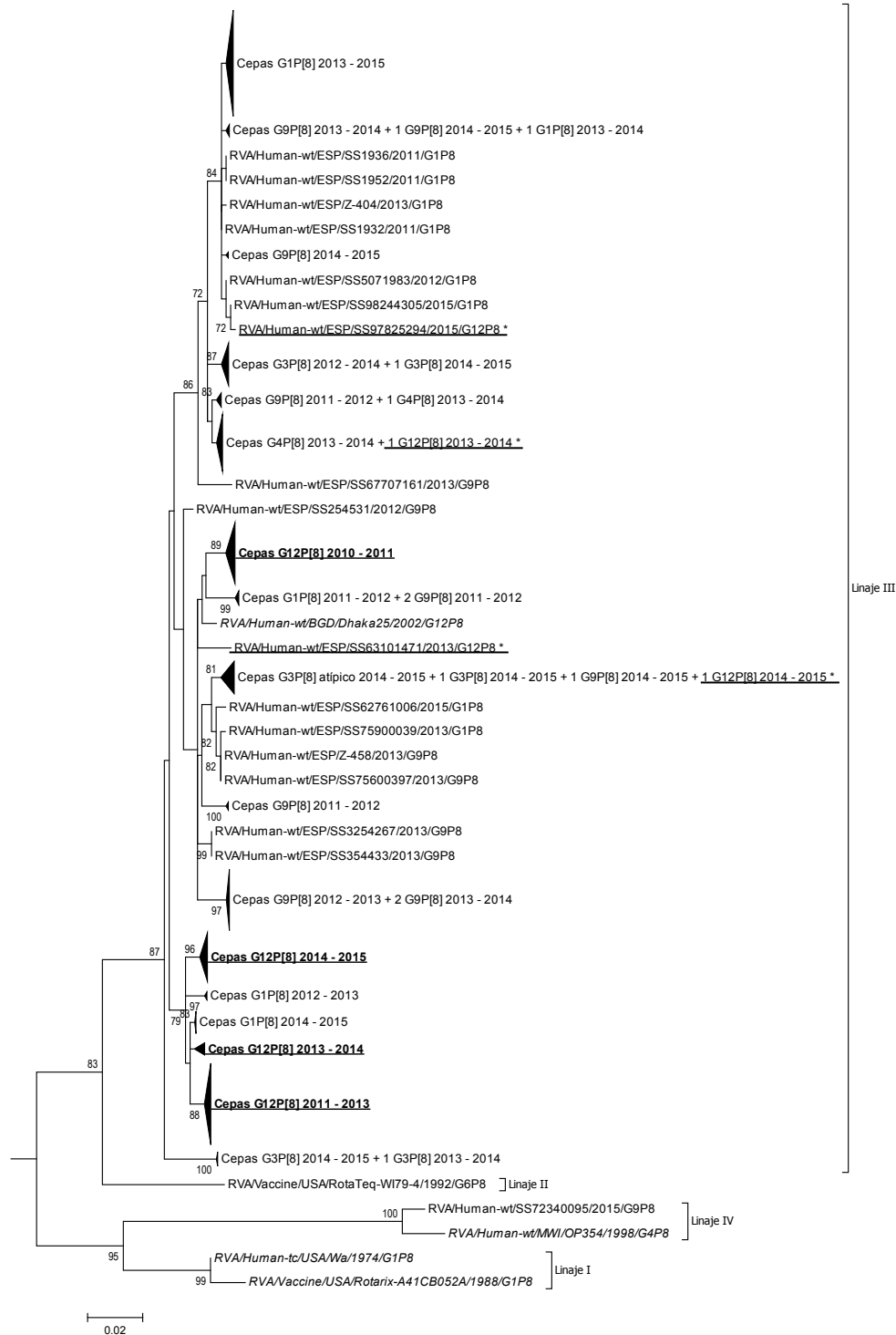


Figura AVI-1.-Análisis filogenético del segmento genómico parcial VP4 (610 pb) de 309 cepas de rotavirus G1, G3, G4, G9 y G12 detectadas en Gipuzkoa en 2010 – 2015. Los nombres subrayados señalan las cepas G12P[8] de las temporadas 2010 – 2011, 2011 – 2013, 2013 – 2014 y 2014 – 2015 y los asteriscos las cuatro cepas G12P[8] con VP4 P[8] dispar. Se incluyen cepas representando los diferentes linajes de P[8], sus nombres están marcados en cursiva. No se muestran los valores de *bootstrap* menores del 70%. La barra de escala indica el número de sustituciones por posición de nucleótido.

Apéndice VII

Constelaciones genéticas de cepas analizadas en Gipuzkoa (genoma completo) en relación a cepas de referencia

Tabla AVII-1.- Constelaciones genotípicas completas de las cepas de rotavirus utilizadas para construir el árbol filogenético de genes (ORF) concatenados (Figura 34). Las doce primeras constelaciones corresponden a las cepas G12 y G1 de Gipuzkoa. El asterisco (*) indica que la cepa posee además del segmento génico tipo Wa utilizado para construir el árbol, otro segmento génico tipo DS-1.

CEPA	GENOTIPO										
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Human-wt/ESP/SS454877/2011/G1P[8]	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/SS455348/2011/G1P[8]	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/SS450652/2010/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/SS453194/2011/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/SS257451/2012/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/VI4816626/2012/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/SS66209011/2013/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/SS62505693/2013/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/SS68923753/2014/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/SS66106040/2014/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/SS62237307/2015/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/SS65130987/2015/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P[8]	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/PRY/1679SR/2008/G1P[8]	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BEL/BE00047/2009/G1P[8]	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/CAN/RT072-09/2009/G1P[8]	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/NIC/45J/2010/G1P[8]	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/AUS/CK00103/2010/G1P[8]	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P[4]	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/ITA/PR599/2013/G3P[8]	G3	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ARG/Men1741/1998/G4P[8]	G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/CHN/E2484/2011/G4P[8]	G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/HRV/CR2006/2006/G8P[8]	G8	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/DC8/2009/G9P[8]	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/PHL/L26/1987/G12P[4]	G12	P[4]	I2	R2	C2	M1	A2	N1	T2	E2	H1
RVA/Human-wt/ZAF/3133WC/2009/G12P[4]	G12	P[4]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BGD/RV161/2000/G12P[6]	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E1	H2
RVA/Human-wt/BGD/Matlab13/2003/G12P[6]	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T2	E1	H1
RVA/Human-tc/KOR/CAU 214/2006/G12P[6]	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/COD/KisB521/2008/G12P[6]	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ZMB/MRC-DPRU1680/2008/G12P[6]	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ZWE/MRC-DPRU1794/2009/G12P[6]	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

RVA/Human-tc/MMR/A23/2011/G12P[6]	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BGD/Dhaka25/2002/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BEL/B4633/2003/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/IND/VR11113/2003/G12P[8]	G12	P[8]	I2	R2	C1*	M1	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/ZAF/MRC-DPRU2140/2005/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/VU08-09-40/2008/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1*
RVA/Human-wt/DEU/GER126-08/2008/G3G12P[8]	G3,G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/THA/CU616-TK/2009/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/CMR/MRC-DPRU3043/2009/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/CMR/MA16/2010/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/TGO/MRC-DPRU5171/2010/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/KEN/KDH651/2010/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ZAF/MRC-DPRU1554/2010/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/CNMC1/2011/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/CNMC12/2011/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/MMR/A14/2011/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/UGA/MRC-DPRU4620/2011/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ETH/MRC-DPRU850/2012/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T2	E1	H1
RVA/Human-wt/ZAF/MRC-DPRU71/2012/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ITA/PA144/12/2012/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/VU11-12-192/2012/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/VU12-13-84/2013/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/VU12-13-149/2013/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/2013774166/2013/G12P[8]	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/THA/T152/1998/G12P[9]	G12	P[9]	I3	R3	C3	M3	A12	N3	T3	E3	H6

Wa-like (genotipo 1)
 DS-1-like (genotipo 2)
 AU-1-like (genotipo 3)

