

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Microbiologia i Ecologia



**ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES  
VP7 Y NSP4 DE CEPAS DE ROTAVIRUS DE NIÑOS  
CON GASTROENTERITIS EN  
VALENCIA Y CASTELLÓN**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por

**Carlos J. Téllez Castillo**

Dirigida por

**Dr. Javier Buesa Gómez**



*A mi madre Victoria Esperanza.*

*A ti José Gabriel que ya no estás...*

*A mis cuatro hermanos Rosana, Gabriel, Juan y Héctor.*

*A Germayra y mis abuelos Rosa Victoria y Vicente.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que con su ayuda han hecho posible la realización de esta tesis y en especial:

Al **Dr. Javier Buesa Gómez**, médico adjunto del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario y Catedrático del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia y Director de esta tesis, por su inestimable ayuda en la realización de la misma.

A la **Dra. Rosario Moreno Muñoz**, Jefe de la Sección de Microbiología del Hospital General de Castellón (HGC), al **Dr. Francisco Pardo Serrano**, adjunto de Microbiología del HGC, y a la **Dra. María D. Tirado Balaguer**, adjunto de Microbiología del HGC por su ayuda en mi formación como microbiólogo y en la recolección de muestras de heces para el estudio.

A los **Dres. Josep Prat y Rosa Escoms**, médicos adjuntos de Microbiología del Hospital de Sagunto por su ayuda en la recolección de las muestra de heces para su estudio.

Al **Dr. Fernando González Candelas**, Catedrático de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Valencia, por su orientación y ayuda en el estudio filogenético.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia: **Manuel Fernández-Jiménez, Rebeca Montava, Juan M. Ribes, Marta Fos y Noelia Carmona** por haberme facilitado y animado en todo momento. Al igual que mis amigos **Merxe Barberá, Gabriel Delgado, Esther Tolós, Jenny Peresson, Mayte Arcos, Maite Beato, Leticia Amselem, Noemí Prado y Ana Beltrán**.



## ABREVIATURAS, ANGLICISMOS Y UNIDADES

**aa:** Aminoácido/s

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**ARN:** Ácido ribonucleico

**Bootstrap:** Método de remuestreo computacional utilizado para evaluar la robustez de un estudio filogenético

**Core:** estructura central de un virus que contiene el genoma viral.

**Cluster:** Conjunto o grupo de secuencias de un mismo gen con elevada similaridad

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**DLP:** Partículas de doble capa

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato

**EDA:** Enfermedad diarreica aguda

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EuroRotaNet:** Red europea de vigilancia de rotavirus

**ELISA:** Acrónimo del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ‘Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas’

**g:** Gramo

**kDa:** Kilodaltons

**l:** Litro

**M:** Molar

**mM:** Milimolar

**μl:** Microlitro

**μM:** Micromolar

**NSP:** *Non-structural protein*, proteína no estructural

**NSP4:** Proteína no estructural 4

**Nt:** Nucleótido

**NTPasa:** Nucleósido trifosfatasa

**ORF:** *Open reading frame*, marco de lectura

**Pb:** Par/es de bases.

**PBS:** *Phosphate buffered saline*, tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**Pellet:** Sedimento resultante después de una centrifugación

**Primer:** Oligonucleótido, cebador

**P.M.:** Peso molecular

**RE:** Retículo endoplasmático  
**RCWG:** *Rotavirus Classification Working Group*  
**RNAsa:** Ribonucleasa  
**r.p.m:** Revoluciones por minuto  
**RT:** Transcripción reversa

**SDS:** Dodecil sulfato sódico  
**STE:** Tampón cloruro de sodio-Tris-EDTA

**Taq:** *Thermus aquaticus*

**TBE:** Tampón tris-borato-EDTA  
**UV:** Ultravioleta

**VP:** *Viral protein*, proteína viral  
**VP7:** Proteína viral 7

# ÍNDICE

<b>DEDICATORIA</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>v</b>
<b>ABREVIATURAS, ANGLICISMOS Y UNIDADES</b>	<b>vii</b>
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
1.1. Breve historia y taxonomía de los rotavirus	5
1.2. Características estructurales y biológicas de los rotavirus	6
1.3. Clasificación de rotavirus	9
1.4. Estructura proteica	12
1.4.1. Proteínas estructurales	12
1.4.1.1. Proteína VP4	14
1.4.1.2. Proteína VP7	16
1.4.2. Proteínas no estructurales	18
1.4.2.1. Proteína NSP4	19
1.4.2.2. Otras proteínas no estructurales	22
1.5. Importancia sanitaria de los rotavirus: morbilidad y mortalidad	23
1.6. Epidemiología molecular de rotavirus	25
<b>2. <u>OBJETIVOS</u></b>	<b>31</b>
<b>3. <u>CAPÍTULO 1</u></b>	
<b>EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ROTAVIRUS EN TRES DEPARTAMENTOS DE SALUD DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (2005-2009)</b>	<b>35</b>
3.1. ANTECEDENTES	37
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	41
3.2.1. Población de estudio	41
3.2.2. Ámbito de estudio	41
3.2.3. Criterios de inclusión y exclusión	41
3.2.4. Muestras clínicas	42
3.2.4.1. Obtención de las muestras	42
3.2.4.2. Conservación	42
3.2.5. Procesamiento microbiológico	42
3.2.5.1. Estudio bacteriológico	42
3.2.5.2. Estudio virológico	42
3.2.6. Análisis molecular de cepas de rotavirus	43
3.2.6.1. Extracción de ARN vírico	43
3.2.6.2. Reacción de transcripción inversa para síntesis ADNc	44
3.2.6.3. Tipificación del gen de la VP7 (G)	45
3.2.6.4. Tipificación del gen de la VP4 (P)	49

3.3. RESULTADOS.....	51
3.3.1. Genotipo G.....	53
3.3.2. Genotipo P.....	58
3.3.3. Combinación de los genotipos G/P.....	59
3.4. DISCUSIÓN.....	61
<b>4. <u>CAPÍTULO II</u></b>	
<b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN CODIFICANTE DE VP7 EN CEPAS DEL GENOTIPO G9 DE ROTAVIRUS.....</b>	<b>65</b>
4.1. ANTECEDENTES.....	67
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
4.2.1. Análisis de la secuencia de VP7.....	79
4.2.2. Secuenciación e identificación de los productos de amplificación .....	79
4.2.2.1. Purificación de amplímeros de ADN para secuenciación.....	79
4.2.2.2. Cuantificación del ADN de los amplímeros.....	82
4.2.2.3. Secuenciación de los productos amplificados de RT-PCR.....	83
4.2.3. Análisis filogenético de la secuencia parcial de VP7 de cepas de rotavirus G9P[8].....	83
4.3. RESULTADOS.....	85
4.3.1. Análisis de secuencias del gen de la proteína VP7.....	85
4.3.2. Análisis filogenético del gen de la proteína VP7.....	86
4.3.3. Comparación de las regiones antigénicas y sustituciones de aminoácidos.....	87
4.3.4. Polimorfismo y el nivel de divergencia de las secuencias de VP .....	91
4.4. DISCUSIÓN.....	93
<b>5. <u>CAPÍTULO III</u></b>	
<b>CARACTERIZACION MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN CODIFICANTE DE NSP4 EN CEPAS DE ROTAVIRUS G9.....</b>	<b>97</b>
5.1. ANTECEDENTES.....	99
5.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	105
5.2.1. Muestras.....	105

5.2.2. Análisis de NSP4.....	105
5.2.3. Secuenciación e identificación de los productos de amplificación.....	107
5.2.3.1. Purificación de los productos de amplificación.....	107
5.2.3.2. Secuenciación de los productos amplificados por RT- PCR.....	107
5.2.4. Estudio de las secuencias.....	107
5.2.5. Números de acceso de secuencias de nucleótidos en GenBank.....	108
<b>5.3. RESULTADOS .....</b>	<b>109</b>
5.3.1. Análisis de secuencias.....	109
5.3.2. Análisis filogenético del gen NSP4.....	110
5.3.3. Comparación de secuencias de aminoácidos.....	113
5.3.4. Polimorfismo y el nivel de divergencia de las secuencias de NSP4.....	116
<b>5.4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>118</b>

## **6. CAPÍTULO IV**

### **ANÁLISIS FILOGENÉTICO CONJUNTO DE LOS GENES CODIFICANTES DE VP7 Y NSP4 DE CEPAS DE ROTAVIRUS G9.....125**

<b>6.1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>127</b>
<b>6.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>129</b>
6.2.1. Muestra.....	129
6.2.2. Estudio de las secuencias .....	130
<b>6.3. RESULTADOS .....</b>	<b>130</b>
6.3.1. Análisis de la unión de secuencias de VP7 y NSP4 del genotipo G9P[8].....	130
6.3.2. Análisis filogenético de los genes VP7/NSP4.....	131
6.3.3. Polimorfismo y nivel de divergencia de las secuencias de VP7/NSP4.....	134
<b>6.4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>136</b>

### **7. CONCLUSIONES.....139**

### **8. BIBLIOGRAFÍA.....143**

**9.ANEXOS.....163**

**Anexo 1. Descripción de las cepas de rotavirus (ciudad, país, año de aislamiento) cuyos genes de VP7 son analizados filogenéticamente. Se indica el linaje VP7 y el núm. de acceso en GenBank.....165**

**Anexo 2. Descripción de las cepas de rotavirus (ciudad, país, año de aislamiento) cuyos genes de NSP4 son analizados filogenéticamente. Se indica el genotipo NSP4 y el núm. de acceso en GenBank.....167**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros clasificados en la familia <i>Reoviridae</i> (VIII Report of the Internacional Committee on Taxonomy of Viruses; Virus Taxonomy, 2006).....	6
Tabla 2. Función y localización de las proteínas estructurales de rotavirus.....	13
Tabla 3. Función de las proteínas no estructurales de rotavirus.....	19
Tabla 4. Porcentajes de casos de gastroenteritis infantil por rotavirus.....	24
Tabla 5. Distribución temporal y espacial de rotavirus en diferentes años y países.....	40
Tabla 6. Oligonucleótidos para identificar por PCR el genotipo de VP7.....	46
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados, primera y segunda PCR, VP4.....	49
Tabla 8. Distribución de infección por rotavirus por grupo de edad.....	52
Tabla 9. Distribución de infección por rotavirus por grupo de edad 1 – 4 años.....	52
Tabla 10. Distribución de genotipos G identificados en los años 2005-2006.....	53
Tabla 11. Distribución de genotipos G identificados en los años 2006-2007.....	54
Tabla 12. Distribución de genotipos G identificados en los años 2007-2008.....	55
Tabla 13. Distribución de genotipos G identificados en los años 2008-2009.....	56
Tabla 14. Distribución de genotipos G9 según el hospital de procedencia identificada en los años 2008-2009.....	57
Tabla 15. Distribución de genotipos G/P identificados en los años 2005-2009.....	59
Tabla 16. Genotipo G9 de rotavirus en diferentes partes del mundo.....	77
Tabla 17. Distribución de rotavirus G9P[8] de muestras escogidas al azar de tres ciudades de la Comunidad Valenciana (2005-2009) para su secuenciación y análisis filogenético.....	85
Tabla 18. Cambios de aminoácidos observados en secuencias de Castellón, Sagunto y Valencia (2005-2009).....	89
Tabla 19. Diversidad interna de grupos de secuencias (clusters A y B) del gen de VP7 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.....	91
Tabla 20. Diversidad entre grupos de secuencias (clusters A y B) del gen de VP7 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.....	92
Tabla 21. Oligonucleótidos NSP4.....	105
Tabla 22. Distribución de las muestras escogidas al azar de tres ciudades de la Comunidad Valenciana (2005-2009) para caracterizar el gen NSP4 de rotavirus.....	109

Tabla 23. Cambios observados de aminoácidos en sitios de glicosilación 1 y 2 de la NSP4.....	114
Tabla 24. Diversidad interna de grupos de secuencias (clusters E1-A, E1-B y E1-C) del gen de NSP4 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.....	116
Tabla 25. Diversidad entre grupos de secuencias (clusters E1-A, E1-B y E1-C) del gen de NSP4 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.....	117
Tabla 26. Distribución de las muestras de tres ciudades de la Comunidad Valenciana (2005-2009) en las que se caracterizo el gen de la VP7 y NSP4.....	131
Tabla 27. Diversidad entre los grupos de secuencias de los genes de VP7 y NSP4 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.....	134
Tabla 28. Diversidad entre grupos de secuencias de los genes de VP7/NSP4 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.....	135

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Patrones electroforéticos de ARN viral de distintas cepas de rotavirus en un gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata.....	8
Fig. 2. Estructura de un fragmento génico de rotavirus.....	8
Fig. 3. Diagrama de flujo para la clasificación de los genotipos de rotavirus.....	11
Fig. 4. Estructura tridimensional de la partícula de rotavirus. Segmentos genómicos que codifican las diferentes proteínas en función de su movilidad electroforética.....	12
Fig. 5. Esquema de proteínas estructurales de rotavirus.....	13
Fig. 6. Representación esquemática de la proteína VP4 de rotavirus. Regiones variables conservadas de la proteína y lugares de corte de la tripsina (VP5* y VP8*).....	15
Fig. 7. Modelo de la membrana de VP4.....	16
Fig. 8. Representación esquemática de la proteína VP7 de rotavirus. ....	18
Fig. 9. Representación esquemática de la proteína NSP4 de rotavirus.....	20
Fig.10. Dendrograma de genotipos VP7 del RCWG (Rotavirus Classification Working Group).....	39
Fig.11. Esquema de la amplificación de fragmentos de PCR correspondientes a ocho genotipos G de rotavirus (G1 a G4, G8, G9, G10 y G12) identificables por su tamaño mediante análisis por electroforesis en gel de agarosa.....	47

Fig. 12. Esquema de la amplificación de fragmentos de PCR correspondientes a seis genotipos P de rotavirus (P[4], P[6], P[8], P[9], P10], P[11]) identificables por su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa.....	50
Fig. 13. Distribución de genotipos G identificados en los años 2005-2006.....	54
Fig. 14. Distribución de genotipos G identificados en los años 2006-2007.....	55
Fig. 15. Distribución de genotipos G identificados en los años 2007-2008.....	56
Fig. 16. Distribución de genotipos G identificados en los años 2008-2009.....	57
Fig. 17. Distribución de genotipos G9 por procedencia identificados en los años 2008-2009.....	58
Fig. 18. Distribución de los genotipos P (VP4) identificados en los años 2005-2009.....	58
Fig. 19. Distribución de genotipo G/P identificados en los años 2005-2009.....	59
Fig. 20. Distribución de los genotipos G9P[8] identificados en los años 2005-2009.....	60
Fig. 21. Distribución temporal y expansión geográfica a nivel mundial durante las dos últimas décadas de las cepas de rotavirus del genotipo G9.....	74
Fig. 22. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre el genotipo G9 de diferentes secuencias de origen humano y porcino en el mundo y sus linajes.....	78
Fig. 23. Método para purificar amplímeros de PCR.....	81
Fig. 24. Dendrograma de genotipos G9P[8] linaje IIIId con cepas de referencia. ....	88
Fig. 25. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de VP7 de cepas de rotavirus G9P[8] con secuencias de referencia.....	90
Fig. 26. Representación esquemática de la proteína NSP4 de rotavirus.....	100
Fig. 27. Dendrograma de genotipos NSP4 según el “Rotavirus Classification Working Group” (RCWG).....	102
Fig. 28. Dendrograma de secuencias nucleotídicas del gen de NSP4.....	111
Fig. 29. Dendrograma de genotipos NSP4 con cepas de referencia.....	112
Fig. 30. Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de NSP4 de cepas de rotavirus G9P[8].....	115
Fig. 31. Dendrograma de secuencias nucleotídicas de la unión de secuencias de los genes de VP7 y NSP4.....	132
Fig. 32. Dendrograma de secuencias nucleotídicas de la unión de secuencias de los genes de VP7 y NSP4.....	133



# **1. INTRODUCCIÓN**



Los rotavirus constituyen una de las causas más frecuentes de diarrea infantil, siendo más prevalentes en niños menores de cinco años (Parashar et al., 2003; Glass et al., 2005).

El virus posee una doble cápside y un *core* central que contiene el ARN genómico que está compuesto por 11 segmentos de doble cadena que codifican seis proteínas estructurales y seis no estructurales. Las características antigénicas de la proteína VP6 de la cápside interna han permitido diferenciar 7 serogrupos (A-G), siendo el serogrupo A el que infecta predominantemente a la especie humana. La proteína VP4, forma dímeros que constituyen las espículas del virión, y la glicoproteína VP7 es el principal componente de la cápside externa.

Estas proteínas de la cubierta externa (VP7/VP4) determinan la clasificación de rotavirus en los denominados serotipos/genotipos G y P. Cuando el método utilizado para la detección de estos es inmunológico (anticuerpos policlonales o monoclonales tipo-específicos) se habla de serotipos, mientras que si el método de detección es molecular (RT-PCR con cebadores tipo-específicos o secuenciación) se denominan genotipos.

Hasta el momento actual se han descritos 27 genotipos G y 35 genotipos P (Matthijnssens et al., 2011). El Grupo de Trabajo de Clasificación de Rotavirus (RCWG) ha identificado hasta abril de 2011 nuevos genotipos de VP7 (G20-G27), VP4 (P[28]-P[35]), VP6 (I12-I16), VP1 (R5-R9), VP2 (C6-C9), VP3 (M7-M8), NSP1 (A15-A16), NSP2 (N6-N9), NSP3 (T8-T12), NSP4 (E12-E14) y NSP5/6 (H7-H11) (Santos y Hoshino, 2005; Matthijnssens et al., 2011).

Los cuatro genotipos G más comunes son G1, G2, G3, G4 y dos genotipos P, P[4] y P[8]. Desde 1994 se han publicado diferentes estudios que demuestran la

aparición de un nuevo genotipo G9 causante de gastroenteritis infantil con una amplia distribución geográfica (Arista et al., 1997; Palombo et al., 2000; Zhou et al., 2001; Fischer et al., 2004; Ansaldi et al., 2007). El genotipo G9 ha sido detectado en combinación con P[4] y P[8], pero también ha sido descrito combinado con P[6], P[9], P[11] y P[19] (Gentsch et al., 1996).

Los análisis filogenéticos del gen VP7 de cepas G9 diferenciaron inicialmente tres linajes (Laird et al., 2003; Hoshino et al., 2004). El linaje 1 incluye aislados de los años 80; el linaje 2 corresponde a aislados de muestras de heces de recién nacidos asintomáticos en la India y el linaje 3 se detecta en aislados actuales alrededor de todo el mundo. Posteriormente, se describieron 6 nuevos linajes y 11 sublinajes en el genotipo G9 (Rahman et al., 2005; Phan et al., 2007).

Respecto a las proteínas no estructurales NSP2, NSP5 y NSP6 intervienen en la replicación viral. La proteína NSP4 tiene un interés especial, ya que se sabe que tiene un papel importante en el proceso de maduración de los viriones, actuando como receptor intracelular para VP6. Por otra parte, esta proteína actúa como una enterotoxina, siendo capaz por sí sola de producir diarrea en el ratón (Kirkwood y Palombo, 1997).

Los genes NSP4 de rotavirus han sido estudiados tanto en cepas de origen animal como humano, habiéndose descritos seis genotipos distintos de NSP4 (A-F). Los genotipos A, B, C y D se han descrito en mamíferos, mientras que los genotipos E y F se han identificado en aislados de aves. Los genotipos A, B y C son los más frecuentemente detectados en los seres humanos, especialmente el genotipo B (Ciarlet et al., 2000; Mori et al., 2002; Lin y Tian, 2003).

## **1.1. BREVE HISTORIA Y TAXONOMÍA DE LOS ROTAVIRUS**

En 1973 Bishop et al. describieron un virus en forma de rueda tras la observación al microscopio electrónico de cortes de intestino delgado procedentes de niños con gastroenteritis (Bishop, 1973). No obstante, diez años antes, en 1963, se habían encontrado en la mucosa intestinal de ratones con diarrea unos virus con una morfología similar. El virus aislado de los ratones fue llamado virus de la diarrea epizootica de ratones lactantes (EDIM) (Adams y Kraft, 1963). En ese mismo año, (Malherbe y Harwin, 1963) aislaron partículas víricas a partir del tejido rectal de un mono ‘vervet’ sano. El virus fue llamado SA11, del inglés “*simian agent 11*”. Este aislado pudo ser propagado en una línea celular procedente de la misma especie de simio. Posteriormente, Mebus y colaboradores demostraron la presencia de otro virus de tamaño y morfología similares a los descritos anteriormente en heces de terneros con diarrea (Mebus et al., 1969). El virus aislado por Mebus también pudo ser propagado en células fetales bovinas (Mebus et al., 1971). Debido a su morfología en forma de rueda, estos nuevos virus causantes de gastroenteritis fueron llamados rotavirus, del término en latín “*rota*” que significa rueda. Finalmente, en 1979, Matthews estableció el género *Rotavirus* e incorporó este nuevo género a la familia *Reoviridae* (Matthews, 1979). Esta familia está compuesta por virus de estructura icosaédrica sin envoltura lipídica cuya cápside está formada por capas concéntricas de proteínas con un diámetro de entre 60 y 80 nm. El genoma está constituido por 10 a 12 segmentos de ARN de doble cadena (ARNbc) lo que permite que se produzcan recombinaciones y reordenamientos genéticos. La replicación de los virus pertenecientes a la familia *Reoviridae* tiene lugar en el citoplasma celular, en unas estructuras subcelulares ricas en proteínas víricas llamadas viroplasma.

Dentro de la familia *Reoviridae* se agrupan doce géneros diferentes: *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Seadorvirus*, que afectan a vertebrados; *Cypovirus*, que afectan a invertebrados; *Fijivirus*, *Phytoreovirus* y *Oryzavirus* que afectan a plantas, y por último, *Idnoreovirus* y *Mycoreovirus*, que afectan a insectos (Tabla 1).

Familia	Género	Especie tipo
<i>Reoviridae</i>	<i>Aquareovirus</i>	Aquareovirus A
	<i>Cypovirus</i>	Cypovirus 1
	<i>Coltivirus</i>	Fiebre por garrapatas del Colorado
	<i>Fijivirus</i>	Virus de la enfermedad de Fiji
	<i>Idnoreovirus</i>	Idnoreovirus 1
	<i>Mycoreovirus</i>	Mycoreovirus 1
	<i>Orbivirus</i>	Virus de la lengua azul
	<i>Orthoreovirus</i>	Orthoreovirus de mamíferos
	<i>Oryzavirus</i>	Virus del arroz mellado atrofiado
	<i>Phytoreovirus</i>	Virus del arroz enano
	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus grupo A
	<i>Seadornavirus</i>	Virus Banna

Tabla 1. Géneros clasificados en la familia *Reoviridae* (VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2005).

## 1.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y BIOLÓGICAS

*Rotavirus* constituye un género dentro de la familia *Reoviridae*, en la que los miembros de esta familia comparten características comunes.

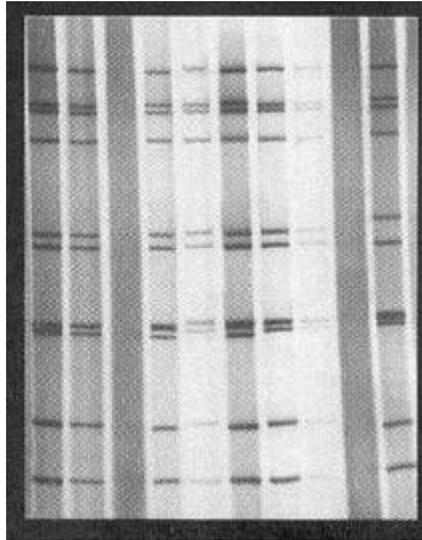
Estructuralmente, los rotavirus son virus de simetría icosaédrica, de 75 nm de diámetro, carentes de membrana lipídica, con tres capas proteicas que conforman la cápside vírica, en la que se encuentran las enzimas necesarias para la transcripción de

sus ARN mensajeros.

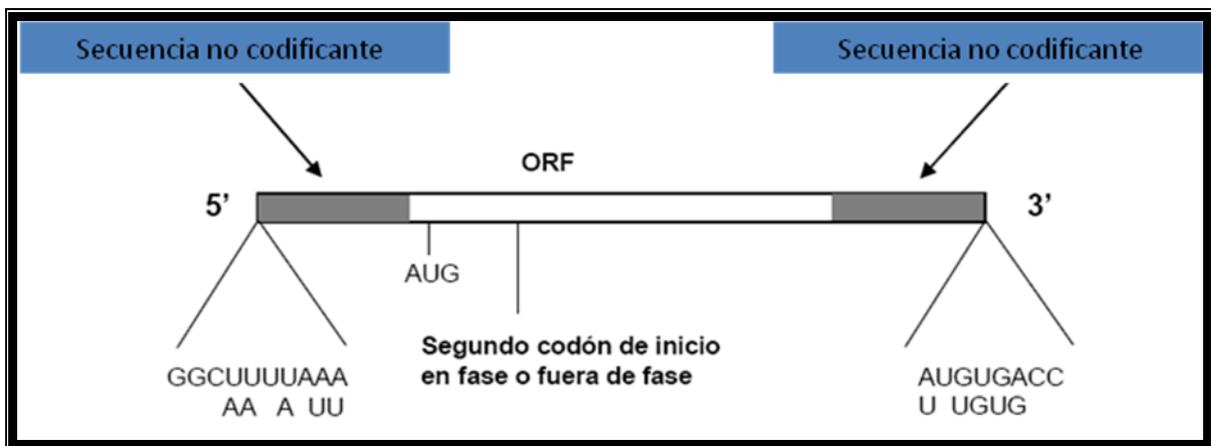
El genoma está constituido por 11 segmentos de ARN bicatenario distinguibles electroforéticamente, con tamaños que oscilan entre 660 pb (segmento 11) y 3.300 pb (segmento 1), que codifican seis proteínas estructurales y seis no estructurales (Figura 1). Los segmentos genómicos comienzan siempre con una guanina y están seguidos por secuencias conservadas en la zona no codificante. La zona codificante de la proteína (“*open reading frame*” ORF), al menos una por cada segmento genómico, se encuentra flanqueada por secuencias conservadas no codificantes (Figura 2). Cada segmento de ARN genómico codifica al menos una proteína.

La naturaleza segmentada del ARN facilita los reordenamientos del genoma cuando las células se infectan con diferentes cepas de rotavirus. En cuanto a su replicación, se realiza en el citoplasma en diferentes regiones de la célula, caracterizadas por contener concentraciones diferentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Estes et al., 2001). Primeramente, se observan en el citoplasma estructuras nuevas llamadas viroplasmos, que corresponden a la acumulación de productos virales: proteínas, ARN y partículas virales precursoras que tienen solamente dos capas proteicas (DLP). Luego, las DLP entran en el retículo endoplasmático (RE) donde terminan su proceso de maduración. Para ello, interactúan con un receptor intracelular en la membrana del RE, la proteína NSP4, que corresponde a una glicoproteína viral no estructural. La internalización ocurre por gemación donde las partículas adquieren transitoriamente una cubierta lipídica que contiene constitutivamente la VP7 (proteína estructural). En el transcurso de este evento, la otra proteína externa, VP4, está también internalizada desde el citoplasma, probablemente a través de una asociación a NSP4 y/o VP7, cuyos detalles se desconocen. Dentro del RE, se produce la exclusión de NSP4 y de los lípidos de la membrana. Paralelamente, VP7 y VP4 son reubicados sobre las partículas para formar la última capa proteica de la

cápside.



**Fig. 1. Patrones electroforéticos de ARN viral de distintas cepas de rotavirus en un gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata.**



**Fig. 2. Estructura de un fragmento génico de rotavirus.**

El virus es estable a 20°C - 40°C cuando se mantiene en una concentración 1,5 mM de calcio, con estabilidad y en un rango de pH de 3 a 9. Este virus puede multiplicarse en cultivos celulares con dificultad. La línea celular clásicamente utilizada para su cultivo ha sido MA-104, con la incorporación de tripsina (1 µg/ml) al medio (Ramia y Sattar, 1980; Wyatt et al., 1983).

En cuanto a su infectividad, la cepa de simio SA11 mantiene la misma a valores de pH entre 3,3 y 10, y no es inactivada por éter, cloroformo, fluorocarbonos, proteasas ni ciclos de congelación y descongelación (Estes et al., 1983). Pierde infectividad después de incubación en  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , EDTA y tras calentamiento en  $\text{ClNa}$  durante 15 minutos a  $50^\circ\text{C}$ . Asimismo, estos virus pierden la cápside externa y son menos infectivos bajo la acción de agentes quelantes del calcio (Estes et al., 1979). Entre los desinfectantes más efectivos frente a rotavirus se encuentran el etanol al 95% y el hipoclorito sódico (Tan y Schnagl, 1981; Abad et al., 1994). Además, se ha demostrado que los rotavirus sobreviven al tratamiento estándar con cloro en depósitos de agua contaminada (Smith y Gerba, 1982).

### **1.3. CLASIFICACIÓN DE ROTAVIRUS**

Los *Rotavirus* se clasifican en grupos, subgrupos y genotipos según las propiedades antigénicas de las proteínas de su cápside. La proteína VP6 es la determinante de la especificidad de grupo y de subgrupo. En la antigenicidad de esta proteína se basan la mayoría de los ensayos diagnósticos (ELISA, aglutinación de partículas de látex, inmunocromatografía).

En la actualidad existen 7 grupos denominados con las letras de la A a la G y los subgrupos, I, II, I y II y ni I ni II en el grupo A (Estes, 2001). Los grupos A, B y C son los que producen infección en el hombre. Los grupos D, E, F y G únicamente han sido descritos en animales hasta el momento (Coulson, 1996). La clasificación en genotipos se basa en las diferencias antigénicas de las proteínas de la cubierta externa VP7 y VP4. Los genotipos “G”, se denominan así por la naturaleza glicosilada de la proteína VP7 y los genotipos “P” por la proteasa de la proteína VP4.

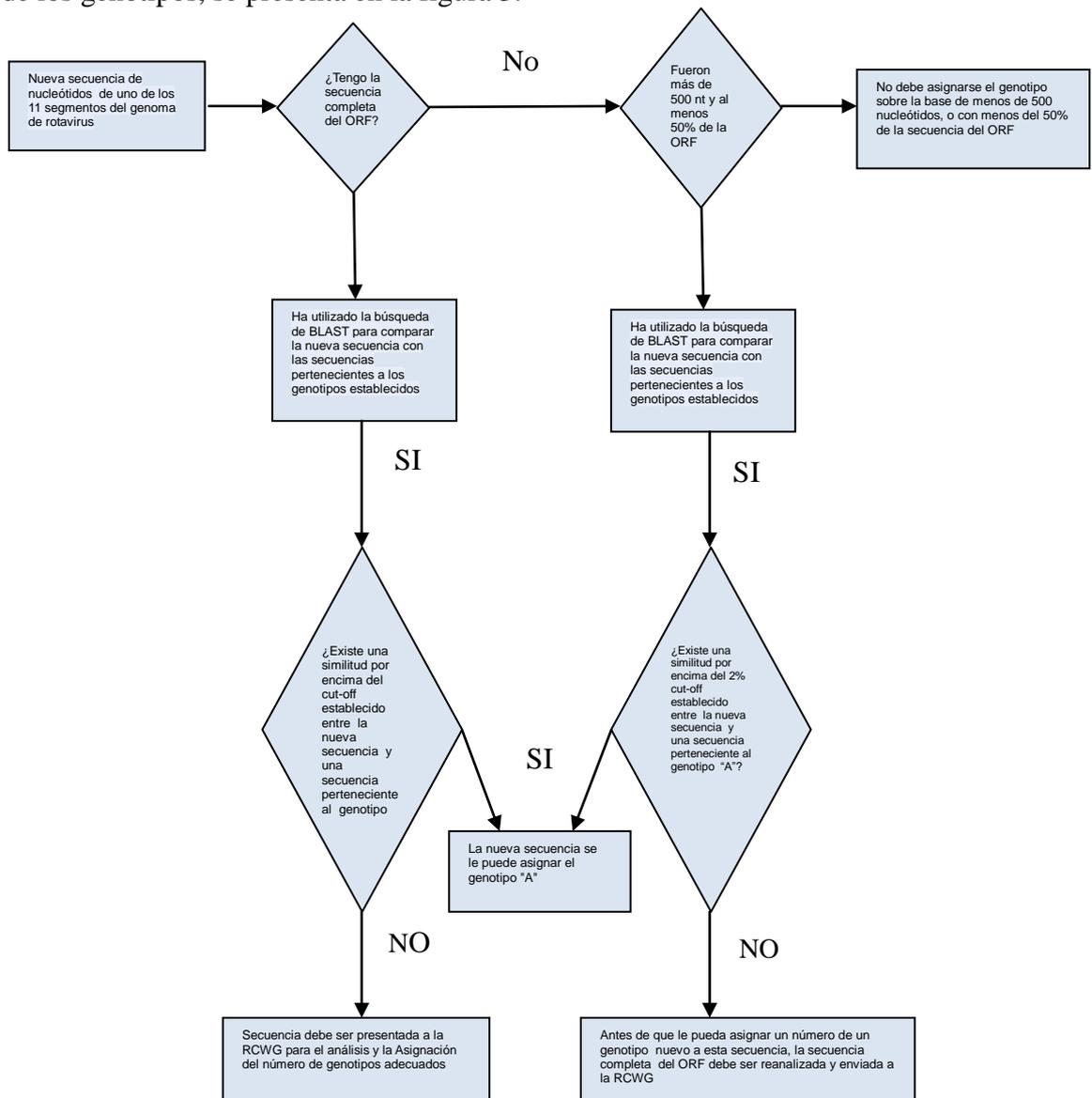
Hasta el momento se han descrito 15 genotipos G y 24 genotipos P (Estes et al.,

2001; Santos y Hoshino, 2005). Los genotipos G1, G2, G3 y G4 son los predominantes en todo el mundo (Ciarlet y Liprandi, 1994; Christensen, 1999; Gouvea y Santos, 1999). Se han descrito también infecciones por los genotipos G5, G6, G8, G9, G10 y G12 (Radwan et al., 1997; Santos et al., 1998; Unicomb et al., 1999; Bon et al., 2000). Los genotipos circulantes pueden variar dentro de una misma región a lo largo de las distintas temporadas (Woods et al., 1992; Haffeejee, 1995; Gentsch et al., 1996; Cunliffe et al., 2001), hecho que se ha descrito también en nuestro país (Wilhelmi et al., 1999; Buesa et al., 2000; Cilla et al., 2000; Tellez et al., 2008; Tellez Castillo et al., 2010).

Los serotipos P se han clasificado mediante técnicas de neutralización en serotipos y subtipos P: 1A, 1B, 2A, 2B, 3, 4, 5 y 8 (Christensen, 1999). Hoy día se utiliza más la clasificación según las técnicas moleculares de genotipado y se recomienda incluir en corchetes el número del genotipo para diferenciarlo del serotipo determinado por neutralización (Gentsch et al., 1996). Hasta el momento se han descrito 24 genotipos P en relación con la proteína VP4, siendo los más frecuentes los genotipos P[4], P[6], P[8] (Gentsch et al., 1996; Santos et al., 2005). Aunque cabría pensar que los genotipos G y P son independientes, existen asociaciones que se repiten con mayor frecuencia, como son G1, G3 y G4 con el genotipo P[8] y el G2 con el P[4] (Gentsch et al., 1996).

Recientemente, ha sido propuesto un nuevo sistema de clasificación para rotavirus siendo una extensión del aplicado anteriormente (VP4, VP7, VP6 y NSP4), en el cual se utiliza la identidad de los 11 segmentos genómico de ARN (Matthijnsens et al., 2008; Matthijnsens et al., 2011), para así definir los diferentes genotipos para cada segmento del genoma. Se ha propuesto una nomenclatura para la comparación de genomas completos de rotavirus de la siguiente manera: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx para definir los genotipos de VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-

NSP3-NSP4-NSP5 respectivamente. Este sistema se ha establecido con el fin de establecer un orden en los genotipos actuales y en los nuevos genotipos. De esta manera, al estudiar los genomas completos de cepas de rotavirus se pueden identificar los nuevos genotipos de cada uno de los once segmentos genómicos, ayudando a minimizar los errores y evitando duplicaciones. La estrategia propuesta de clasificación actual de los genotipos, se presenta en la figura 3.



**Fig. 3. Diagrama de flujo para la clasificación de los genotipos de rotavirus según el RCWG (Rotavirus Classification Working Group).**

## 1.4. ESTRUCTURA PROTEICA

Las proteínas codificadas por el genoma de rotavirus son seis proteínas estructurales que se denominan con las iniciales VP (“*viral protein*”) seguidas de un número (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales que se designan con las iniciales NSP (“*non-structural protein*”) seguidas de un número (NSP1-NSP6) (Figura 4).

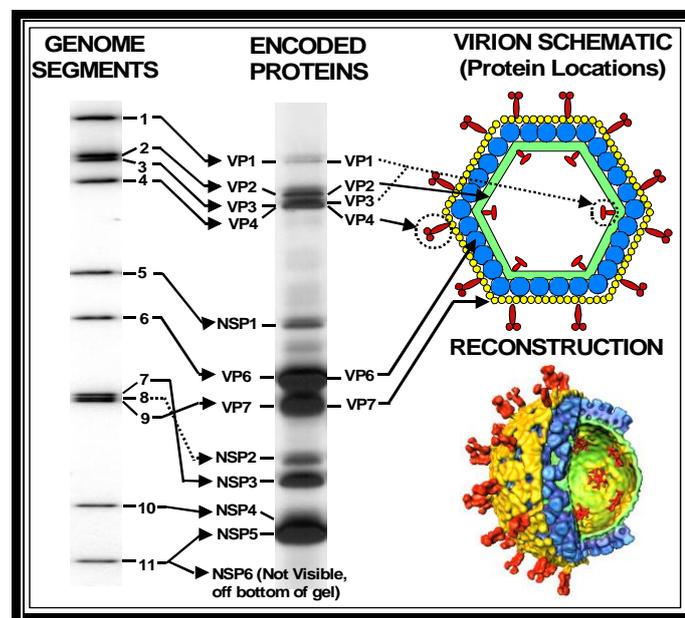


Fig. 4. Estructura tridimensional de la partícula de rotavirus. Numeración de los segmentos genómicos que codifican las diferentes proteínas en función de su movilidad electroforética. Y su correspondencia con estas proteínas.

### 1.4.1. Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales VP7 y VP4 constituyen la cápside externa. La VP7 corresponde a la parte lisa de la cubierta y la VP4 a las espículas (VP4 se divide en las subunidades VP5\* y VP8\* debido a la digestión con tripsina). Ambas proteínas son los únicos antígenos virales que inducen independientemente la formación de anticuerpos

neutralizantes (Yeager et al., 1990; Franco et al., 1996). La cápside interna está formada por la proteína VP6, que se distribuye en 260 trímeros, y el *core* por 120 polipéptidos de VP2 distribuidos en 60 dímeros (Estes et al., 2001). En el interior del *core* se encuentran los 11 segmentos genómicos y la ARN polimerasa constituida por las proteínas VP1 y VP3 (Figura 5). Cada una de las proteínas estructurales posee una función descrita de forma resumida en la tabla 2.

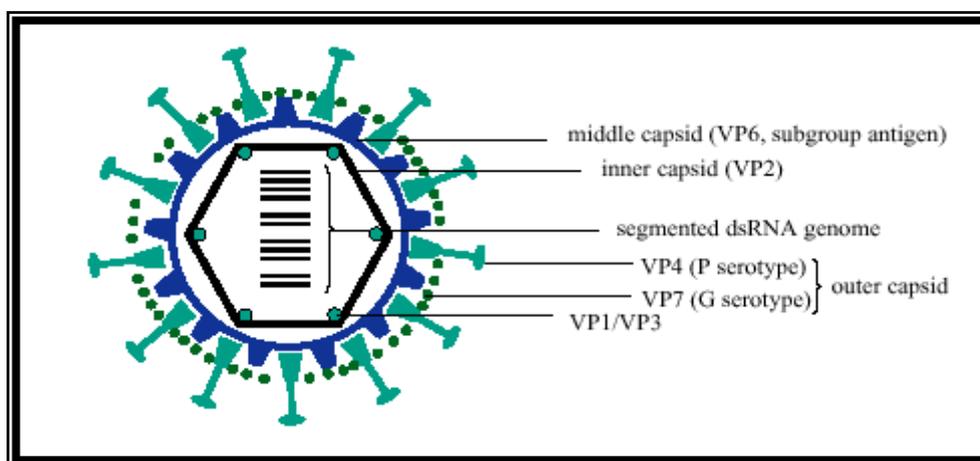


Fig. 5. Esquema de proteínas estructurales de rotavirus.

Segmento genómico	Proteína	Localización	Función
1	VP1	interior del core	ARN-polimerasa; forma el complejo transcripcional con VP3
2	VP2	core	Unión al ARN, necesario para actividad replicasa con VP1
3	VP3	interior del core	Guanililtransferasa; metiltransferasa; complejo transcripcional con VP1
4	VP4(VP5+VP8)	cápside externa (espículas)	Hemaglutinina, unión a los receptores, factor de virulencia; ag. neutralizante P
6	VP6	cápside interna	Antígeno de grupo y subgrupo
7, 8, 9	VP7	cápside externa	Glicoproteína, antígeno inductor de anticuerpos neutralizantes (tipo G)

Tabla 2. Función y localización de las proteínas estructurales de rotavirus

### **1.4.1.1. Proteína VP4**

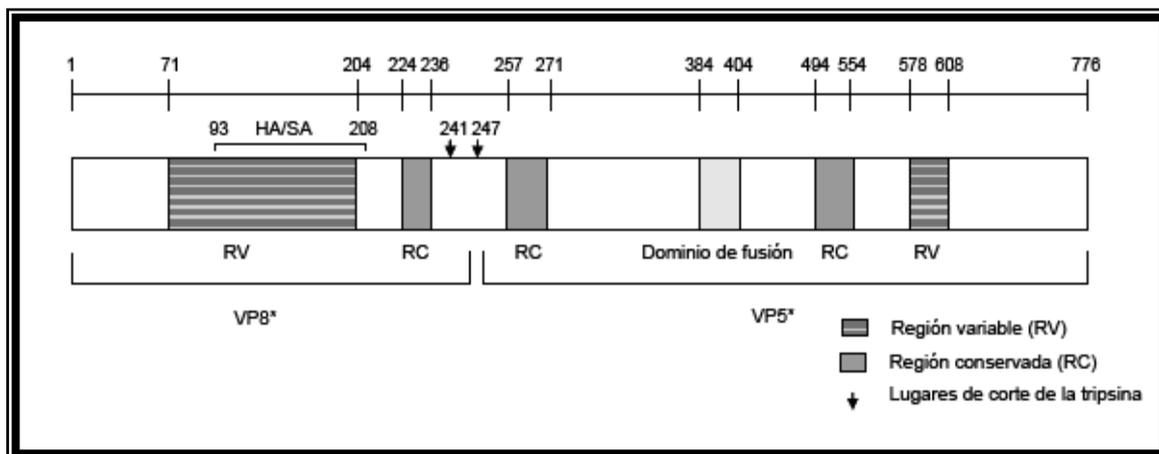
La proteína VP4 es el producto del cuarto segmento genómico, no glicosilado. Tiene un peso molecular de 88 kDa, encontrándose en la parte más externa de la cápside formando dímeros que constituyen las 60 espículas del virión.

Posee una longitud de 776 aminoácidos en la mayoría de rotavirus aislados en animales, o 775 en el caso de la mayoría de las cepas aisladas en humanos, en las cuales falta el aminoácido situado entre las posiciones 134 y 136. Esta proteína es un importante determinante antigénico, ya que es capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes de la infección por rotavirus (Hoshino et al., 1995). Esta característica permite la clasificación de los rotavirus del grupo A en diferentes serotipos P. También es una proteína clave en la infectividad viral: se ha demostrado que es un determinante de virulencia en ratones y cerdos (Espejo et al., 1981; Estes et al., 1981; Offit et al., 1986), así como para la inducción de anticuerpos neutralizantes (Hoshino et al., 1985; Offit y Blavat, 1986). La VP4 de muchas cepas de origen animal posee la capacidad de aglutinar hematíes, actuando como una hemaglutinina viral. No se observa esta capacidad hemaglutinante en las cepas de rotavirus humanos.

La proteína VP4 de rotavirus es escindida en dos polipéptidos por la acción de la tripsina. Esta escisión ocurre en aminoácidos conservados (arginina 241 y 247), aunque la arginina 247 es el lugar principal de escisión (Lopez et al., 1985). La acción de proteasas sobre la proteína VP4 aumenta la infectividad de rotavirus (Ramia y Sattar, 1980; Espejo et al., 1981; Estes et al., 1981; Wyatt et al., 1983). Se han demostrado cambios conformacionales en las espículas de virión al ser incubados éstos con concentraciones crecientes de tripsina (Crawford et al., 2001), aunque los cambios

estructurales y fisicoquímicos ocurridos en las espículas después de la proteólisis no están definidos en su totalidad.

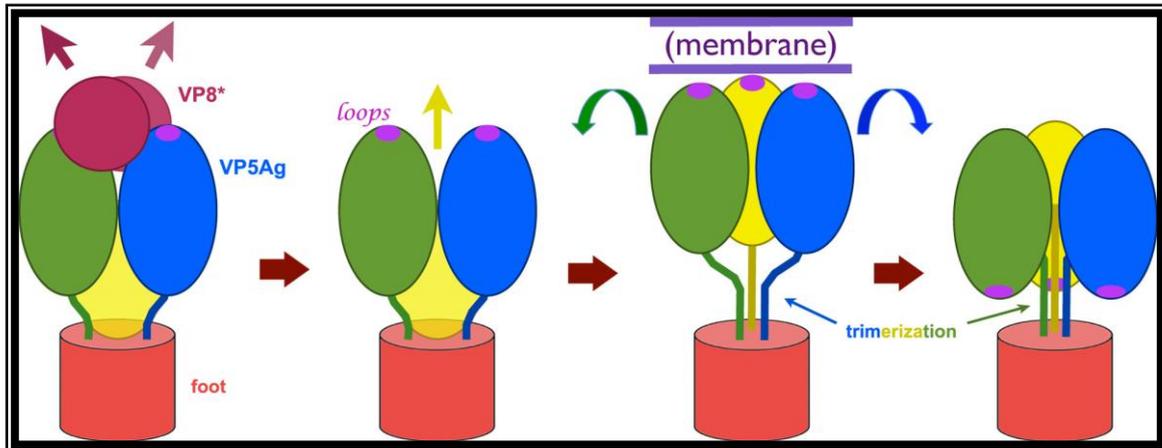
Las proteínas VP5\* y VP8\* son los productos de la proteólisis de esta proteína; siendo VP8\* el fragmento amino-terminal (28 kDa), y VP5\* extremo carboxi-terminal (60 kDa) de la proteína VP4 (Figura 6 y 7).



**Fig. 6. Representación esquemática de la proteína VP4 de rotavirus. Regiones variables y conservadas de la proteína y lugares de corte por tripsina (VP5\* y VP8\*).**

Las espículas de VP4 resultan sólo evidentes en las partículas víricas maduras tras ser tratadas con tripsina, que genera los fragmentos VP8\* y VP5\* (Crawford et al., 2001). Los dos productos de la escisión con tripsina permanecen asociados en el virión, aunque la ubicación topográfica exacta de VP5\* y VP8\* en la espícula han sido motivo de controversia. Mediante estudios estructurales de mutantes de escape con un anticuerpo monoclonal que identifica VP5\* se observó que el extremo distal de la espícula contiene un dominio dentro de la región VP5\* (Prasad et al., 1990). La digestión proteolítica de VP4 activa la infectividad del virus (Estes et al., 1981). Antes de ser escindidas, las regiones externas de la VP4 probablemente se encuentran flexiblemente plegadas hacia la base de la espícula, que está fijada por la VP7 a la cápside interna (Dormitzer et al., 2004). Cada espícula contiene tres copias de VP4. La

parte más distal de la espícula parece estar formada por un dímero y encontrarse desplazada del eje. La criomicroscopía electrónica ha demostrado que la base consta de un trímero de simetría triple (Li et al., 2009). Esta falta de correlación en las simetrías sugiere que la estructura de la espícula depende de un estímulo apropiado.



**Fig.7. Modelo de la estructura de VP4.** La secuencia de reordenamientos conformacionales en el diagrama comienza con la disociación de VP8\*, seguida por la formación de una superficie intermedia que origina así un trímero, que se extiende por el lado hidrofóbico a una membrana. Esta interacción aumenta el rendimiento de VP5\*. Original de Kim et al. (2010) *J. Virol.* 84:6200-7.

Los estudios realizados recientemente sobre la estructura de VP4 sugieren el modelo representado en la Figura 7 (Kim et al., 2010). La VP4 digerida con tripsina forma la espícula, en la que existe un “cuerpo” integrado por dos de los tres fragmentos de VP5\*; dos fragmentos VP8\* asociados cubren el extremo hidrofóbico de los dominios VP5\* agrupados en barril beta. Las tres subunidades VP5\* constituyen la base C-terminal, que es estabilizada por un trímero de VP7.

### 1.4.1.2. Proteína VP7

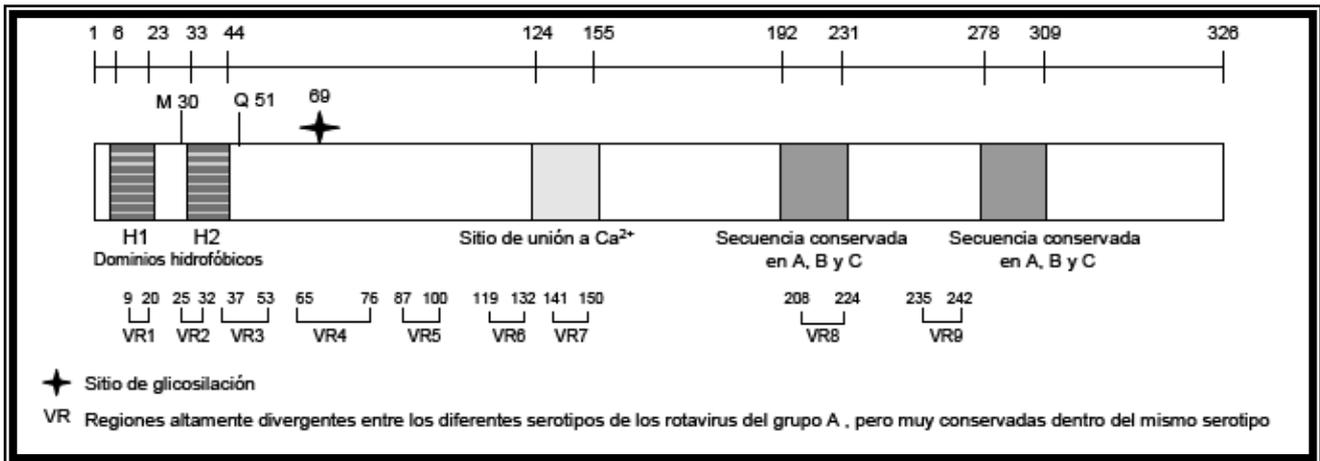
La proteína VP7 es la proteína más abundante del virión, ya que constituye el 30% de la proteína viral (Mattion et al., 1994). El gen de la proteína VP7 codifica 326 aminoácidos. En la mayoría de las cepas estudiadas es codificada por el segmento 9. La

movilidad electroforética de este segmento puede variar, migrando en la posición 7 u 8 en la cepa RRV o UK, respectivamente (Dyall-Smith y Holmes, 1981). Es una proteína glicosilada de la cápside externa del virión de rotavirus. La secuencia de glicosilación puede variar de unas cepas a otras (posiciones 69-71), siendo la secuencia Asn-Ser-Thr (Kouvelos et al., 1984; Gunn et al., 1985; Nishikawa et al., 1989) (Figura 8).

El ORF de 326 aminoácidos comienza con un codón de inicio con una secuencia consenso débil, seguido por una zona hidrofóbica (H1) y un segundo codón de inicio en fase, esta vez precedido por una secuencia consenso fuerte. Este segundo codón ATG de iniciación también va seguido por una zona hidrofóbica (H2). Estas secuencias hidrofóbicas actúan dirigiendo a la proteína VP7 hacia el retículo endoplasmático (RE), llevándose a cabo su glicosilación durante la entrada de la proteína. El péptido señal que dirige la proteína VP7 al RE es escindido en la glicina 51 en la mayoría de las cepas de rotavirus, de forma que los dos dominios hidrofóbicos no están presentes en las proteínas maduras (Stirzaker et al., 1987). La proteína VP7 al quedar insertada en el retículo endoplasmático queda orientada hacia el lumen, y una vez asociada a la membrana es resistente a la digestión por estas enzimas. Sin embargo, la proteína VP7 carece de la secuencia KDEL que se ha visto que promueve la retención en el RE de otras proteínas (Munro y Pelham, 1987).

En el virión, las moléculas de VP7 se asocian formando trímeros de forma triangular rodeando los canales acuosos de la cápside externa con simetría T=13. Los trímeros muestran una pequeña depresión en el centro, y están conectados unos con otros en los lados. Cada virión tiene 780 moléculas de VP7 (260 trímeros), siendo el grosor total de la cápside externa de ~35 Å.

VP7 es el antígeno que establece la clasificación de los serotipos G de rotavirus, atendiendo a la presencia de anticuerpos neutralizantes que reconocen esta proteína.



**Fig. 8. Representación esquemática de la proteína VP7 de rotavirus. Dominios hidrofóbicos de la proteína (H1, H2); sitio de corte del péptido indicado como Q51. Sitio de glicosilación (aa 69). Secuencias conservadas entre cepas del mismo serotipo.**

#### 1.4.2. Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales (NSP) de rotavirus son codificadas por diferentes segmentos genómicos. Estas proteínas no forman parte de la estructura del virión y son sintetizadas en el citoplasma de la célula durante la infección y tienen diferentes funciones relacionadas con la replicación viral, control de síntesis de proteínas celulares y virales, empaquetamiento de los genes virales y maduración de la partícula viral en el interior celular. El papel de las proteínas no estructurales y su correspondiente segmento genómico se resume en la siguiente tabla:

Segmento genómico	Proteína	Función
5	NSP1	Unión al citoesqueleto; puede inhibir la respuesta del interferón durante la infección (Graff et al., 2002)
7,8,9	NSP3	Replicación viral (ARN); inhibe la síntesis proteica celular (Padilla-Noriega et al., 2002)
8	NSP2	Unión a ARN, NTPasa (Vende et al., 2002)
10	NSP4	Receptor intracelular, enterotoxina, papel en la morfogénesis (Ball et al., 1996; Kirkwood y Palombo, 1997)
11	NSP5	Replicación viral, interacción con VP2, NSP2 (Vende et al., 2002)
	NSP6	Replicación viral, interacción con NSP5 (Torres-Vega et al., 2000)

**Tabla 3. Función de las proteínas no estructurales de rotavirus.**

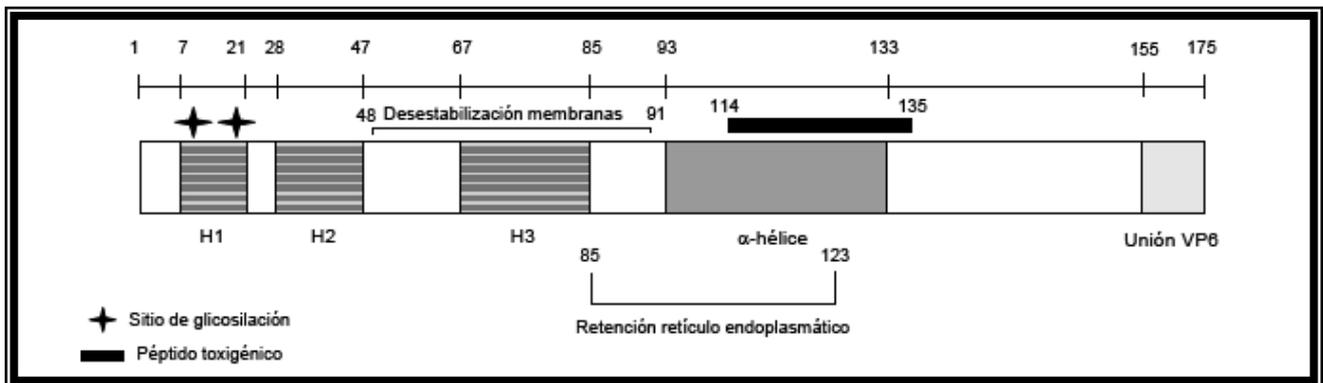
#### **1.4.2.1. Proteína NSP4**

La proteína no estructural NSP4 es codificada por el segmento 10, consta de 175 aminoácidos y sirve como receptor intracelular en la membrana del retículo endoplasmático de las partículas de doble capa e interactúa con las proteínas de la cápside viral (Taylor, 2003). Además, se ha descrito que la proteína NSP4 posee actividad enterotoxigénica, que se encuentra ubicada entre los aminoácidos 114 y 135 (Ball et al., 1996). Los cambios en su actividad han sido asociados con modificaciones en esta región (Ball et al., 1996; Zhang et al., 1998). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que NSP4 no es un factor determinante de patogenicidad en las infecciones por rotavirus (Lee et al., 2000; Lin y Tian, 2003), por lo cual otros estudios han intensificado sus investigaciones debido tanto a su intervención en la morfogénesis como en la fisiopatología de las infecciones por rotavirus.

## INTRODUCCIÓN

En la secuencia de la proteína NSP4 existen dos zonas claramente definidas:

- 1) porción amino-terminal: encargadas de dirigir la proteína hacia el retículo endoplasmático donde la proteína será glicosilada. Dicha porción posee tres zona hidrofóbicas (H1, H2, H3) (Estes, 2001).
- 2) porción carboxi-terminal: donde se encuentran la mayoría de las actividades de la proteína NSP4, es hidrofílica y queda expuesta hacia el citoplasma celular (Fig. 9).



**Fig.9. Representación esquemática de la proteína NSP4 de rotavirus. Se indican la región del péptido toxigénico, los dominios hidrofóbicos (H1, H2, H3), el dominio de unión a VP6 y los sitios de glicosilación en la región hidrofóbica (H1), que es la única que queda orientada hacia el lumen.**

Como se ha expuesto anteriormente, dentro de las funciones descritas la proteína NSP4 actúa como receptor intracelular en el proceso de morfogénesis de rotavirus, para que las partículas víricas inmaduras sean internalizadas en el retículo endoplasmático. La región de la proteína implicada en este reconocimiento se encuentra en los últimos 20 aminoácidos de la cola citoplasmática de la proteína (Au et al., 1989; Meyer et al., 1989; Au et al., 1993; Olivo y Streckert, 1995; Taylor et al., 1996; O'Brien et al., 2000). La proteína NSP4 queda retenida en el retículo endoplasmático, bloqueando el tráfico

de membranas del retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi (Xu et al., 2000). La región implicada en la retención de NSP4 en el aparato de Golgi se encuentra entre los aminoácidos 85 y 123 de la región citoplasmática de NSP4 (Mirazimi et al., 2003).

Otra de las funciones descritas para NSP4 de rotavirus es su capacidad para desestabilizar membranas durante la morfogénesis viral, lo que estaría relacionado con la pérdida de la envuelta lipídica después de la internalización de partículas inmaduras en el retículo endoplasmático. Esta capacidad se encuentra entre los aminoácidos 48 a 91 de la proteína (Tian et al., 1996; Browne et al., 2000).

En 1996 Ball y colaboradores (Ball et al., 1996) describieron la capacidad de producir diarrea tanto de la proteína completa como del péptido sintético que contiene los aminoácidos 114 a 135 de la proteína NSP4 (péptido NSP4<sub>114-135</sub>), movilizando el calcio del retículo endoplasmático hacia el citoplasma y estimulando así la salida de iones cloruro y agua al exterior celular (Tian et al., 1995; Ball et al., 1996; Dong et al., 1997; Morris et al., 1999), siendo así la primera enterotoxina de origen vírico descrita.

De acuerdo con los análisis de la secuencia del gen NSP4 se diferenciaron inicialmente seis genotipos: A (KUN), B (Wa), C (AU-1), D (EW) E (PO-13) y F (Ch-1, avian-like). Los genotipos A, B y C se detectaron en humanos, mientras que los genotipos D, E y F, lo fueron en animales (Mori et al., 2002; Iturriza-Gomara et al., 2003; Lin y Tian, 2003). Se describió que cada genotipo NSP4 se relaciona con la especie animal que infecta (Ciarlet et al., 2000). También se ha observado que las combinaciones G1P[8], G3P[8] o G4P[8] pertenecen generalmente a cepas del genotipo B, mientras que las cepas del genotipo A presentan generalmente la combinación G2P[4] con un electroforetipo corto (Cunliffe et al., 1997). Actualmente se han descrito 14 genotipos NSP4, denominados E (de enterotoxina): E1-E14 (Matthijnssens et al., 2011).

### 1.4.2.2. Otras proteínas no estructurales

Todas las proteínas no estructurales, excepto NSP4, interactúan con los ácidos nucleicos y están implicadas, al igual que NSP4, en la replicación viral. NSP1 es la menos conservada de todas las proteínas víricas, mostrando más variaciones de secuencia que VP4 y VP7 (Estes et al., 2001). Contiene un dominio relativamente conservado “en dedo de zinc”, pero está ausente en algunas cepas, por lo que no parece esencial para la replicación vírica (Okada et al., 1999). NSP1 no es imprescindible para la replicación, al menos en cultivo celular, y algunos estudios han implicado este gen como factor de virulencia en el ratón (Broome et al., 1993).

NSP2 es una NTPasa que se localiza en los viroplasmos, desestabiliza dobles hélices y puede estar implicada en la encapsidación de ARN y en la virulencia (Taraporewala et al., 1999; Vende et al., 2000).

NSP3 se une al extremo 3' del ARNm viral y representa el prototipo de una clase de proteínas que se unen a secuencias específicas de ARN que sólo requieren 4 nucleótidos para su reconocimiento (Poncet et al., 1994). NSP3 se une al factor de iniciación de la traducción eIF4G e inhibe la síntesis de proteínas celulares, actuando de forma similar a la proteína celular PAPB al unirse a poli-A. Además, NSP3 incrementa la traducción de los ARNm virales (Vende et al., 2000).

NSP5 es una fosfoproteína *o*-glicosilada que se autoensambla en dímeros y posee actividad auto-quinasa (Blackhall et al., 1997). Cuando se coexpresan en células no infectadas, NSP2 induce una hiperfosforilación de NSP5 (Afrikanova et al., 1996). NSP6 es codificada por un ORF alternativo en el fragmento 11, se acumula en viroplasmos e interactúa con VP5 (Torres-Vega et al., 2000).

## **1.5. IMPORTANCIA SANITARIA DE ROTAVIRUS: MORBILIDAD Y MORTALIDAD**

La enfermedad diarreica aguda (EDA) es un problema importante en la población infantil, presentándose entre 2,6 y 3,3 episodios/niño/año en menores de 5 años, y 5 episodios/niño/año en menores de un año (Chaparro et al., 2002).

No obstante, la incidencia de la diarrea en niños menores de 5 años varía según la región geográfica y la edad. En los países en vías de desarrollo se puede observar una incidencia de 2,2 episodios/niño/año a 10,6 episodios/niño/año en niños menores de dos años (Urrestarazu et al., 1999), produciéndose 600.000 muertes anuales por esta causa (OMS, 1999). En los países desarrollados la situación cambia, a pesar de que la morbilidad sigue siendo alta (38 millones de casos/año), requieren ingreso hospitalario un 9% de los niños menores de 5 años y la mortalidad es baja (325-425 casos/año) (Alcalde Martin et al., 2002).

La EDA puede ser producida por diversos agentes, incluyendo bacterias, parásitos y virus. Los virus asociados más frecuentemente a las gastroenteritis agudas son, en primer lugar, los rotavirus, seguidos de astrovirus, calicivirus (norovirus y sapovirus) y adenovirus, sumándose a todos éstos en los últimos años, coronavirus y torovirus (Ciruela et al., 2004).

La infección por rotavirus ocurre en todas las áreas del mundo y es la causa más común de diarrea grave en los niños pequeños. Casi todos adquieren la infección antes de 3 a 5 años de edad. A las infecciones por rotavirus se atribuyen 111 millones de episodios graves de diarrea, que originan 527.000 muertes anuales, lo que constituye el 29% de todos los fallecimientos por diarrea en niños menores de 5 años (Parashar et al., 2009). En Europa, entre el 6% y el 11% de todos los ingresos hospitalarios de niños

## INTRODUCCIÓN

---

menores de 5 años son debidos a gastroenteritis y entre el 14% y el 54% de los ingresos la causa principal es la infección por rotavirus (Berner et al., 1997; Desenclos et al., 1999; Fischer, 2001; Ehlken et al., 2002; Roman et al., 2003; Tellez Castillo et al., 2008).

En los países industrializados, en los que la mortalidad debida a gastroenteritis por rotavirus es muy baja, el impacto de la enfermedad viene dado por su alta morbilidad y por la frecuencia de ingresos hospitalarios que produce (Glass, 1996). Diversos estudios europeos señalan rotavirus como responsable del 20 al 60% de los casos de gastroenteritis que requieren hospitalización, mientras que disminuye su porcentaje en los que pueden manejarse de forma ambulatoria (Caprioli et al., 1996; Johansen et al., 1999; Koopmans y Brown, 1999; Iturriza-Gomara et al., 2000). En Australia se encuentran cifras similares (Barnes et al., 1998). En EEUU se ha estimado que uno de cada 73 niños habrá sido hospitalizado por diarrea por rotavirus A en los primeros 5 años de vida (Glass et al., 1996) (Tabla 4).

<b>País</b>	<b>Referencia</b>	<b>Años</b>	<b>Porcentaje de casos por rotavirus</b>
<b>España</b>	(Wilhelmi et al., 1999)	1996-1997	45 %
<b>Reino Unido</b>	(Iturriza-Gomara et al., 2000)	1995-1998	81,8 %
<b>Vietnam</b>	(Nguyen et al., 2001)	2000-2003	55 %
<b>Singapur</b>	(Boudville et al., 2006)	1997-2004	92 %
<b>Brasil</b>	(Cardoso et al., 2003)	1986-2000	14,4 %
<b>Brasil</b>	(Santos et al., 2003)	1997-1999	23%
<b>Colombia</b>	(Urbina et al., 2003)	1998-2000	36,6%
<b>Venezuela</b>	(Salinas et al., 2004)	1998-2002	23%
<b>Argentina</b>	(Cuestas Montanes et al., 2005)	2002-2003	45,2 %

**Tabla 4. Porcentajes de casos de gastroenteritis infantil producidos por rotavirus.**

## **1.6. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ROTAVIRUS**

La epidemiología molecular se ha definido recientemente como "una ciencia que estudia la contribución de los posibles factores de riesgo genéticos y ambientales, identificados a nivel molecular, a la etiología, la distribución y la prevención de la enfermedad en las familias y en todas las poblaciones". ("What is Molecular Epidemiology?". *Molecular Epidemiology Homepage*. University of Pittsburgh. 28 July 1998. <http://www.pitt.edu/~kk/molepi.html>).

Este nuevo campo surge por la integración de la biología molecular en la investigación epidemiológica tradicional. Los objetivos de la epidemiología molecular son muy amplios e incluyen:

- Los estudios descriptivos y analíticos para evaluar las interacciones del medio ambiente con el hospedador en la producción de la enfermedad.
- El desarrollo de estrategias de prevención para el control de las infecciones bacterianas, parasitarias y víricas a través del diagnóstico molecular.
- La prevención de las enfermedades no transmisibles y las enfermedades genéticas mediante la evaluación de riesgos y la identificación de individuos susceptibles a través de análisis genéticos.

El logro de estos objetivos depende de la disponibilidad de:

- equipos de biotecnología avanzada y reactivos para el análisis de los posibles factores de riesgo genéticos y ambientales.
- epidemiólogos moleculares entrenados, capaces de integrar la biología molecular en la investigación epidemiológica y en la práctica de la salud pública.

Al reconocerse a los rotavirus como la principal causa de gastroenteritis aguda

## INTRODUCCIÓN

---

en niños pequeños se promovió pronto la investigación de estas infecciones aplicando técnicas moleculares. Inicialmente se realizaron análisis del ARN genómico de las cepas de rotavirus mediante la electroforesis de los segmentos genómicos en geles de poliacrilamida (PAGE). Otra técnica usada para el estudio epidemiológico es la caracterización del genogrupo (“genogrouping”) que consiste en una combinación de hibridación de ácidos nucleicos corrida en geles de poliacrilamida, permitiendo evidenciar relaciones de homología entre segmentos genómicos de distintas cepas. La identificación de genogrupos ha sido útil para clasificar a los rotavirus en grupos que comparten gran homología (genogrupos) y para identificar el origen de segmentos específicos de RNA en virus con recombinaciones genómicas (“reassortants”), por ejemplo aquellos involucrados en transmisión inter-especies. El estudio de genogrupos permitió individualizar los tres genogrupos principales de rotavirus humanos: tipo Wa “Wa like”, tipo DS-1 “DS-1 like” y tipo AU-1 “AU-1 like”.

Actualmente se utiliza la identificación de electroferotipos por PAGE y de genogrupos para el seguimiento de la diseminación de las cepas y para el estudio de aparición de recombinantes genómicos, respectivamente.

La descripción de perfiles o patrones electroforéticos de las distintas cepas sirve para examinar también aislados de diferentes brotes epidémicos, zonas geográficas, periodos, etc. Se ha podido constatar en las cepas circulantes de rotavirus en la comunidad un alto grado de diversidad genética, como sucede con muchos virus de ARN, además de mostrar diferentes genotipos G y P y una variedad de combinantes de estos. Mediante otras técnicas como el mapeo de oligonucleótidos y los análisis de hibridación se comprobó que estas variaciones estaban enmarcadas en tres mecanismos importantes para la evolución genética y diversidad de rotavirus: 1) “drift” (derivadas o

deslizamientos), 2) “shift” (saltos o cambios bruscos) y 3) “rearrangement” (reordenamiento) (Sanders, 1985).

1) “Drift” (derivadas o deslizamientos): la tasa de mutación de rotavirus se ha calculado aproximadamente en  $< 5 \times 10^{-5}$  por nucleótidos por repetición, originando por lo menos una mutación en un nuevo genoma de rotavirus (Blackhall et al., 1996 828). Las mutaciones puntuales pueden acumularse y dar lugar a variaciones intratípicas identificadas por la existencia de linajes dentro de los genes de las proteínas estructurales VP7 y VP4 de determinados genotipos G y P. Dichas mutaciones puntuales pueden dar lugar a cambios antigénicos, ocasionando la aparición de mutantes de escape de anticuerpos.

2) “Shift” (saltos o cambios bruscos): la infección de una misma célula por más de una cepa de rotavirus puede producir una progenie de virus recombinantes (“reassortants”). Como las proteínas estructurales (VP7, VP4 y VP6) son codificadas por diferentes segmentos génicos, el número de combinaciones posibles es muy elevado, y muchas de estas diferentes combinaciones han sido encontradas “in vivo”. Esta redistribución puede contribuir a la diversidad de rotavirus, y hay una evidencia creciente de que el reordenamiento se lleva a cabo “in vivo”. También hay evidencias de que el reordenamiento, a través de alteraciones en las interacciones proteína-proteína, puede dar lugar a cambios en epítomos conformacionales, pudiendo contribuir a la evolución de los tipos antigénicos. La transmisión entre especies y la consiguiente aparición de fenómenos de recombinación entre rotavirus animales y humanos ocasionan un aumento en la diversidad de las cepas circulantes de rotavirus.

3) “Rearrangement”(reordenamiento): consiste en un proceso de formación de empalmes (concatémeros) o de truncamientos de los segmentos génicos y sus ORFs, ocasionando la producción de nuevas proteínas con funciones que pueden estar alteradas, contribuyendo a la evolución de los rotavirus.

Estos mecanismos hacen que los rotavirus puedan sufrir recombinaciones de segmentos “in vivo” y reordenamientos, independientemente de los genes responsables, lo cual hace que la dotación genética total de un aislado en particular no pueda ser asumida “a priori”. Aunque, se observan combinaciones G/P típicas en cada especie animal también se ha documentado la circulación de cepas recombinantes con combinaciones humanas infrecuentes o con segmentos genómicos adquiridos de cepas animales.

A fin de determinar los genotipos circulantes en una región determinada, lo que es imprescindible para el estudio de la evolución viral, su interacción con los huéspedes y para el diseño y monitorización de planes de vacunación, se han utilizado técnicas inmunológicas y moleculares. Hasta mediados de los años 90 se aplicaron técnicas inmunológicas, detectándose generalmente los serotipos G por ELISA con anticuerpos monoclonales. Esas técnicas han sido reemplazadas casi totalmente por la tipificación o, más estrictamente, la genotipificación por RT-PCR. Esto fue impulsado por los inconvenientes de la técnica de ELISA (necesidad de emplear varios monoclonales para cada serotipo G para cubrir variantes intratípicas, ausencia de un suministro adecuado de anticuerpos fiables anti-serotipos P) y la mayor fiabilidad y adaptabilidad de la RT-PCR

En Europa, la Red Europea de Vigilancia de Rotavirus (EuroRotaNet) está proporcionando información sobre la diversidad de las cepas de rotavirus circulantes en el continente, permitiendo establecer comparaciones entre los genotipos circulantes en los distintos países, con y sin programas universales de vacunación frente a rotavirus, para así conocer mejor la epidemiología molecular y la evolución genética de estos virus.



## **2. OBJETIVOS**



En el presente estudio se pretende analizar la epidemiología molecular de la infección por rotavirus en el periodo 2005-2009 en tres ciudades de la Comunidad Valenciana (Valencia, Sagunto y Castellón), así como realizar un análisis filogenético de la variación de secuencias de dos proteínas virales, VP7 y NSP4. Los objetivos específicos propuestos son los siguientes:

- 1.** Caracterizar los genotipos G (VP7) y P (VP4) de las cepas de rotavirus detectadas en nuestra área geográfica (Valencia y Castellón) durante cuatro periodos (2005-06, 2006-07, 2007-08, 2008-09) y determinar los genotipos más prevalentes en la población estudiada, investigando especialmente las cepas del genotipo G9.
- 2.** Describir los datos demográficos de la población con infección por rotavirus, atendiendo a la edad y al sexo.
- 3.** Estudiar la variabilidad de los genes codificantes de las proteínas estructural VP7 y no estructural NSP4 de las cepas de rotavirus G9 detectadas a lo largo del tiempo de estudio (2005-09).
- 4.** Analizar filogenéticamente los genes de las proteínas VP7 y NSP4 de las cepas de rotavirus G9.



### **3. CAPÍTULO I**

# **EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ROTAVIRUS EN TRES DEPARTAMENTOS DE SALUD DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (2005-2009)**



### 3.1. ANTECEDENTES

Las infecciones por rotavirus afectan principalmente en la edad pediátrica y constituyen la primera causa de gastroenteritis en niños. Antes de los 5 años, el 95 % de los niños se habrán infectado por este virus (Parashar et al., 2003; Glass et al., 2005).

La distribución de genotipos de rotavirus es muy variable según la región geográfica y el periodo de tiempo analizado, como se ha demostrado en numerosos estudios (Tabla 5). Aunque en los diferentes trabajos revisados la combinación G1P[8] ha sido la más prevalente a lo largo del tiempo en diferentes partes de mundo, se observa claramente que dentro de una misma región pueden circular simultáneamente distintas combinaciones de genotipos (Buesa et al., 2000; Cilla et al., 2000; Sanchez-Fauquier et al., 2004).

La importancia de estos estudios radica en el conocimiento de las variaciones de los tipos antigénicos circulantes y la aparición o emergencia de nuevos genotipos (como por ejemplo G9 o G12), lo cual puede influir en las estrategias de vacunación. De la misma manera, también sirve para comprender el papel del sistema inmunológico en la protección frente a la infección, y de esa forma monitorizar las campañas de vacunación para la protección frente a rotavirus.

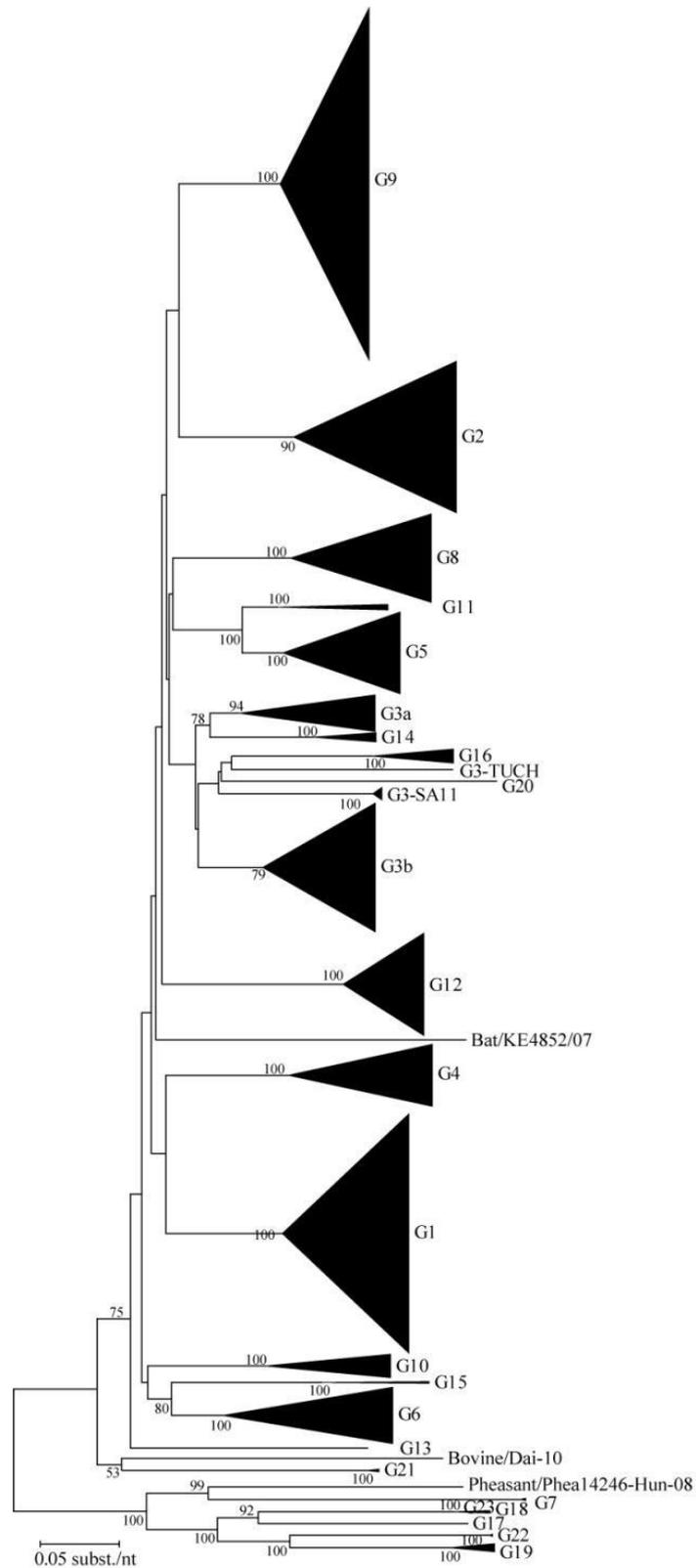
La realización de estos estudios ha permitido comprobar las variaciones en la evolución de los genotipos a través del tiempo. Un ejemplo de ello lo constituye la aparición del genotipo G9 en los últimos años, que se ha detectado en diversos países de Europa y de todo el mundo, convirtiéndose en el más prevalente en España durante el periodo 2005-06 (Sanchez-Fauquier et al., 2006; Tellez et al., 2008).

En Europa se ha organizado la Red Europea de Vigilancia de Rotavirus, EuroRotaNet, compuesta por 16 laboratorios de 15 países, en la que participa nuestro

grupo. Esta Red Europea se creó en enero de 2007 para recoger información sobre cepas de rotavirus circulantes en Europa. Los objetivos específicos de la EuroRotaNet son los siguientes: (1) desarrollar métodos y algoritmos para la caracterización de rotavirus (VP4, VP7, VP6 y NSP4), (2) supervisar la eficacia de los métodos de genotipado, (3) describir la epidemiología molecular de las infecciones por rotavirus en Europa durante temporadas consecutivas, a través de la tipificación de genotipos de las cepas de rotavirus recogidas en cada país, (4) controlar la aparición y propagación de las nuevas cepas de rotavirus, y (5) desarrollar la infraestructura para futuras actividades de vigilancia y de evaluación de: (a) la eficacia de las vacunas frente a rotavirus en la población general, a través de su monitorización, y (b) la aparición de genotipos distintos de los incluidos en la vacuna, y/o reordenamientos de cepas vacunales con las cepas circulantes (Iturriza-Gomara et al., 2009).

Los datos recogidos por la EuroRotaNet proporcionarán una información valiosa sobre la diversidad de las cepas de rotavirus circulantes en Europa antes de la introducción de las vacunas, y esta red permitirá asimismo la supervisión de las mismas durante la aplicación de las vacunas. Por otra parte, como la vacunación contra rotavirus no se ha introducido con los mismos criterios en toda Europa, será posible establecer comparaciones entre los genotipos circulantes en los distintos países con y sin programas universales de vacunación contra rotavirus.

Actualmente, tras diferentes estudios filogenéticos de secuencias analizadas por los miembros del Rotavirus Classification Working Group (RCWG), se han descrito nuevos genotipos de rotavirus (VP7) (Figura 10).



**Fig. 10.** Dendrograma de genotipos VP7 del RCWG (Rotavirus Classification Working Group). Se ha construido por el método Neighbor-joining a partir de las secuencias nucleotídicas del gen VP7. Se muestran los valores de “bootstrap” (1.000 réplicas). Algunos “clusters” se representan con triángulos en los que la altura del triángulo simboliza el número de secuencias y la anchura la diversidad genética dentro del “cluster” (Matthijssens et al., 2008).

**Tabla 5. Distribución temporal y espacial de rotavirus en diferentes años y países.**

País	Años	Genotipos	Referencias
Reino Unido	1995-1998	G1P[8] 74,0 % G1P[4] 1,1 % G2P[4] 11,2 % G3P[8] 3,3 % G4P[8] 6,2 % G9P[8] 2,1 % G9P[6] 0,9 %	(Iturriza-Gomara et al., 2000)
España	1996-1999	G1P[8] 42,7 % G2P[4] 5,5 % G3P[8] 2,0 % G4P[8] 36,5 %	(Buesa et al., 2000)
Holanda	1997-2001	G1P[8] 69,1 % G2P[4] 6,4 % G3P[8] 4,5 % G4P[8] 7,3 %	(van der Heide et al., 2005)
Paraguay	1998-2000	G1P[8] 10,9 % G4P[8] 46,9 % G9P[8] 17,2 %	(Parra et al., 2005)
Dinamarca	2000-2002	G1P[8] 27,8 % G1P[4] 4,3 % G2P[4] 16,0 % G4P[8] 8,0 % G9P[8] 7,4 %	(Fischer et al., 2005)
Brasil	2000-2002	G1P[8] 77,8 % G1P[6] 5,6 % G4P[8] 5,6 % G9P[8] 11,1 %	(Costa et al., 2004)
Colombia	2004	G1P[8] 5,3 % G1P[4] 5,3 % G2P[4] 1,8 % G3P[4] 8,8 % G9P[4] 1,8 % G9P[6] 7,0 %	(Urbina et al., 2004)
Japón	2005-2006	G1P[8] 70,1 % G1P[4] 2,6 % G2P[4] 2,6 % G3P[8] 17,9 % G9P[8] 6,8 %	(Phan et al., 2007)

## **3.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Población de estudio**

Pacientes con gastroenteritis aguda por rotavirus diagnosticados en los Servicios de Microbiología del Hospital General de Castellón (HGC), Hospital de Sagunto y Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) desde octubre de 2005 hasta septiembre de 2009.

### **3.2.2. Ámbito de estudio**

El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, donde se recibieron las muestras de heces previamente analizadas en los laboratorios de los Servicios de Microbiología Clínica del Hospital General de Castellón (Departamento de Salud 02), Hospital de Sagunto (Departamento de Salud 04) y Hospital Clínico Universitario de Valencia (Departamento de Salud 05). Dichos hospitales atienden a una población de 285.309 habitantes, 145.884 habitantes y 345.401 habitantes, respectivamente.

### **3.2.3. Criterios de inclusión y exclusión**

Se seleccionaron las muestras de heces correspondientes a pacientes que presentaban cuadro clínico y diagnóstico de gastroenteritis por rotavirus. Se excluyeron las muestras de un mismo sujeto con un intervalo inferior a 15 días entre ellas, por considerarlas pertenecientes a un mismo episodio diarreico, así como aquellas de las que se carecía de los datos demográficos completos (edad, sexo, procedencia, mes y año).

### 3.2.4. Muestras clínicas

#### 3.2.4.1. Obtención de las muestras

La recogida de heces se realizó durante las 24 horas siguientes a ser atendidos los pacientes.

Se han obtenido un total 648 muestras, 316 del Hospital Clínico Universitario de Valencia, 251 del Hospital General de Castellón y 81 del Hospital de Sagunto.

#### 3.2.4.2. Conservación

Las muestras de heces se conservaron a 4°C si su procesamiento iba a realizarse en un periodo breve de tiempo, y congeladas a -20°C para periodos más prolongados.

### 3.2.5. Procesamiento microbiológico

#### 3.2.5.1. Estudio bacteriológico

En la mayoría de los casos se realizó coprocultivo para estudio de bacterias enteropatógenas (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Aeromonas* spp. y *Campylobacter* spp.).

#### 3.2.5.2. Estudio virológico

El análisis virológico incluyó estudio de rotavirus del grupo A y adenovirus 40/41.

La determinación de rotavirus en heces se efectuó por ELISA (Premier Rotaclone®, Meridian Bioscience) o inmunocromatografía (VIKIA® ROTA-ADENO de BioMérieux y SIMPLE ROTA-ADENO de Operon).

### 3.2.6. Análisis molecular de cepas de rotavirus

#### 3.2.6.1. Extracción del ARN vírico

El aislamiento y purificación de los ácidos nucleicos víricos a partir de las muestras de heces se realizó por el método de fenol-cloroformo y purificación con celulosa CF11 (Wilde et al., 1990).

El procedimiento consiste en:

- Mezclar 450  $\mu$ l de suspensión fecal diluida al 10-20 % en PBS con 50  $\mu$ l de 1M acetato sódico pH 5,0 con 1 % SDS, incubando 10 minutos a 37 °C.
- Añadir 500  $\mu$ l de mezcla fenol-cloroformo (3:2), mezclar y centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm, mezclando la fase acuosa con 80  $\mu$ l etanol de 95%.
- Agregar 30 mg de CF11 celulosa (Sigma), agitar intensamente y dejar 90 minutos a 4 °C o temperatura ambiente.
- Centrifugar a 9.000 r.p.m. durante 1 minuto, desechar el sobrenadante y lavar tres veces el sedimento con 500  $\mu$ l de tampón STE con 15 % de etanol (vol/vol), y centrifugar de nuevo a 9.000 r.p.m durante 1 minuto después de cada lavado. Luego lavar con STE sin etanol para eluir el ARN de la celulosa y centrifugar 5 minutos para sedimentar la CF11 celulosa.
- Añadir al sobrenadante 1/10 volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 y agregar 2 volúmenes de etanol absoluto frío, dejando precipitar a -20 °C 2 horas. Finalmente, centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos. Secar el sedimento, que contiene el ARN vírico ligado a la matriz, a 45°C 30 minutos, disolver en 50  $\mu$ l de agua desionizada (mQ) y conservar a 20 °C para posteriormente realizar la caracterización de los genotipos G y P.

### 3.2.6.2. Reacción de transcripción inversa para síntesis de ADNc

Para genotipar el gen de la glicoproteína VP7 (G) mediante RT-PCR, se realizó una retrotranscripción con cebadores aleatorios (“*random primers*”) y posterior amplificación con los oligonucleótidos descritos por Gouvea et al. (1990).

1.- Añadir 1  $\mu$ l de DMSO a 9  $\mu$ l de extracto de ácidos nucleicos, choque térmico a 65 °C durante 5 min, y mantenimiento a 4 °C 2 min.

2.- Reacción para RT (volumen total 20  $\mu$ l):

Tampón RT 10X	6 $\mu$ l
Inhibidor de RNAsas (Promega)	0,25 $\mu$ l
“Random primers” (50 $\mu$ M, Invitrogen)	0,5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM, Pharmacia)	1 $\mu$ l
RT-AMV (200 U/ $\mu$ l, Promega)	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O DEPC	11,75 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

3.- Agregar 20  $\mu$ l de la solución “master” de RT al extracto de ácidos nucleicos (10  $\mu$ l), incubándose 10 minutos a temperatura ambiente, para incubar después 35 minutos a 42 °C; posteriormente 4 °C durante 5 minutos y luego a 92 °C durante 2 minutos para la inactivar la transcriptasa inversa.

### 3.2.6.3. Tipificación del gen de la VP7 (G)

#### 1ª PCR de VP7, amplificación de VP7

Se amplificaba el ADNc mediante cebadores específicos (VP7-F) y (VP7-R)

(Gomara et al., 2001):

- VP7-F: 5' ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC 3' (nt 51-71)
- VP7-R: 5' AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC 3' (nt 914-932)

Producto de la amplificación: 882 pb

- Mezcla de la reacción:

Tampón de PCR 10X	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 µl
dNTPs (10 mM, Pharmacia)	1 µl
VP7-F (10 µM)	1 µl
VP7-R (10 µM)	1 µl
H <sub>2</sub> O	34,5 µl
Taq polimerasa (5 U/µl Biotools)	0,5 µl

- Protocolo de PCR:
  - Un ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C
  - 35 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto a 72 °C
  - Un ciclo final de 7 minutos a 72 °C
- Visualización:
  - Gel de agarosa al 1,5% (p/v) en buffer TBE
  - 80 V durante 45 minutos

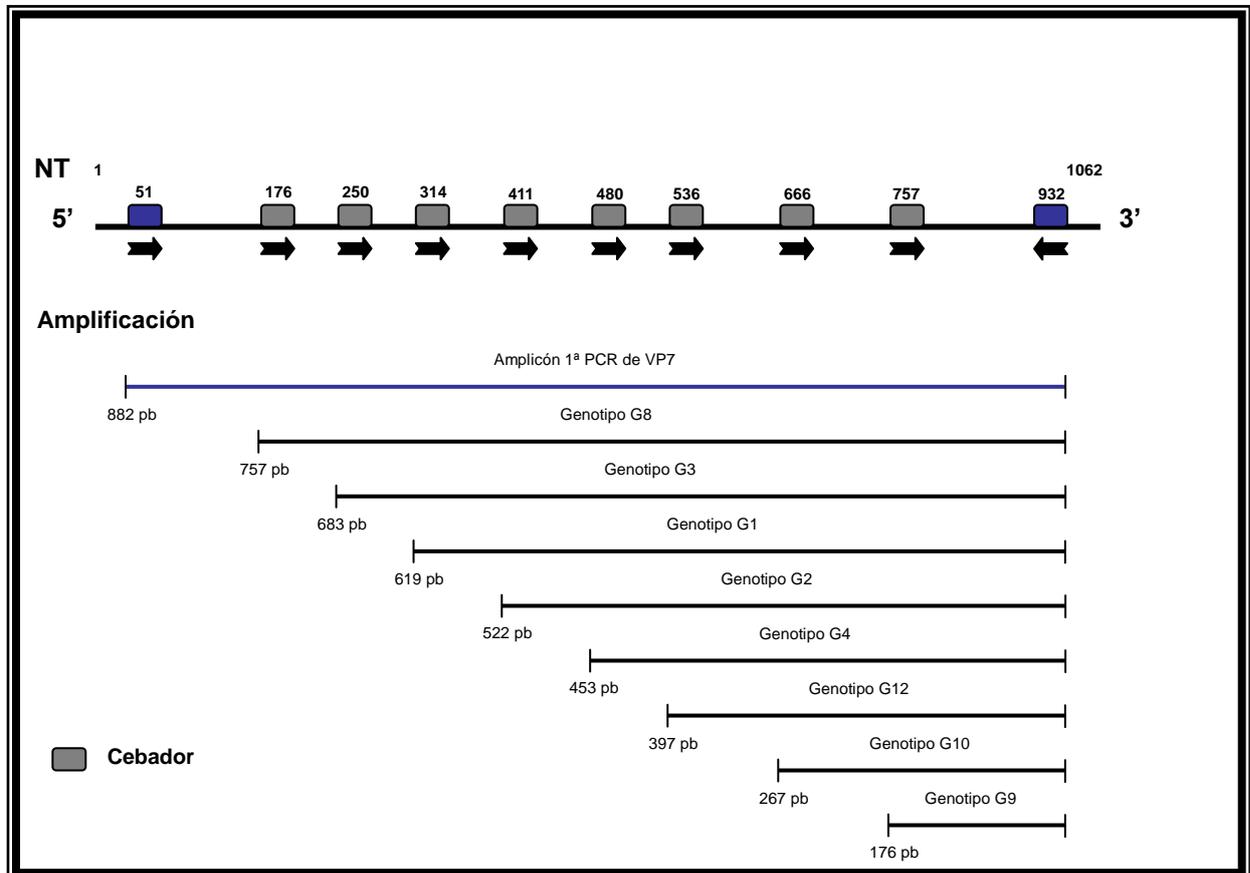
2ª PCR de VP7, G múltiple

Una vez obtenido el producto de la primera reacción de PCR, se sometía a una segunda PCR según la región hipervariable del gen (Gouvea et al., 1990; Das et al., 1994), utilizando un cebador común a todos ellos (VP7-R) y uno específico para cada uno de los genotipos estudiados que generaban un amplímero de tamaño característico para cada genotipo. Se usaban cebadores específicos para los genotipos G: G1-G4, G8-G10 y G12 (Gouvea et al., 1990; Iturriza Gomara et al., 2004; Aladin et al., 2010).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la caracterización de los genotipos G se exponen en la tabla 6 y figura 11.

**Tabla 6. Oligonucleótidos para identificar por PCR el genotipo de VP7**

Cebador	Secuencia	Nt	Amplicón
<b>Genotipo G1</b>	5' CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G 3'	314-335	619 pb
<b>Genotipo G2</b>	5' CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G 3'	411-435	522 pb
<b>Genotipo G3</b>	5' ACG AAC TCA ACA CGA GAG G 3'	250-269	683 pb
<b>Genotipo G4</b>	5' CGT TTC TGG TGA GGA GTT G 3'	480-499	453 pb
<b>Genotipo G8</b>	5' TTR TCG CAC CAT TTG TGA AAT 3'	176-198	757 pb
<b>Genotipo G9</b>	5' CTT GAT GTG ACT AYA AAT AC 3'	757-776	176 pb
<b>Genotipo G10</b>	5' ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG 3'	666-687	267 pb
<b>Genotipo G12</b>	5' GGT TAT GTA ATC CGA TGG ACG 3'	536-557	397 pb



**Fig. 11.** Esquema de la amplificación de fragmentos de PCR correspondientes a ocho genotipos G de rotavirus (G1 a G4, G8, G9, G10 y G12) identificables por su tamaño mediante análisis por electroforesis en gel de agarosa.

A partir del producto amplificado de las muestras en las que se detectaron rotavirus mediante la RT-PCR del fragmento del gen VP7, se llevó a cabo la siguiente reacción:

1. Mezclar 1 µl del ADNc con 49 µl de una solución conteniendo:

Tampón de PCR 10X	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2,5 µl
dNTPs (10 mM, Pharmacia)	0,5 µl
VP7-R	1 µl
G1 (aBT1)	1 µl
G2 (aCT2)	1 µl
G3 (aET3)	1 µl
G4 (aDT4)	1 µl
G8 (aAT8)	1 µl
G9 (aFT9)	1 µl
G10	1 µl
G12	1 µl
Agua desionizada mQ	31,5 µl
Taq polimerasa (5 U/µl Biotools)	0,5 µl

2. En un termociclador “Gene” se realiza un ciclo de desnaturalización (4 min a 94°C), 30 ciclos de amplificación (1 min a 94 °C, 2 minutos a 42 °C y 1 min a 72°C) y un ciclo de extensión final (7 min a 72 °C).

Posteriormente se analizaban los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X con bromuro de etidio 0.5 % durante 1 h a 70 voltios. Los amplificados se observaban con un captador de imágenes conectado a un transiluminador de luz ultravioleta (Gelprinter Ultra, T.D.I.).

#### 3.2.6.4. Tipificación del gen de la VP4 (P)

El genotipado de VP4 (P) se llevó a cabo mediante RT-PCR semi-anidada, mediante oligonucleótidos descritos por (Gentsch et al., 1992; Iturriza Gomara et al., 2004) (Tabla 7). Una vez obtenido el producto de la primera reacción de PCR, se sometían a una segunda PCR con oligonucleótidos específicos de cada genotipo P según la región hipervariable del gen (Figura 12).

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados, primera y segunda PCR, VP4

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición
<b>Primera PCR:</b>		
<b>VP4-F</b>	<b>TAT GCT CCA GTN AAT TGG</b>	132-149
<b>VP4-R</b>	<b>ATT GCA TTT CTT TCC ATA ATG</b>	775-795
<b>Segunda PCR:</b>		
<b>VP4-F</b>	<b>TAT GCT CCA GTN AAT TGG</b>	132-149
<b>P[4] 2T-1</b>	<b>CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC</b>	474-494
<b>P[6] 3T-1</b>	<b>TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA</b>	259-278
<b>P[8] 1T-1D</b>	<b>TCT ACT GGR TTR ACN TGC</b>	339-356
<b>P[9] 4T-1</b>	<b>TGA GAC ATG CAA TTG GAC</b>	385-402
<b>P[10] 5T-1</b>	<b>ATC ATA GTT AGT AGT CGG</b>	575-594
<b>P[11]</b>	<b>GTAAAC ATC CAG AAT GTG</b>	305-323

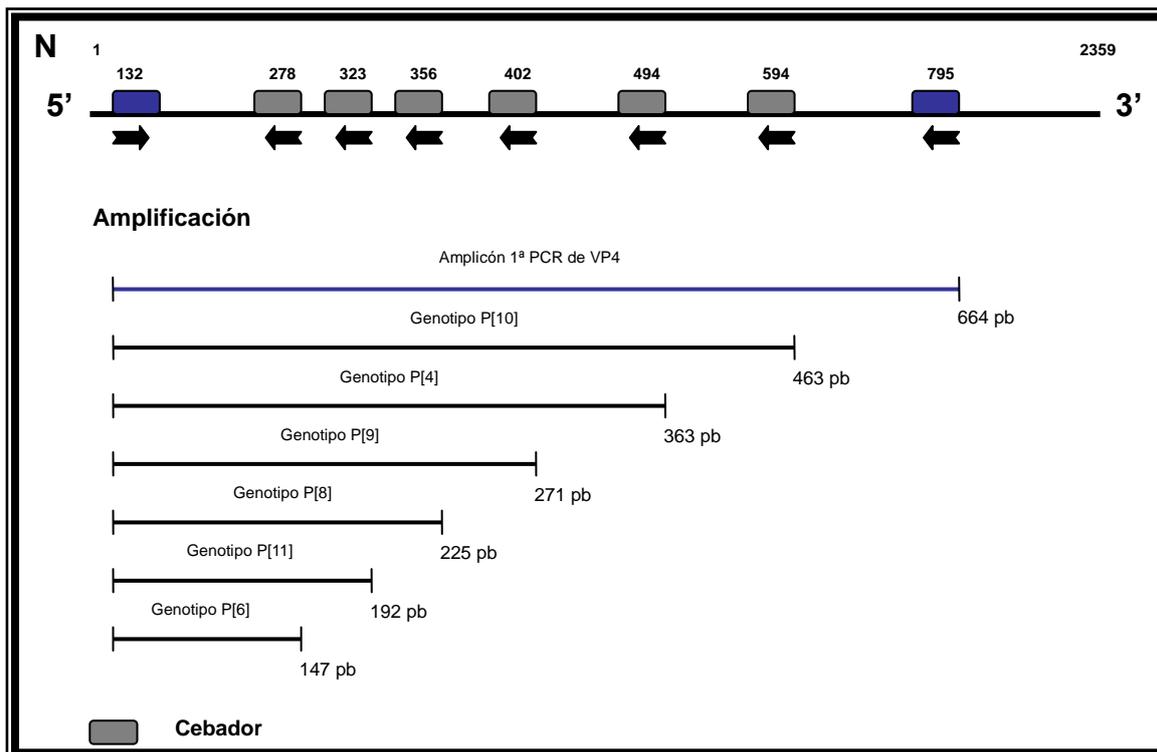


Fig. 12. Esquema de la amplificación de fragmentos de PCR correspondientes a seis genotipos P de rotavirus (P[4], P[6], P[8], P[9], P[10], P[11]) identificables por su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se siguió el siguiente procedimiento:

1.- Mezclar 5 µl del ADNc con 45 µl de una solución conteniendo:

Tampón de PCR 10X	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 µl
dNTPs (10 mM, Pharmacia)	1 µl
VP4-F	1 µl
VP4-R	1 µl
H <sub>2</sub> O	34,5 µl
Taq polimerasa (5 U/µl Biotools)	0,5 µl

2.- Se realiza en un termociclador secuencialmente una primera fase un ciclo de desnaturalización (2 minutos a 94 °C), 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 50 °C y 1 minutos a 72 °C) y un ciclo de extensión final (7 minutos a 72 °C).

3.- Un volumen de 1 µl de esta primera reacción de PCR es sometida a la segunda PCR con 49 µl de una solución que contiene 10x tampón de reacción (5 µl); 50 mM MgCl<sub>2</sub> (2 µl); 10 mM dNTPs (0,5 µl); oligonucleótidos VP4F, P[4], P[6], P[8], P[9], P[10], P[11] (1 µmol respectivamente), agua DEPC 33 µl y Taq ADN polimerasa (0,5 µl).

Se visualiza el producto obtenido de la misma manera del genotipado de la VP4.

### **3.3. RESULTADOS**

Durante el periodo de estudio se analizaron 648 muestras de heces procedentes de:

- Hospital Clínico Universitario de Valencia: 316 muestras,
- Hospital de General de Castellón: 251 muestras, y
- Hospital de Sagunto: 81 muestras.

La distribución por sexo de los pacientes infectados fue de 325 niños (50,15%) y 323 niñas (49,84%).

La edad media fue de 1,6 años y el porcentaje de infección por grupo de edad: 41 % en menores de un año, 53,4 % de 1 a 4 años, 2,7 % de 5 a 9 años y 2,9 % de 10 a 14 años (Tabla 8).

## CAPÍTULO I

---

Dentro del grupo con mayor porcentaje de infección (1-4 años), se observó una mayor porcentaje en los pacientes de un año de edad con un 28 %, seguidos por los de 2 años con un 26 % (Tabla 9).

Grupos	Enfermos	Porcentaje
< 1 año	265	41
1 - 4 años	346	53,4
5 - 9 años	18	2,7
10 -14 años	19	2,9
Total	648	100

**Tabla 8. Distribución de la infección por rotavirus por grupos de edad.**

Grupos	Enfermos	Porcentaje
1 año	97	28
2 años	90	26
3 años	81	23,4
4 años	78	22,5
Totales	346	100

**Tabla 9. Distribución de infección por rotavirus por edades en el grupo de edad 1 – 4 años.**

### 3.3.1. Genotipo G

Se identificó el genotipo G (VP7) en 581 muestras, lo que correspondió a un 89,6 %. No se logró identificar el genotipo G en 67 muestras (10,3 %). De los genotipos caracterizados, el genotipo G9 fue claramente el predominante, detectándose en 306 casos, seguido del genotipo G1 en 215, G2 en 41, G3 en 15, G4 en 12, G6 en 1 y G8 en 1. Se observó la presencia de infección mixta por los genotipos G1-G9 en 13 casos, G3-G9 en 7 y G1-G4 en 1.

Durante los años 2005-2006, el genotipo G9 se detectó en 173 casos, G1 en 21 casos, G2 en 2 casos, G3 en 1 caso y G4 en ningún caso. No se logró identificar el genotipo G en 11 muestras. Cuatro casos contenían más de un genotipo G: G1 + G9 y G3 + G9 (Tabla 10 y figura 13).

<b>GENOTIPOS G</b>	<b>Nº Muestras</b>	<b>Porcentaje</b>
Genotipo G1	21	9,9
Genotipo G2	2	0,9
Genotipo G3	1	0,5
Genotipo G4	0	0,0
Genotipo G9	173	81,6
Genotipos mixtos G1 + G9	2	0,9
Genotipos mixtos G3 + G9	2	0,9
No tipadas	11	5,2
<b>Total</b>	<b>212</b>	<b>100</b>

**Tabla 10. Distribución de genotipos G identificados en los años 2005-2006.**

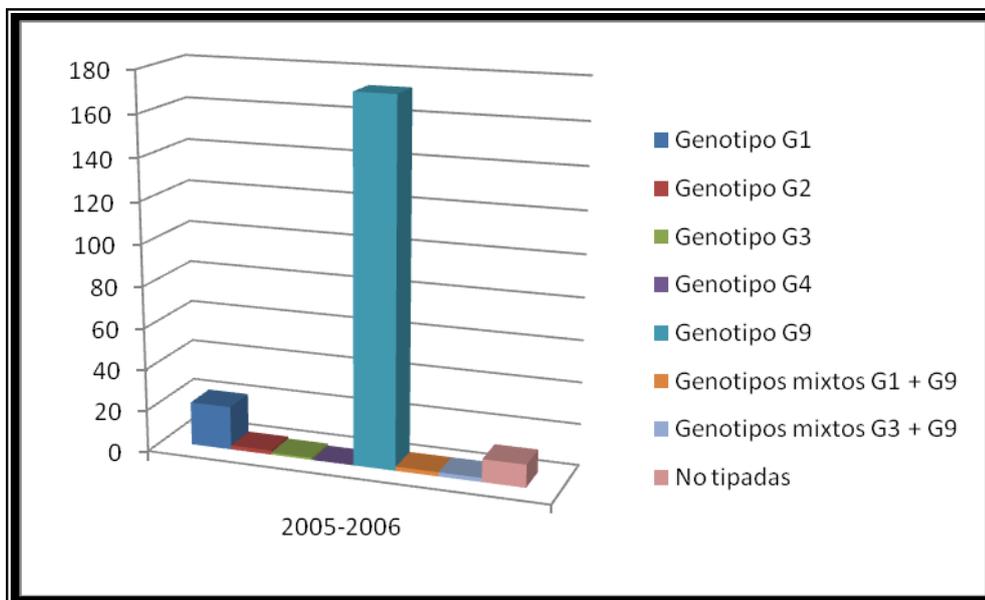
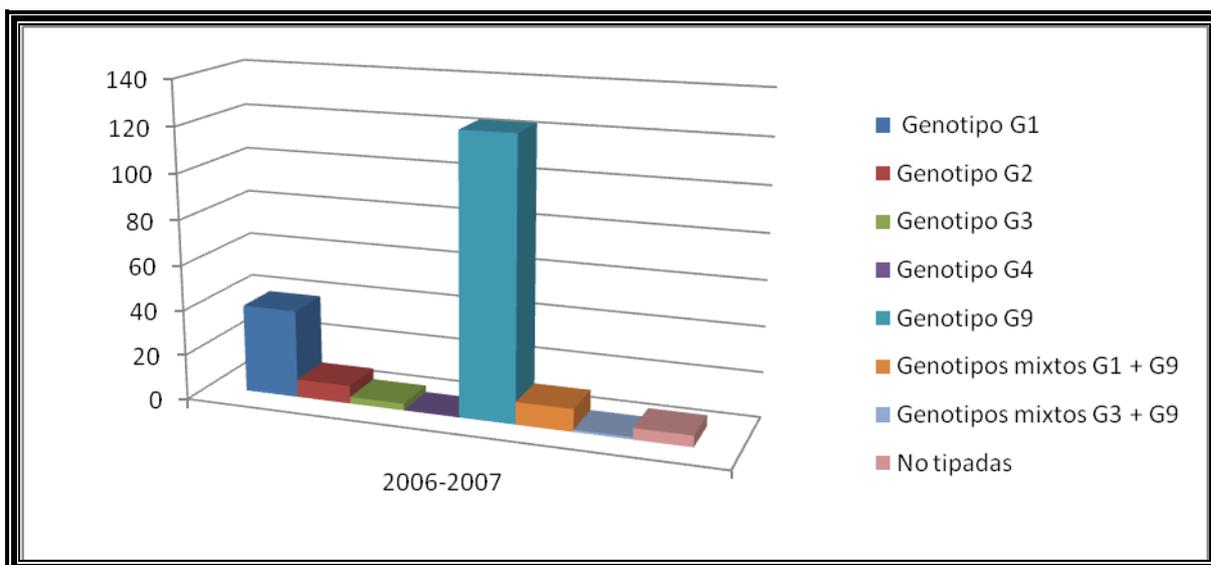


Fig. 13. Distribución de genotipos G identificados en los años 2005-2006.

Durante los años 2006-2007, el genotipo G9 se detectó en 123 casos, G1 en 39 casos, G2 en 8 casos, G3 en 3 casos y G4 en ningún caso. No se logró identificar el genotipo G en estos años en 5 muestras. Once muestras contenían más de un genotipo G: G1 + G9 y G3 + G9 (Tabla 11 y figura 14).

GENOTIPOS G	Nº Muestras	Porcentaje
Genotipo G1	39	20,6
Genotipo G2	8	4,2
Genotipo G3	3	1,6
Genotipo G4	0	58,0
Genotipo G9	123	65,1
Genotipos mixtos G1 + G9	10	5,3
Genotipos mixtos G3 + G9	1	0,5
No tipadas	5	2,6
<b>Total</b>	<b>189</b>	<b>100</b>

Tabla 11. Distribución de genotipos G identificados en los años 2006-2007.



**Fig. 14. Distribución de genotipos G identificados en los años 2006-2007.**

En los años 2007-2008, el genotipo G9 se detectó en 10 casos, G1 en 96 casos, G2 en 5 casos, G3 en 10 casos, G4 en 2 casos y G6 en 1 caso. No se logró caracterizar el genotipo G en estos años en 9 muestras. Cinco casos contenían más de un genotipo G: G1 + G9 y G3 + G9 (Tabla 12 y figura 15).

GENOTIPOS G	Nº Muestras	Porcentaje
Genotipo G1	96	69,6
Genotipo G2	5	3,6
Genotipo G3	10	7,2
Genotipo G4	2	1,4
Genotipo G8	0	0,0
Genotipo G9	10	7,2
Genotipo G6	1	0,7
Genotipos mixtos G1 + G9	1	0,7
Genotipos mixtos G3 + G9	4	2,9
No tipadas	9	6,5
<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>100</b>

**Tabla 12. Distribución de genotipos G identificados en los años 2007-2008.**

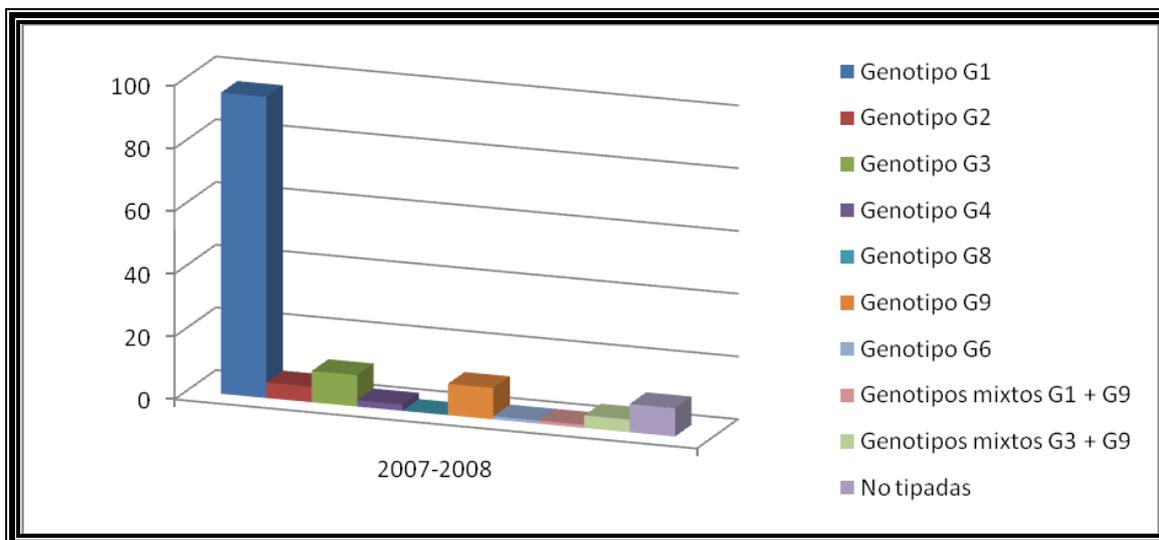
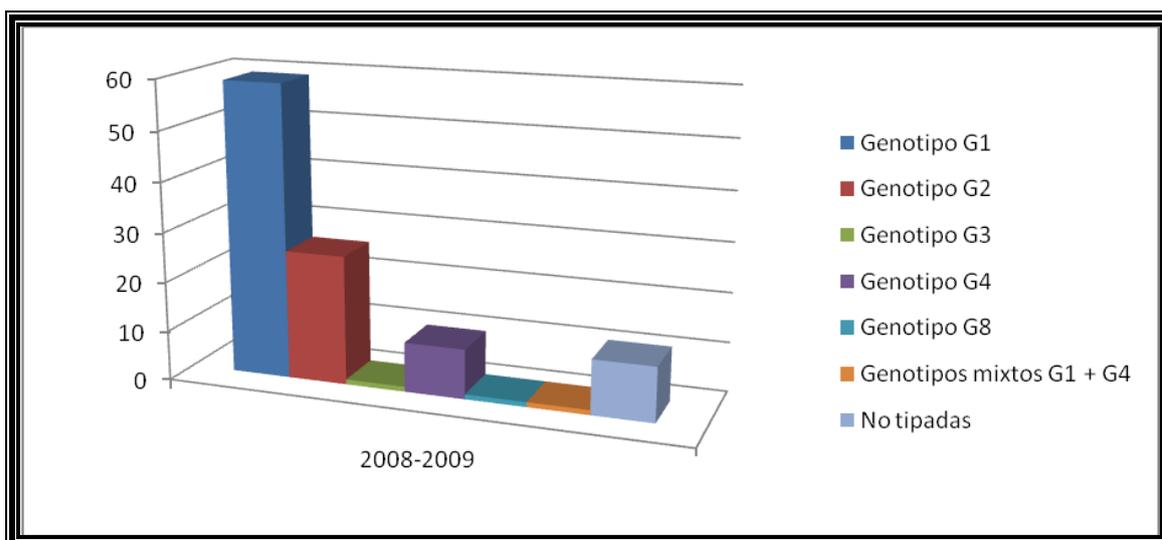


Fig. 15. Distribución de genotipos G identificados en los años 2007-2008.

En el periodo 2008-2009, G9 no se detectó en ningún caso, G1 en 59 casos, G2 en 26 casos, G3 en 1 caso, G4 en 10 casos y G8 en 1 caso. No se identificó el genotipo G en este periodo en 11 muestras. Una muestra contenía una mezcla de G1 + G4 (Tabla 13 y figura 16).

GENOTIPOS G	Nº Muestras	Porcentaje
Genotipo G1	59	54,1
Genotipo G2	26	23,9
Genotipo G3	1	0,9
Genotipo G4	10	9,2
Genotipo G8	1	0,9
Genotipos mixtos G1 + G4	1	0,9
No tipadas	11	10,1
<b>Total</b>	<b>109</b>	<b>100</b>

Tabla 13. Distribución de genotipos G identificados en los años 2008-2009.



**Fig. 16. Distribución de genotipos G identificados en los años 2008-2009.**

En la tabla 14 y figura 17 se puede observar la distribución del genotipo G9 en las distintas de zonas estudiadas en el periodo de estudio.

PROCEDENCIA	2005-2006	2006-2007	2007-2008	2008-2009
H. CLÍNICO	44	46	14	0
H. SAGUNTO	39	8	1	0
H. CASTELLÓN	94	74	0	0

**Tabla 14. Distribución de genotipos G9 según el hospital de procedencia identificados en los años 2005-2009.**

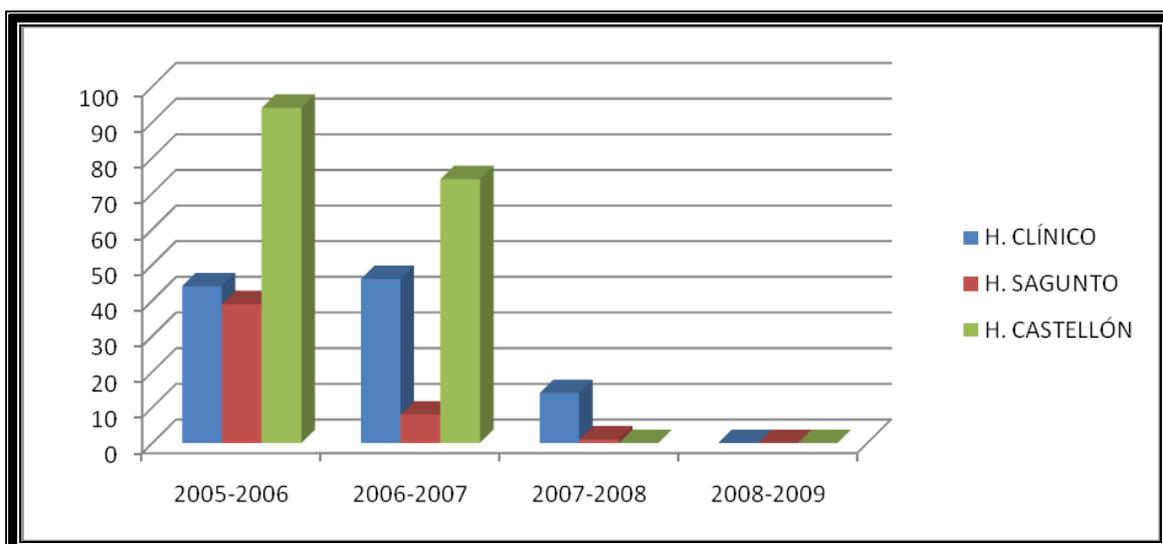


Fig. 17. Distribución de genotipos G9 por hospital de procedencia en los años 2005-2009.

### 3.3.2. Genotipo P

Se identificó el genotipo P (VP4) en 610 muestras (94,1 %). No se logró caracterizar el genotipo P en 38 muestras (5,5 %).

Al estudiar los genotipos P (VP4), de los 648 casos correspondieron al genotipo P[8] 571 casos, P[4] 31 casos, P[6] 4 casos y P[14] 1 caso. Tres casos contenían más de un genotipo P: P [4] + P[8] 2 casos y P[4] + P[6] 1 caso (Figura 18).

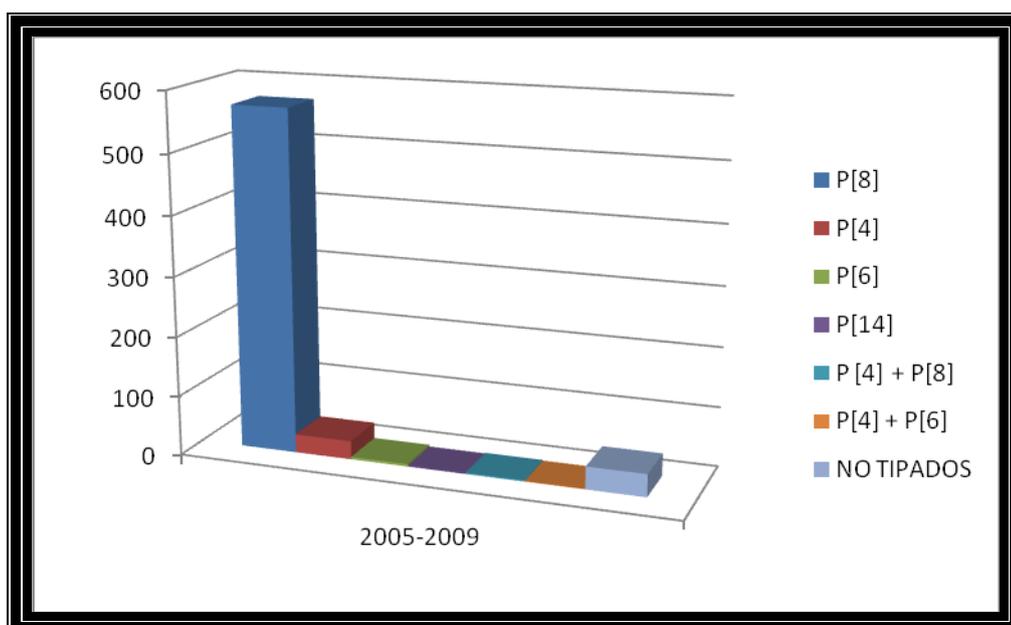


Fig. 18. Distribución de los genotipos P (VP4) identificados en los años 2005-2009.

### 3.3.3. Combinación de los genotipos G/P

La asociación más frecuentemente detectada fue G9P[8] en 306 casos, seguida de G1P[8] en 215 casos (Tabla 15 y figuras 19-20).

Genotipos	2005-2006		2006-2007		2007-2008		2008-2009	
	Nº Muestras	Porcentajes						
G1P[8]	21	9,9%	39	20,6%	96	69,6%	59	54,1%
G2P[4]	0	0,0%	6	3,2%	2	1,4%	23	21,1%
G2P[6]	0	0,0%	0	0,0%	3	2,2%	1	0,9%
G2P[8]	2	0,9%	2	1,1%	0	0,0%	0	0,0%
G3P[8]	1	0,5%	3	1,6%	10	7,2%	1	0,9%
G4P[8]	0	0,0%	0	0,0%	2	1,4%	10	9,2%
G6P[14]	0	0,0%	0	0,0%	1	0,7%	0	0,0%
G9P[8]	173	81,6%	123	65,1%	10	7,2%	0	0,0%
G2P[4] + P[8]	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	1,8%
G8P[4] + P[6]	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,9%
G1 + G4P[8]	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,9%
G1 + G9P[8]	2	0,9%	10	5,3%	1	0,7%	0	0,0%
G3 + G9P[6]	0	0,0%	0	0,0%	2	1,4%	0	0,0%
G3 + G9P[8]	2	0,9%	1	0,5%	2	1,4%	0	0,0%
No tipadas	11	5,2%	5	2,6%	9	6,5%	11	10,1%
TOTAL	212	100%	189	100%	138	100%	109	100%

Tabla 15. Distribución de genotipos G/P identificados en los años 2005-2009.

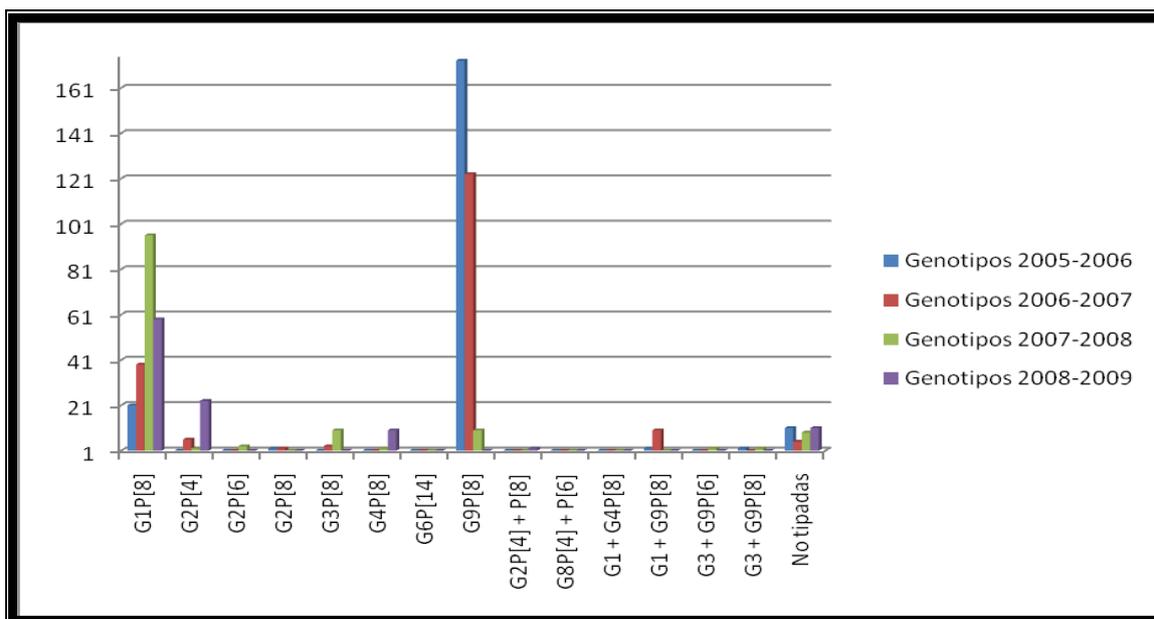
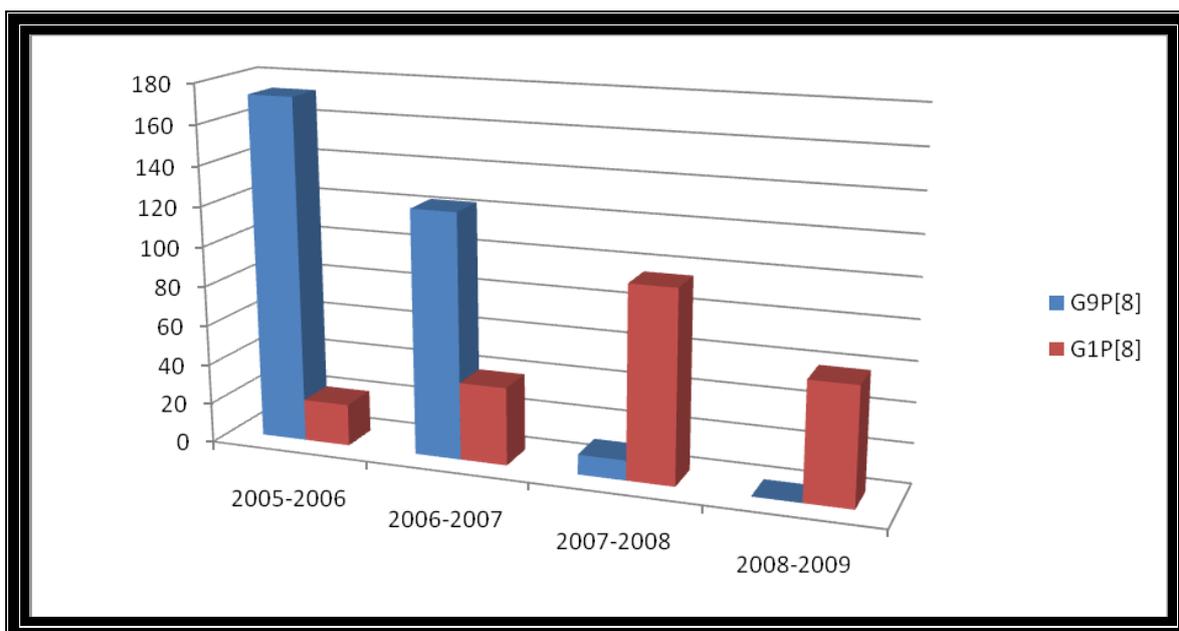


Fig. 19. Distribución de genotipos G/P identificados en los años 2005-2009.



**Fig. 20. Distribución de los genotipos G9P[8] identificados en los años 2005-2009.**

En la muestra analizada de la población infantil de Valencia y Castellón, la infección por rotavirus se observó en niños menores de 4 años, con mayor afectación de los menores de 1 año, e igual distribución entre ambos sexos.

Se analizaron 648 muestras de heces procedentes del Hospital Clínico Universitario de Valencia (316 muestras), del Hospital de General de Castellón (251 muestras), y del Hospital de Sagunto (81 muestras). De estas, se identificó el genotipo G (VP7) en 581 muestras y no se logró su identificación en 67 muestras. Se identificó el genotipo P (VP4) en 610 muestras aunque no se logró caracterizar el genotipo P en 38 muestras.

Predominó el genotipo G9 durante los periodos 2005-06 y 2006-07, con un descenso brusco en 2007-08, no habiéndose detectado ninguna cepa G9 en 2008-09. Todas las cepas de rotavirus G9 analizadas desde 2005 hasta 2009 presentan el genotipo P[8], a diferencia de las cepas estudiadas en otras áreas geográficas, en las que se han encontrado combinaciones con P[6] u otros genotipos P.

### 3.4. DISCUSIÓN

Los estudios de epidemiología molecular de rotavirus tienen interés para conocer su evolución y su distribución temporal y geográfica (Iturriza-Gomara et al., 2004). En este estudio se ha analizado la epidemiología molecular de rotavirus en niños con diagnóstico de gastroenteritis aguda en tres áreas de Salud Pública de la Comunidad Valenciana desde octubre de 2005 a septiembre de 2009.

En el análisis de los casos con infección por rotavirus, se observó una mayor afectación de los menores de 2 años, observación que coincide con estudios realizados en otras áreas (Cilla et al., 2000; Tellez Castillo et al., 2008). La distribución de los casos por sexos fue equitativa.

Se ha logrado caracterizar el genotipo G en 581 muestras, lo que correspondió a un 89,66 % y P en 610 muestras, lo que correspondió a un 94,13 %. El genotipo G9 de rotavirus fue identificado en 306 muestras, lo que correspondió a un 52,66 %. Las causas por las que no se lograron tipificar el genotipo G de 67 muestras y el genotipo P de 37 muestras pueden ser muy diversas, desde la presencia en ellas de inhibidores de la reacción de PCR, la degradación del ARN vírico, la existencia de mutaciones en las secuencias reconocidas por los cebadores hasta la existencia de genotipos no investigados, o la congelación y descongelación repetidas veces de las muestras. En ocasiones esto puede deberse también a resultados falsos positivos de los métodos inmunológicos empleados para establecer el diagnóstico, ELISA o inmunocromatografía, como se ha demostrado en nuestro laboratorio (Tellez et al., 2008).

En la mayoría de los estudios epidemiológicos de rotavirus se han determinado los tipos G por la importancia que han tenido estos serotipos en el diseño de las vacunas

y por el valor que se ha atribuido a los anticuerpos neutralizantes anti-VP7 en conferir protección frente a las infecciones de rotavirus. En nuestro estudio hemos observado un claro predominio del genotipo G9P[8] seguido del G1P[8] durante las temporadas 2005-06 y 2006-07, con una menor presencia de cepas con genotipo G2, G3 y la ausencia de G4. Este último dato es interesante, ya que G4 fue uno de los genotipos más comunes en Valencia durante los años 1996-1999 (Buesa et al., 2000) y uno de los más comunes en España en la década de los 90 (Cilla et al., 2000; Sanchez-Fauquier et al., 2004). Sin embargo, en la temporada 2007-08 se produce un brusco descenso del genotipo G9P[8], que pasa a constituir solamente el 7,2% de las cepas detectadas, siendo de nuevo G1P[8] el más prevalente (68,8%). Es interesante destacar que en esta temporada se detectaron dos genotipos muy poco frecuentes, G8P[4]+P[6] y G6P[14], cada uno de ellos en un paciente.

El genotipo G9 de rotavirus fue identificado por primera vez en 1983 en los Estados Unidos (Clark et al., 1987) y durante el periodo 1985-1986 en Japón (Nakagomi et al., 1988; Nakagomi et al., 1990). Posteriormente fue descrito en Yugoslavia en 1985-1988, en Tailandia en 1989 y en la India de 1986 a 1993 (Das et al., 1994). La aparición en diferentes áreas del mundo del genotipo G9 ha despertado un considerable interés, incluyendo sus aspectos epidemiológicos, su origen evolutivo y la composición genética del virus, así como su posible impacto en la eficacia de una vacuna frente a rotavirus (Ruiz-Palacios et al., 2006; Vesikari et al., 2006). En España se detectaron por vez primera cepas de rotavirus G9 en Madrid en 1998-1999 (Sanchez-Fauquier et al., 2004). En nuestro laboratorio se identificaron las primeras cepas G9 en la temporada 2003-04, y en 2004-05 constituyeron el 10,7% de las cepas estudiadas (Abu-Mallouh, 2006). Como se demuestra en el presente estudio, en 2005-06 se produjo una rápida diseminación de este genotipo, que se convirtió en el más prevalente en esa

temporada y en la siguiente, disminuyendo drásticamente en 2007-08. No se conocen los motivos de la distribución tan rápida de este genotipo en nuestra zona geográfica y de su implantación como genotipo predominante en dos temporadas seguidas (2005-2006 y 2006-07), hecho que ha sido también descrito en otras áreas de la Península Ibérica, como en Portugal (Martinez-Laso et al., 2009). Una posible explicación es que, al tratarse de una cepa vírica nueva, la población no presentaba inmunidad protectora frente a este serotipo, produciéndose una rápida transmisión del mismo. Las frecuentes infecciones por G9 habrían provocado el desarrollo en la población de inmunidad frente a este nuevo sero/genotipo, produciéndose un brusco descenso de su incidencia en 2007-08. Además, si las vacunas de rotavirus comercializadas son realmente protectoras frente a G9, a pesar de que no lo incluyen en su composición, podría suceder que las infecciones naturales con otros genotipos induzcan también protección cruzada frente a G9. Recientemente se ha publicado un análisis filogenético de 12 cepas de rotavirus G9 aisladas en Madrid, resultando todas ellas pertenecer al linaje III de los 6 linajes descritos (Rodrigues et al., 2007).

Santos y Hoshino realizaron una revisión de 124 trabajos que incluyen un total de 45.571 cepas de rotavirus, en la que los cuatro tipos G más comunes (G1-G4) en asociación con P[8] o P[4] representan más del 88 % de las cepas halladas en todo el mundo, panorama que ha ido variando a lo largo de los años, fundamentalmente a causa de la aparición de G9 asociado con P[8] o con P[6] (Santos y Hoshino, 2005).

Hemos detectado 24 casos de infecciones mixtas, en las que se encontraron más de un genotipo G y/o P. Este hallazgo es también frecuente en otros estudios, encontrándose hasta un 31% de infecciones mixtas en un estudio realizado en la India (Das et al., 2004). Las nuevas combinaciones G/P detectadas en los últimos años podrían deberse al incremento de la inmigración procedente de otros países.



## **4. CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN CODIFICANTE DE VP7 EN CEPAS DE ROTAVIRUS G9**



#### 4.1. ANTECEDENTES

Los genotipos G1, G2, G3 y G4 de rotavirus eran hasta 1995 los más prevalentes en todo el mundo, pero a partir de aquel año comenzó a detectarse con una frecuencia cada vez mayor el genotipo G9, que se ha convertido actualmente en el quinto genotipo VP7 de rotavirus más frecuente.

Rotavirus G9 fue identificado por primera vez como causa de gastroenteritis en un niño de 18 meses en 1983 en Filadelfia, Estados Unidos, siendo denominada la cepa identificada W161 (Clark et al., 1987). Durante el periodo 1985-1986 se identificaron dos cepas más, F45 y AU35 en Japón (Nakagomi et al., 1990). Estas tres primeras cepas de rotavirus G9 (W161, AU35 y F45) compartieron una misma especificidad antigénica y características genotípicas, incluyendo además el mismo genogrupo (Wa), serogrupo (P1A[8]G9), electroforetipo largo y subgrupo II, con genes VP7 estrechamente relacionados (Clark et al., 1987; Green et al., 1989; Gorziglia et al., 1990; Nakagomi y Uesugi, 1990; Oka et al., 2000). Posteriormente fueron identificadas cepas G9 en Yugoslavia en 1985-1988 (Zizdic et al., 1992), en Tailandia en 1989 (Urasawa et al., 1989) y en la India de 1986 a 1993 (Das et al., 1994). Las cepas encontradas en India y Tailandia tenían serotipos P inusuales, en la India P[11] y en Tailandia P[6] (Figura 21) (Gentsch et al., 1993; Okada et al., 2000).

Después de la detección de rotavirus G9 en Yugoslavia en 1985 (Zizdic et al., 1992), este genotipo volvió a detectarse en Italia, Francia e Inglaterra en la década de los 90. Las cepas de rotavirus G9 se encontraron en el Reino Unido en la temporada invernal 1995-96 (Iturriza-Gomara et al., 2000), coincidiendo con la aparición de G9 en Bangladesh (Unicomb et al., 1999) y con la reaparición y diseminación de cepas G9 en los Estados Unidos. En 1996-97 se observó un aumento importante de la distribución de

las cepas G9 en diferentes áreas geográficas (Iturriza-Gomara et al., 2000). En los años 2001-2002 se encontró una frecuencia relativa del 53% de rotavirus G9 en Bari (Italia) (Martella et al., 2003).

El genotipo G9 se convirtió rápidamente en uno de los más prevalentes en muchos países (Santos y Hoshino, 2005). Este rápido incremento de G9, asociado a su notable heterogeneidad genética, despertó muchos interrogantes sobre su origen y trascendencia epidemiológica.

Resulta evidente que desde mitad de la década de los 90 se ha producido una emergencia global de cepas del genotipo G9, con propiedades genéticas y moleculares distintas a las de las cepas detectadas en los años 80 (Kirkwood et al., 1993; Kirkwood et al., 2003). En Australia, aunque el serotipo G9 se identificó por primera vez en la temporada 1999-2000, durante las temporadas 1999-2000 y 2000-2001 constituyó el segundo tipo G más común, y fue responsable del 10% y del 18,1%, respectivamente, del total de infecciones por rotavirus en el país (Masendycz et al., 2001). En la temporada 2001-2002, el serotipo G9 fue el más importante en Australia, puesto que representó el 40,4% de los aislamientos (Kirkwood et al., 2002).

En España, estudios anteriores habían identificado G1P[8] y G4P[8] como los genotipos predominantes de 1995 a 2004 (Buesa et al., 2000), mientras que las cepas de G9 se detectaron por primera vez en Madrid en 1998-1999 (Sanchez-Fauquier et al., 2004). En Valencia se identificaron cepas G9 en el invierno de 2003-2004 (Abu-Mallouh, 2006) y, como se demuestra en el presente estudio, ya en 2005 se convirtió este genotipo en el más prevalente, representando más del 50% de los aislamientos en varias regiones de España (Sanchez-Fauquier et al., 2006; Tellez et al., 2008; Tellez Castillo et al., 2010).

Del mismo modo, el serotipo G9 fue identificado como el predominante en varias ciudades japonesas desde 1998 hasta 2000 con altas tasas de prevalencia, de 52,9% a 71,4% (Zhou et al., 2000). Como fue expuesto anteriormente, en 1995, rotavirus G9 surgió en Bangladesh y se convirtió en el segundo genotipo predominante (27,7%) durante el período 2001-2005 (Rahman et al., 2005). Las cepas G9 representaron la mayor parte (91,6%) de las cepas circulantes en Tailandia durante la temporada 2000-2001, donde se ha convertido en el genotipo más común (Khamrin et al., 2006). En China, las cepas G9 se identificaron en 3 regiones, incluyendo Kunming, Lanzhou y Qinhuangdao, en 1999 y 2003 (Fang et al., 2002; Fang et al., 2005) y sólo una cepa fue detectada entre los años 1982 y 1997 en Beijing (Fang et al., 2002). La incidencia del genotipo G9 aumentó del 0,9% al 4% de 1999 a julio de 2003, lo que coincidió con un aumento en la incidencia mundial del genotipo G9 en varios países.

Actualmente, las cepas más recientes de rotavirus de serotipo G9 presentan los electroforetipos corto y largo, lo que hace pensar que la emergencia de este genotipo no ha derivado directamente de las cepas inicialmente aisladas (P1A[8]G9), tipo E largo de USA y Japón, pero sí estarían relacionadas directamente unas con otras (Oka et al., 2000; Ramachandran et al., 2000; Araujo et al., 2001; Bok et al., 2001; Santos et al., 2001).

Se ha sugerido que el gen de la VP7 genotipo G9 surgió por una delección de un solo nucleótido dentro o al final del codón de terminación de las cepas G9 (Green et al., 1989; Das et al., 1993). La primera hipótesis sugiere que la supresión del nucleótido en el codón de terminación originó un nuevo codón de parada para las cepas G9, UGA, en lugar de la UAG que se encuentran en la mayoría de otros genotipos de rotavirus humanos G (Estes y Cohen, 1989; Das et al., 1993). Asumiendo que esta eliminación y cambio de uso de codón de parada (UGA), sugiere la existencia inicial de un progenitor

común para todos o casi todos los linajes de humanos G9 de rotavirus descritos, incluyendo los primeros aislamientos de los EE.UU., Japón y la India .

La existencia actual de varios linajes de rotavirus G9 estaría relacionada con los primeros G9 aislados de la década de 1980 sugiriendo que la mayoría de estas cepas pueden representar descendiente filogenéticamente lejanos de las primeras cepas, que pueden haber seguido circulando en los humanos sin haber sido detectadas.

Sin embargo, los estudios de las diferentes secuencias de G9 hasta la fecha sugieren que la gran mayoría de las cepas circulantes en diferentes lugares y en diferentes años pertenecen a un mismo linaje filogenético estrechamente relacionado con el gen de la VP7. Esto sugiere la propagación del genotipo G9 a partir de la introducción de una sola cepa, seguido de su transmisión por sucesivas infecciones y de la variación genética de ese linaje. Las cepas descritas en los últimos años son filogenéticamente diferentes a las registradas en la década de 1980, al igual que en algunos aislamientos recientes, lo que sugiere que un precursor común donó un nuevo gen de VP7 a las cepas actuales del genotipo G9. Los datos epidemiológicos de que se dispone son insuficientes para determinar si el genotipo G9 de los rotavirus humanos actuales representan la progenie de una sola cepa antigua o la introducción de múltiples cepas independientes. Se ha descrito una excepción, la cepa CIT 254RV (O'Halloran et al., 2002), en la que el gen VP7 de genotipo G9 tiene 1.061 pb de longitud, es decir, 1 nt más corto de lo habitual para el gen VP7 de la mayoría de los rotavirus de mamíferos (Estes y Cohen, 1989).

Algunas cepas descritas en el sudeste asiático, como por ejemplo 684VN (Nguyen et al., 2001), y en el Extremo Oriente, como en Japón y China (Zhou et al., 2003) a finales de 1990, o incluso diferentes cepas distribuidas a nivel mundial, hacen que se pueda apoyar la hipótesis de un progenitor común debido a que estas cepas se

relacionan estrechamente con la cepa Mc323 en los diferentes análisis filogenéticos.

Sin embargo, las divergencias filogenéticas en diferentes secuencias de cepas actuales de los últimos 10 años contradice esta hipótesis. Surge por tanto una segunda hipótesis de emergencias independientes de cepas VP7 G9 de fuente desconocida que podrían provenir de un reservorio animal (Laird et al., 2003). Apoyando esta hipótesis sobre la interacción genética entre cepas de rotavirus animales y humanas se encuentran algunos artículos que demuestran que ciertos rotavirus G9 aislados de Asia fueron reordenamientos entre cepas porcina-humana o bovina-humana (Urasawa et al., 1992; Das et al., 1993).

Por otra parte, la detección de cepas de rotavirus G9 en muestras diarreicas de cerdos y la presencia de anticuerpos específicos frente a VP7 G9 en corderos, demuestra que los rotavirus humanos G9 podrían haberse originado en una especie animal (Munoz et al., 1995; Santos et al., 1999).

Se han identificado 6 linajes filogenéticos diferentes y 11 sublinajes en las cepas de rotavirus G9, basados en la variabilidad genética del gen de VP7 (Phan et al., 2007). Al linaje I pertenecen las cepas G9 aisladas en los años 80, al linaje II corresponden cepas G9 aisladas en neonatos asintomáticos en la India y al linaje III corresponde la mayoría de las cepas G9 que actualmente circulan por todo el mundo (Martinez-Laso et al., 2009). Es de destacar que los linajes I, II, IV y V se han encontrado sólo en humanos, mientras que los linajes III y VI se han detectado tanto en humanos como en ganado porcino (Phan et al., 2007). El linaje III contiene 4 sublinajes, de los cuales, los sublinajes IIIa, IIIb y IIIc se encontraron restringidos a Tailandia, Vietnam e Irlanda, respectivamente, mientras que las cepas del sublinaje III d se han detectado en muchas regiones de todo el mundo (Phan et al., 2007). Además, el linaje VI se ha dividido en 7 sublinajes, de los cuales los sublinajes a-d y g se han encontrado sólo en humanos, y los

sublinajes e y f en cerdos. La identidad de nucleótidos en las cepas de un mismo sublinaje oscila entre el 96% y el 100%. Por el contrario, la variación de secuencias entre cepas de distintos linajes es superior, entre un 5% y un 14% (Hoshino et al., 2004).

En Bangladesh se describieron 3 combinaciones distintas de G9 con VP4 P[6] y P[8] y subgrupo específico I o II, electroforetipo (corto, largo) (Unicomb et al., 1999). Asimismo, la alta tasa de infecciones mixtas encontradas en este estudio sugiere la facilidad del intercambio genómico inter-genogrupo de los genotipos P y G (VP4 y VP7). Actualmente, se han identificado cepas de rotavirus P[6]G9, electroforetipo corto, pudiéndose inferir que su origen proviene de recombinantes entre los diferentes genotipos (Kirkwood et al., 2003).

Sin embargo, Gentsch et al. (1996) opinan que la mayoría de los serotipos G se asocian principalmente con un mismo serotipo P, y presentan un electroforetipo y subgrupo específico, debido a estudios de hibridación de ARN-ARN que han demostrado que el intercambio de segmentos genómicos y electroforetipos es restrictivo entre las cepas (Wa y subgrupos DS1) (Gentsch et al., 1996). Al igual que otros autores, consideran que las cepas G9 que han aislado no forman recombinantes entre ellas (Araujo et al., 2001; Cunliffe et al., 2001) (Tabla 16).

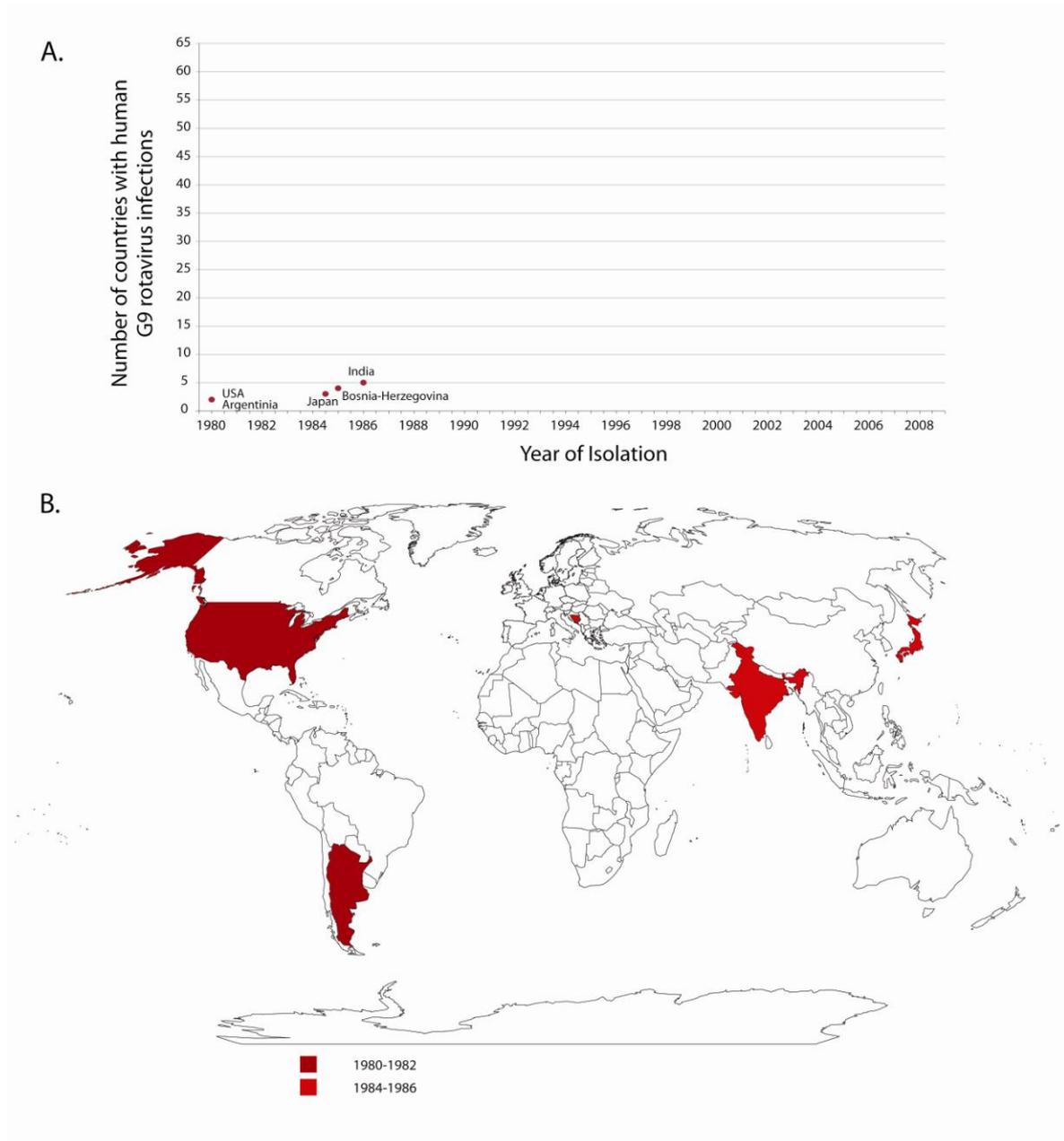
Algunos estudios han atribuido características clínicas y epidemiológicas poco comunes a las cepas G9. Se ha descrito que estas “nuevas cepas G9” causan infecciones sintomáticas en niños mayores de 5 años, que supuestamente estarían protegidos por una inmunidad anti-rotavirus preexistente (Iturriza-Gomara et al., 2000), e incluso se ha descrito que estas infecciones pueden ser más graves (Linhares et al., 2006). Estas cepas G9 se han detectado también causando diarrea en neonatos, lo que sugiere que la inmunidad adquirida de la madre no las neutralizaría eficazmente (Widdowson et al., 2000). Según estas observaciones, es posible que las cepas G9 hayan escapado a los

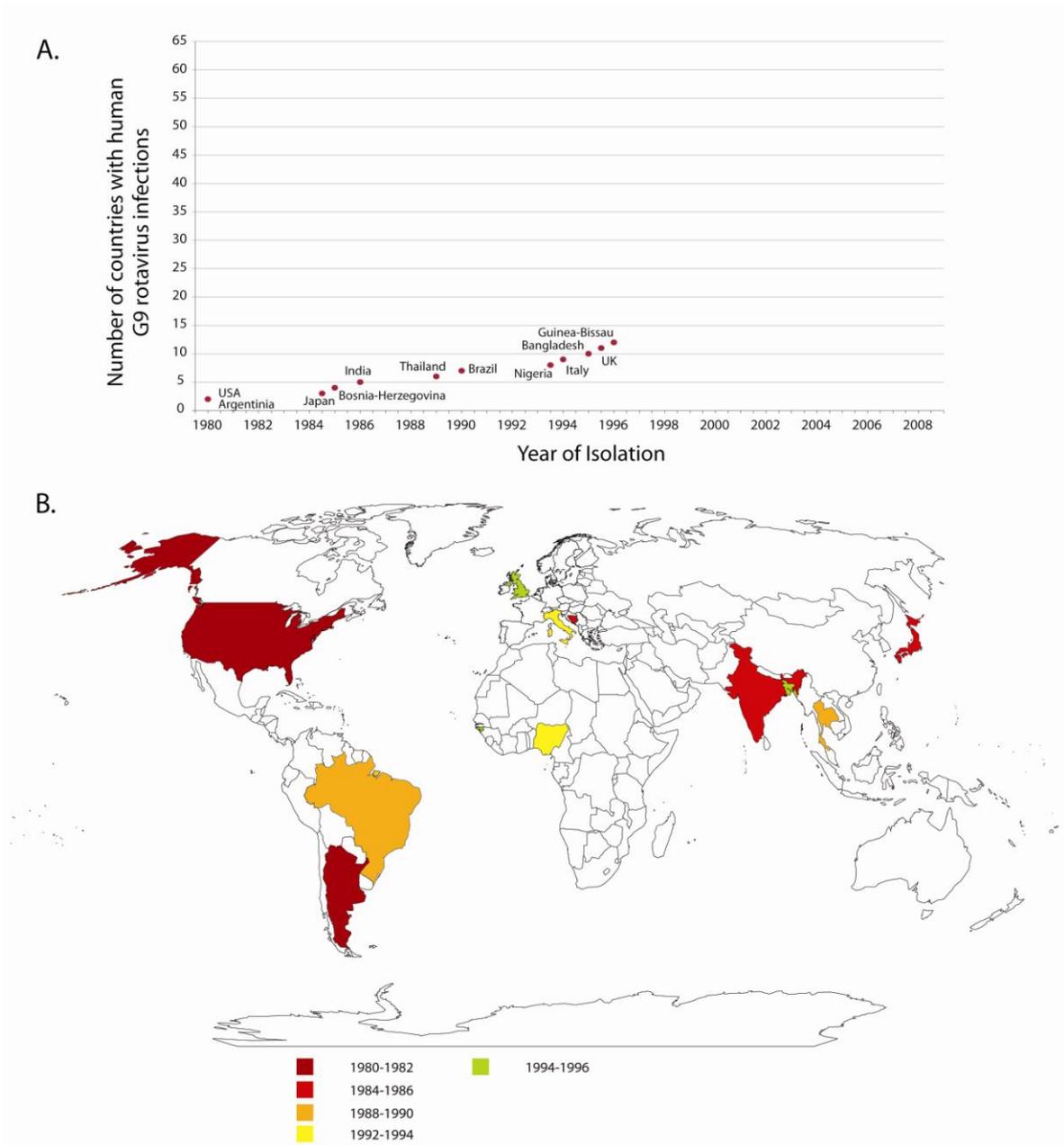
mecanismos inmunológicos preexistentes, inducidos por otras cepas de rotavirus, porque estas poblaciones no habrían contactado nunca antes con cepas G9 (Banyai et al., 2004). Paradójicamente, las vacunas Rotarix® y Rotateq® protegen frente a las infecciones por cepas del genotipo G9 (Vesikari et al., 2006; Linhares et al., 2008; Vesikari et al., 2009). Sin embargo, aunque las vacunas actuales han demostrado ser eficaces en la protección frente a G9, algunos estudios han sugerido que en niños vacunados son posibles las infecciones sintomáticas por G9 (Vesikari et al., 2004; Vesikari et al., 2006). Por este motivo es importante analizar la variabilidad existente dentro del genotipo G9 y estudiar la posible existencia de ‘clusters’ que reflejen una diversidad tanto genética como antigénica, que podría explicar estos fracasos de las vacunas.

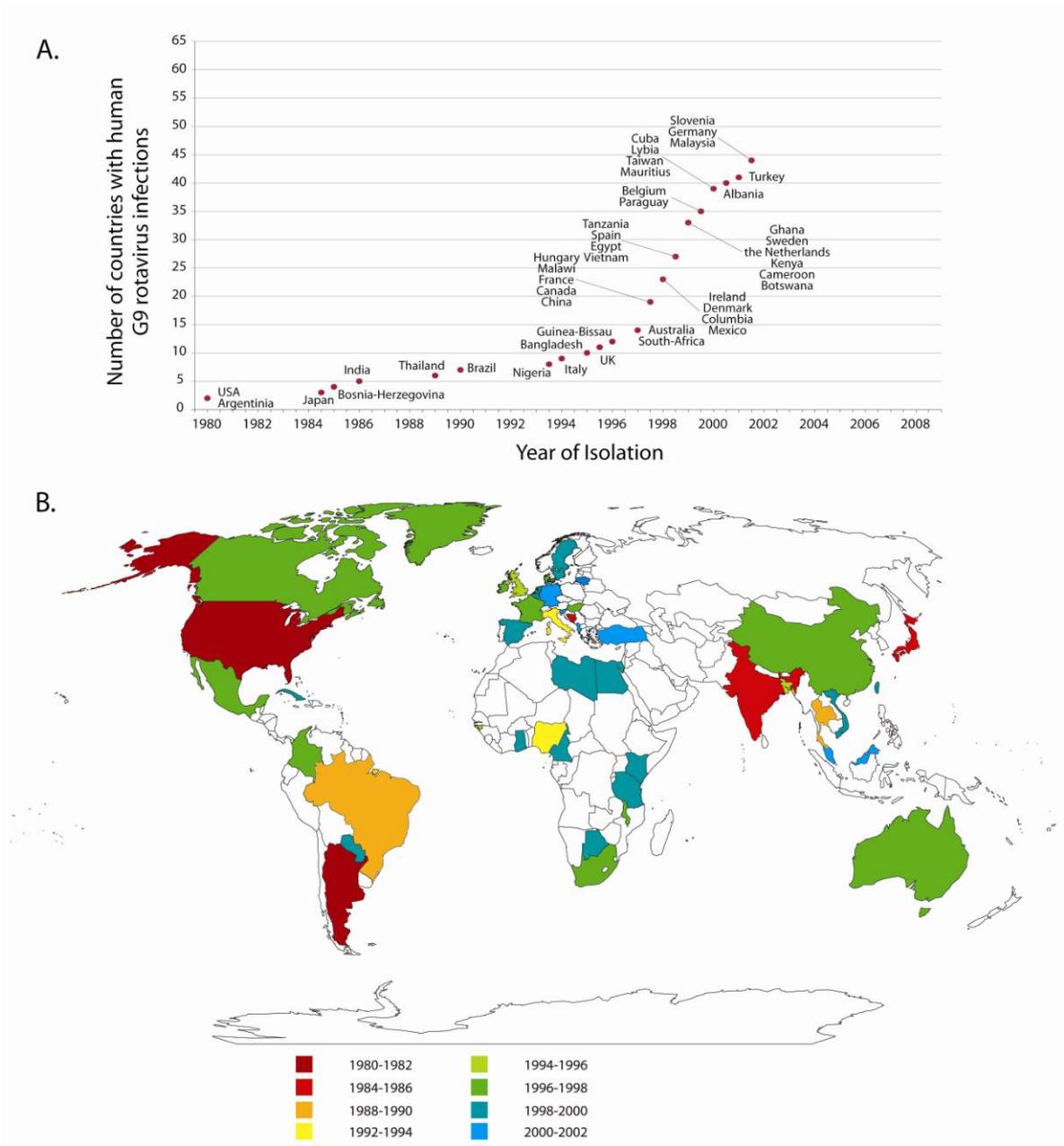
Las cepas del genotipo G9 que han producido la “pandemia” en la última década pertenecen al linaje III (Rahman et al., 2005; Santos y Hoshino, 2005). El origen de estas cepas del genotipo G9, linaje III, sigue siendo un enigma. Parece claro que el linaje III no ha evolucionado del linaje I por deriva antigénica (“antigenic drift”) y que los linajes I y III tienen orígenes evolutivos independientes (Hoshino et al., 2004). Los análisis filogenéticos han demostrado que las cepas G9 porcinas están más próximas a las nuevas cepas G9 humanas (90-94%) que a las clásicas cepas G9 humanas (86-89%). El gen VP7 de una cepa porcina G9 (CMP003) aislada en Tailandia en 2000 se clasificó junto a las cepas G9 humanas en el linaje III, mientras que los genes de cepas G9 humanas detectadas en China y Japón se incluyeron entre las cepas porcinas (Phan et al., 2007). Por lo tanto, los genes VP7 de cepas G9 porcinas y las nuevas cepas G9 humanas podrían tener un precursor común. Esto sugiere la existencia de recombinaciones entre cepas porcinas y humanas como posible explicación a la

emergencia de los rotavirus G9 en humanos (Figura 22) (Phan et al., 2007; Martinez-Laso et al., 2009; Matthijssens et al., 2010).

Fig. 21. Distribución temporal y expansión geográfica a nivel mundial durante las dos últimas décadas de las cepas de rotavirus del genotipo G9.







<b>País</b>	<b>Año</b>	<b>Genotipo y electroforetipo</b>	<b>Referencia</b>
<b>Estados Unidos India</b>	1993-2001	G9P[8] e-corto 47,5% G9P[6] e-largo 17,5% G9P[6] e-largo 35%	(Laird et al., 2003)
<b>Bangladesh</b>	1995	G9P[8] e-largo 1,8% G9P[8] e-corto 15% G9P[6] e-largo 10% G9P[6] e-corto 57,1% G9P[0] e-largo 11% G9P[0] e-corto 5,1%	(Unicomb et al., 1999)
<b>Taiwan</b>	2000-2002	G9P[8] e-largo 99,5% G9P[4] e-corto 0,5%	(Lin et al., 2006)
<b>Brasil</b>	2001	G9P[4] 2% G9P[6] 2% G9P[8] 9%	(Araujo et al., 2001)

**Tabla 16. Genotipo G9 de rotavirus en diferentes partes del mundo**

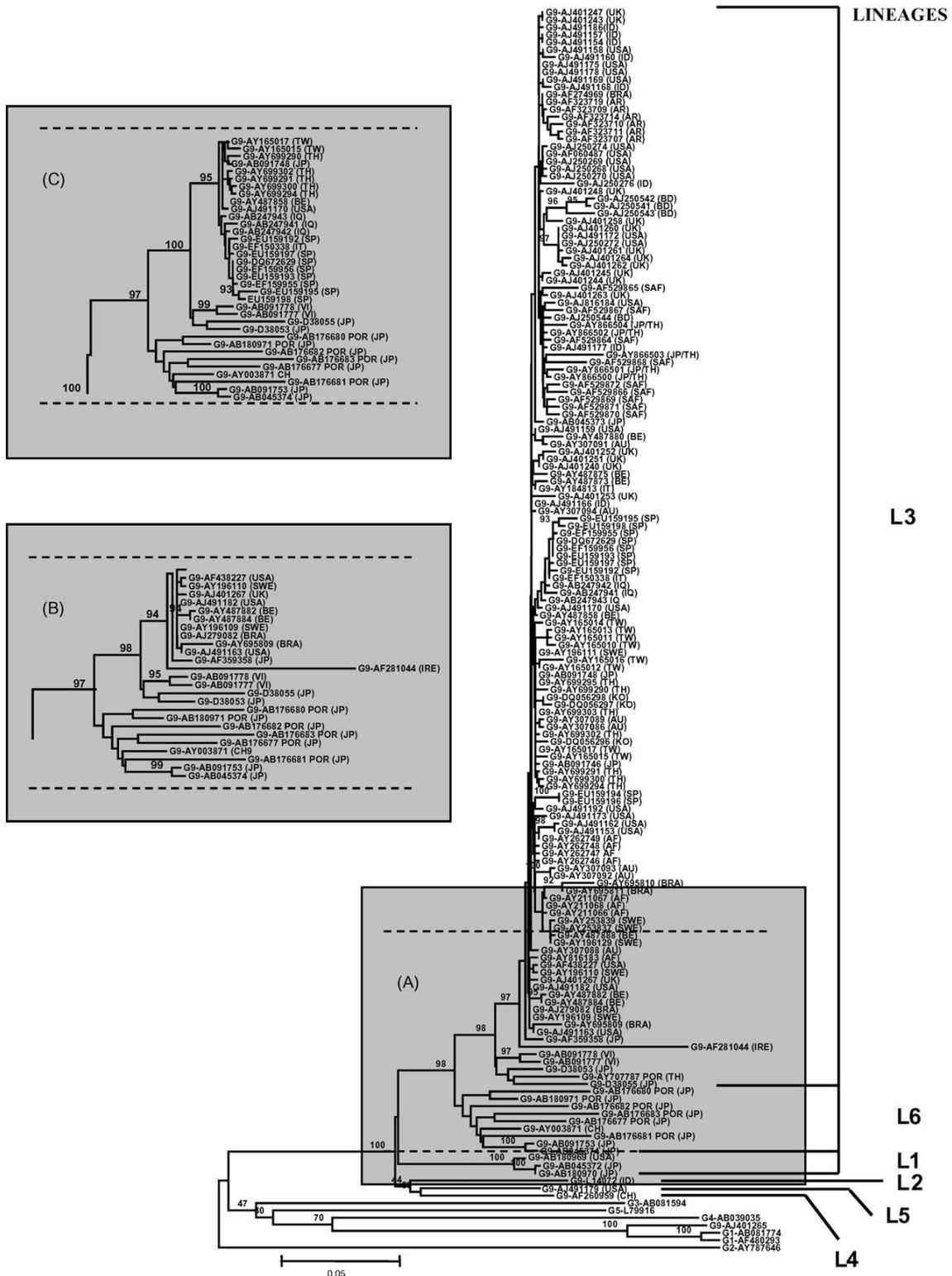


Fig. 22. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre el genotipo G9 de diferentes secuencias de origen humano y porcino en el mundo y sus linajes. Método Neighbor-joining; se muestran los valores de “bootstrap” superiores a 90 (1.000 réplicas). (A) Región parcial del árbol filogenético mostrando el linaje VI y algunas secuencias del linaje III . (B) en la misma región parcial del árbol filogenético como 2A sin la secuencia de origen porcino (AY707787). (C) en la misma región parcial del árbol filogenético de las secuencias 2A sin AY707787 (porcina) y AF281044 (CIT-254, humana). Las iniciales entre paréntesis indican el país donde se obtuvieron las muestras. Se utilizaron de

referencia de secuencias de cepas del genotipo G9 de origen humano (227 secuencias) (Martinez-Laso et al., 2009)

## **4.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Análisis de la secuencia de VP7**

Se han estudiado 306 muestras de heces en las que previamente se había detectado el genotipo G9P[8]. Las muestras se obtuvieron de niños con gastroenteritis, entre octubre de 2005 y octubre de 2009 en tres Departamentos de Salud (Castellón de la Plana, Sagunto y Valencia) de la Comunidad Valenciana. Todas las muestras recogidas habían sido previamente identificadas como positivas para rotavirus del grupo A por enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Premier Rotaclone®, Meridian Bioscience) o inmunocromatografía (VIKIA® ROTA-ADENO de BioMérieux y SIMPLE ROTA-ADENO de Operon).

Se escogieron al azar 60 de las 306 muestras genotipo G9P[8] de las tres zonas en estudio para realizar un estudio filogenético del gen de la proteína VP7.

### **4.2.2. Secuenciación e identificación de los productos de amplificación**

Se realizó el protocolo de amplificación del ADNc con cebadores específicos (VP7-F) y (VP7-R) (Gomara et al., 2001) descrito anteriormente en el Capítulo I.

#### **4.2.2.1. Purificación de ampliceros de ADN para secuenciación**

Los productos de amplificación que se detectaron por electroforesis en gel de agarosa con un tamaño similar al esperado se purificaron para su posterior caracterización mediante secuenciación. Para ello, dependiendo de los patrones de

bandas observados en el gel, se emplearon dos métodos diferentes de purificación (Figura 23):

- A) Cuando en una misma muestra se observaban bandas de diferentes tamaños, incluida una con el tamaño esperado, se empleó el Kit “Gel Extraction Systems” (Marligen Bioscience). La banda “dudosa” se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) al 1,5 % en tampón TBE teñido con bromuro de etidio a concentración 0,5 µg/ml. A continuación, el gel se visualizaba mediante luz UV y cuando la separación de bandas era patente, se cortaba con un bisturí la porción de gel que contenía la banda de interés. Ésta era transferida a un eppendorf de 1,5 ml y pesada, añadiéndose 30 µl de tampón de solubilización L1 por cada 10 mg de gel de agarosa. Seguidamente, se realizaba una incubación a 50 °C durante 15 minutos, lográndose así la separación del ADN de la agarosa. Se filtraba por una columna de sílica y se centrifugaba a 12.000 x g 1 minuto. Se descartaba el sobrenadante y se añadían 500 µl de tampón de solubilización L1 a la columna de filtración, incubando 1 minuto a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 12.000 x g, se descartaba el sobrenadante y se añadían 700 µl de tampón de lavado L2, incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaba a 12.000 x g durante 1 minuto y se descartaba el sobrenadante, centrifugando nuevamente para descartar el tampón residual. La columna se introducía en un eppendorf de 1,5 ml y se añadían 50 µl de tampón de elución (TE) directamente al centro de la columna, durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugaba a

12.000 x g durante 2 minutos. El eluido final contenía el ADN que era analizado por secuenciación.

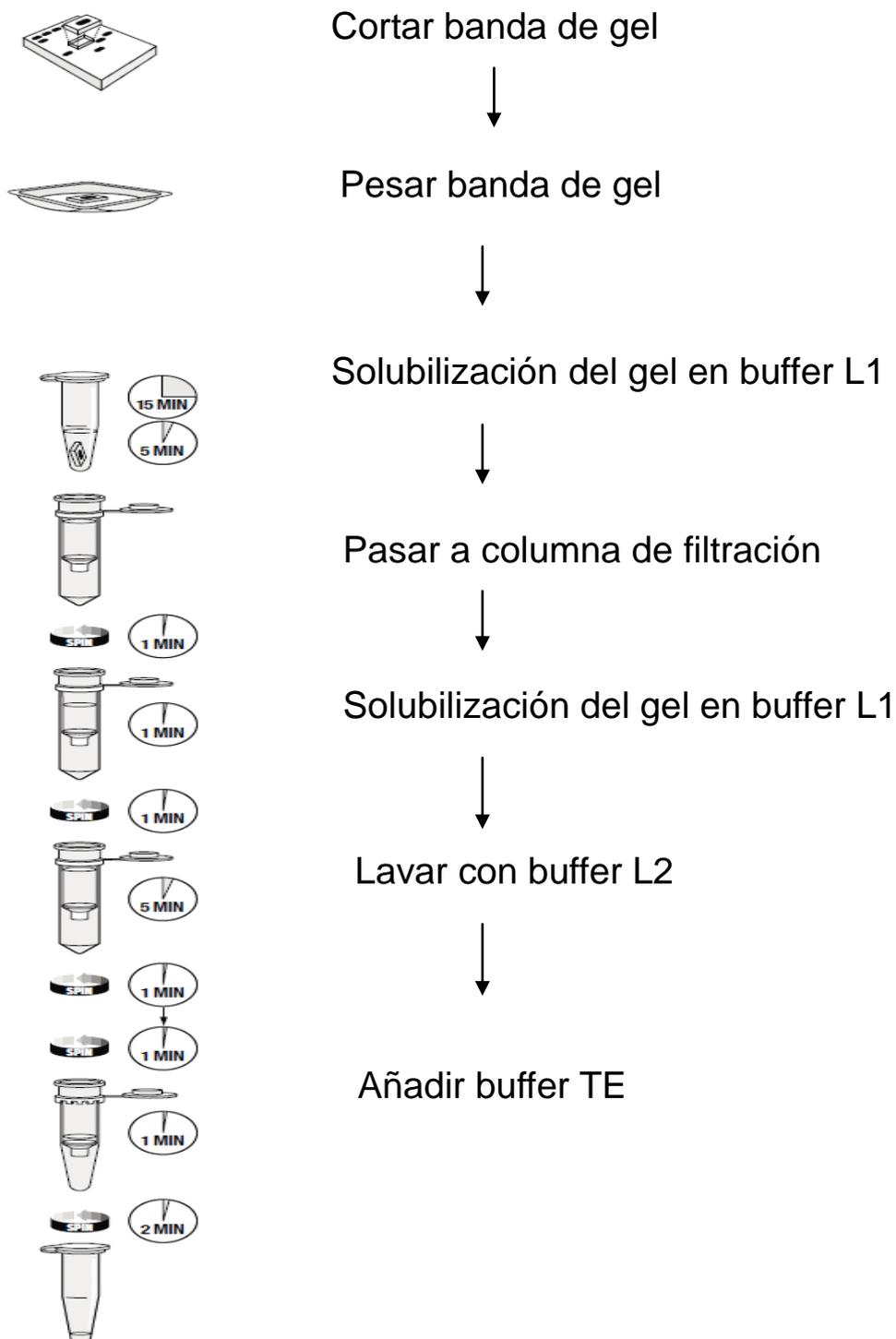


Fig. 23. Método para purificar amplímeros de PCR

B) Si la banda era del tamaño esperado, siendo única, se purificaba utilizando el reactivo ExoSAP-IT<sup>®</sup> Clean Up (UBS, GE Healthcare Life Sciences), sistema de purificación y eliminación de primers y nucleótidos, según el siguiente procedimiento:

- La muestra se transfería a un eppendorf de 1,5 ml, se añadían 5 µl de producto de la PCR y 2 µl de ExoSAP-IT<sup>®</sup> para completar un volumen final de 7 µl. Se incubaba posteriormente a 37 °C durante 15 minutos para la degradación de primers y nucleótidos restantes en el producto de PCR. Se realizaba una posterior incubación durante 15 minutos a 80 °C para inactivar ExoSAP-IT<sup>®</sup>. El eluido final fue conservado a -20 °C hasta su secuenciación.

#### 4.2.2.2. Cuantificación del ADN de los amplímeros

Se visualizaban las bandas de ADN resultantes de la reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,7 % en tampón TBE (conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio) durante 30 min a 90 voltios, con un marcador de P.M. (100 pb ladder ADN, Biotools).

Se realizaba una cuantificación aproximada de ADN comparándolo con un marcador de pesos moleculares con concentraciones de ADN conocidas (Low ADN Mass Ladder, Invitrogen).

#### **4.2.2.3. Secuenciación de los productos amplificados de RT-PCR**

Después de la purificación de los productos de RT-PCR de VP7, se procedió a la secuenciación de los mismos utilizando el kit de secuenciación ABI PRISM BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems) y un secuenciador automático (Applied Biosystems ABI PRISM 377). Para cada muestra a secuenciar se utilizó el cebador específico VP7-F 5' ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC 3' (nt 51-71) (881pb). La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación de ADN y Análisis Molecular del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València.

#### **4.2.3. Análisis filogenético de la secuencia parcial de VP7 de cepas de rotavirus G9P[8]**

Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas con los programas Chromas Lite, versión 2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) o BioEdit, versión 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), que permiten obtener y evaluar los cromatogramas. Las secuencias parciales de VP7 obtenidas tenían aproximadamente 880 pb.

Las secuencias de nucleótidos se compararon con secuencias de referencia depositadas en las bases de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) mediante la aplicación del programa en red “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para confirmar que los productos obtenidos era los esperados y correspondían al gen codificante de la proteína VP7.

Además, las secuencias nucleotídicas de los fragmentos obtenidos mediante PCR del gen codificante de la proteína VP7 fueron traducidas a aminoácidos utilizando

el programa “Translate” del portal web ExPASy Proteomics tools ([www.expasy.ch/tools/](http://www.expasy.ch/tools/)) y se alinearon utilizando los programas BioEdit y CLUSTAL-W (European Bioinformatics Institute, Cambridge, Reino Unido). Cualquier error detectado en las secuencias fue corregido tras verificar los cromatogramas, antes de realizar el alineamiento. Una vez realizado éste, el archivo con las secuencias alineadas se guardaba en formato “.msf”, idóneo para editar y trabajar alineamientos con el programa GeneDoc. Con este programa (GeneDoc, versión 2.7) se igualaron las longitudes de las secuencias nucleotídicas, se observaron las diferencias entre grupos de secuencias y se obtuvo la secuencia consenso. Una vez guardado el nuevo alineamiento en formato FASTA, se procedió a construir los árboles filogenéticos utilizando el método Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) mediante el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA ) (Kumar et al., 2001) de 57 secuencias parciales del gen VP7 de cepas de rotavirus G9P[8] escogidas al azar de 306 cepas descritas en el capítulo anterior y de cepas de referencia. La distancia genética se calculó por el método Jukes-Cantor. La confianza estadística se realizó mediante análisis de “bootstrap” (1.000 réplicas). Los árboles filogenéticos se visualizaron con el programa MEGA y TreeView (versión 1.6.2). Se incluyeron secuencias representativas de los linajes G9-I, G9-II, G9-III, G9-IV, G9-IV y G9-VI.

Los datos de las secuencias de nucleótidos obtenidas de VP7 G9P[8] fueron depositados en la base de datos GenBank con los números de acceso correspondientes (ANEXO 1).

Para el método de la mínima evolución se empleó el modelo Jukes-Cantor “complete deletion”, para sustitución de nucleótidos, utilizando las posiciones primeras y segunda de las regiones codificantes.

Se estudió el polimorfismo y el nivel de divergencia de las secuencias de los

distintos clusters obtenidos en el análisis filogenético utilizando el programa DnaSP versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009). DnaSP es un programa informático interactivo para el análisis del polimorfismo de ADN a partir de datos de secuencias de nucleótidos (<http://www.ub.edu/dnasp/>) (Librado y Rozas, 2009).

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Análisis de secuencias del gen de la proteína VP7

Se analizaron un total de 306 muestras de heces positivas para rotavirus. Fueron recogidas de niños con gastroenteritis aguda durante el período comprendido entre Octubre de 2005 y Octubre de 2009. Los genotipos G y P de los rotavirus se determinaron por RT-PCR, por el procedimiento descrito en el capítulo I. En las 306 muestras analizadas se detectaron 173 cepas de rotavirus del genotipo G9 en el periodo 2005-2006, 123 cepas en el periodo 2006-2007 y 10 cepas en el periodo 2007-2008. Se escogieron aleatoriamente 60 muestras de los cuatro periodos invernales de los tres departamentos de salud, para ser secuenciado el gen de la VP7, obteniéndose 57 secuencias.

La distribución de las 57 muestras secuenciadas por periodo invernal y por Departamento de Salud se muestra en la tabla 17.

Ciudades	2005-06	2006-07	2007-08	2008-09	Total
Castellón de la Plana	3	7	7	0	17
Sagunto	3	7	5	1	16
Valencia	2	5	13	4	24
<b>Total</b>	8	19	25	5	57

Tabla 17. Distribución de rotavirus G9P[8] de muestras escogidas al azar de tres ciudades de la Comunidad Valenciana (2005-2009) para su secuenciación y análisis filogenético.

Se determinó la secuencia del gen de la proteína VP7 de las 57 cepas de rotavirus con genotipo G9P[8]. Estas secuencias fueron analizadas y comparadas con secuencias de referencia conocidas de la base de datos GenBank (ANEXO 1).

En las 57 muestras analizadas por secuenciación se encontró un alto grado de identidad nucleotídica (97-100 %).

### **4.3.2. Análisis filogenético del gen de la proteína VP7**

Se caracterizaron las 57 cepas aisladas de G9 escogidas al azar de los tres departamentos en estudio y, tras la secuenciación de los genes de VP7, se alinearon las secuencias de nucleótidos del gen VP7. La mayoría de los genes estaban estrechamente relacionados, encontrándose menos de un 3% de divergencia nucleotídica entre ellas.

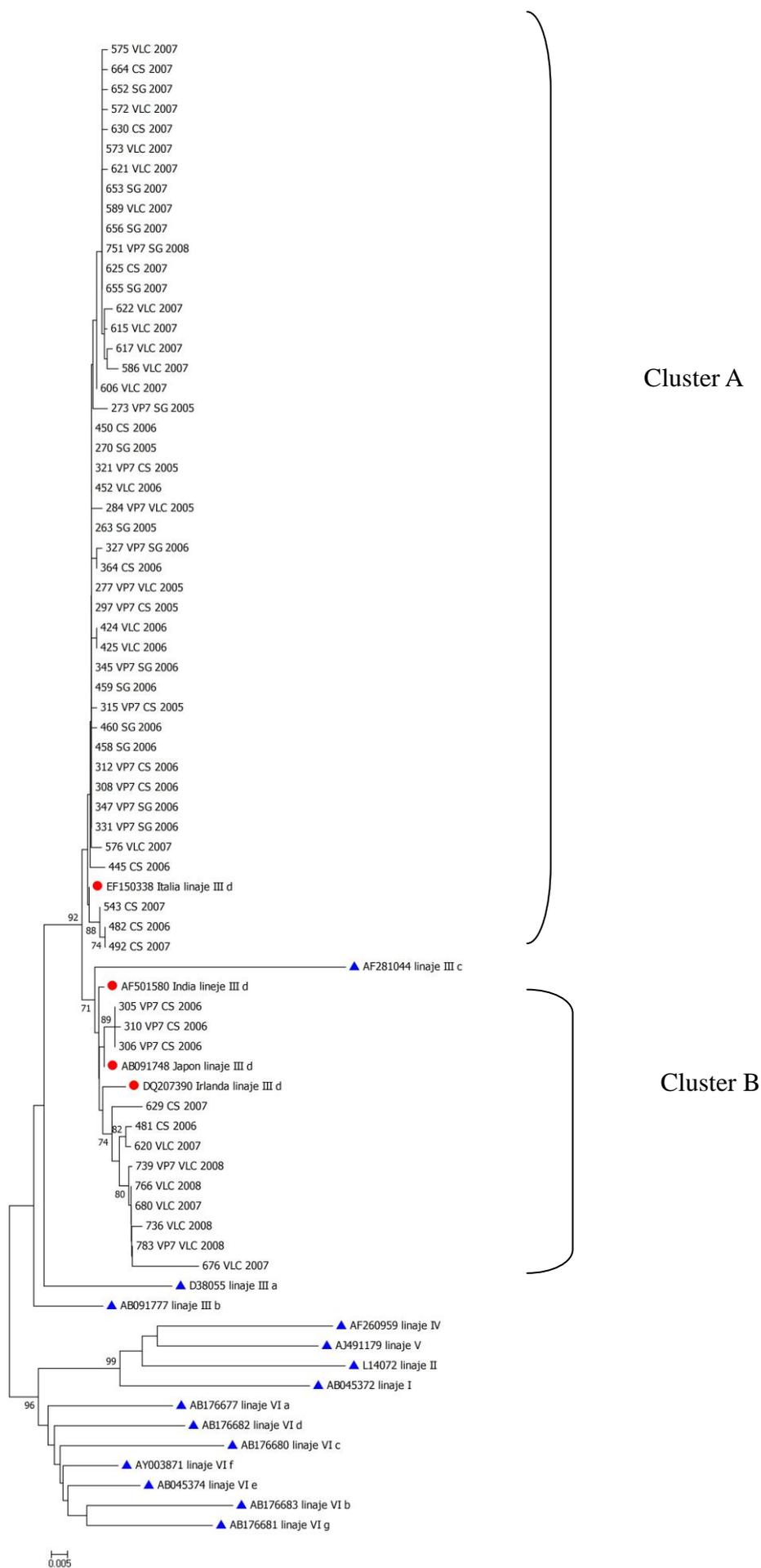
Las secuencias de VP7 de las cepas G9 (n=57 secuencias de 309 cepas de G9P[8]) presentaban un 97 % de identidad al ser comparadas con cepas de referencia de diferentes linajes.

Se realizó un dendrograma mediante el método Neighbor-joining con las 57 secuencias de nucleótidos de las cepas G9 aisladas y con 18 secuencias prototipos de los seis linajes principales del genotipo G9: G9-I, G9-II, G9-III, G9-IV, G9-IV y G9-VI (Figura 24). Se demostró claramente en el análisis filogenético que las cepas G9 de nuestro estudio se agrupan en el linaje IIIId del genotipo G9, independientemente de dónde y cuándo fueron aisladas. Se agrupan formando dos “clusters”: un primer “cluster” A formado por 45 secuencias de las tres áreas y de los diferentes años de estudio, junto con una cepa EF150338 de Italia genotipo G9 linaje IIIId (“bootstrap” 92 %), y otro “cluster” B con 12 secuencias pertenecientes a las tres áreas y a los diferentes

años de estudio, agrupándose con cepas G9 linaje IIIId de Irlanda, Japón y la India (“bootstrap” 71 %).

#### **4.3.3. Comparación de las regiones antigénicas y sustituciones de aminoácidos**

El patrón de sustituciones de aminoácidos en las cepas aisladas se examinó mediante un alineamiento de aminoácidos, con secuencias de referencia del linaje IIIId del genotipo G9 (EF1503338; AF501580; AB091748; DQ207390) (Fig. 23). Las cepas de este estudio difieren de las secuencias de referencia en las regiones antigénicas A, B, C y F, manteniéndose conservada la región antigénica D (Tabla 18 y figura 25).



←Figura 24. Dendrograma de genotipos G9P[8] linaje IIIId con cepas de referencia. Se ha construido con 75 secuencias nucleotídicas de diferentes linajes de G9, 57 secuencias de Castellón, Sagunto y Valencia (2005-2009) y 18 secuencias de referencia mediante el método Neighbor-joining; se muestran los valores de “bootstrap” superiores a 70 (1.000 réplicas). Con círculos rojos se señalan las secuencias del genotipo G9 linaje IIIId y con triángulos azules las cepas de los genotipos G9-I, G9-II, G9-III, G9-IV, G9-VI y sus respectivos subgrupos.

REGIONES ANTIGÉNICAS VP7 (RA)					
CEPAS	RA D (65-76aa)	RA A (87-101aa)	RA B (142-152aa)	RA C (208-221aa)	RA F (235-245aa)
310 CS 2006	0	1 (Gln → Lys)	1 (Glu → Lys)	0	0
306 CS 2006	0	0	1 (Glu → Lys)	0	0
315 CS 2006	0	1 (Ala → Thr)	0	0	0
327 SG 2006	0	0	0	1(Pro → Gln)	0
305 VLC 2006	0	0	1 (Glu → Lys)	0	1 (Ala → Thr)
364 CS 2006	0	0	0	1 (Pro → Gln)	0
347 SG 2006	0	0	0	0	1 (Ala → Thr)
445 CS 2006	0	0	0	0	1 (Ala → Thr)
481 CS 2006	0	0	1 (Thr → Ile)	0	1 (Ala → Thr)
452 VLC 2006	0	0	0	0	1 (Ala → Thr)
621 VLC 2007	0	0	0	1(Gly → Arg)	0
620 VLC 2007	0	0	0	0	1 (Ala → Thr)
680 VLC 2007	0	0	0	0	1 (Ala → Thr)
783 VLC 2008	0	0	0	0	1 (Ala → Thr)
676 VLC 2008	0	0	0	0	1 (Ala → Thr)
736 VLC 2008	0	0	0	0	1 (Ala → Thr)
739 VLC 2008	0	0	0	0	1 (Ala → Thr)
<b>TOTAL</b>	0	2	4	3	11

Tabla 18. Cambios de aminoácidos observados en las secuencias deducidas de las cinco regiones antigénicas de VP7 de las cepas de rotavirus G9P[8] de Castellón, Sagunto y Valencia (2005-2009) en comparación con las secuencias de referencia (EF1503338, AF501580, AB091748, DQ207390).

# CAPÍTULO II

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	*	220	*	240	
424 VE7 VL :																									243
425 VE7 VL :																									243
312 VE7 CS :																									243
456 VE7 SG :																									243
459 VE7 SG :																									243
315 VE7 CS :																									243
306 VE7 CS :																									243
460 VE7 SG :																									243
331 VE7 SG :																									243
321 VE7 CS :																									243
345 VE7 SG :																									243
327 VE7 SG :																									243
364 VE7 CS :																									243
629 VE7 CS :																									243
297 VE7 CS :																									243
450 VE7 CS :																									243
270 VE7 SG :																									243
621 VE7 VL :																									243
622 VE7 VL :																									243
575 VE7 VL :																									243
263 VE7 SG :																									243
273 VE7 SG :																									243
751 VE7 SG :																									243
284 VE7 VL :																									243
543 VE7 CS :																									243
630 VE7 CS :																									243
615 VE7 VL :																									243
617 VE7 VL :																									243
576 VE7 VL :																									243
656 VE7 SG :																									243
655 VE7 SG :																									243
625 VE7 CS :																									243
652 VE7 SG :																									243
653 VE7 SG :																									243
586 VE7 VL :																									243
589 VE7 VL :																									243
664 VE7 CS :																									243
572 VE7 VL :																									243
573 VE7 VL :																									243
606 VE7 VL :																									243
445 VE7 CS :																									243
452 VE7 VL :																									243
347 VE7 SG :																									243
482 VE7 CS :																									243
492 VE7 CS :																									243
481 VE7 CS :																									243
620 VE7 VL :																									243
766 VE7 VL :																									243
680 VE7 VL :																									243
783 VE7 VL :																									243
676 VE7 VL :																									243
736 VE7 VL :																									243
739 VE7 VL :																									243
305 VE7 CS :																									243
310 VE7 CS :																									243
306 VE7 CS :																									243
RF501580 I :																									243
RF501148 J :																									243
RF501390 I :																									243
RF501398 I :																									243
RF501398 I : #6LLU8P#1QW9#LEITG#Mdx#AN8SQ#FF1#C#LY#EASQ#IG#I#W#L#S#L#F#W#FC#V#F#H#L#A#S#H#L#E#Q#Y#C#I#W#6#K#Y#H#L#G#S#H#L#L#N#E#C#P#H#L#Y#C#L#E#A#N#W#L#S#C#I#K#C#E#L#Q#I#G#C#H#W#L#F#E#P#S#K#L#G#I#V#G#W#K#I#V#I#T#3#4#N#C#L#E#P#F#I#C#G#S#V#L#G#A#D#E#T																									

← Figura 25. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de VP7 de cepas de rotavirus G9P[8] con secuencias de referencia (EF1503338; AF501580; AB091748; DQ207390). Se representan los dos dominios hidrofóbicos en barras azules (6-23 aa: dominio H1; 33-44 aa: dominio H2). Se indican los dominios de unión con el calcio con una barra marrón (124-155 aa). Se marcan con rectángulos en negro las cinco regiones antigénicas (RA) de VP7: RA D (65-76 aa), RA A (87-101 aa), RA B (142-152 aa), RA C (208-221 aa) y RA F (235-245 aa).

#### 4.3.4. Polimorfismo y nivel de divergencia de las secuencias VP7

Tras la utilización del programa DnaSP 5.10.01 se obtuvieron los siguientes resultados reflejados en las tablas 19 y 20.

	Cluster A	Cluster B	Total de secuencias
Núm. de secuencias	45	12	57
Núm. de sitios polimórficos	29	32	64
Núm. total de mutaciones	31	32	67
Promedio de diferencias de nucleótidos, k	2,799	8,136	6,554
Diversidad nucleotídica, Pi	0,00457	0,01327	0,01069
Diversidad nucleotídica con Jukes y Cantor, Pi JC	0,00459	0,01344	--
Desviación típica de Pi JC	0,00052	0,000275	--

Tabla 19. Diversidad interna de grupos de secuencias (clusters A y B) del gen de VP7 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.

Diversidad entre Poblaciones	Clusters A / B
Núm. de diferencias fijas	4
Mutaciones compartidas	0
Promedio de diferencias de nucleótidos entre poblaciones	13,244
Promedio de sustituciones de nucleótidos por sitio entre poblaciones, Dxy	0,02161
Dxy con Jukes y Cantor, Dxy(JC)	0,02195
Desviación típica de Dxy(JC)	0,00313
Núm. de sustituciones netas de nucleótidos entre poblaciones, Da	0,001269
Da con Jukes y Cantor, Da(JC)	0,001294
Desviación típica de Da(JC)	0,00317

**Tabla 20. Diversidad entre grupos de secuencias (clusters A y B) del gen de VP7 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.**

En los análisis del estudio del polimorfismo y del nivel de divergencia de las secuencias de los “clusters A y B” obtenidos se observó un coeficiente de diversidad nucleotídica 0,00457 en el “clusters A”, 0,01327 en el “clusters B”, y de 0,01069 del total de secuencias analizadas, lo que nos hace inferir una alta homogeneidad entre las secuencias evaluadas. Se observó que al hacer el análisis de diversidad entre las dos poblaciones “clústeres A/B” no se encontraron mutaciones compartidas entre ellas.

#### 4.4. DISCUSIÓN

Desde que se detectó por primera vez el genotipo G9 en 1983 hasta principios de 1990 rara vez se describió este genotipo, aunque era conocido como causante de infecciones asintomáticas en recién nacidos en la India (Clark et al., 1987; Nakagomi et al., 1990; Urasawa et al., 1992; Zizdic et al., 1992; Das et al., 1993).

A partir de mediados de la década de 1990 hubo un notable incremento en la detección de cepas G9 como causa de gastroenteritis, y en los últimos años los rotavirus G9 se han convertido en uno de los cinco genotipos con más importancia epidemiológica en todo el mundo, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Ramachandran et al., 1996; Griffin et al., 2000; Iturriza-Gomara et al., 2000; Palombo et al., 2000; Widdowson et al., 2000; Araujo et al., 2001; Banyai et al., 2004).

En el presente estudio hemos demostrado que las cepas de rotavirus circulantes en nuestra área pertenecen al linaje III y al sublinaje IIIId, observándose una alta similitud entre ellas (97,5% de identidad de aminoácidos) y con las cepas de referencia, lo que coincide con otros estudios (Clark et al., 1987; Clark et al., 2004; Rahman et al., 2005; Santos y Hoshino, 2005; Martinez-Laso et al., 2009). A pesar de esta escasa diversidad en las secuencias nucleotídicas de G9, hemos encontrado dos “clusters” claramente diferenciados, el “cluster” A en el que se agrupa la mayoría de nuestras cepas junto con una cepa italiana de linaje IIIId, y el “cluster” B, que incluye claramente a 8 cepas junto con otro pequeño grupo de 4 cepas que parecen ser “de transición”. La cepa de referencia AF281044 del linaje IIIc es una cepa de origen irlandés que muestra un comportamiento anómalo, pues en nuestro análisis se incluye entre nuestras cepas del sublinaje IIIId.

El origen de la emergencia del genotipo G9 es controvertido. Sin embargo, algunos estudios recientes sugieren una transmisión inter-especie entre cerdos y humanos (o viceversa), que habría sucedido a mediados de los años 80 (Matthijssens et al., 2010). Estudios de inferencia bayesiana de muestras secuenciadas a lo largo del tiempo permiten estimar que 1989 es el momento de aparición del ancestro común más reciente (“*the most recent common ancestor*” TMRCA) para el principal “cluster” del genotipo III de G9, que constituye el 90% de las cepas G9 actualmente circulantes en todo el mundo, con un intervalo 95% de credibilidad de 1986-1992. Un mismo gen VP7 estaba ya presente en las cepas G9 circulantes a finales de la década de los 80 y comienzos de los 90, que fueron capaces de transmitirse y diseminarse por todo el mundo en menos de una década (Matthijssens et al., 2010). Otra estimación interesante es el momento de divergencia en 1985 para los “subclusters” aislados en China y Japón de cerdos y de humanos, lo que sugiere una infección eficaz y una rápida transmisión entre individuos de la nueva especie hospedadora. El hecho de que en el “subcluster” porcino se haya encontrado una diversidad mayor que en el humano avala la sospecha de que la transmisión se produjo del cerdo al humano (Teodoroff et al., 2005).

Según las reconstrucciones filogenéticas bayesianas realizadas por Matthijssens y cols., el ancestro común más reciente (TMRCA) para el conjunto de las cepas animales y humanas de genotipo G9 se estimaría en 1927 (1879-1962), lo que indicaría que este genotipo ha estado circulando durante muchos años. Las primeras descripciones de rotavirus G9 en humanos y en cerdos datan de principios de los 80 (Clark et al., 1987; Nakagomi et al., 1990; Cao et al., 2008), lo que dificulta determinar cuál es la especie de origen de este genotipo, ya que además es posible que se hayan producido múltiples transmisiones inter-especie entre humanos y cerdos. Otros análisis

filogenéticos de rotavirus G9 también encuentran patrones de similaridad entre genes VP7 G9 humanos y porcinos (Hoshino et al., 2005; Martinez-Laso et al., 2009); que se explicarían por transmisión zoonótica y evolución convergente (Phan et al., 2007).

Se han encontrado diferencias de aminoácidos en cuatro de las cinco regiones antigénicas descritas (Laird et al., 2003), al igual que otros estudios que encuentran cambios aminoacídicos (Martinez-Laso et al., 2009). En nuestro análisis de secuencias, la región D se mantiene conservada; pudiendo inferirse que dichos cambios específicos en 16 de las 57 secuencias analizadas han sido generadas por mutaciones puntuales, por lo que coincidimos con otros autores en que dichos cambios podrían modificar la antigenicidad de las correspondientes regiones, lo que tendría que ser estudiado más profundamente (Hoshino et al., 2004; Martinez-Laso et al., 2009).

Todas las cepas G9 detectadas en el presente estudio presentaban un genotipo P[8], a diferencia de las estudiadas en otras áreas geográficas, en las que se han encontrado combinaciones G9P[6] (Iturriza-Gomara et al., 2000; Stupka et al., 2007) e incluso G9P[4] (Araujo et al., 2001; Lin et al., 2006). Sin embargo, la combinación G9P[8] es actualmente la predominante en todo el mundo (Endara et al., 2007; Ahmed et al., 2010; Tort et al., 2010). Las secuencias nucleotídicas del gen VP4 de las cepas P[6] encontradas en Inglaterra a finales de los 90 mostraban un elevado grado de similitud ( $\geq 98\%$ ), mientras que las secuencias nucleotídicas de las cepas P[8] se agrupaban con cepas que presentaban otros tipos G, sin guardar ninguna relación geográfica ni temporal (Iturriza-Gomara et al., 2000). Esta observación les permitió emitir la hipótesis de que las cepas G9P[8] habrían surgido recientemente a través de recombinaciones en humanos entre cepas G9P[6] y otras cepas G1, G3 o G4, más comunes y que habitualmente son portadoras del genotipo P[8]. En nuestro estudio el gen de la VP4 de las cepas G9 presento un mismo genotipo P[8], no siendo

secuenciado dicho gen, por lo cual no tenemos información sobre la diversidad de las secuencias de este gen, aunque de acuerdo con los resultados obtenidos del estudio filogenético de VP7 es probable que también presenten un alto grado de homología.

La introducción de las vacunas de rotavirus, Rotarix y RotaTeq contribuye a incrementar una presión inmunitaria selectiva sobre las cepas circulantes de rotavirus en la población humana, influyendo probablemente en sus tasas de evolución. La capacidad que tienen las nuevas cepas de rotavirus (por ejemplo, mutantes de escape a las vacunas, nuevos recombinantes) de diseminarse por todo el mundo en un periodo tan breve de tiempo como una década, como ha sucedido con G9, e incluso en menos tiempo por los movimientos migratorios y los viajes tan frecuentes, constituye una amenaza para reducir la eficacia de las vacunas. Estos hechos justifican la necesidad de realizar estudios de vigilancia epidemiológica de las cepas de rotavirus circulantes en las distintas regiones geográficas a lo largo del tiempo, así como evaluar la eficacia de las vacunas y probables vías de transmisión de los genotipos circulantes.

## **5. CAPÍTULO III**

### **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN CODIFICANTE DE NSP4 EN CEPAS DE ROTAVIRUS G9**

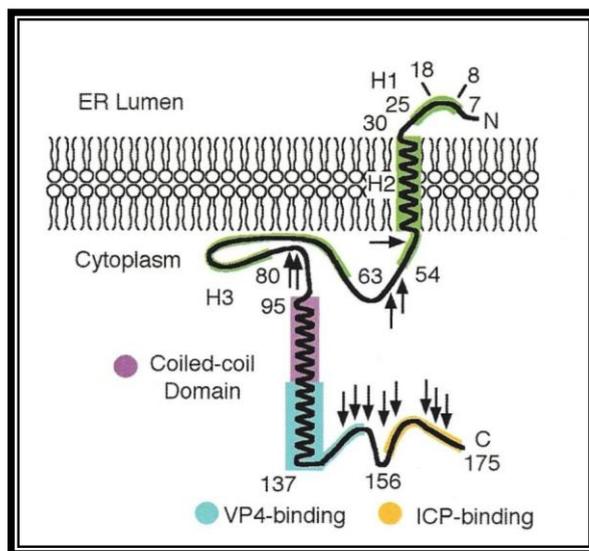


## 5.1. ANTECEDENTES

Los genes que codifican las proteínas estructurales VP7 y VP4 definen los genotipos G y P, respectivamente. En los estudios publicados de las infecciones por rotavirus en seres humanos se han identificado distintos genotipos G y P circulando simultáneamente en diferentes partes del mundo (Santos y Hoshino, 2005; Estes y Kapikian, 2007; Gulati et al., 2007; Martella et al., 2007; Munford et al., 2007; Matthijnssens et al., 2008). Actualmente existe sólo una información limitada referente a la detección o la variabilidad genética del gen que codifica la proteína no estructural 4 (NSP4) (Ciarlet et al., 2000; Mori et al., 2002; Iturriza-Gomara et al., 2003; Araujo et al., 2007; Mascarenhas et al., 2007).

La proteína no estructural 4 (NSP4) es codificada por el segmento genómico 10, está conformada por 175 aminoácidos (aa) (Estes y Kapikian, 2007) y tiene múltiples funciones en la morfogénesis y en la patogenia por rotavirus (Figura 26). NSP4 actúa como receptor intracelular en la membrana del retículo endoplasmático de las partículas de doble capa e interacciona con las proteínas de la cápside viral en el retículo endoplásmico (ER), paso que es fundamental para la adquisición de una membrana viral transitoria y la maduración de las partículas virales (Au et al., 1989; Estes y Cohen, 1989; Meyer et al., 1989; Au et al., 1993; Taylor et al., 1996; O'Brien et al., 2000; Taylor, 2003). NSP4 también causa la desestabilización de la membrana y la interferencia en uniones estrechas ("*tight junctions*") (Tian et al., 1996; Browne et al., 2000; Huang et al., 2001; Tafazoli et al., 2001; Huang et al., 2004) y aumenta los niveles de calcio intracelular (Tian et al., 1994; Tian et al., 1995; Dong et al., 1997; Morris et al., 1999). NSP4 ha sido descrita por su actividad enterotoxigénica viral, al inducir diarrea en ratones jóvenes (Ball et al., 1996; Horie et al., 1999; Morris et al.,

1999; Rodriguez-Diaz et al., 2003). Rodriguez-Díaz et al. estudiaron la participación del óxido nítrico en la infección por rotavirus *in vivo* y de NSP4 *in vitro* en macrófagos peritoneales de ratón, efectos que son inhibidos por suero anti-NSP4 (Rodriguez-Diaz et al., 2006). Esta actividad se localiza en el dominio enterotóxico de la proteína, en la secuencia de los aminoácidos 109 al 135 (Borghan et al., 2007).



**Fig. 26. Representación esquemática de la proteína NSP4 de rotavirus.** La proteína no estructural NSP4 consta de 175 aminoácidos y sirve como receptor intracelular en la membrana del retículo endoplasmático de las partículas de doble capa e interacciona con las proteínas de la cápside viral (Taylor, 2003). En el esquema se observan las tres regiones hidrofóbica: H1 en color verde (entre el aminoácido (aa) 7 al 25 aa), en el cual se observa los dos sitios de glicosilación aa 8 y aa 18; H2 en color verde (entre el aa 30 al aa 54); H3 (entre el aa 67 al 95). La región enterotoxigénica, que se encuentra ubicada entre los aminoácidos 114 y 135 (Ball et al., 1996), en color violeta se muestra la región del dominio helicoidal anfipático alfa-hélice de la glicoproteína; en color azul el dominio de unión con la VP4 y en color amarillo el dominio de unión con la VP6 de las partículas de cápside interna (ICP).

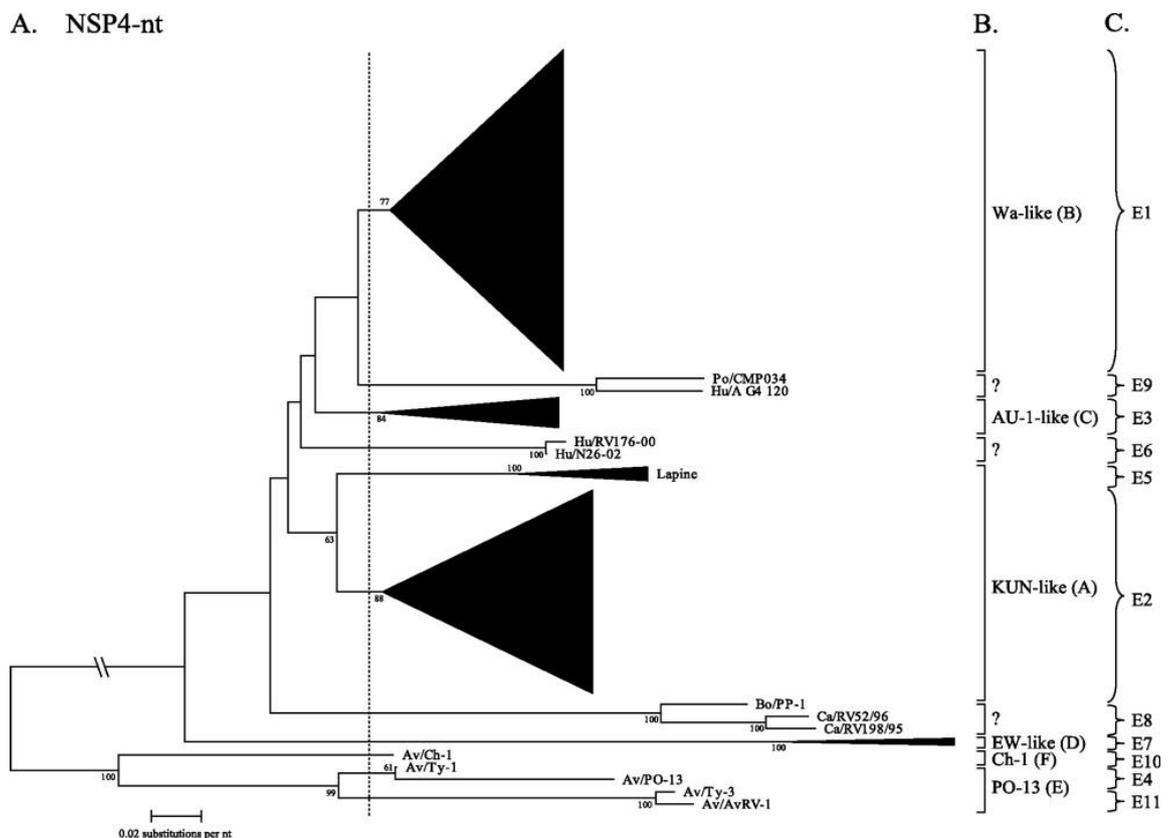
Se llegó a proponer que las cepas de rotavirus causantes de infecciones asintomáticas diferían en su secuencia nucleotídica del gen de NSP4, siendo éste un marcador de virulencia. Esta hipótesis se analizó con virus recombinantes en cerdos gnotobióticos (Hoshino et al., 1995). Sin embargo, varios estudios compararon los genes de la NSP4 de cepas de rotavirus aisladas de casos con diarrea y de cepas causantes de infecciones asintomáticas, no encontrándose diferencias entre ellas (Horie

et al., 1997; Lee et al., 2000). Estos hallazgos sugieren que NSP4 puede no ser el único determinante de patogenicidad en rotavirus.

Se ha propuesto que los anticuerpos frente a NSP4 podrían reducir la frecuencia y severidad de la diarrea en ratones. Junto con los estudios en seres humanos, hay datos que sugieren que la respuesta inmune frente a NSP4 podría modular la diarrea inducida por rotavirus en la enfermedad (Ball et al., 1996; Yuan et al., 2004; Rodriguez-Diaz et al., 2005; Vizzi et al., 2005).

A finales de la década de los 90 y comienzos de los años 2000 se describieron seis genotipos o alelos distintos del gen NSP4 de rotavirus del grupo A, que se denominaron con letras (A-F). Estos genotipos incluían tanto a las cepas humanas de rotavirus como a las de animales (Cunliffe et al., 1997; Kirkwood y Palombo, 1997; Cao et al., 1999; Ciarlet et al., 2000; Mori et al., 2002), aunque se encontraron asociaciones preferentes de ciertos genotipos con determinadas especies de hospedadores. Esta clasificación en seis genotipos distintos de NSP4, A (KUN), B (Wa), C (AU-1), D (EW) E (PO-13) y F (Ch-1) es la que se ha venido utilizando hasta ahora. Las cepas con genotipos A, B, C y D se detectan en mamíferos, mientras que los genotipos E y F se identifican en aves (Ito et al., 2001; Mori et al., 2002). Los genotipos A, B y C se han detectado en seres humanos (Ciarlet et al., 2000; Mori et al., 2002; Mori et al., 2002; Lin y Tian, 2003), siendo el genotipo B el encontrado con más frecuencia (Iturriza-Gomara et al., 2003). Se describió que las cepas pertenecientes al genotipo B presentaban habitualmente las combinaciones G1P[8], G3P[8] ó G4P[8] asociadas a un electroforetipo largo, mientras que las cepas del genotipo A presentaban habitualmente la combinación G2P[4] con un electroforetipo corto (Cunliffe et al., 1997).

En 2008, el “Rotavirus Classification Working Group” (RCWG) propuso establecer 11 genotipos E (de enterotoxina) para el gen de NSP4, y cambiar la nomenclatura a E1-E11, que se corresponden con los genotipos descritos anteriormente de la siguiente forma: E1 = B (Wa-like), E2 = A (KUN-like), E3 = C (AU-1-like), E4 = cepas aviares PO-13-like, E5 = cepas de conejo del antiguo genotipo A, E6 = cepas humanas con nuevo genotipo, E7 = D (EW-like), E8 = cepas bovinas y caninas con nuevo genotipo, E9 = cepas porcinas y humanas con nuevo genotipo, E10 = F (Ch-1), E11 = cepas aviares PO-13-like (Figura 27). Se determinó que el punto de corte adecuado para definir los genotipos es el porcentaje de identidad del 85% en la secuencia nucleotídica del gen, aunque existen identidades intragenotípicas por debajo de este valor porcentual.



**Fig 27. Dendrograma de genotipos NSP4 según el “Rotavirus Classification Working Group” (RCWG). Ha sido construido con 430 secuencias nucleotídicas de NSP4 y se muestran los valores de “bootstrap” superiores a 50 (2.000 réplicas). La línea vertical de puntos indica la mejor opción encontrada para dividir el dendrograma en genotipos, que corresponde a un 85% de porcentaje de**

**identidad de secuencias. Algunos ‘clusters’ se representan como triángulos, en los que la altura del triángulo representa el número de secuencias y su anchura la diversidad genética dentro del ‘cluster’. A la derecha se indican los nombres de los genotipos en la nomenclatura antigua (columna B) y en la nomenclatura nueva propuesta por el RCWG (columna C) (Matthijnssens et al., 2010).**

Existe una asociación muy estrecha entre el genotipo NSP4 y el subgrupo VP6 en los rotavirus humanos, de forma que el genotipo NSP4 A(E2) se asocia siempre con el subgrupo I, mientras que el genotipo NSP4 B(E1) lo hace siempre con el subgrupo II, incluso en cepas recombinantes (Iturriza-Gomara et al., 2003). Los genes de VP6 y NSP4 parece que se segregan de acuerdo a la especie animal de origen de las cepas víricas. También se encontró en experimentos de hibridación en Northern Blot de genomas de cepas de rotavirus comunes con sondas complementarias a los genotipos A y B de NSP4 la existencia de una posible asociación entre el genotipo NSP4 y el subgrupo VP6 (Kirkwood et al., 1999). No se han encontrado evidencias de que se produzcan recombinaciones de los genes 6 y 10. La asociación entre estos genes puede ser una consecuencia de la función de NSP4 como receptor para VP6 durante la morfogénesis vírica, lo que sugiere la existencia de una co-evolución de los genes codificantes de estas dos proteínas. La segregación de los genotipos A y B de NSP4 y los subgrupos VP6 en diferentes especies animales puede ser debida a que alguna de ellas o ambas proteínas son importantes para determinar la especie hospedadora (Ciarlet et al., 2000; Iturriza-Gomara et al., 2003). Es llamativo que la mayor diversidad en la secuencia de aminoácidos entre genotipos se ha encontrado en el dominio citoplasmático, que es el que interacciona con VP6 (Estes et al., 2001). La vinculación NSP4-VP6, así como otras asociaciones entre genes observadas en virus recombinantes (con reordenamientos de segmentos genómicos), podría ser consecuencia de una mayor eficacia biológica (“*fitness*”) de los virus progenie que resultan más eficientes en su

replicación en un huésped determinado. La caracterización del gen de NSP4 puede ser también utilizada para investigar transmisiones inter-especie de cepas de rotavirus en estudios epidemiológicos (Iturriza-Gomara et al., 2003).

En España, hasta el momento, no se han realizado estudios moleculares del gen NSP4 de cepas de rotavirus, a diferencia de los trabajos llevados a cabo con rotavirus de distintos genotipos G y P en otros países (Cunliffe et al., 1997; Mascarenhas et al., 2006; Araujo et al., 2007). Este estudio presenta nuevos datos epidemiológicos sobre la circulación de los genotipos de NSP4 de rotavirus de muestras procedentes de niños con gastroenteritis en tres ciudades de la Comunidad Valenciana: Valencia, Sagunto y Castellón de la Plana.

## 5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.2.1. Muestras

Las muestras de heces fueron recogidas de niños con gastroenteritis entre Octubre de 2005 y Octubre de 2009 en tres ciudades de la Comunidad Valenciana: Castellón de la Plana, Sagunto y Valencia. En todas las muestras se había detectado previamente la presencia de rotavirus por ELISA (Premier Rotaclone®, Meridian Bioscience) o inmunocromatografía (VIKIA® ROTA-ADENO de BioMerioux y SIMPLE ROTA-ADENO de Operon). El gen NSP4 fue caracterizado en las cepas de rotavirus cuyo genotipo VP7 resultó ser G9.

### 5.2.2. Análisis de NSP4

La amplificación del gen de NSP4 fue llevada a cabo mediante PCR con los oligonucleótidos NSP4-F y NSP4-R (Ciarlet et al., 2000) (Tabla 21).

Tabla 21. Oligonucleótidos de NSP4.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
NSP4-F	GGCTTTTAAAAGTTCTGTTCCGAG
NSP4-R	GGTCACACTAAGACCATTCC

El procedimiento seguido fue el siguiente:

Se mezclaban 5  $\mu$ l del ADNc con 45  $\mu$ l de una solución “master” conteniendo:

Tampón de PCR 10X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 $\mu$ l
dNTPs (10 mM, Pharmacia)	1 $\mu$ l
Cebador NSP4-F 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Cebador NSP4-R 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l
Agua (DEPC)	34,5 $\mu$ l
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l Biotools)	0,5 $\mu$ l

En un termociclador se realizaba secuencialmente un primer ciclo de desnaturalización (2 minutos a 94 °C), 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 48 °C y 1 minuto a 72 °C) y un ciclo de extensión final (7 minutos a 72 °C).

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa de la misma manera que los genotipos VP7 en el capítulo anterior.

Los amplicones se visualizaron en un transiluminador de luz UV, comparándolos con un marcador de pesos moleculares (100 pb Ladder Marker, Biotools). Posteriormente, para calcular la concentración de ADN de los amplicones, se utilizó el marcador “Low ADN Mass Ladder” (Invitrogen) con concentraciones de ADN variables. Por último, para la identificación exacta de los fragmentos amplificados se procedió a la secuenciación de los mismos.

### **5.2.3. Secuenciación e identificación de los productos de amplificación**

#### **5.2.3.1. Purificación de los productos de amplificación**

Todo producto de amplificación que fue detectado en el análisis electroforético en gel de agarosa con un tamaño similar al esperado se purificó para su posterior secuenciación e identificación. Para ello, dependiendo de los patrones de bandas observados en el gel, se emplearon los dos métodos descritos en el capítulo II.

#### **5.2.3.2. Secuenciación de los productos amplificados por RT-PCR**

Tras la purificación de los productos de RT-PCR de NSP4 (743 pb), se procedió a su secuenciación utilizando el kit de secuenciación ABI PRISM BigDye® Terminador Cycle (Applied Biosystem) y un secuenciador automático (Applied Biosystems ABI PRISM 377). Para cada muestra a secuenciar se utilizó el cebador específico NSP4-F. La secuenciación fue realizada en el Servicio de Secuenciación de ADN y Análisis Molecular del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València.

### **5.2.4. Estudio de las secuencias**

Las secuencias de NSP4 fueron alineadas y comparadas con las secuencias de NSP4 de cepas de referencia: AB009627 (Genotipo E11), AB065287 (Genotipo E10), U96335 (Genotipo E7), D89873 (Genotipo E3), U59103 (Genotipo E2), D88829 (Genotipo E2), D88830 (Genotipo E1), AF093199 (Genotipo E1), D88831 (Genotipo E1), AJ236765 USA (Genotipo E1), EU872163 Italia (Genotipo E1), GU138210 Rusia (genotipo E1), DQ995181 Eslovenia (Genotipo E1) disponible en GenBank, utilizando el software

Clustal X (Thompson et al., 1997). Los genotipos NSP4 se determinaron mediante análisis filogenético utilizando el programa MEGA, versión 4.0, aplicando el método de Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987). Las secuencias aminoacídicas deducidas se analizaron con el programa GenDoc versión 2.7. Los árboles filogenéticos se visualizaron con el programa MEGA y TreeView (versión 1.6.2). Con los parámetros descritos en el capítulo II.

Se estudió el polimorfismo y el nivel de divergencia de las secuencias de los distintos clusters obtenidos en el análisis filogenético utilizando el programa DnaSP versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009). DnaSP es un programa informático interactivo para el análisis del polimorfismo de ADN a partir de datos de secuencias de nucleótidos (<http://www.ub.edu/dnasp/>) (Librado y Rozas, 2009).

### **5.2.5. Números de acceso de secuencias de nucleótidos en GenBank**

Los datos de las secuencias nucleotídicas de la NSP4 fueron depositados en la base de datos de secuencias GenBank (ANEXO 2).

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. Análisis de secuencias.

El gen NSP4 se detectó en 150 muestras escogidas aleatoriamente de las 306 rotavirus A genotipo G9P[8] descritas en el capítulo II. De ellas, se escogieron 60 muestras (a las cuales a su vez se les había secuenciado el gen de la proteína VP7) para secuenciar asimismo el gen de la proteína NSP4. Se seleccionaron muestras de las cuatro temporadas invernales estudiadas (2005-06, 2006-07, 2007-08 y 2008-09) de los tres Departamentos de Salud. Sólo se obtuvieron 59 secuencias del gen de la NSP4.

La distribución de dichas muestras secuenciadas anteriormente mencionadas por ciudad fue: 37,28 % Castellón de la Plana, 23,72 % de Sagunto y 40,67 % de Valencia. La distribución de las 59 muestras por periodo invernal se muestra en la tabla 22.

Ciudades	2005-06	2006-07	2007-08	2008-09	Total
Castellón de la Plana	3	12	7	0	22
Sagunto	2	7	3	1	13
Valencia	1	5	14	4	24
<b>Total</b>	6	24	24	5	59

**Tabla 22. Distribución de las muestras escogidas al azar de tres ciudades de la Comunidad Valenciana (2005-2009) para caracterizar el gen NSP4 de rotavirus.**

Se determinó la secuencia del gen de la proteína NSP4 (545 pb) de las cepas de rotavirus con genotipo G9P[8]. Estas secuencias fueron analizadas y comparadas con secuencias de referencia obtenidas de GenBank (ANEXO 2).

En las 59 muestras del gen de la proteína NSP4 analizadas por secuenciación se encontró un alto grado de identidad nucleotídica (97-100 %).

### **5.3.2. Análisis filogenético del gen NSP4.**

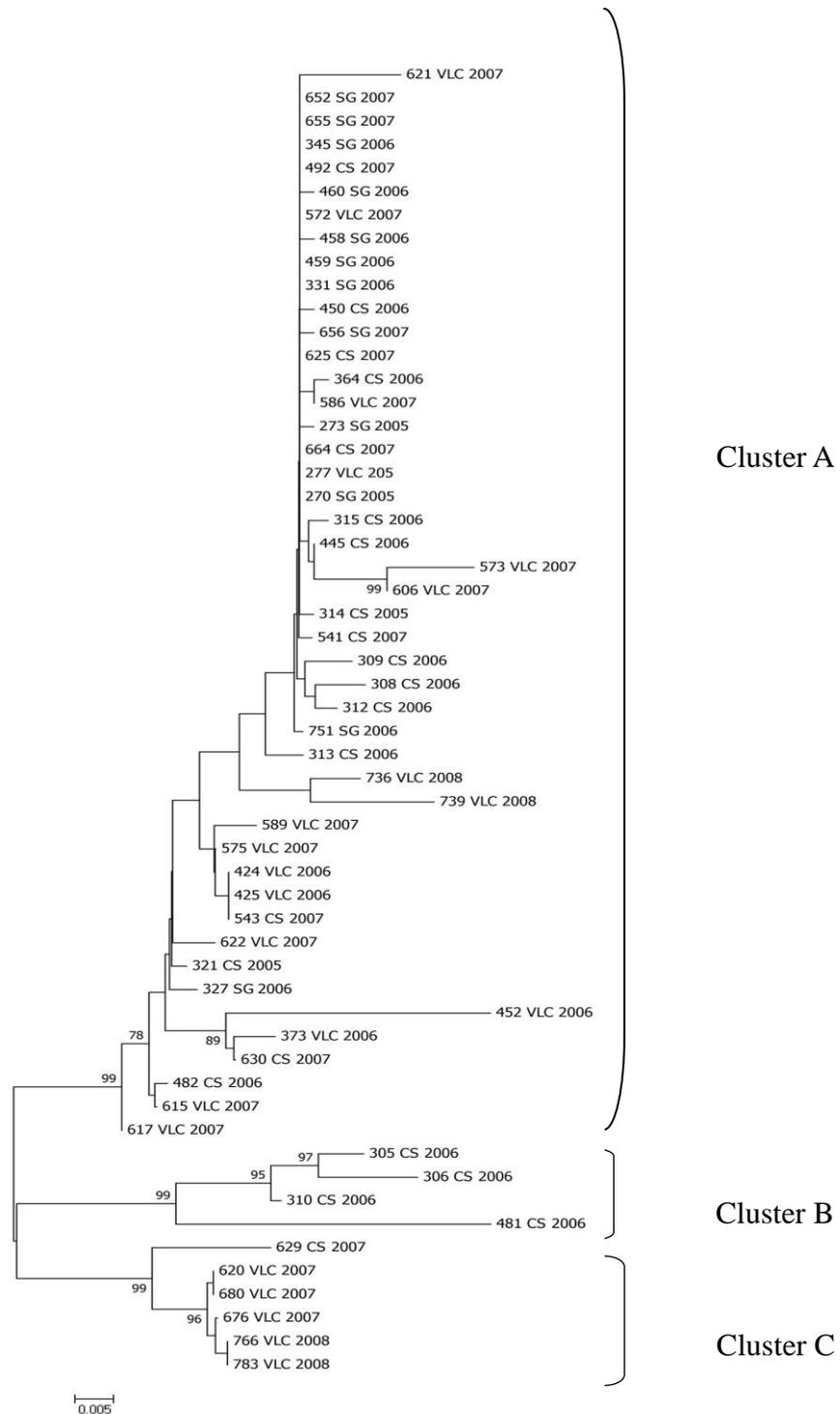
El análisis filogenético de los genes NSP4 de las 59 cepas reveló que todas las cepas G9 se agrupan formando tres “clusters” definidos: “cluster A” formado por 49 cepas provenientes de las tres áreas de las cuatro temporadas en estudio (“bootstrap” 100%). Un “cluster B” formado por 3 cepas (del área de Castellón 2006; (“bootstrap” 99%), y un “cluster C” “bootstrap” 100 % conformado por 6 cepas (secuencias del área de Valencia del año 2007 y 2008) (Figura 28).

Cuando se realizó el alineamiento con las secuencias de referencia, las secuencias se agruparon con las del genotipo E1 (genotipo B) de NSP4, formando grupos diferentes dentro del mismo cluster (“bootstrap” 87 %).

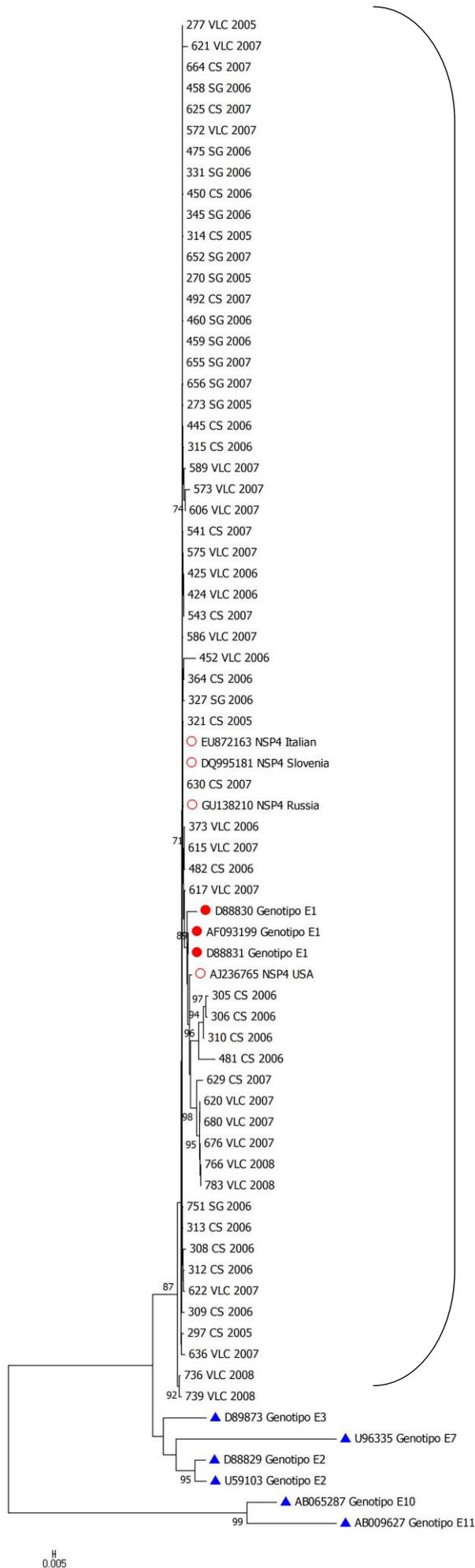
Ninguna de las muestras en estudio se agrupó con los genotipos E2, E3, E7, E10, ni E11 de la NSP4 (Figura 29).

Al incluir en nuestro análisis cepas encontradas en Genbank de genotipos E1 de otras zonas del mundo, nuestras cepas se agruparon con cepas del genotipo NSP4-E1(B) provenientes del continente americano (USA, Brasil, Argentina) y de Europa (Italia, Eslovenia, Rusia) de años anteriores y de los mismos años del estudio (Figura 29).

Así mismo, como fue descrito en el capítulo anterior, se estudió el polimorfismo y el nivel de divergencia de las secuencias de los distintos clusters obtenidos en el análisis filogenético utilizando el programa DnaSP versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009) (Tabla 24 y 25).



**Fig. 28.** Dendrograma de secuencias nucleotídicas del gen de NSP4. Se ha construido con secuencias parciales de NSP4 de 59 cepas de rotavirus G9P[8] de Castellón, Sagunto y Valencia (2005-2009) mediante el método Neighbor-joining y se muestran los valores de “bootstrap” superiores a 70 (1.000 réplicas). Longitud de las secuencias = 545 pb. La escala indica la distancia genética calculada por el método de Jukes-Cantor.



**GENOTIPO E1**

← **Figura 29. Dendrograma de genes de NSP4 con cepas de referencia.** Se ha construido con 70 secuencias nucleotídicas de NSP4, 59 secuencias de Castellón, Sagunto y Valencia (2005-2009) y 13 secuencias de referencia (se señalan con círculos rojos las secuencias de referencia del genotipo E1, con círculos rojos vacíos las secuencias E1 de distintos países y con triángulos azules las cepas de los genotipos E2, E3, E7, E10 y E11), utilizando el programa MEGA versión 4.0 y el método Neighbor-joining. Se muestran los valores de “bootstrap” superiores a 70 (1.000 réplicas). La escala indica la distancia genética calculada por el método de “maximum likelihood”.

### 5.3.3. Comparación de secuencias de aminoácidos.

Al alinear con el programa GenDoc las secuencias de aminoácidos de la proteína NSP4 de las 59 cepas estudiadas con las cepas de referencia del genotipo E1(B), se observó que existían cambios de aminoácidos en los sitios 1 y 2 de glicosilación en la región H1 (entre el aminoácido (aa) 8 y el aa 18) de la porción amino-terminal de la proteína NSP4 en las siguientes cepas:

- a) N-glicosilación 1: 481, 573 y 621.
- b) N-glicosilación 2: 315, 364, 629, 452, 573, 586, 589 y 636 (Tabla 23 y figura 30).

En los dos sitios donde se encuentra la cisteína, no se observaron cambios (figura 30). Los tres dominios hidrofóbicos (del aa 7 al aa 21 dominio H1, del aa 28 al aa 47 dominio H2, y del aa 67 al aa 85 dominio H3) estaban conservados.

Las variaciones se pudieron encontrar en los sitios de unión con la VP4 (112-146 aa), con la VP6 (161-175 aa) y la porción del dominio anfipático alfa-hélice de la glicoproteína (93-133 aa).

Sin embargo, la región propuesta como el péptido enterotóxico (114-135 aa) se mantuvo conservada en todas las cepas analizadas, en comparación con las cepas de referencia.

CEPAS NSP4	SITIOS DE GLICOSILACION	CONSENSO	CAMBIO aa	RESULTADO
<b>481 CS 2006</b>	N-glicosilación 1	Asn-Tyr-Thr	Tyr → Leu	Asn- <b>Leu</b> -Thr
<b>573 VLC 2007</b>	N-glicosilación 1	Asn-Tyr-Thr	Asn → Ile	<b>Ile</b> -Tyr-Thr
<b>573 VLC 2007</b>	N-glicosilación 1	Asn-Tyr-Thr	Tyr → Asp	<b>Ile-Asp</b> -Thr
<b>621 VCL 2007</b>	N-glicosilación 1	Asn-Tyr-Thr	Thr → Arg	Asn-Tyr- <b>Arg</b>
<b>315 CS 2006</b>	N-glicosilación 2	Asn-Tyr-Thr	Thr → Pro	Asn-Tyr- <b>Pro</b>
<b>364 CS 2006</b>	N-glicosilación 2	Asn-Tyr-Thr	Thr → Ile	Asn-Tyr- <b>Ile</b>
<b>629 CS 2007</b>	N-glicosilación 2	Asn-Tyr-Thr	Thr → Pro	Asn-Tyr- <b>Pro</b>
<b>452 VLC 2006</b>	N-glicosilación 2	Asn-Tyr-Thr	Thr → Ile	Asn-Tyr- <b>Ile</b>
<b>573 VLC 2007</b>	N-glicosilación 2	Asn-Tyr-Thr	Thr → Ala	Asn-Tyr- <b>Ala</b>
<b>586 VLC 2007</b>	N-glicosilación 2	Asn-Tyr-Thr	Thr → le	Asn-Tyr- <b>Ile</b>
<b>589 VLC 2007</b>	N-glicosilación 2	Asn-Tyr-Thr	Thr → Pro	Asn-Tyr- <b>Pro</b>
<b>636 VLC 2007</b>	N-glicosilación 2	Asn-Tyr-Thr	Thr →le	Asn-Tyr- <b>Ile</b>

Tabla 23. Cambios de aminoácidos observados en los sitios de glicosilación 1 y 2 del dominio hidrofóbico H1 de la proteína NSP4.

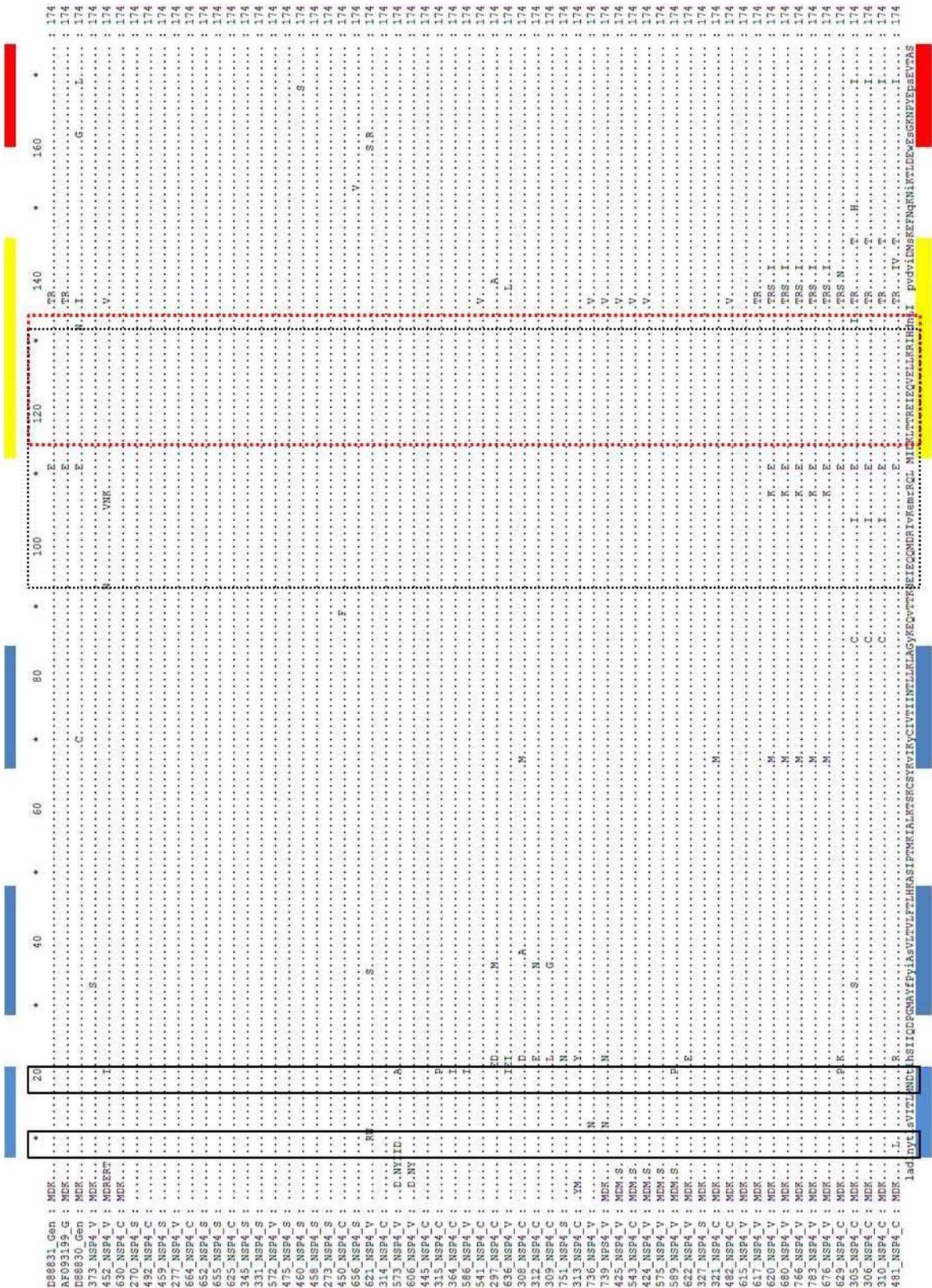


Figura 30. Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de NSP4 de cepas de rotavirus G9P[8]. Se representan los tres dominios hidrofóbicos en barras azules (7-21 aa: dominio H1; 28-47 aa: dominio H2; 67-85 aa: dominio H3). Se indican los dominios de unión con la VP4 con una barra amarilla (112-146 aa), con la VP6 con una barra roja (161-175 aa) y la porción del dominio anfipático alfa-hélice de la glicoproteína con un rectángulo de color negro en puntos (93-133 aa). La

región descrita como una enterotoxina en rectángulo rojo en puntos (114-135 aa). Los dos sitios de glicosilación se marcan con rectángulos negros con línea continua.

### 5.3.4. Polimorfismo y nivel de divergencia de las secuencias de NSP4

Tras la utilización del programa DnaSP 5.10.01 se obtuvieron los siguientes resultados reflejados en las tablas 24 y 25.

	Cluster E1-A	Cluster E1-B	Cluster E1-C
Núm. de secuencias	49	4	6
Núm. de sitios polimórficos	79	41	14
Núm. total de mutaciones	95	41	14
Promedio de diferencias de nucleótidos, k	9,490	20,833	4,933
Diversidad nucleotídica, Pi	0,01748	0,03837	0,00909
Diversidad nucleotídica con Jukes y Cantor, Pi JC	0,01781	0,03972	0,00921
Desviación típica de Pi JC	0,00242	0,01326	0,00481

Tabla 24 . Diversidad entre grupos de secuencias (clusters E1-A, E1-B y E1-C) del gen de NSP4 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.

Diversidad entre poblaciones	Clusters E1-A / E1-B	Clusters E1-A / E1-C	Clusters E1-B / E1-C
Núm. de diferencias fijas	16	16	19
Mutaciones compartidas	11	7	3
Promedio de diferencias de nucleótidos entre poblaciones	43,434	33,765	38,333
Promedio de sustituciones de nucleótidos por sitio entre poblaciones, Dxy	0,07999	0,06218	0,07047
Dxy con Jukes y Cantor, Dxy(JC)	0,08472	0,06498	0,07408
Desviación típica de Dxy(JC)	0,01391	0,00880	0,02290
Núm. de sustituciones netas de nucleótidos entre poblaciones, Da	0,05207	0,004890	0,04678
Da con Jukes y Cantor, Da(JC)	0,05595	0,05147	0,04966
Desviación típica de Da(JC)	0,01479	0,00907	0,02349

Tabla 25. Diversidad entre grupos de secuencias (clusters E1-A, E1-B y E1-C) del gen de NSP4 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.

Posterior, al estudio del polimorfismo y del nivel de divergencia de las secuencias de los “clusters E-1, E-2 y E-3” se observó al igual que en el capítulo anterior un coeficiente de diversidad nucleotídica del total de secuencias analizadas bajo, objetivándose una homogeneidad entre las secuencias evaluadas. Cabe destacar, al hacer el análisis de diversidad entre las tres poblaciones, se observó un mayor número de mutaciones compartidas entre el clusters E-1 A y E-1 B en comparación con el resto.

### 5.4. DISCUSIÓN

Rotavirus G9 ha sido considerado un genotipo que presenta una diversidad mucho mayor que otros, debido probablemente a que las cepas de este genotipo tienen más probabilidades de realizar recombinaciones con cepas de otros genotipos (Unicomb et al., 1999; Ramachandran et al., 2000; Das et al., 2002; Fang et al., 2002; Rahman et al., 2003; Santos et al., 2003; Hoshino et al., 2005). Así mismo, se ha demostrado la existencia de variaciones en el gen que codifica la proteína no estructural de la NSP4 (Lee et al., 2000; Estes, 2001; Iturriza-Gomara et al., 2003).

Por estos motivos nos ha interesado analizar la variabilidad que presenta el gen de la proteína NSP4 y determinar los genotipos NSP4 en las cepas de rotavirus G9 detectadas en los últimos años en la Comunidad Valenciana. La estrategia seguida en este estudio sobre la variabilidad del gen de NSP4 consistió en su amplificación por PCR para después secuenciar los amplificadores obtenidos, lográndose secuencias de más de 540 nucleótidos de longitud con el cebador NSP4-F. Aunque algunos genes se secuenciaron con los cebadores NSP4-F y NSP4-R, la mayoría se secuenciaron solamente con NSP4-F.

Rodríguez-Díaz et al. diseñaron un procedimiento alternativo, consistente en una técnica de tipificación del gen de NSP4 basada en una PCR múltiple semi-anidada, similar a las diseñadas para tipificar los genotipos G y P (Rodríguez-Díaz et al., 2008). Esta técnica no ha sido aplicada en este trabajo, ya que cuando se publicó éste ya se estaba llevando a cabo, y no habría permitido analizar filogenéticamente el gen de NSP4. Sin embargo, aporta ventajas interesantes, como una mayor rapidez en el análisis

y un menor coste económico. La necesidad de utilizar cebadores específicos de cada genotipo implica un riesgo potencial de no detectar mutantes con cambios en las secuencias de unión de los cebadores. Así mismo, han sido descritos dos métodos basados en PCR para diferenciar los genotipos E1-E2 y E3 (A, B, y C) (Ray et al., 2003; Banyai et al., 2009).

NSP4 es una proteína multifuncional descrita como la primera enterotoxina de origen viral. Las distintas regiones funcionales de la proteína NSP4 han sido definidas en la región de los aminoácidos (aa) 114 al 135, que es capaz de inducir diarrea y por lo tanto, de actuar como una enterotoxina. La región del aa 87 al aa 145 es el sitio de interacción con la proteína VP4 (Boshuizen et al., 2004). También, como se ha descrito anteriormente, la proteína NSP4 tiene capacidad de inducir respuestas de anticuerpos heterotípicos durante la infección (Ray et al., 2003; Rodríguez-Díaz et al., 2005).

Hasta la fecha se han identificado seis genotipos de NSP4 de rotavirus (Ciarlet et al., 2000; Mori et al., 2002; Lin y Tian, 2003), con una mayor diversidad en el gen de la NSP4 de los rotavirus humanos en los genotipos A(E2) y B(E1) (Iturriza-Gomara et al., 2003). En este estudio, el genotipo predominante en la Comunidad Valenciana en el periodo 2005-2009 fue el genotipo B, que se corresponde con el genotipo E1 de NSP4 según la nueva clasificación que el “Rotavirus Classification Working Group” (RCWG) propuso en el año 2008 (Matthijnsens et al., 2008).

No existen datos anteriores en relación con los genotipos NSP4 de rotavirus en España, por lo que nuestros resultados representan la primera documentación de genotipos NSP4 de rotavirus circulantes en este país.

A pesar que las cepas estudiadas provenían de tres ciudades diferentes de la Comunidad Valenciana y de periodos invernales distintos, no existió variación alguna en el genotipo E1 de NSP4 encontrado. Estos resultados son similares a los descritos por otros autores en diferentes regiones geográficas en el mundo (Lee et al., 2000; Iturriza-Gomara et al., 2003; Kirkwood et al., 2006; Mascarenhas et al., 2006; Shah et al., 2006; Araujo et al., 2007; Xu et al., 2010). Así mismo, ninguna de las muestras analizadas en nuestro estudio estaban estrechamente relacionados con la cepa prototipo UA-1, que fue aislada de seres humanos y se describe como NSP4 genotipo E3 (C) (Iturriza-Gomara et al., 2003). De la misma manera, no se encontraron cepas relacionadas con otros genotipos diferentes de la NSP4 descritos (Stupka et al., 2007; Tavares Tde et al., 2008).

Varios estudios han comparado el gen de la NSP4 de diferentes cepas de rotavirus aislados de niños con diarrea y de niños asintomáticos (Cunliffe et al., 1997; Lee et al., 2000; Mascarenhas et al., 2007). En nuestro estudio, todos los genes caracterizados de la NSP4 eran de rotavirus de niños con diarrea. Este tipo de muestras son también las analizadas en otros trabajos (Horie et al., 1997; Lee et al., 2000; Mascarenhas et al., 2007).

En el presente estudio, no se ha observado variación en el genotipo de la NSP4 de ninguna cepa de rotavirus del genotipo G9, vinculándose dichas cepas con el genotipo E1 (B) de la NSP4. Por el contrario, estudios realizados en Brasil han descrito el hallazgo de los genotipos A(E2) y B(E1) en cepas G9P[8] y P[6] (Tavares Tde et al., 2008). De igual forma, en el análisis filogenético del gen NSP4 descrito en Argentina, las cepas G9P[8] y G9P[6] pertenecían a los genotipos A(E2) y B(E1), respectivamente. Shah et al. (2006) analizaron las secuencias de NSP1 y de NSP4 de 29 cepas de

rotavirus G9 representativas de aislados de 9 años (1997-2002) en Australia. Encontraron una mayor variabilidad en el gen NSP1 que en NSP4, siendo todas las cepas del genotipo B (E1) y sólo una del genotipo A (E2).

Nuestras cepas G9P[8] se han agrupado filogenéticamente con otras cepas G9P[8] aisladas en diferentes partes del mundo, a excepción de tres cepas detectadas en Bangladesh y USA, que podrían ser recombinantes. Se ha descrito en países de Sudamérica que el gen de la NSP4 de cepas con genotipo G9P[8] se ha agrupado con otras cepas provenientes de otros países vecinos circulantes durante el mismo período, al igual que sucede con las cepas de nuestro estudio (Fig. 29), lo que sugiere una posible transmisión a través de las fronteras entre países, y en nuestro caso, entre ciudades pertenecientes a la misma Comunidad. Así por ejemplo, en Australia y USA se han agrupado cepas G9P[8] con cepas G9P[8] aisladas en Sudamérica, reforzando la idea de una rápida propagación en todo el mundo de cepas G9P[8] (Banyai et al., 2004; Santos y Hoshino, 2005).

Ramachandran et al. en el año 2000 observaron por medio de análisis de hibridación que las cepas G9 aisladas desde 1995 presentaban la combinación con P[6], tenían el genotipo E2 (A) de NSP4 y pertenecían al genogrupo DS-1, mientras que las cepas con la combinación G9P[8] presentan el genotipo E1(B) y pertenecían al genogrupo Wa. A pesar de que en nuestro estudio no se realizó el análisis por hibridación, la caracterización molecular del gen VP7 y NSP4 permite inferir que nuestras cepas G9 pertenecen al genogrupo Wa (Nakagomi et al., 1989; Ramachandran et al., 2000).

Como se ha descrito, en la secuencia de la proteína NSP4 existen dos zonas claramente definidas, la porción amino-terminal y la porción carboxi-terminal. La porción amino-terminal posee tres zonas hidrofóbicas (H1, H2, H3) (Estes, 2001) que, según nuestros resultados, se mantienen altamente conservadas sin por lo tanto afectarse las funciones de esta región.

En el dominio carboxi-terminal, donde se encuentran la mayor parte de las actividades de la proteína NSP4, se han observado la mayoría de las variaciones de aminoácidos de las cepas de nuestro estudio. Dichos cambios se concentraron principalmente en el dominio variable entre especies (131-141 aa) y en la región VP6 (156-175 aa), siendo nuestros datos sobre la región de 131-141 aa similares a otros estudios (Cunliffe et al., 1997; Lee et al., 2000; Araujo et al., 2001; Iturriza-Gomara et al., 2003; Estes y Kapikian, 2007; Tavares Tde et al., 2008), que describen también cambios en estas regiones en los distintos genotipos de la proteína NSP4.

Nuestro estudio ha identificado también cambios en la región de la unión de NSP4 con la proteína VP4 (112-148 aa), lo que ha sido también descrito previamente (Lee et al., 2000).

La respuesta inmune frente a la proteína NSP4 ha sido investigada por algunos autores (Ray et al., 2003), y aunque no se ha definido si la inclusión de esta proteína en las vacunas contra rotavirus presentaría alguna ventaja (Araujo et al., 2007). En este contexto, se han llevado a cabo estudios para dilucidar los determinantes antigénicos de la proteína NSP4, habiéndose descrito dos regiones inmunodominantes en la NSP4 de la cepa de rotavirus aviar PO-13 (P(17), G7, NSP4 genotipo e (E11). El sitio antigénico I (AS I) (aminoácidos 151 a 169) y el sitio antigénico II (AS II) (aminoácidos 136-150)

son dos regiones inmunodominantes y se encuentran en el citoplasma (Borgan et al., 2003). Posteriormente, Rodríguez-Díaz et al. demostraron que el dominio C-terminal (aa 136-175) de la NSP4 es inmunodominante en la cepa humana Wa (Rodríguez-Díaz et al., 2004)

El papel que tanto las respuestas inmunes humoral como mediada por células frente a NSP4 puede desempeñar en la protección contra la infección por rotavirus es aún poco conocido. NSP4 ha mostrado inducir la respuesta inmune humoral y celular en seres humanos (Johansen et al., 1999; Ray et al., 2003; Yuan et al., 2004).

En el estudio realizado por Rodríguez-Díaz et al. (2005) se describe la respuesta de anticuerpos frente a la proteína NSP4 en niños y adultos sanos, al igual que en niños convalecientes tras infección aguda (Rodríguez-Díaz et al., 2005). Encontraron que los anticuerpos en el suero humano podían distinguir entre los genotipos de la NSP4 A y B de niños infectados naturalmente, coincidiendo con los resultados obtenidos por Yuan et al. (2004), que detectan tanto homotípica y heterotípicamente la respuesta frente a la NSP4 en niños vacunados frente a rotavirus (Yuan et al., 2004).

Por todo esto, consideramos que el conocimiento de los genotipos de NSP4 de las cepas de rotavirus circulantes permite llevar a cabo una mayor caracterización de las mismas, complementando los genotipos G y P, lo que permite evaluar mejor su transmisión y establecer las bases para posteriores estudios sobre la proteína NSP4 en relación con la respuesta inmunológica, comparándola con la respuesta frente a las proteínas estructurales de rotavirus.



## **6- CAPITULO IV**

# **ANÁLISIS FILOGENÉTICO CONJUNTO DE LOS GENES CODIFICANTES DE VP7 Y NSP4 DE CEPAS DE ROTAVIRUS G9**



## 6.1. ANTECEDENTES

Los estudios epidemiológicos de rotavirus en la población humana demuestran que estos virus presentan una gran diversidad genética, como sucede con otros muchos virus con genoma ARN. Existe una importante diversidad de genotipos G y P, además de los referidos a los demás genes codificantes de proteínas estructurales y no estructurales, y en las combinaciones de los mismos. En la evolución y diversidad de los rotavirus participan principalmente tres mecanismos: recombinaciones génicas, acumulaciones de mutaciones puntuales (“drift”) y reordenamientos de segmentos genómicos (“shift”) (Iturriza-Gomara et al., 2000).

Los intercambios o mezclas de segmentos genómicos mediante fenómenos de reordenamiento (“reassortment”) pueden ocurrir tras infecciones mixtas de una misma célula por dos cepas víricas diferentes. Estos reordenamientos no parecen producirse al azar. Se ha observado que existe *in vivo* una influencia por parte del hospedador sobre la combinación de segmentos génicos tras infecciones mixtas (Ramig, 1997). También se ha comprobado mediante experimentación animal que el estado inmunitario del animal afecta a los reordenamientos resultantes (Gombold y Ramig, 1989). Se ha sugerido también que los reordenamientos pueden dar lugar a cambios en algunos epítomos conformacionales a través de cambios en las interacciones entre proteínas, lo que contribuiría a la evolución de los serotipos (Lazdins et al., 1995). Además, los saltos de barrera interespecie y el consiguiente reordenamiento de segmentos génicos de origen animal y humano tienen un enorme potencial para incrementar la diversidad de cepas cocirculantes de rotavirus. La aparición en la población humana de estas cepas con genes de origen animal, que codifican proteínas a las que los seres humanos no son inmunes, causaría su rápida diseminación (Iturriza-Gomara et al., 2000). Existen datos que apoyan que esto sucedió con la aparición de las cepas del genotipo G9P[8]

(Iturriza-Gómara. M. et al., 2003).

Las cepas G9P[8] probablemente surgieron en humanos a través de reordenamientos entre cepas G9P[6] introducidas recientemente y cepas G1P[8], G3P[8] o G4P[8] que aportaron el gen VP4 (Iturriza-Gomara et al., 2001). La incidencia de G9P[6] se ha mantenido muy baja, lo que una menor eficacia biológica o una menor capacidad replicativa en humanos.

Algunos hallazgos sustentan la teoría de que la introducción de rotavirus G9 en la población humana a principios de los años 80 sucedió de forma brusca y se siguió de una rápida diseminación:

- La relativa falta de diversidad nucleotídica del gen VP7 de las cepas G9P[6] y G9P[8] y entre las secuencias VP4 de G9P[6] en comparación con la observada en las secuencias VP7 y VP4 de cepas de tipos G y P más comunes en la población humana (Iturriza-Gomara et al., 2001).
- La agrupación cronológica de las secuencias de VP7 de G9 en linajes y la diversidad de linajes cocirculando en momentos de máxima incidencia de G9P[8] (Iturriza-Gómara. M. et al., 2003).
- La mayor variabilidad de las secuencias nucleotídicas de VP4 en las cepas G9P[8], que se agrupan en los mismos linajes que las cepas P[8] con otros genotipos G, que no se correlaciona con agrupaciones temporales o geográficas (Gouvea et al., 1999; Gouvea y Santos, 1999; Iturriza-Gomara et al., 2001).
- La observación de que una proporción importante de infecciones con cepas G9P[6] y G9P[8] son infecciones severas en niños mayores (Cubitt et al., 2000), y su mayor incidencia en poblaciones urbanas sugieren que estas cepas se han introducido recientemente en una población no inmune.

Los rotavirus de algunos genotipos G/P, como G1P[8], G3P[8] y G4P[8], contienen los genes de las proteínas internas del genotipo 1 y pertenecen al genogrupo Wa. Por el contrario, las cepas G2P[4] contienen genes del genotipo 2 y pertenecen al genogrupo DS-1 (Matthijnssens et al., 2008). Aunque existen reordenamientos inter-genogrupos, los datos obtenidos por (Matthijnssens et al., 2009) sugieren que estas cepas con combinaciones mixtas (con genes tanto del genotipo 1 como del genotipo 2) tienen menor eficacia biológica (“fitness”) y no pueden competir con las cepas parentales. La selección natural de las cepas que contienen genes que funcionan mejor cuando se mantienen juntos puede limitar la diversidad de cepas de rotavirus que se generan por reordenamientos. Se tiene que producir un equilibrio entre las ventajas del reordenamiento génico y las desventajas de no combinar genes preferidos o proteínas preferidas.

Con el objeto de analizar posibles divergencias en las secuencias de VP7 y de NSP4 de las cepas G9P[8] estudiadas, se ha procedido a realizar un análisis filogenético conjunto de las secuencias de ambos genes de cada cepa.

## **6.2 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.2.1 Muestras**

Las muestras de heces fueron recogidas de niños con gastroenteritis entre Octubre de 2005 y Octubre de 2009 en tres ciudades de la Comunidad Valenciana: Castellón de la Plana, Sagunto y Valencia, tal como fue descrito en los capítulos anteriores. Se escogieron aquellas cepas de las que fueron caracterizados los genes de VP7 (genotipo G9) y de NSP4 (ver capítulos II y III).

### 6.2.2. Estudio de las secuencias

Se realizó la secuenciación e identificación de los productos de amplificación de las cepas escogidas y se procedió a la purificación de los productos de amplificación y secuenciación de los mismos como fue descrito en los capítulos II y III.

Las secuencias de VP7 y NSP4 obtenidas fueron alineadas y comparadas con las secuencias de cepas de referencia (Figuras 24 y 29). Los genotipos de VP7 y NSP4 se determinaron mediante análisis filogenético utilizando el programa MEGA, versión 4.0, aplicando el método de Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987). Las secuencias aminoacídicas deducidas se analizaron con el programa GenDoc versión 2.7. Los árboles filogenéticos se visualizaron con el programa MEGA y TreeView (versión 1.6.2) con los parámetros descritos en los capítulos anteriores.

Se estudió el polimorfismo y el nivel de divergencia de las secuencias de los distintos clusters obtenidos en el análisis filogenético utilizando el programa DnaSP versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009). DnaSP es un programa informático interactivo para el análisis del polimorfismo de ADN a partir de datos de secuencias de nucleótidos (<http://www.ub.edu/dnasp/>) (Librado y Rozas, 2009).

## 6.3. RESULTADOS

### 6.3.1. Análisis de la unión de secuencias de VP7 y NSP4 del genotipo G9P[8]

Se obtuvieron 57 secuencias del gen de VP7 (descritas en el capítulo II) y 59 secuencias del gen de NSP4 (descritas en el capítulo III). Se escogieron las cepas de las que se disponía de las secuencias de ambos genes, resultando un total de 52 cepas (52 secuencias del gen de VP7 y del gen de NSP4).

La distribución del número de cepas por ciudad y periodo invernal se muestra en la tabla 26.

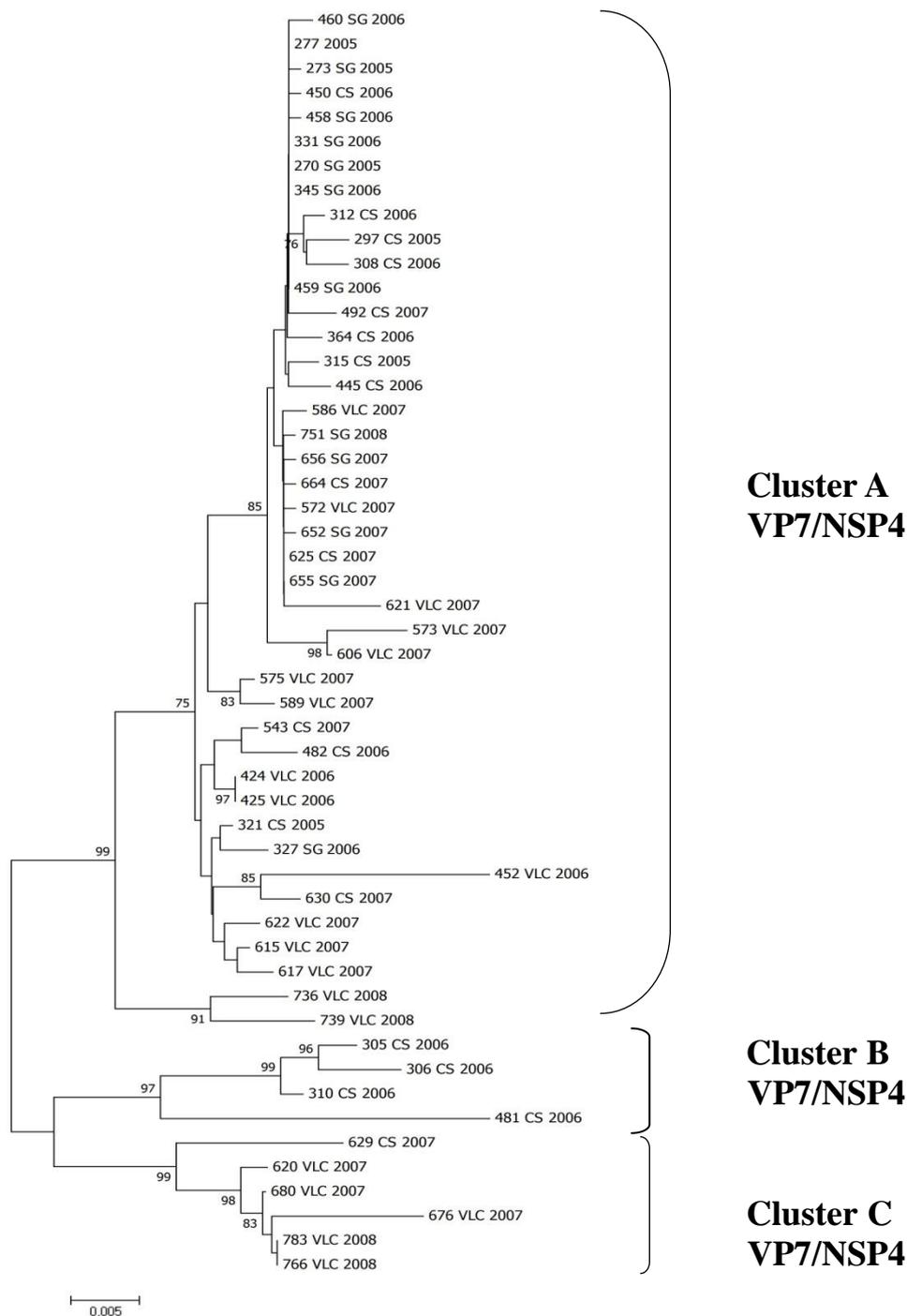
Ciudades	2005-06	2006-07	2007-08	2008-09	Total
<b>Castellón de la Plana</b>	3	10	6	0	19
<b>Sagunto</b>	2	6	3	1	12
<b>Valencia</b>	1	3	13	4	21
<b>Total</b>	6	19	22	5	52

**Tabla 26. Distribución de las muestras de tres ciudades de la Comunidad Valenciana (2005-2009) en las que se caracterizó el gen de VP7 y de NSP4.**

### **6.3.2. Análisis filogenético de los genes VP7/NSP4.**

Se unieron los pares de secuencias (52 secuencias de VP7 y de NSP4) de cada cepa en sentido 5'-3'. Al realizarse esta uniones se obtuvieron 52 secuencias de 1.296 pares de bases cada una, que fueron alineadas utilizando el programa de software Clustal X (Thompson et al., 1997). Se realizó el análisis filogenético con el programa MEGA versión 4.0, aplicando el método de Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987).

El análisis filogenético de los genes VP7/NSP4 de las 52 cepas reveló que todas las cepas G9 se agrupan formando tres “clusters” definidos: un “cluster A” formado por 42 cepas provenientes de las tres áreas de las cuatro temporadas estudiadas (“bootstrap” 99%), un “cluster B” formado por 4 cepas (del área de Castellón de 2006) (“bootstrap” 97%) y un “cluster C formado por 6 cepas (del área de Valencia, de 2007 y de 2008) (“bootstrap” 100%) (Figura 31).



**Fig. 31. Dendrograma de secuencias nucleotídicas de la unión de secuencias de los genes de VP7 y NSP4. Se ha construido con secuencias parciales de VP7/NSP4 de 52 cepas de rotavirus G9P[8] de Castellón, Sagunto y Valencia (2005-2009) mediante el método Neighbor-joining y se muestran los valores de “bootstrap” superiores a 70 (1.000 réplicas). Longitud de las secuencias = 1.296 pb. La escala indica la distancia genética calculada por el método de Jukes-Cantor.**

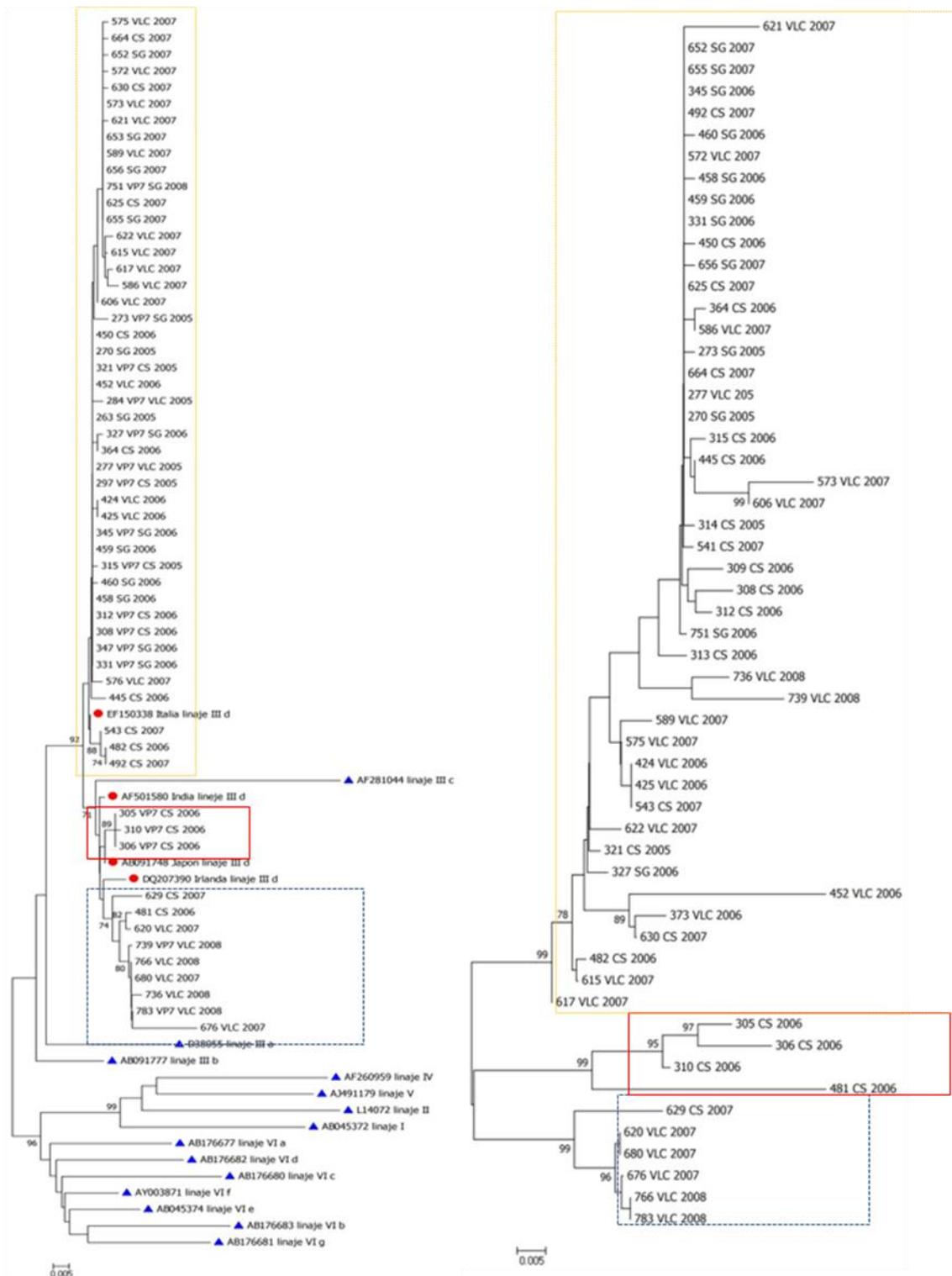


Fig. 32. Dendrograma de secuencias nucleotídicas de la unión de secuencias de los genes de VP7 y, NSP4. Se han construido con secuencias parciales de VP7, NSP4 de cepas de rotavirus G9P[8] de Castellón, Sagunto y Valencia (2005-2009) mediante el método Neighbor-joining y se muestran los valores de “bootstrap” superiores a 70 (1.000 réplicas). Las escalas indican las distancias genéticas

calculadas por el método de Jukes-Cantor. En los recuadros de color amarillo, azul y rojo se representan los “clusters” definidos en los análisis.

### 6.3.3. Polimorfismo y nivel de divergencia de las secuencias de VP7/NSP4

Asimismo, como se describió anteriormente, se estudió el polimorfismo y el nivel de divergencia de las secuencias de los distintos “clusters” obtenidos en el análisis filogenético, utilizando el programa DnaSP versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009).

Se obtuvieron los siguientes resultados reflejados en las tablas 27 y 28.

	Cluster A	Cluster B	Cluster C
Núm. de secuencias	42	4	6
Núm. de sitios polimórficos	107	51	37
Núm. total de mutaciones	120	51	37
Promedio de diferencias de nucleótidos, k	12,918	25,833	12,800
Diversidad nucleotídica, Pi	0,01125	0,02250	0,001115
Diversidad nucleotídica con Jukes y Cantor, Pi JC	0,01138	0,02298	0,01128
Desviación típica de Pi JC	0,00155	0,00821	0,00399

Tabla 27. Diversidad entre los grupos de secuencias de los genes de VP7 y NSP4 de cepas del genotipo G9 de rotavirus.

	Clusters A /B	Clusters A /C	Clusters B /C
Núm. de diferencias fijas	16	16	10
Mutaciones compartidas	14	11	11
Promedio de diferencias de nucleótidos entre poblaciones	53,619	47,837	51,750
Promedio de sustituciones de nucleótidos por sitio entre poblaciones, Dxy	0,04671	0,04167	0,04072
Dxy con Jukes y Cantor, Dxy(JC)	0,04825	0,04290	0,04189
Desviación típica de Dxy(JC)	0,00620	0,00475	0,01194
Núm. de sustituciones netas de nucleótidos entre poblaciones, Da	0,02983	0,003047	0,02380
Da con Jukes y Cantor, Da(JC)	0,03107	0,03157	0,02466
Desviación típica de Da(JC)	0,00700	0,00498	0,01266

**Tabla 28. Diversidad entre grupos de secuencias de los genes de VP7/NSP4 de cepas del genotipo G9 de rotavirus**

Tras el análisis del estudio del polimorfismo y del nivel de divergencia de las secuencias de los distintos “clusters” obtenidos se observó un coeficiente de diversidad nucleotídica bajo, lo que nos hace inferir una homogeneidad entre las secuencias evaluadas.

### 6.4. DISCUSIÓN

La caracterización de rotavirus mediante métodos moleculares ha facilitado la identificación de los genotipos circulantes y la detección de cepas con potenciales reordenamientos (“reassortants”). Se ha descrito en diferentes regiones geográficas un alto grado de diversidad de las cepas de rotavirus (Alfieri et al., 1996; Unicomb et al., 1999; Cunliffe et al., 2000; Iturriza-Gomara et al., 2000; Kang et al., 2002). En el análisis de los datos del genotipado de rotavirus del capítulo I se indicó que diferentes genotipos comunes y no comunes circulaban en Castellón, Sagunto y Valencia entre 2005-2009 (Tabla 15 y figuras 19-20). De estos, G1P[8] y G9P[8] fueron los genotipos más encontrados, en consonancia con la mayoría de los estudios en todo el mundo para este periodo. Rotavirus G9 es un genotipo que predominó tras ser introducido en la población por recombinación con virus animales o directamente de origen humano (Desselberger et al., 2001). Debido a que los rotavirus sufren mutaciones puntuales, que pueden ser utilizadas para clasificar los linajes y sublinajes dentro de los genotipos, es posible realizar un seguimiento filogenético de estas variantes.

En este estudio, es el primer estudio donde se han investigado las cepas de rotavirus G9P[8] detectadas en tres ciudades de la Comunidad Valenciana, de las cuales se realizó la caracterización conjunta de los genes de las proteínas VP7 y NSP4.

El análisis filogenético conjunto de los genes VP7/NSP4 reveló que todas las cepas G9P[6] se agrupan formando tres “clusters” definidos descritos en el apartado de resultados (Figura 31).

Si comparamos el análisis filogenético individual de los genes codificantes de VP7 y de NSP4 (Capítulos II y III) con el análisis conjunto de los genes VP7 y NSP4 de estas mismas cepas se puede observar que en los tres análisis se mantiene la distribución de las secuencias en tres “clusters” (Figura 32). En general, los estudios de polimorfismo y variabilidad nucleotídica muestran siempre una baja diversidad entre las diferentes secuencias analizadas.

Sin embargo, se observan algunos cambios interesantes en los agrupamientos de las secuencias según se analicen individual o conjuntamente. Por ejemplo, las secuencias 736 VLC-2008 y 739 VLC-2008 pertenecen al “cluster” B de VP7 y al “cluster” A de NSP4. Cuando se realiza el análisis conjunto de VP7/NSP4 se mantienen dentro del “cluster” A, formando un “subcluster” propio (“bootstrap” 91%).

La secuencia 481 CS-2006 se encuentra en el “cluster” C de VP7 asociada a la cepa 620 VLC-2007, mientras que está en el “cluster” B de NSP4 asociada a 305 CS-2006, 306 CS-2006 y 310 CS-2006, al igual que en el árbol filogenético conjunto VP7/NSP4. Las secuencias que conforman el “cluster” A en los análisis individuales de VP7 y de NSP4 se mantienen en el mismo “cluster” en el análisis conjunto VP7/NSP4.

Estos hallazgos sugieren que las cepas 736 VLC-2008, 739 VLC-2008 y 481 CS-2006 contienen reordenamientos de los genes VP7 y NSP4 ocurridos entre cepas del genotipo G9, es decir, constituyen reordenamientos intra-genotipo. De igual forma que las cepas de rotavirus de distintos genotipos pueden coinfectar y dar lugar a cepas con reordenamientos inter-genotipos (“reassortants”), las cepas de un mismo genotipo pueden también coinfectar y generar reordenamientos de segmentos genómicos.

Habiéndose detectado 3 cepas con reordenamientos de un total de 52 cepas analizadas (5,7%), estos intercambios de material genético entre cepas no deben ser infrecuentes.

Por último, el presente estudio filogenético de las cepas circulantes en la comunidad puede contribuir en un futuro a diseñar modelos predictivos de evolución genética de rotavirus, así como a plantear hipótesis sobre la asociación entre genotipos de VP7 y NSP4 y las consecuencias clínicas de la infección.

## **7. CONCLUSIONES**



1. La infección por rotavirus se observa en menores de 4 años, con mayor afectación de los menores de 1 año, e igual distribución entre ambos sexos, en la población infantil estudiada de Valencia y Castellón.
2. El genotipo G9 de rotavirus ha predominado durante los periodos 2005-06 y 2006-07, con un descenso brusco en 2007-08, no habiéndose detectado en 2008-09.
3. Todas las cepas de rotavirus G9 analizadas desde 2005 hasta 2009 presentan el genotipo P[8], a diferencia de las cepas estudiadas en otras áreas geográficas, en las que se han encontrado combinaciones con P[6] u otros genotipos P.
4. Las cepas de rotavirus G9 circulantes en Valencia y Castellón pertenecen al linaje III y al sublinaje IIIId, observándose una alta similitud entre ellas.
5. Se han encontrado diferencias en los aminoácidos en cuatro de las cinco regiones antigénicas de la proteína VP7 de las cepas de rotavirus G9. Estos cambios son ocasionados por mutaciones puntuales, pudiendo modificar la antigenicidad de estas regiones variables.
6. Todas las cepas de rotavirus G9 detectadas en el periodo 2005-2009 presentan el genotipo B de NSP4, o E1 según la nueva nomenclatura propuesta.

## CONCLUSIONES

---

7. A lo largo del tiempo estudiado (2005-09) se ha encontrado muy escasa variabilidad genética en el genotipo E1 de NSP4 de las cepas de rotavirus G9.
8. Las secuencias deducidas de aminoácidos de NSP4 se mantienen altamente conservadas en las tres zonas hidrofóbicas, observándose algunos cambios en la región carboxi-terminal, en el dominio variable entre especies y en los dominios de unión a VP6 y a VP4.
9. El análisis filogenético de los genes codificantes de VP7 y de NSP4, realizado tanto en forma individual como conjunta de ambos genes, demuestra que las secuencias se agrupan en tres “clusters”.
10. Los estudios filogenéticos de los genes de VP7 y de NSP4 de 52 cepas del genotipo G9 han permitido detectar 3 cepas (5,7%) con reordenamientos genómicos (“reassortments”) intra-genotipo.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**



- Abad, F. X., R. M. Pinto, J. M. Diez and A. Bosch (1994). "Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine." *Appl Environ Microbiol* **60**(7): 2377-2383.
- Abu-Mallouh, R. (2006). Epidemiología molecular de las infecciones por rotavirus (Valencia) y por calicivirus (Comunidad Valenciana y Cataluña) (2001-2005). *Microbiología i Ecología*. Valencia, Valencia. **PhD**: 205.
- Adams, W. R. and L. M. Kraft (1963). "Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent." *Science* **141**: 359-360.
- Afrikanova, I., M. C. Miozzo, S. Giambiagi and O. Burrone (1996). "Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5." *J Gen Virol* **77** ( Pt 9): 2059-2065.
- Ahmed, K., S. Ahmed, M. T. Mitui, A. Rahman, L. Kabir, A. Hannan, A. Nishizono and O. Nakagomi (2010). "Molecular characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh." *Virus Genes* **40**(3): 347-356.
- Aladin, F., S. Nawaz, M. Iturriza-Gomara and J. Gray (2010). "Identification of G8 rotavirus strains determined as G12 by rotavirus genotyping PCR: updating the current genotyping methods." *J Clin Virol* **47**(4): 340-344.
- Alcalde Martin, C., L. Gomez Lopez, M. I. Carrascal Arranz, A. Blanco Del Val, H. Marcos Andres, P. Bedate Calderon, A. Gonzalez Perez and E. Jimenez Mena (2002). "[Acute Gastroenteritis in hospitalized children. 14-Year evolution]." *An Esp Pediatr* **56**(2): 104-110.
- Alfieri, A. A., J. P. Leite, O. Nakagomi, E. Kaga, P. A. Woods, R. I. Glass and J. R. Gentsch (1996). "Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence." *Arch Virol* **141**(12): 2353-2364.
- Ansaldi, F., B. Pastorino, L. Valle, P. Durando, L. Sticchi, P. Tucci, P. Biasci, P. Lai, R. Gasparini and G. Icardi (2007). "Molecular characterization of a new variant of rotavirus P[8]G9 predominant in a sentinel-based survey in central Italy." *J Clin Microbiol* **45**(3): 1011-1015.
- Araujo, E. C., S. A. Clemens, C. S. Oliveira, M. C. Justino, P. Rubio, Y. B. Gabbay, V. B. Silva, J. D. Mascarenhas, V. L. Noronha, R. Clemens, R. H. Gusmao, N. Sanchez, T. A. Monteiro and A. C. Linhares (2007). "Safety, immunogenicity, and protective efficacy of two doses of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in healthy infants." *J Pediatr (Rio J)* **83**(3).
- Araujo, I. T., M. S. Ferreira, A. M. Fialho, R. M. Assis, C. M. Cruz, M. Rocha and J. P. Leite (2001). "Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil." *J Clin Microbiol* **39**(5): 1999-2001.
- Araujo, I. T., M. B. Heinemann, J. D. Mascarenhas, R. M. Assis, A. M. Fialho and J. P. Leite (2007). "Molecular analysis of the NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil." *J Med Microbiol* **56**(Pt 6): 854-859.
- Arista, S., E. Vizzi, D. Ferraro, A. Cascio and R. Di Stefano (1997). "Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea." *Arch Virol* **142**(10): 2065-2071.
- Au, K. S., W. K. Chan, J. W. Burns and M. K. Estes (1989). "Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28." *J Virol* **63**(11): 4553-4562.
- Au, K. S., N. M. Mattion and M. K. Estes (1993). "A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28." *Virology* **194**(2): 665-673.
- Ball, J. M., P. Tian, C. Q. Zeng, A. P. Morris and M. K. Estes (1996). "Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein." *Science* **272**(5258): 101-104.

- Banyai, K., A. Bogdan, G. Szucs, S. Arista, S. De Grazia, G. Kang, I. Banerjee, M. Iturriza-Gomara, C. Buonavoglia and V. Martella (2009). "Assignment of the group A rotavirus NSP4 gene into genotypes using a hemi-nested multiplex PCR assay: a rapid and reproducible assay for strain surveillance studies." *J Med Microbiol* **58**(Pt 3): 303-311.
- Banyai, K., J. R. Gentsch, R. Schipp, F. Jakab, J. Bene, B. Meleg, R. I. Glass and G. Szucs (2004). "Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001." *J Med Microbiol* **53**(Pt 8): 791-801.
- Barnes, G. L., E. Uren, K. B. Stevens and R. F. Bishop (1998). "Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993." *J Clin Microbiol* **36**(1): 133-138.
- Berner, R., R. F. Schumacher and J. Forster (1997). "Survey on rotavirus infections in a German pediatric hospital." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**(6): 479-481.
- Bishop, R. F., B. L. Davidson, I. H. Holmes y B. J. Ruck (1973). "Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosal from children with viral gastroenteritis." *Lancet* **2**: 1281-1283.
- Blackhall, J., A. Fuentes, K. Hansen and G. Magnusson (1997). "Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5." *J Virol* **71**(1): 138-144.
- Blackhall, J., A. Fuentes and G. Magnusson (1996). "Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation." *Virology* **225**(1): 181-190.
- Bok, K., G. Palacios, K. Sijvarger, D. Matson and J. Gomez (2001). "Emergence of G9 P[6] human rotaviruses in Argentina: phylogenetic relationships among G9 strains." *J Clin Microbiol* **39**(11): 4020-4025.
- Bon, F., C. Fromantin, S. Aho, P. Pothier and E. Kohli (2000). "G and P genotyping of rotavirus strains circulating in France over a three-year period: detection of G9 and P[6] strains at low frequencies. The AZAY Group." *J Clin Microbiol* **38**(4): 1681-1683.
- Borgan, M. A., Y. Mori, N. Ito, M. Sugiyama and N. Minamoto (2003). "Antigenic analysis of nonstructural protein (NSP) 4 of group A avian rotavirus strain PO-13." *Microbiol Immunol* **47**(9): 661-668.
- Borghan, M. A., Y. Mori, A. B. El-Mahmoudy, N. Ito, M. Sugiyama, T. Takewaki and N. Minamoto (2007). "Induction of nitric oxide synthase by rotavirus enterotoxin NSP4: implication for rotavirus pathogenicity." *J Gen Virol* **88**(Pt 7): 2064-2072.
- Boshuizen, J. A., J. W. Rossen, C. K. Sitaram, F. F. Kimenai, Y. Simons-Oosterhuis, C. Laffeber, H. A. Buller and A. W. Einerhand (2004). "Rotavirus enterotoxin NSP4 binds to the extracellular matrix proteins laminin-beta3 and fibronectin." *J Virol* **78**(18): 10045-10053.
- Boudville, I. C., K. B. Phua, S. H. Quak, B. W. Lee, H. H. Han, T. Verstraeten and H. L. Bock (2006). "The epidemiology of paediatric intussusception in Singapore: 1997 to 2004." *Ann Acad Med Singapore* **35**(10): 674-679.
- Broome, R. L., P. T. Vo, R. L. Ward, H. F. Clark and H. B. Greenberg (1993). "Murine rotavirus genes encoding outer capsid proteins VP4 and VP7 are not major determinants of host range restriction and virulence." *J Virol* **67**(5): 2448-2455.
- Browne, E. P., A. R. Bellamy and J. A. Taylor (2000). "Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain." *J Gen Virol* **81**(Pt 8): 1955-1959.
- Buesa, J., C. O. de Souza, M. Asensi, C. Martinez, J. Prat and M. T. Gil (2000). "VP7 and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from children with gastroenteritis over a 3-year period in Valencia, Spain." *Eur J Epidemiol* **16**(6):

- 501-506.
- Cao, D., M. Barro and Y. Hoshino (2008). "Porcine rotavirus bearing an aberrant gene stemming from an intergenic recombination of the NSP2 and NSP5 genes is defective and interfering." *J Virol* **82**(12): 6073-6077.
- Cao, X. R., S. Akihara, Z. Y. Fang, O. Nakagomi and H. Ushijima (1999). "Genetic variation in the VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan." *Microbiol Immunol* **43**(2): 171-175.
- Caprioli, A., C. Pezzella, R. Morelli, A. Giammanco, S. Arista, D. Crotti, M. Facchini, P. Guglielmetti, C. Piersimoni and I. Luzzi (1996). "Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. The Italian Study Group on Gastrointestinal Infections." *Pediatr Infect Dis J* **15**(10): 876-883.
- Cardoso, D. D., C. M. Soares, M. B. Dias e Souza, S. de Azevedo Mda, R. M. Martins, D. A. Queiroz, W. M. de Brito, V. Munford and M. L. Racz (2003). "Epidemiological features of rotavirus infection in Goiania, Goias, Brazil, from 1986 to 2000." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**(1): 25-29.
- Ciarlet, M. and F. Liprandi (1994). "Serological and genomic characterization of two porcine rotaviruses with serotype G1 specificity." *J Clin Microbiol* **32**(1): 269-272.
- Ciarlet, M., F. Liprandi, M. E. Conner and M. K. Estes (2000). "Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses." *Arch Virol* **145**(2): 371-383.
- Cilla, G., E. Perez-Trallero, M. C. Lopez-Lopategui, A. Gilsetas and M. Gomariz (2000). "Incidence, seasonality and serotypes of rotavirus in Gipuzkoa (Basque Country), Spain. A 14-year study." *Epidemiol Infect* **125**(3): 677-683.
- Ciruela, P., C. Izquierdo, M. Oviedo, A. y. Domínguez and G. d. T. d. S. d. N. M. d. Cataluña (2004). "Rotavirus y adenovirus 40-41 como causantes de diarrea infantil." *Vacunas* **5**: 16-23.
- Clark, H. F., Y. Hoshino, L. M. Bell, J. Groff, G. Hess, P. Bachman and P. A. Offit (1987). "Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype." *J Clin Microbiol* **25**(9): 1757-1762.
- Clark, H. F., D. A. Lawley, A. Schaffer, J. M. Patacsil, A. E. Marcello, R. I. Glass, V. Jain and J. Gentsch (2004). "Assessment of the epidemic potential of a new strain of rotavirus associated with the novel G9 serotype which caused an outbreak in the United States for the first time in the 1995-1996 season." *J Clin Microbiol* **42**(4): 1434-1438.
- Costa, P. S., D. D. Cardoso, S. J. Grisi, P. A. Silva, F. Fiaccadori, M. B. Souza and R. A. Santos (2004). "[Rotavirus A infections and reinfections: genotyping and vaccine implications]." *J Pediatr (Rio J)* **80**(2): 119-122.
- Coulson, B. S. (1996). "VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies." *Arch Virol Suppl* **12**: 113-118.
- Crawford, S. E., S. K. Mukherjee, M. K. Estes, J. A. Lawton, A. L. Shaw, R. F. Ramig and B. V. Prasad (2001). "Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike." *J Virol* **75**(13): 6052-6061.
- Cubitt, W. D., A. D. Steele and M. Iturriza (2000). "Characterisation of rotaviruses from children treated at a London hospital during 1996: emergence of strains G9P2A[6] and G3P2A[6]." *J Med Virol* **61**(1): 150-154.
- Cuestas Montanes, E., J. Appendino Camacho and M. Valle Toselli (2005). "[Rotavirus diarrhea in a population covered by private health insurance in Cordoba, Argentina]." *An Pediatr (Barc)* **63**(4): 369-372.
- Cunliffe, N. A., B. K. Das, M. Ramachandran, M. K. Bhan, R. I. Glass and J. R.

- Gentsch (1997). "Sequence analysis demonstrates that VP6, NSP1 and NSP4 genes of Indian neonatal rotavirus strain 116E are of human origin." *Virus Genes* **15**(1): 39-44.
- Cunliffe, N. A., W. Dove, J. E. Bunn, M. Ben Ramadam, J. W. Nyangao, R. L. Riveron, L. E. Cuevas and C. A. Hart (2001). "Expanding global distribution of rotavirus serotype G9: detection in Libya, Kenya, and Cuba." *Emerg Infect Dis* **7**(5): 890-892.
- Cunliffe, N. A., J. R. Gentsch, C. D. Kirkwood, J. S. Gondwe, W. Dove, O. Nakagomi, T. Nakagomi, Y. Hoshino, J. S. Bresee, R. I. Glass, M. E. Molyneux and C. A. Hart (2000). "Molecular and serologic characterization of novel serotype G8 human rotavirus strains detected in Blantyre, Malawi." *Virology* **274**(2): 309-320.
- Cunliffe, N. A., J. S. Gondwe, S. M. Graham, B. D. Thindwa, W. Dove, R. L. Broadhead, M. E. Molyneux and C. A. Hart (2001). "Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999." *J Clin Microbiol* **39**(3): 836-843.
- Cunliffe, N. A., P. A. Woods, J. P. Leite, B. K. Das, M. Ramachandran, M. K. Bhan, C. A. Hart, R. I. Glass and J. R. Gentsch (1997). "Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups." *J Med Virol* **53**(1): 41-50.
- Chaparro, A., A. Matiz, M. Mercado, A. Trespacios, N. Ajami and M. F. Gutiérrez (2002). "Estimación de la prevalencia de Rotavirus A en una población de Enero a Diciembre de 2002." *Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana. Universitas Scientiarum Colombia* **9**: 15-22.
- Christensen, M. (1999). *Rotaviruses*. Washington, ASM Press.
- Das, B. K., J. R. Gentsch, H. G. Cicirello, P. A. Woods, A. Gupta, M. Ramachandran, R. Kumar, M. K. Bhan and R. I. Glass (1994). "Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India." *J Clin Microbiol* **32**(7): 1820-1822.
- Das, B. K., J. R. Gentsch, Y. Hoshino, S. Ishida, O. Nakagomi, M. K. Bhan, R. Kumar and R. I. Glass (1993). "Characterization of the G serotype and genogroup of New Delhi newborn rotavirus strain 116E." *Virology* **197**(1): 99-107.
- Das, S., A. Sen, G. Uma, V. Varghese, S. Chaudhuri, S. K. Bhattacharya, T. Krishnan, P. Dutta, D. Dutta, M. K. Bhattacharya, U. Mitra, N. Kobayashi and T. N. Naik (2002). "Genomic diversity of group A rotavirus strains infecting humans in eastern India." *J Clin Microbiol* **40**(1): 146-149.
- Das, S., V. Varghese, S. Chaudhuri, P. Barman, K. Kojima, P. Dutta, S. K. Bhattacharya, T. Krishnan, N. Kobayashi and T. N. Naik (2004). "Genetic variability of human rotavirus strains isolated from Eastern and Northern India." *J Med Virol* **72**(1): 156-161.
- Desenclos, J. C., I. Rebiere, L. Letrillard, A. Flahault and B. Hubert (1999). "Diarrhoea-related morbidity and rotavirus infection in France." *Acta Paediatr Suppl* **88**(426): 42-47.
- Desselberger, U., M. Iturriza-Gomara and J. J. Gray (2001). "Rotavirus epidemiology and surveillance." *Novartis Found Symp* **238**: 125-147; discussion 147-152.
- Dong, Y., C. Q. Zeng, J. M. Ball, M. K. Estes and A. P. Morris (1997). "The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3960-3965.
- Dormitzer, P. R., E. B. Nason, B. V. Prasad and S. C. Harrison (2004). "Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus." *Nature* **430**(7003): 1053-1058.

- Dyall-Smith, M. L. and I. H. Holmes (1981). "Gene-coding assignments of rotavirus double-stranded RNA segments 10 and 11." *J Virol* **38**(3): 1099-1103.
- Ehlken, B., B. Laubereau, W. Karmaus, G. Petersen, A. Rohwedder and J. Forster (2002). "Prospective population-based study on rotavirus disease in Germany." *Acta Paediatr* **91**(7): 769-775.
- Endara, P., G. Trueba, O. D. Solberg, S. J. Bates, K. Ponce, W. Cevallos, J. Matthijnsens and J. N. Eisenberg (2007). "Symptomatic and subclinical infection with rotavirus P[8]G9, rural Ecuador." *Emerg Infect Dis* **13**(4): 574-580.
- Espejo, R. T., S. Lopez and C. Arias (1981). "Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin." *J Virol* **37**(1): 156-160.
- Estes, M. K. (2001). *Rotaviruses and their replication* Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins
- Estes, M. K. and J. Cohen (1989). "Rotavirus gene structure and function." *Microbiol Rev* **53**(4): 410-449.
- Estes, M. K., D. Y. Graham and B. B. Mason (1981). "Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms." *J Virol* **39**(3): 879-888.
- Estes, M. K., D. Y. Graham, E. M. Smith and C. P. Gerba (1979). "Rotavirus stability and inactivation." *J Gen Virol* **43**(2): 403-409.
- Estes, M. K., G. Kang, C. Q. Zeng, S. E. Crawford and M. Ciarlet (2001). "Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis." *Novartis Found Symp* **238**: 82-96; discussion 96-100.
- Estes, M. K. and A. Z. Kapikian (2007). *Rotaviruses*. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Estes, M. K., E. L. Palmer and J. F. Obijeski (1983). "Rotaviruses: a review." *Curr Top Microbiol Immunol* **105**: 123-184.
- Fang, Z. Y., B. Wang, P. E. Kilgore, J. S. Bresee, L. J. Zhang, L. W. Sun, Z. Q. Du, J. Y. Tang, A. C. Hou, H. Shen, X. B. Song, B. Nyambat, E. Hummelman, Z. Y. Xu and R. I. Glass (2005). "Sentinel hospital surveillance for rotavirus diarrhea in the People's Republic of China, August 2001-July 2003." *J Infect Dis* **192 Suppl 1**: S94-99.
- Fang, Z. Y., H. Yang, J. Qi, J. Zhang, L. W. Sun, J. Y. Tang, L. Ma, Z. Q. Du, A. H. He, J. P. Xie, Y. Y. Lu, Z. Z. Ji, B. Q. Zhu, H. Y. Wu, S. E. Lin, H. P. Xie, D. D. Griffin, B. Ivanoff, R. I. Glass and J. R. Gentsch (2002). "Diversity of rotavirus strains among children with acute diarrhea in China: 1998-2000 surveillance study." *J Clin Microbiol* **40**(5): 1875-1878.
- Fischer, T. K. (2001). "Incidence of hospitalizations due to rotavirus gastroenteritis in Denmark." *Acta Paediatr* **90**(9): 1073-1075.
- Fischer, T. K., J. S. Bresee and R. I. Glass (2004). "Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children." *Vaccine* **22 Suppl 1**: S49-54.
- Fischer, T. K., J. Eugen-Olsen, A. G. Pedersen, K. Molbak, B. Bottiger, K. Rostgaard and N. M. Nielsen (2005). "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* **43**(3): 1099-1104.
- Franco, M. A., N. Feng and H. B. Greenberg (1996). "Molecular determinants of immunity and pathogenicity of rotavirus infection in the mouse model." *J Infect Dis* **174 Suppl 1**: S47-50.
- Gentsch, J. R., B. K. Das, B. Jiang, M. K. Bhan and R. I. Glass (1993). "Similarity of the VP4 protein of human rotavirus strain 116E to that of the bovine B223

- strain." *Virology* **194**(1): 424-430.
- Gentsch, J. R., R. I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B. K. Das and M. K. Bhan (1992). "Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction." *J Clin Microbiol* **30**(6): 1365-1373.
- Gentsch, J. R., P. A. Woods, M. Ramachandran, B. K. Das, J. P. Leite, A. Alfieri, R. Kumar, M. K. Bhan and R. I. Glass (1996). "Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development." *J Infect Dis* **174 Suppl 1**: S30-36.
- Glass, R. I. (1996). "Rotavirus Vaccine Workshop Held." *Emerg Infect Dis* **2**(1): 73.
- Glass, R. I., J. S. Bresee, U. Parashar, R. Turcios, T. K. Fischer, B. Jiang, M. A. Widdowson and J. Gentsch (2005). "Rotavirus vaccines: past, present, and future." *Arch Pediatr* **12**(6): 844-847.
- Glass, R. I., J. R. Gentsch and B. Ivanoff (1996). "New lessons for rotavirus vaccines." *Science* **272**(5258): 46-48.
- Gomara, M. I., D. Cubitt, U. Desselberger and J. Gray (2001). "Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype." *J Clin Microbiol* **39**(10): 3796-3798.
- Gombold, J. L. and R. F. Ramig (1989). "Passive immunity modulates genetic reassortment between rotaviruses in mixedly infected mice." *J Virol* **63**(11): 4525-4532.
- Gorziglia, M., G. Larralde, A. Z. Kapikian and R. M. Chanock (1990). "Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(18): 7155-7159.
- Gouvea, V., R. I. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H. F. Clark, B. Forrester and Z. Y. Fang (1990). "Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens." *J Clin Microbiol* **28**(2): 276-282.
- Gouvea, V., R. C. Lima, R. E. Linhares, H. F. Clark, C. M. Nosawa and N. Santos (1999). "Identification of two lineages (WA-like and F45-like) within the major rotavirus genotype P[8]." *Virus Res* **59**(2): 141-147.
- Gouvea, V. and N. Santos (1999). "Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States." *J Clin Microbiol* **37**(7): 2385-2386.
- Graff, J. W., D. N. Mitzel, C. M. Weisend, M. L. Flenniken and M. E. Hardy (2002). "Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1." *J Virol* **76**(18): 9545-9550.
- Green, K. Y., Y. Hoshino and N. Ikegami (1989). "Sequence analysis of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein (VP7) of two new human rotavirus serotypes." *Virology* **168**(2): 429-433.
- Griffin, D. D., C. D. Kirkwood, U. D. Parashar, P. A. Woods, J. S. Bresee, R. I. Glass and J. R. Gentsch (2000). "Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of unusual strains. The National Rotavirus Strain Surveillance System collaborating laboratories." *J Clin Microbiol* **38**(7): 2784-2787.
- Gulati, B. R., R. Deepa, B. K. Singh and C. D. Rao (2007). "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* **45**(3): 972-978.
- Gunn, P. R., F. Sato, K. F. Powell, A. R. Bellamy, J. R. Napier, D. R. Harding, W. S. Hancock, L. J. Siegman and G. W. Both (1985). "Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis." *J Virol* **54**(3): 791-797.
- Haffeejee, I. E. (1995). "The epidemiology of rotavirus infections: a global perspective."

- J Pediatr Gastroenterol Nutr **20**(3): 275-286.
- Horie, Y., O. Masamune and O. Nakagomi (1997). "Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis." J Gen Virol **78** ( Pt **9**): 2341-2346.
- Horie, Y., O. Nakagomi, Y. Koshimura, T. Nakagomi, Y. Suzuki, T. Oka, S. Sasaki, Y. Matsuda and S. Watanabe (1999). "Diarrhea induction by rotavirus NSP4 in the homologous mouse model system." Virology **262**(2): 398-407.
- Horie, Y., T. Nakagomi, M. Oseto, O. Masamune and O. Nakagomi (1997). "Conserved structural features of nonstructural glycoprotein NSP4 between group A and group C rotaviruses." Arch Virol **142**(9): 1865-1872.
- Hoshino, Y., S. Honma, R. W. Jones, J. Ross, N. Santos, J. R. Gentsch, A. Z. Kapikian and R. A. Hesse (2005). "A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains." Virology **332**(1): 177-188.
- Hoshino, Y., R. W. Jones, J. Ross, S. Honma, N. Santos, J. R. Gentsch and A. Z. Kapikian (2004). "Rotavirus serotype G9 strains belonging to VP7 gene phylogenetic sequence lineage 1 may be more suitable for serotype G9 vaccine candidates than those belonging to lineage 2 or 3." J Virol **78**(14): 7795-7802.
- Hoshino, Y., L. J. Saif, S. Y. Kang, M. M. Sereno, W. K. Chen and A. Z. Kapikian (1995). "Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model." Virology **209**(1): 274-280.
- Hoshino, Y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, A. Z. Kapikian and R. M. Chanock (1985). "Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(24): 8701-8704.
- Huang, H., F. Schroeder, M. K. Estes, T. McPherson and J. M. Ball (2004). "Interaction(s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes." Biochem J **380**(Pt 3): 723-733.
- Huang, H., F. Schroeder, C. Zeng, M. K. Estes, J. K. Schoer and J. M. Ball (2001). "Membrane interactions of a novel viral enterotoxin: rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4." Biochemistry **40**(13): 4169-4180.
- Ito, H., M. Sugiyama, K. Masubuchi, Y. Mori and N. Minamoto (2001). "Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses." Virus Res **75**(2): 123-138.
- Iturriza-Gomara, M., E. Anderton, G. Kang, C. Gallimore, W. Phillips, U. Desselberger and J. Gray (2003). "Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains." J Clin Microbiol **41**(8): 3566-3573.
- Iturriza-Gomara, M., D. Cubitt, D. Steele, J. Green, D. Brown, G. Kang, U. Desselberger and J. Gray (2000). "Characterisation of rotavirus G9 strains isolated in the UK between 1995 and 1998." J Med Virol **61**(4): 510-517.
- Iturriza-Gomara, M., T. Dallman, K. Banyai, B. Bottiger, J. Buesa, S. Diedrich, L. Fiore, K. Johansen, N. Korsun, A. Kroneman, M. Lappalainen, B. Laszlo, L. Maunula, J. Matthinjssens, S. Midgley, Z. Mladenova, M. Poljsak-Prijatelj, P. Pothier, F. M. Ruggeri, A. Sanchez-Fauquier, E. Schreier, A. Steyer, I. Sidaraviciute, A. N. Tran, V. Usonis, M. Van Ranst, A. de Rougemont and J. Gray (2009). "Rotavirus surveillance in Europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data." J Infect Dis **200** Suppl 1: S215-221.
- Iturriza-Gomara, M., J. Green, D. W. Brown, M. Ramsay, U. Desselberger and J. J.

- Gray (2000). "Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998." *J Clin Microbiol* **38**(12): 4394-4401.
- Iturriza-Gomara, M., B. Isherwood, U. Desselberger and J. Gray (2001). "Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999." *J Virol* **75**(8): 3696-3705.
- Iturriza-Gomara, M., G. Kang and J. Gray (2004). "Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses." *J Clin Virol* **31**(4): 259-265.
- Iturriza-Gómara, M., U. Desselberger and J. Gray (2003). "Molecular epidemiology of rotaviruses: Genetic mechanisms associated with diversity". Amsterdam, Elsevier.
- Iturriza Gomara, M., G. Kang, A. Mammen, A. K. Jana, M. Abraham, U. Desselberger, D. Brown and J. Gray (2004). "Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India." *J Clin Microbiol* **42**(6): 2541-2547.
- Johansen, K., R. Bennet, K. Bondesson, M. Eriksson, K. O. Hedlund, K. De Verdier Klingenberg, I. Uhnoo and L. Svensson (1999). "Incidence and estimates of the disease burden of rotavirus in Sweden." *Acta Paediatr Suppl* **88**(426): 20-23.
- Johansen, K., J. Hinkula, F. Espinoza, M. Levi, C. Zeng, U. Ruden, T. Vesikari, M. Estes and L. Svensson (1999). "Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus." *J Med Virol* **59**(3): 369-377.
- Kang, G., J. Green, C. I. Gallimore and D. W. Brown (2002). "Molecular epidemiology of rotaviral infection in South Indian children with acute diarrhea from 1995-1996 to 1998-1999." *J Med Virol* **67**(1): 101-105.
- Khamrin, P., S. Peerakome, L. Wongsawasdi, S. Tonusin, P. Sornchai, V. Maneerat, C. Khamwan, F. Yagy, S. Okitsu, H. Ushijima and N. Maneekarn (2006). "Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand." *J Med Virol* **78**(2): 273-280.
- Kim, I. S., S. D. Trask, M. Babyonyshev, P. R. Dormitzer and S. C. Harrison (2010). "Effect of mutations in VP5 hydrophobic loops on rotavirus cell entry." *J Virol* **84**(12): 6200-6207.
- Kirkwood, C., N. Bogdanovic-Sakran, R. Clark, P. Masendycz, R. Bishop and G. Barnes (2002). "Report of the Australian Rotavirus Surveillance Program, 2001/2002." *Commun Dis Intell* **26**(4): 537-540.
- Kirkwood, C., N. Bogdanovic-Sakran, E. Palombo, P. Masendycz, H. Bugg, G. Barnes and R. Bishop (2003). "Genetic and antigenic characterization of rotavirus serotype G9 strains isolated in Australia between 1997 and 2001." *J Clin Microbiol* **41**(8): 3649-3654.
- Kirkwood, C., P. J. Masendycz and B. S. Coulson (1993). "Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses." *Virology* **196**(1): 79-88.
- Kirkwood, C. D., N. Bogdanovic-Sakran, D. Cannan, R. F. Bishop and G. L. Barnes (2006). "National Rotavirus Surveillance Program annual report, 2004-05." *Commun Dis Intell* **30**(1): 133-136.
- Kirkwood, C. D., J. R. Gentsch and R. I. Glass (1999). "Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States." *Virus Genes* **19**(2): 113-122.
- Kirkwood, C. D. and E. A. Palombo (1997). "Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4." *Virology* **236**(2): 258-265.

- Koopmans, M. and D. Brown (1999). "Seasonality and diversity of Group A rotaviruses in Europe." *Acta Paediatr Suppl* **88**(426): 14-19.
- Kouvelos, K., M. Petric and P. J. Middleton (1984). "Comparison of bovine, simian and human rotavirus structural glycoproteins." *J Gen Virol* **65** ( Pt 7): 1211-1214.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen and M. Nei (2001). "MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software." *Bioinformatics* **17**(12): 1244-1245.
- Laird, A. R., J. R. Gentsch, T. Nakagomi, O. Nakagomi and R. I. Glass (2003). "Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993 to 2001." *J Clin Microbiol* **41**(7): 3100-3111.
- Lazdins, I., B. S. Coulson, C. Kirkwood, M. Dyall-Smith, P. J. Masendycz, S. Sonza and I. H. Holmes (1995). "Rotavirus antigenicity is affected by the genetic context and glycosylation of VP7." *Virology* **209**(1): 80-89.
- Lee, C. N., Y. L. Wang, C. L. Kao, C. L. Zao, C. Y. Lee and H. N. Chen (2000). "NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea." *J Clin Microbiol* **38**(12): 4471-4477.
- Li, Z., M. L. Baker, W. Jiang, M. K. Estes and B. V. Prasad (2009). "Rotavirus architecture at subnanometer resolution." *J Virol* **83**(4): 1754-1766.
- Librado, P. and J. Rozas (2009). "DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data." *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.
- Lin, S. L. and P. Tian (2003). "Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A rotavirus NSP4 proteins." *Virus Genes* **26**(3): 271-282.
- Lin, Y. P., S. Y. Chang, C. L. Kao, L. M. Huang, M. Y. Chung, J. Y. Yang, H. Y. Chen, K. Taniguchi, K. S. Tsai and C. N. Lee (2006). "Molecular epidemiology of G9 rotaviruses in Taiwan between 2000 and 2002." *J Clin Microbiol* **44**(10): 3686-3694.
- Linhares, A. C., F. R. Velazquez, I. Perez-Schael, X. Saez-Llorens, H. Abate, F. Espinoza, P. Lopez, M. Macias-Parra, E. Ortega-Barria, D. M. Rivera-Medina, L. Rivera, N. Pavia-Ruz, E. Nunez, S. Damaso, G. M. Ruiz-Palacios, B. De Vos, M. O'Ryan, P. Gillard and A. Bouckennooghe (2008). "Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study." *Lancet* **371**(9619): 1181-1189.
- Linhares, A. C., T. Verstraeten, J. Wolleswinkel-van den Bosch, R. Clemens and T. Breuer (2006). "Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America." *Clin Infect Dis* **43**(3): 312-314.
- Lopez, S., C. F. Arias, J. R. Bell, J. H. Strauss and R. T. Espejo (1985). "Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity." *Virology* **144**(1): 11-19.
- Malherbe, H. and R. Harwin (1963). "The cytopathic effects of vervet monkey viruses." *S Afr Med J* **37**: 407-411.
- Martella, V., M. Ciarlet, K. Banyai, E. Lorusso, S. Arista, A. Lavazza, G. Pezzotti, N. Decaro, A. Cavalli, M. S. Lucente, M. Corrente, G. Elia, M. Camero, M. Tempesta and C. Buonavoglia (2007). "Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) Genotype in Italian swine herds." *J Clin Microbiol* **45**(2): 577-580.
- Martella, V., V. Terio, G. Del Gaudio, M. Gentile, P. Fiorente, S. Barbuti and C. Buonavoglia (2003). "Detection of the emerging rotavirus G9 serotype at high frequency in Italy." *J Clin Microbiol* **41**(8): 3960-3963.
- Martinez-Laso, J., A. Roman, J. Head, I. Cervera, M. Rodriguez, I. Rodriguez-Avial and J. J. Picazo (2009). "Phylogeny of G9 rotavirus genotype: a possible explanation

- of its origin and evolution." *J Clin Virol* **44**(1): 52-57.
- Mascarenhas, J. D., A. C. Linhares, A. P. Bayma, J. C. Lima, M. S. Sousa, I. T. Araujo, M. B. Heinemann, R. H. Gusmao, Y. B. Gabbay and J. P. Leite (2006). "Molecular analysis of VP4, VP7, and NSP4 genes of P[6]G2 rotavirus genotype strains recovered from neonates admitted to hospital in Belem, Brazil." *J Med Virol* **78**(2): 281-289.
- Mascarenhas, J. D., A. C. Linhares, Y. B. Gabbay, C. S. Lima, F. Guerra Sde, L. S. Soares, D. S. Oliveira, J. C. Lima, O. Macedo and J. P. Leite (2007). "Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belem, Brazil." *Virus Res* **126**(1-2): 149-158.
- Masendycz, P., N. Bogdanovic-Sakran, C. Kirkwood, R. Bishop and G. Barnes (2001). "Report of the Australian Rotavirus Surveillance Program, 2000/2001." *Commun Dis Intell* **25**(3): 143-146.
- Matthews, R. (1979). "The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague." *Intervirology* **11**: 133-135.
- Matthijnssens, J., M. Ciarlet, E. Heiman, I. Arijs, T. Delbeke, S. M. McDonald, E. A. Palombo, M. Iturriza-Gomara, P. Maes, J. T. Patton, M. Rahman and M. Van Ranst (2008). "Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains." *J Virol* **82**(7): 3204-3219.
- Matthijnssens, J., M. Ciarlet, S. M. McDonald, H. Attoui, K. Banyai, J. R. Brister, J. Buesa, M. D. Esona, M. K. Estes, J. R. Gentsch, M. Iturriza-Gomara, R. Johne, C. D. Kirkwood, V. Martella, P. P. Mertens, O. Nakagomi, V. Parreno, M. Rahman, F. M. Ruggeri, L. J. Saif, N. Santos, A. Steyer, K. Taniguchi, J. T. Patton, U. Desselberger and M. Van Ranst (2011). "Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)." *Arch Virol* **156**(8): 1397-1413.
- Matthijnssens, J., M. Ciarlet, M. Rahman, H. Attoui, K. Banyai, M. K. Estes, J. R. Gentsch, M. Iturriza-Gomara, C. D. Kirkwood, V. Martella, P. P. Mertens, O. Nakagomi, J. T. Patton, F. M. Ruggeri, L. J. Saif, N. Santos, A. Steyer, K. Taniguchi, U. Desselberger and M. Van Ranst (2008). "Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments." *Arch Virol* **153**(8): 1621-1629.
- Matthijnssens, J., E. Heylen, M. Zeller, M. Rahman, P. Lemey and M. Van Ranst (2010). "Phylogenetic Analyses of Rotavirus Genotypes G9 and G12 Underscore their Potential for Swift Global Spread." *Mol Biol Evol*.
- Matthijnssens, J., C. A. Potgieter, M. Ciarlet, V. Parreno, V. Martella, K. Banyai, L. Garaicoechea, E. A. Palombo, L. Novo, M. Zeller, S. Arista, G. Gerna, M. Rahman and M. Van Ranst (2009). "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* **83**(7): 2917-2929.
- Mattion, N. M., P. A. Reilly, S. J. DiMichele, J. C. Crowley and C. Weeks-Levy (1994). "Attenuated poliovirus strain as a live vector: expression of regions of rotavirus outer capsid protein VP7 by using recombinant Sabin 3 viruses." *J Virol* **68**(6): 3925-3933.
- Mebus, C. A., M. Kono, N. R. Underdahl and M. J. Twiehaus (1971). "Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus." *Can Vet J* **12**(3): 69-72.
- Mebus, C. A., N. R. Underdahl, M. B. Rhodes and M. J. Twiehaus (1969). "Further studies on neonatal calf diarrhea virus." *Proc Annu Meet U S Anim Health*

- Assoc **73**: 97-99.
- Meyer, J. C., C. C. Bergmann and A. R. Bellamy (1989). "Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28." *Virology* **171**(1): 98-107.
- Mirazimi, A., K. E. Magnusson and L. Svensson (2003). "A cytoplasmic region of the NSP4 enterotoxin of rotavirus is involved in retention in the endoplasmic reticulum." *J Gen Virol* **84**(Pt 4): 875-883.
- Mori, Y., M. A. Borgan, N. Ito, M. Sugiyama and N. Minamoto (2002). "Diarrhea-inducing activity of avian rotavirus NSP4 glycoproteins, which differ greatly from mammalian rotavirus NSP4 glycoproteins in deduced amino acid sequence in suckling mice." *J Virol* **76**(11): 5829-5834.
- Mori, Y., M. A. Borgan, N. Ito, M. Sugiyama and N. Minamoto (2002). "Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from Group A avian rotaviruses." *Virus Res* **89**(1): 145-151.
- Morris, A. P., J. K. Scott, J. M. Ball, C. Q. Zeng, W. K. O'Neal and M. K. Estes (1999). "NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca(2+)mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice." *Am J Physiol* **277**(2 Pt 1): G431-444.
- Munford, V., E. C. Souza, T. A. R. Caruzo, M. B. Martinez and M. L. RÁCZ (2007). "Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil." *Braz J Microbiol* **38**: 459-466
- Munoz, M., I. Lanza, M. Alvarez and P. Carmenes (1995). "Prevalence of neutralizing antibodies to 9 rotavirus strains representing 7 G-serotypes in sheep sera." *Vet Microbiol* **45**(4): 351-361.
- Munro, S. and H. R. Pelham (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." *Cell* **48**(5): 899-907.
- Nakagomi, O., T. Nakagomi, K. Akatani and N. Ikegami (1989). "Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization." *Mol Cell Probes* **3**(3): 251-261.
- Nakagomi, O. and S. Uesugi (1990). "Molecular diagnosis and characterization of rotaviruses" *Rinsho Byori Suppl* **85**: 136-148.
- Nakagomi, T., K. Akatani, N. Ikegami, N. Katsushima and O. Nakagomi (1988). "Occurrence of changes in human rotavirus serotypes with concurrent changes in genomic RNA electropherotypes." *J Clin Microbiol* **26**(12): 2586-2592.
- Nakagomi, T., A. Ohshima, K. Akatani, N. Ikegami, N. Katsushima and O. Nakagomi (1990). "Isolation and molecular characterization of a serotype 9 human rotavirus strain." *Microbiol Immunol* **34**(1): 77-82.
- Nguyen, V. M., V. T. Nguyen, P. L. Huynh, D. T. Dang, T. H. Nguyen, V. T. Phan, T. L. Nguyen, T. L. Le, B. Ivanoff, J. R. Gentsch and R. I. Glass (2001). "The epidemiology and disease burden of rotavirus in Vietnam: sentinel surveillance at 6 hospitals." *J Infect Dis* **183**(12): 1707-1712.
- Nishikawa, K., Y. Hoshino, K. Taniguchi, K. Y. Green, H. B. Greenberg, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock and M. Gorziglia (1989). "Rotavirus VP7 neutralization epitopes of serotype 3 strains." *Virology* **171**(2): 503-515.
- O'Brien, J. A., J. A. Taylor and A. R. Bellamy (2000). "Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle." *J Virol* **74**(11): 5388-5394.
- O'Halloran, F., M. Lynch, B. Cryan and S. Fanning (2002). "Application of restriction fragment length polymorphism analysis of VP7-encoding genes: fine comparison of Irish and global rotavirus isolates." *J Clin Microbiol* **40**(2): 524-531.
- Offit, P. A. and G. Blavat (1986). "Identification of the two rotavirus genes determining

- neutralization specificities." *J Virol* **57**(1): 376-378.
- Offit, P. A., G. Blavat, H. B. Greenberg and H. F. Clark (1986). "Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4." *J Virol* **57**(1): 46-49.
- Oka, T., T. Nakagomi and O. Nakagomi (2000). "Apparent re-emergence of serotype G9 in 1995 among rotaviruses recovered from Japanese children hospitalized with acute gastroenteritis." *Microbiol Immunol* **44**(11): 957-961.
- Okada, J., N. Kobayashi, K. Taniguchi and S. Urasawa (1999). "Analysis on reassortment of rotavirus NSP1 genes lacking coding region for cysteine-rich zinc finger motif." *Arch Virol* **144**(2): 345-353.
- Okada, J., T. Urasawa, N. Kobayashi, K. Taniguchi, A. Hasegawa, K. Mise and S. Urasawa (2000). "New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus." *J Med Virol* **60**(1): 63-69.
- Olivo, M. and H. J. Streckert (1995). "Studies on the single-shelled rotavirus receptor with a synthetic peptide derived from the cytoplasmic domain of NS28." *Arch Virol* **140**(12): 2151-2161.
- OMS (1999). Posición de la OMS sobre las vacunas antirotavirus., *Rev Panam Salud Pública/Pan Am J Public Health*. **5**: 172-173.
- Padilla-Noriega, L., O. Paniagua and S. Guzman-Leon (2002). "Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis." *Virology* **298**(1): 1-7.
- Palombo, E. A., P. J. Masendycz, H. C. Bugg, N. Bogdanovic-Sakran, G. L. Barnes and R. F. Bishop (2000). "Emergence of serotype G9 human rotaviruses in Australia." *J Clin Microbiol* **38**(3): 1305-1306.
- Parashar, U. D., A. Burton, C. Lanata, C. Boschi-Pinto, K. Shibuya, D. Steele, M. Birmingham and R. I. Glass (2009). "Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004." *J Infect Dis* **200 Suppl 1**: S9-S15.
- Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller and R. I. Glass (2003). "Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children." *Emerg Infect Dis* **9**(5): 565-572.
- Parra, G. I., K. Bok, V. Martinez, G. Russomando and J. Gomez (2005). "Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay." *J Med Virol* **77**(4): 579-586.
- Phan, T. G., P. Khamrin, T. D. Quang, S. K. Dey, S. Takanashi, S. Okitsu, N. Maneekarn and H. Ushijima (2007). "Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan." *J Virol* **81**(9): 4645-4653.
- Phan, T. G., S. Okitsu, N. Maneekarn and H. Ushijima (2007). "Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses." *Infect Genet Evol* **7**(5): 656-663.
- Poncet, D., S. Laurent and J. Cohen (1994). "Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3." *Embo J* **13**(17): 4165-4173.
- Prasad, B. V., J. W. Burns, E. Marietta, M. K. Estes and W. Chiu (1990). "Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy." *Nature* **343**(6257): 476-479.
- Radwan, S. F., M. K. Gabr, S. El-Maraghi and A. F. El-Saifi (1997). "Serotyping of group A rotaviruses in Egyptian neonates and infants less than 1 year old with acute diarrhea." *J Clin Microbiol* **35**(11): 2996-2998.
- Rahman, M., K. De Leener, T. Goegebuer, E. Wollants, I. Van der Donck, L. Van Hoovels and M. Van Ranst (2003). "Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] rotavirus." *J Clin Microbiol*

- 41**(5): 2088-2095.
- Rahman, M., J. Matthijssens, T. Goegebuer, K. De Leener, L. Vanderwegen, I. van der Donck, L. Van Hoovels, S. De Vos, T. Azim and M. Van Ranst (2005). "Predominance of rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999-2003." *J Clin Virol* **33**(1): 1-6.
- Ramachandran, M., B. K. Das, A. Vij, R. Kumar, S. S. Bhambal, N. Kesari, H. Rawat, L. Bahl, S. Thakur, P. A. Woods, R. I. Glass, M. K. Bhan and J. R. Gentsch (1996). "Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India." *J Clin Microbiol* **34**(2): 436-439.
- Ramachandran, M., C. D. Kirkwood, L. Unicomb, N. A. Cunliffe, R. L. Ward, M. K. Bhan, H. F. Clark, R. I. Glass and J. R. Gentsch (2000). "Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection." *Virology* **278**(2): 436-444.
- Ramia, S. and S. A. Sattar (1980). "The role of trypsin in plaque formation by simian rotavirus SA-11." *Can J Comp Med* **44**(4): 433-439.
- Ramia, S. and S. A. Sattar (1980). "Rotavirus concentration from cell culture harvests: trypsin treatment followed by hydroextraction." *Appl Environ Microbiol* **40**(6): 1133-1135.
- Ramig, R. F. (1997). "Genetics of the rotaviruses." *Annu Rev Microbiol* **51**: 225-255.
- Ray, P., J. Malik, R. K. Singh, S. Bhatnagar, R. Bahl, R. Kumar and M. K. Bhan (2003). "Rotavirus nonstructural protein NSP4 induces heterotypic antibody responses during natural infection in children." *J Infect Dis* **187**(11): 1786-1793.
- Rodrigues, A., M. de Carvalho, S. Monteiro, C. S. Mikkelsen, P. Aaby, K. Molbak and T. K. Fischer (2007). "Hospital surveillance of rotavirus infection and nosocomial transmission of rotavirus disease among children in Guinea-Bissau." *Pediatr Infect Dis J* **26**(3): 233-237.
- Rodriguez-Diaz, J., M. Banasaz, C. Istrate, J. Buesa, O. Lundgren, F. Espinoza, T. Sundqvist, M. Rottenberg and L. Svensson (2006). "Role of nitric oxide during rotavirus infection." *J Med Virol* **78**(7): 979-985.
- Rodriguez-Diaz, J., P. Lopez-Andujar, A. Garcia-Diaz, J. Cuenca, R. Montava and J. Buesa (2003). "Expression and purification of polyhistidine-tagged rotavirus NSP4 proteins in insect cells." *Protein Expr Purif* **31**(2): 207-212.
- Rodriguez-Diaz, J., V. Monedero, G. Perez-Martinez and J. Buesa (2004). "Single-chain variable fragment (scFv) antibodies against rotavirus NSP4 enterotoxin generated by phage display." *J Virol Methods* **121**(2): 231-238.
- Rodriguez-Diaz, J., R. Montava, A. Garcia-Diaz and J. Buesa (2005). "Humoral immune response to rotavirus NSP4 enterotoxin in Spanish children." *J Med Virol* **77**(2): 317-322.
- Rodriguez-Diaz, J., E. Rubilar-Abreu, M. Spitzner, K. O. Hedlund, F. Liprandi and L. Svensson (2008). "Design of a multiplex nested PCR for genotyping of the NSP4 from group A rotavirus." *J Virol Methods* **149**(2): 240-245.
- Roman, E., I. Wilhelmi, J. Colomina, J. Villar, M. L. Cilleruelo, V. Nebreda, M. Del Alamo and A. Sanchez-Fauquier (2003). "Acute viral gastroenteritis: proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children." *J Med Microbiol* **52**(Pt 5): 435-440.
- Ruiz-Palacios, G. M., I. Perez-Schael, F. R. Velazquez, H. Abate, T. Breuer, S. C. Clemens, B. Chevart, F. Espinoza, P. Gillard, B. L. Innis, Y. Cervantes, A. C. Linhares, P. Lopez, M. Macias-Parra, E. Ortega-Barria, V. Richardson, D. M. Rivera-Medina, L. Rivera, B. Salinas, N. Pavia-Ruz, J. Salmeron, R. Ruttimann, J. C. Tinoco, P. Rubio, E. Nunez, M. L. Guerrero, J. P. Yarzabal, S. Damaso, N.

- Tornieporth, X. Saez-Llorens, R. F. Vergara, T. Vesikari, A. Bouckennooghe, R. Clemens, B. De Vos and M. O'Ryan (2006). "Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis." *N Engl J Med* **354**(1): 11-22.
- Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol* **4**(4): 406-425.
- Salinas, B., G. Gonzalez, R. Gonzalez, M. Escalona, M. Materan and I. P. Schael (2004). "Epidemiologic and clinical characteristics of rotavirus disease during five years of surveillance in Venezuela." *Pediatr Infect Dis J* **23**(10 Suppl): S161-167.
- Sanchez-Fauquier, A., V. Montero, S. Moreno, M. Sole, J. Colomina, M. Iturriza-Gomara, A. Revilla, I. Wilhelmi and J. Gray (2006). "Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain." *Emerg Infect Dis* **12**(10): 1536-1541.
- Sanchez-Fauquier, A., I. Wilhelmi, J. Colomina, E. Cubero and E. Roman (2004). "Diversity of group A human rotavirus types circulating over a 4-year period in Madrid, Spain." *J Clin Microbiol* **42**(4): 1609-1613.
- Santos, N. and Y. Hoshino (2005). "Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine." *Rev Med Virol* **15**(1): 29-56.
- Santos, N., R. C. Lima, C. M. Nozawa, R. E. Linhares and V. Gouvea (1999). "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* **37**(8): 2734-2736.
- Santos, N., R. C. Lima, C. F. Pereira and V. Gouvea (1998). "Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea." *J Clin Microbiol* **36**(9): 2727-2729.
- Santos, N., C. C. Soares, E. M. Volotao, M. C. Albuquerque and Y. Hoshino (2003). "Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999." *J Clin Microbiol* **41**(7): 3399-3402.
- Santos, N., E. M. Volotao, C. C. Soares, M. C. Albuquerque, F. M. da Silva, V. Chizhikov and Y. Hoshino (2003). "VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR." *Virus Res* **93**(1): 127-138.
- Santos, N., E. M. Volotao, C. C. Soares, M. C. Albuquerque, F. M. da Silva, T. R. de Carvalho, C. F. Pereira, V. Chizhikov and Y. Hoshino (2001). "Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999." *J Clin Microbiol* **39**(3): 1157-1160.
- Santos, N., E. M. Volotao, C. C. Soares, G. S. Campos, S. I. Sardi and Y. Hoshino (2005). "Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies." *J Clin Microbiol* **43**(8): 4064-4069.
- Shah, K., C. D. Kirkwood, M. Bhave and E. A. Palombo (2006). "Genetic variation of NSP1 and NSP4 genes among serotype G9 rotaviruses causing hospitalization of children in Melbourne, Australia, 1997-2002." *J Med Virol* **78**(8): 1124-1130.
- Smith, E. M. and C. P. Gerba (1982). "Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage." *Appl Environ Microbiol* **43**(6): 1440-1450.
- Stirzaker, S. C., P. L. Whitfeld, D. L. Christie, A. R. Bellamy and G. W. Both (1987). "Processing of rotavirus glycoprotein VP7: implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* **105**(6 Pt 2): 2897-2903.
- Stupka, J. A., G. I. Parra, J. Gomez and J. Arbiza (2007). "Detection of human rotavirus

- G9P[8] strains circulating in Argentina: Phylogenetic analysis of VP7 and NSP4 genes." *J Med Virol* **79**(6): 838-842.
- Tafazoli, F., C. Q. Zeng, M. K. Estes, K. E. Magnusson and L. Svensson (2001). "NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells." *J Virol* **75**(3): 1540-1546.
- Tan, J. A. and R. D. Schnagl (1981). "Inactivation of a rotavirus by disinfectants." *Med J Aust* **1**(1): 19-23.
- Taraporewala, Z., D. Chen and J. T. Patton (1999). "Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity." *J Virol* **73**(12): 9934-9943.
- Tavares Tde, M., W. M. Brito, F. S. Fiaccadori, E. R. Freitas, J. A. Parente, P. S. Costa, L. G. Giugliano, M. S. Andreasi, C. M. Soares and D. D. Cardoso (2008). "Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus samples from the West Central region of Brazil." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**(3): 288-294.
- Taylor, J. A., Bellamy, A. R. (2003). Interaction of the rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 with the viral and cellular components. Amsterdam, Elsevier Science.
- Taylor, J. A., J. A. O'Brien and M. Yeager (1996). "The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains." *Embo J* **15**(17): 4469-4476.
- Tellez Castillo, C. J., R. Montava Vilaplana, M. Fernandez Jimenez, J. M. Ribes Fernandez and J. Buesa Gomez (2010). "Predominance of G9 rotavirus in Valencia and Castellon between 2005 and 2007 " *An Pediatr (Barc)* **72**(1): 49-54.
- Tellez Castillo, C. J., M. D. Tirado Balaguer, J. Colomer Revuelta, R. Moreno Munoz and J. M. Beltran Garrido (2008). "Ten-year retrospective study of rotavirus infection in the province of Castellon (Spain)." *An Pediatr (Barc)* **68**(1): 39-44.
- Tellez, C. J., R. Montava, J. M. Ribes, M. D. Tirado and J. Buesa (2008). "[Evaluation of two immunochromatography kits for rapid diagnosis of rotavirus infections]." *Rev Argent Microbiol* **40**(3): 167-170.
- Teodoroff, T. A., H. Tsunemitsu, K. Okamoto, K. Katsuda, M. Kohmoto, K. Kawashima, T. Nakagomi and O. Nakagomi (2005). "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* **43**(3): 1377-1384.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins (1997). "The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res* **25**(24): 4876-4882.
- Tian, P., J. M. Ball, C. Q. Zeng and M. K. Estes (1996). "The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity." *J Virol* **70**(10): 6973-6981.
- Tian, P., M. K. Estes, Y. Hu, J. M. Ball, C. Q. Zeng and W. P. Schilling (1995). "The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum." *J Virol* **69**(9): 5763-5772.
- Tian, P., Y. Hu, W. P. Schilling, D. A. Lindsay, J. Eiden and M. K. Estes (1994). "The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels." *J Virol* **68**(1): 251-257.
- Torres-Vega, M. A., R. A. Gonzalez, M. Duarte, D. Poncet, S. Lopez and C. F. Arias

- (2000). "The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6." *J Gen Virol* **81**(Pt 3): 821-830.
- Tort, L. F., M. Volotao Ede, M. C. de Mendonca, M. F. da Silva, A. A. Siqueira, R. M. Assis, G. Moratorio, J. Cristina and J. P. Leite (2010). "Phylogenetic analysis of human P[8]G9 rotavirus strains circulating in Brazil reveals the presence of a novel genetic variant." *J Clin Virol* **47**(4): 345-355.
- Unicomb, L. E., G. Podder, J. R. Gentsch, P. A. Woods, K. Z. Hasan, A. S. Faruque, M. J. Albert and R. I. Glass (1999). "Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995." *J Clin Microbiol* **37**(6): 1885-1891.
- Urasawa, S., A. Hasegawa, T. Urasawa, K. Taniguchi, F. Wakasugi, H. Suzuki, S. Inouye, B. Pongprot, J. Supawadee, S. Suprasert and et al. (1992). "Antigenic and genetic analyses of human rotaviruses in Chiang Mai, Thailand: evidence for a close relationship between human and animal rotaviruses." *J Infect Dis* **166**(2): 227-234.
- Urasawa, S., K. Taniguchi and N. Kobayashi (1992). "The serotype of rotavirus." *Uirusu* **42**(2): 145-153.
- Urasawa, S., T. Urasawa, K. Taniguchi, F. Wakasugi, N. Kobayashi, S. Chiba, N. Sakurada, M. Morita, O. Morita, M. Tokieda and et al. (1989). "Survey of human rotavirus serotypes in different locales in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies." *J Infect Dis* **160**(1): 44-51.
- Urbina, D., O. Arzuza, G. Young, E. Parra, R. Castro and M. Puello (2003). "Rotavirus type A and other enteric pathogens in stool samples from children with acute diarrhea on the Colombian northern coast." *Int Microbiol* **6**(1): 27-32.
- Urbina, D., J. G. Rodriguez, O. Arzuza, E. Parra, G. Young, R. Castro and P. del-Portillo (2004). "G and P genotypes of rotavirus circulating among children with diarrhea in the Colombian northern coast." *Int Microbiol* **7**(2): 113-120.
- Urrestarazu, M. I., F. Liprandi, E. Perez de Suarez, R. Gonzalez and I. Perez-Schael (1999). "[Etiologic, clinical and socio-democratic characteristics of acute diarrhea in Venezuela]." *Rev Panam Salud Publica* **6**(3): 149-156.
- van der Heide, R., M. P. Koopmans, N. Shekary, D. J. Houwers, Y. T. van Duynhoven and W. H. van der Poel (2005). "Molecular characterizations of human and animal group A rotaviruses in the Netherlands." *J Clin Microbiol* **43**(2): 669-675.
- Vende, P., M. Piron, N. Castagne and D. Poncet (2000). "Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end." *J Virol* **74**(15): 7064-7071.
- Vende, P., Z. F. Taraporewala and J. T. Patton (2002). "RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA." *J Virol* **76**(10): 5291-5299.
- Vesikari, T., R. Itzler, A. Karvonen, T. Korhonen, P. Van Damme, U. Behre, G. Bona, L. Gothefors, P. M. Heaton, M. Dallas and M. G. Goveia (2009). "RotaTeq, a pentavalent rotavirus vaccine: efficacy and safety among infants in Europe." *Vaccine* **28**(2): 345-351.
- Vesikari, T., A. Karvonen, L. Puustinen, S. Q. Zeng, E. D. Szakal, A. Delem and B. De Vos (2004). "Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants." *Pediatr Infect Dis J* **23**(10): 937-943.
- Vesikari, T., A. V. Karvonen, J. Majuri, S. Q. Zeng, X. L. Pang, R. Kohberger, B. D. Forrest, Y. Hoshino, R. M. Chanock and A. Z. Kapikian (2006). "Safety,

- Efficacy, and Immunogenicity of 2 Doses of Bovine-Human (UK) and Rhesus-Rhesus-Human Rotavirus Reassortant Tetravalent Vaccines in Finnish Children." *J Infect Dis* **194**(3): 370-376.
- Vizzi, E., E. Calvino, R. Gonzalez, I. Perez-Schael, M. Ciarlet, G. Kang, M. K. Estes, F. Liprandi and J. E. Ludert (2005). "Evaluation of serum antibody responses against the rotavirus nonstructural protein NSP4 in children after rhesus rotavirus tetravalent vaccination or natural infection." *Clin Diagn Lab Immunol* **12**(10): 1157-1163.
- Widdowson, M. A., G. J. van Doornum, W. H. van der Poel, A. S. de Boer, U. Mahdi and M. Koopmans (2000). "Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea." *Lancet* **356**(9236): 1161-1162.
- Wilde, J., J. Eiden and R. Yolken (1990). "Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions." *J Clin Microbiol* **28**(6): 1300-1307.
- Wilhelmi, I., C. Mier, E. Roman, J. Colomina, J. Prat and A. Sanchez-Fauquier (1999). "The molecular epidemiology of the rotavirus in Spanish children. The Rotavirus Study Group (GER)." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **17**(10): 509-514.
- Woods, P. A., J. Gentsch, V. Gouvea, L. Mata, M. Santosham, Z. S. Bai, S. Urasawa and R. I. Glass (1992). "Distribution of serotypes of human rotavirus in different populations." *J Clin Microbiol* **30**(4): 781-785.
- Wyatt, R. G., H. D. James, Jr., A. L. Pittman, Y. Hoshino, H. B. Greenberg, A. R. Kalica, J. Flores and A. Z. Kapikian (1983). "Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes." *J Clin Microbiol* **18**(2): 310-317.
- Xu, A., A. R. Bellamy and J. A. Taylor (2000). "Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules." *Embo J* **19**(23): 6465-6474.
- Xu, M., Y. Fu, J. Sun, J. Zhang, M. Feng, X. Cheng and J. Xu (2010). "Analysis of rotavirus NSP4 genotypes and age-dependent antibody response against NSP4 in Shanghai, China." *Jpn J Infect Dis* **63**(4): 280-282.
- Yeager, M., K. A. Dryden, N. H. Olson, H. B. Greenberg and T. S. Baker (1990). "Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction." *J Cell Biol* **110**(6): 2133-2144.
- Yuan, L., S. Ishida, S. Honma, J. T. Patton, D. C. Hodgins, A. Z. Kapikian and Y. Hoshino (2004). "Homotypic and heterotypic serum isotype-specific antibody responses to rotavirus nonstructural protein 4 and viral protein (VP) 4, VP6, and VP7 in infants who received selected live oral rotavirus vaccines." *J Infect Dis* **189**(10): 1833-1845.
- Zhang, M., C. Q. Zeng, Y. Dong, J. M. Ball, L. J. Saif, A. P. Morris and M. K. Estes (1998). "Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence." *J Virol* **72**(5): 3666-3672.
- Zhou, Y., L. Li, B. Kim, K. Kaneshi, S. Nishimura, T. Kuroiwa, T. Nishimura, K. Sugita, Y. Ueda, S. Nakaya and H. Ushijima (2000). "Rotavirus infection in children in Japan." *Pediatr Int* **42**(4): 428-439.
- Zhou, Y., L. Li, S. Okitsu, N. Maneekarn and H. Ushijima (2003). "Distribution of human rotaviruses, especially G9 strains, in Japan from 1996 to 2000." *Microbiol Immunol* **47**(8): 591-599.
- Zhou, Y., J. Supawadee, C. Khamwan, S. Tonusin, S. Peerakome, B. Kim, K. Kaneshi, Y. Ueda, S. Nakaya, K. Akatani, N. Maneekarn and H. Ushijima (2001).

## BIBLIOGRAFÍA

---

- "Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand from 1995 to 1997." *J Med Virol* **65**(3): 619-628.
- Zizdic, S., Z. Ridjanovic and I. Masic (1992). "Newly discovered rotavirus serotypes in 4 years of collecting samples from children with diarrheal syndromes." *Med Arh* **46**(1-2): 15-18.

## **9. ANEXOS**



## ANEXO 1

Descripción de las cepas de rotavirus del genotipo G9 (ciudad, país, año de aislamiento) cuyos genes de VP7 se analizan filogenéticamente. Se indica el linaje VP7 y el núm. de acceso en GenBank.

MUESTRA	CIUDAD	PAIS	AÑO	VP7	Número de acceso de la secuencia (GenBank)
ITA-MAR1-2005	GENOVA	ITALIA	2005	Linaje III d G9P[8]	EF150338
CIT-254RV	CORK	IRLANDA	2002	Linaje III c	AF281044
ISO-3	KOLKATA	INDIA	2002	Linaje III d G9	AF501580
00-SG2509VP7	TOKKYO	JAPON	2004	Linaje III d G9	AB091748
17025-03	BELFAST	IRLANDA	2005	Linaje III d G9	DQ207390
Mc345	SAPPORO	JAPON	1994	Linaje III a	D38055
608VN	HO CHI MINH	VIETNAM	2002	Linaje III b	AB091777
97 SZ37	BEIJING	CHINA	2000	Linaje IV	AF260959
OM67	NEBRASKA	USA	1993-2001	Linaje V	AJ491179
116E	NEW DELHI	INDIA	1993	Linaje II	L14072
AU32	AKITA	JAPON	2000	Linaje I	AB045372
Hokkaido-14	SHICHINOHE	JAPON	2004	Linaje VI a	AB176677
JP32-4	SHICHINOHE	JAPON	2004	Linaje VI d G9	AB176682
JP16-3	SHICHINONE	JAPON	2005	Linaje VI c G9	AB176680
t203	BEIJING	CHINA	2000	Linaje VI f G9	AY003871
K-1	AIKITA	JAPON	1995	Linaje VI e G9	AB045374
JP32-4	AOMORI	JAPON	2004	Linaje VI b G9	AB176682
JP29-6	SHICHINOHE	JAPON	2004	Linaje VI g	AB176681
270	SAGUNTO	ESPAÑA	2005	Linaje III d	HQ450744
263	SAGUNTO	ESPAÑA	2005	Linaje III d	HQ589063
273	SAGUNTO	ESPAÑA	2005	Linaje III d	HQ589064
277	VALENCIA	ESPAÑA	2005	Linaje III d	HQ589065
284	VALENCIA	ESPAÑA	2005	Linaje III d	HQ596337
297	CASTELLON	ESPAÑA	2005	Linaje III d	HQ596338
305	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ595303
306	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ595304
308	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ595305
310	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ596339
312	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ596340
315	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ613820
321	CASTELLON	ESPAÑA	2005	Linaje III d	HQ613821
327	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ633063
331	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ633064
345	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ633065
347	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ633066
364	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655299
424	VALENCIA	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655300
425	VALENCIA	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655301
445	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655302
450	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655303
452	VALENCIA	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655304
458	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655311
459	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655310
460	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655312
481	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655323
482	CASTELLON	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ655324
492	CASTELLON	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655329
543	CASTELLON	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655330

## ANEXOS

---

572	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655325
573	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655326
575	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655327
576	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655313
586	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655328
589	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655314
606	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655315
615	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655316
617	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655317
620	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655318
621	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655319
622	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655320
625	CASTELLON	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655331
629	CASTELLON	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655332
630	CASTELLON	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655333
652	SAGUNTO	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655321
653	SAGUNTO	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ555322
655	SAGUNTO	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655283
656	SAGUNTO	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655284
664	CASTELLON	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655285
676	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ655286
680	VALENCIA	ESPAÑA	2007	Linaje III d	HQ634584
736	VALENCIA	ESPAÑA	2008	Linaje III d	HQ655309
739	VALENCIA	ESPAÑA	2008	Linaje III d	HQ634585
751	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	Linaje III d	HQ634586
766	VALENCIA	ESPAÑA	2008	Linaje III d	HQ634587
783	VALENCIA	ESPAÑA	2008	Linaje III d	HQ634588

## ANEXO 2

**Descripción de las cepas de rotavirus del genotipo G9 (ciudad, país, año de aislamiento) cuyos genes de NSP4 se analizan filogenéticamente. Se indica el genotipo NSP4 y el núm. de acceso en GenBank.**

MUESTRA	CIUDAD	PAIS	AÑO	NSP4	Número de acceso de la secuencia (GenBank)
SI-885/06	LJUBLJANA	SLOVENIA	2006	E1	DQ995181
Omsk07-78	SIBERIA	RUSIA	2007	E1	GU138210
PA110/05	PALERMO	ITALIA	2005	E1	EU872163
1052	ATLANTA	USA	1999	E1	AJ236765
OSU	AKITA	JAPON	1996	E1	D88831
Wa	OHIO	USA	1998	E1	AF093199
AU32	AKITA	JAPON	1996	E1	D88830
KUN	AKITA	JAPON	1996	E2	D88829
RV5	VITORIA	AUSTRALIA	1996	E2	U59103
AU1	AKITA	JAPON	1996	E3	D89873
EW	CALIFORNIA	USA	1997	E7	U96335
Ch-1	GIFU	JAPON	2001	E10	AB065287
PO-13	GIFU	JAPON	2001	E11	AB009627
270	SAGUNTO	ESPAÑA	2005	E1	HQ450743
273	SAGUNTO	ESPAÑA	2005	E1	HQ589060
277	VALENCIA	ESPAÑA	2005	E1	HQ589061
297	CASTELLON	ESPAÑA	2005	E1	HQ589062
305	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ595300
306	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ595301
308	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ595302
309	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ596341
310	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ596342
312	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ596343
313	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ613816
314	CASTELLON	ESPAÑA	2005	E1	HQ613817
315	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ613818
321	CASTELLON	ESPAÑA	2005	E1	HQ613819
327	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	E1	HQ633067
331	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	E1	HQ633068
345	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	E1	HQ633069
364	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ655262
373	VALENCIA	ESPAÑA	2006	E1	HQ655263
424	VALENCIA	ESPAÑA	2006	E1	HQ655264
425	VALENCIA	ESPAÑA	2006	E1	HQ655265
445	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ655266
450	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ655267
452	VALENCIA	ESPAÑA	2006	E1	HQ655268
458	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	E1	HQ655269
459	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	E1	HQ655270
460	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	E1	HQ655271
475	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	E1	HQ655272
481	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ655293
482	CASTELLON	ESPAÑA	2006	E1	HQ655294
492	CASTELLON	ESPAÑA	2007	E1	HQ655288
541	CASTELLON	ESPAÑA	2007	E1	HQ655273
543	CASTELLON	ESPAÑA	2007	E1	HQ655289
572	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655295
573	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655296

## ANEXOS

---

575	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655297
586	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655298
589	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655274
606	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655275
615	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655276
617	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655277
620	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655278
621	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655279
622	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655280
625	CASTELLON	ESPAÑA	2007	E1	HQ655290
629	CASTELLON	ESPAÑA	2007	E1	HQ655291
630	CASTELLON	ESPAÑA	2007	E1	HQ655292
636	CASTELLON	ESPAÑA	2007	E1	HQ655281
652	SAGUNTO	ESPAÑA	2007	E1	HQ655282
655	SAGUNTO	ESPAÑA	2007	E1	HQ655283
656	SAGUNTO	ESPAÑA	2007	E1	HQ655284
664	CASTELLON	ESPAÑA	2007	E1	HQ655285
676	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ655286
680	VALENCIA	ESPAÑA	2007	E1	HQ634584
736	VALENCIA	ESPAÑA	2008	E1	HQ655287
739	VALENCIA	ESPAÑA	2008	E1	HQ634585
751	SAGUNTO	ESPAÑA	2006	E1	HQ634586
766	VALENCIA	ESPAÑA	2008	E1	HQ634587
783	VALENCIA	ESPAÑA	2008	E1	HQ634588