

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

Facultat de Medicina i Odontologia  
Departament de Microbiologia i Ecologia



**ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS E  
INFECCIÓN POR ROTAVIRUS**

TESIS DOCTORAL

Programa de doctorado 3139 Medicina

Presentada por

**Raúl Pérez Ortín**

Licenciado en Medicina y Cirugía General  
Especialista en Pediatría y sus áreas específicas

Dirigida por

**Dr. Javier Buesa Gómez**

Catedrático de Microbiología

Octubre 2019



**Javier Buesa Gómez**, Catedrático de Microbiología del Departamento de Microbiología de la Universitat de València.

**CERTIFICA:**

Que la presente memoria, titulada “**ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS E INFECCIÓN POR ROTAVIRUS**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. **Raúl Pérez Ortín**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado 3139 en Medicina de la Universitat de València.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, a 3 de Octubre de 2019.



Fdo. Prof. Dr. Javier Buesa Gómez



*A mi madre y a mi mujer  
por ser las dos mujeres  
más importantes en mi vida.*

*A mi familia y a mis amigos  
porque sin ellos no sabría vivir.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Es muy difícil para mí, expresar en unas pocas palabras todo lo que siento. Por eso, espero que las personas que de alguna manera me han ayudado a realizar este proyecto, nombradas o no en estas líneas, sepan que lo escribo desde el corazón.

A mi mujer, Elena. Ella es mi TODO. Durante todo el tiempo que ha durado este proyecto ella ha sido mi fiel escudera, siempre a mi lado, apoyándome, queriéndome, enseñándome y, como no, animándome en los malos momentos y felicitándome cuando la ocasión lo ha requerido.

A mi familia. Ellos han sabido siempre expresar esa palabra de ánimo que necesitaba, darme un abrazo en el momento oportuno o realizar un esfuerzo extra para que yo pudiera estar relajado y centrado en mi trabajo.

A mi mejor amigo y hermano de sangre, Lorenzo. Por su inestimable paciencia y perseverancia en el asunto de la tesis y por haber estado siempre a mi lado.

A mis compañeras del centro de trabajo, Pura y Ana. Por su infinita paciencia para soportar mis ausencias y por sus ánimos y felicitaciones que siempre me han hecho sentir un gran profesional.

A mis compañeros de laboratorio, Susana Vila Vicent, Cristina Santiso Bellón, Noelia Carmona Vicente y Jesús Rodríguez Díaz. Por ayudarme a sacar este proyecto adelante, siempre con los brazos abiertos y con una gran sonrisa en la boca.

A José Bermúdez Edo, por su inestimable apoyo en el procesado estadístico de los datos y a Enma Castro Izaguirre, por facilitarme la información necesaria del grupo de donantes de sangre.

Y finalmente, pero no por ello menos importante - pues él me ha enseñado que los verdaderos maestros no quieren ser nombrados los primeros y dejan que sus pupilos sean los que reciben la gloria - a mi director de tesis doctoral, Javier Buesa Gómez. No sólo porque ha sido el mejor maestro que podría haber tenido, guiándome de la mano por este mundo de la investigación mientras crecía como científico, sino que, además, ha sido un compañero, un amigo y una persona con la que he compartido inquietudes más allá de la ciencia médica.

A todos, ¡MUCHAS GRACIAS!

## **RESUMEN**

La infección por rotavirus es la principal causa de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años en todo el mundo. Su incidencia es similar en países desarrollados y en vías de desarrollo, aunque la mayor mortalidad ocurre en estos últimos. Las vacunas frente a rotavirus han demostrado una gran efectividad en los países industrializados, pero su protección es menor en los países del África subsahariana y Asia. Se ha descrito que los antígenos histo-sanguíneos, presentes en la membrana de los enterocitos, actúan como ligandos para distintos genotipos de rotavirus. Esto podría explicar las diferencias que se observan en su distribución geográfica y la distinta eficacia vacunal de unas áreas a otras, puesto que el genotipo P[8] está presente en ambas vacunas.

Con el fin de analizar los antígenos histo-sanguíneos de niños con infección aguda por rotavirus en nuestra área geográfica, se reclutaron 133 pacientes entre 0 y 5 años de edad pertenecientes al Departamento de Salud 5 de Valencia que habían sufrido al menos una infección por rotavirus entre enero de 2013 y diciembre de 2015. Los resultados del análisis se compararon con los obtenidos de un grupo control de 50 niños sanos de edades similares y con los datos obtenidos de donantes de sangre de la Comunidad Valenciana.

El diagnóstico de infección por rotavirus se realizó mediante inmunocromatografía o ELISA, y los genotipos G/P se determinaron por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa. Los antígenos histo-sanguíneos se analizaron en muestras de saliva. Los antígenos Lewis (Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup>) y los grupos sanguíneos ABO se analizaron por ELISA con anticuerpos específicos. El gen *FUT2* se tipificó por PCR-RFLP y fenotípicamente por ELISA con lectina *Ulex europaeus*.

La edad media de los pacientes fue de 22 meses, con un 84% menores de 3 años de edad. La mayor parte de los pacientes (82%) se infectaron con un solo genotipo de rotavirus, siendo el genotipo G9P[8] el más frecuente (49%). La mayoría de los pacientes infectados (98,5%) resultaron ser secretores (H tipo 1 positivo), homocigotos o heterocigotos para el gen *FUT2*. La infección fue también más frecuente en los niños con grupos sanguíneos A y AB, en comparación con los niños infectados del grupo O. Los individuos secretores Lewis positivos mostraron de forma significativa ( $p = 0.000$ ) una mayor predisposición a padecer una infección sintomática por rotavirus. La vacunación frente a rotavirus disminuyó el riesgo de sufrir una infección por rotavirus ( $p = 0.003$ ), aunque se detectaron fallos vacunales. No se encontró ninguna relación entre la distribución de los genotipos G/P de rotavirus y el estado de vacunación de los pacientes.

La diferente expresión de los antígenos histo-sanguíneos (H tipo 1, ABO y antígenos Lewis) en los individuos de una población repercute en la susceptibilidad a la infección por rotavirus, sin poderse establecer diferencias significativas entre los distintos genotipos G/P de rotavirus detectados en nuestro estudio.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. GENERALIDADES .....	3
1.2. ROTAVIRUS.....	6
1.2.1. Antecedentes históricos.....	6
1.2.2. Estructura de la partícula vírica.....	8
1.2.3. Clasificación y nomenclatura .....	14
1.2.4. Epidemiología. Epidemiología molecular. Distribución geográfica.....	21
1.2.5. Mecanismos de evolución. Transferencia interespecie ..	23
1.2.6. Transmisión de la infección .....	28
1.2.7. Replicación vírica.....	29
1.2.8. Fisiopatogenia y manifestaciones clínicas .....	34
1.2.9. Diagnóstico de laboratorio .....	39
1.2.10. Tratamiento de la infección.....	40
1.2.11. Prevención. Vacunas.....	44
1.3. ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS.....	54
1.3.1. Antecedentes históricos.....	54
1.3.2. Concepto .....	55
1.3.3. Clasificación y nomenclatura .....	56
1.3.4. Estructura molecular.....	63
1.3.5. Formación y expresión de los antígenos ABO, H y Lewis .....	66

1.3.5.1. Antígeno H.....	67
1.3.5.2. Antígenos ABO .....	69
1.3.5.3. Antígenos Lewis.....	70
1.4. INTERACCIÓN ENTRE ROTAVIRUS Y ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS .....	76
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>85</b>
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	87
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	87
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>89</b>
3.1. PERIODO DE INVESTIGACIÓN Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO .....	91
3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	93
3.3. MUESTRAS CLÍNICAS .....	93
3.3.1. Obtención de las muestras.....	93
3.3.2. Conservación de las muestras .....	94
3.4. ESTUDIO VIROLÓGICO.....	94
3.4.1. Detección de rotavirus en heces por técnicas inmunológicas .....	94
3.4.2. Detección de rotavirus en heces por técnicas moleculares. Caracterización de genotipos G y P mediante transcripción inversa y amplificación de ácidos nucleicos (RT-PCR)..	96
3.5. ESTUDIO DE LOS ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS ....	111
3.5.1. Determinación del grupo sanguíneo ABO y de los antígenos Lewis a y Lewis b.....	111

3.5.2.	Caracterización del fenotipo / genotipo secretor (gen FUT2) .....	113
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	120
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>121</b>
4.1.	ANÁLISIS DEMOGRÁFICO DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO.....	123
4.1.1.	Población de estudio .....	123
4.1.2.	Población de control .....	125
4.2.	ANÁLISIS DE LOS ROTAVIRUS INFECTANTES .....	126
4.3.	ANÁLISIS DE LOS ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS .....	130
4.3.1.	Grupo sanguíneo ABO .....	130
4.3.2.	Fenotipo secretor (FUT2).....	133
4.3.3.	Antígenos Lewis (a y b) .....	133
4.4.	RELACIÓN ENTRE LOS ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS DE LOS PACIENTES Y LOS GENOTIPOS DE ROTAVIRUS INFECTANTES.....	136
4.5.	RELACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR ROTAVIRUS Y ESTADO VACUNAL DE LOS PACIENTES.....	142
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>145</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>161</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>165</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>219</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de las proteínas de rotavirus .....	13
Tabla 2. Géneros clasificados en la familia <i>Reoviridae</i> .....	14
Tabla 3. Constelaciones de genes de cepas de rotavirus comunes, vacunales, inusuales y animales .....	20
Tabla 4. Resumen de las características de las vacunas que se utilizan a nivel regional, recientemente autorizadas o en desarrollo .....	53
Tabla 5. El sistema ABO simplificado .....	54
Tabla 6. Sistemas de grupo sanguíneo .....	57
Tabla 7. Colecciones de grupo sanguíneo .....	59
Tabla 8. Serie de baja frecuencia. Serie 700 .....	60
Tabla 9. Serie de alta frecuencia. Serie 901 .....	61
Tabla 10. Ejemplos de nomenclatura en el sistema Kell .....	62
Tabla 11. Precursores disacáridos .....	64
Tabla 12. Algunos genes de sistema de grupo sanguíneo y las enzimas que codifican .....	67
Tabla 13. Expresión de diferentes antígenos en hematíes y secreciones corporales según los distintos genotipos de los genes FUT2 y FUT3 (en individuos del grupo O) .....	69
Tabla 14. Frecuencia de fenotipo Lewis en las células rojas de tres poblaciones humanas .....	74

Tabla 15. Secuencias de cebadores específicos de genotipos G (VP7)	104
Tabla 16. Secuencias de los cebadores específicos de genotipo P (VP4)	108
Tabla 17. Comparación del grupo de pacientes frente al grupo controles	131
Tabla 18. Comparación del grupo de pacientes frente al grupo donantes	132
Tabla 19. Distribución del grupo de pacientes según su estado secretor	133
Tabla 20. Distribución de antígenos histo-sanguíneos en el grupo de pacientes y grupo control	135
Tabla 21. Distribución de antígenos histo-sanguíneos en el grupo de pacientes y en el grupo de donantes	136
Tabla 22. Relación de los genotipos G/P infectantes de rotavirus con el grupo sanguíneo y genotipo FUT2 del paciente	138
Tabla 23. Relación entre fenotipo Lewis positivo y antígeno secretor. Estadística comparativa entre ambos grupos de estudio	139
Tabla 24. Distribución según el fenotipo Lewis a y Lewis b. Comparación estadística entre pacientes y controles	140
Tabla 25. Distribución según el fenotipo Lewis a y Lewis b. Comparación estadística entre pacientes y donantes	140
Tabla 26. Distribución de genotipos G/P de rotavirus detectados según la expresión de los antígenos Lewis a y Lewis b de los pacientes	141

Tabla 27. Análisis estadístico de los individuos vacunados y no vacunados en cada grupo de estudio ..... 142

Tabla 28. Distribución de genotipos G/P de rotavirus detectados según el estado de vacunación de los pacientes ..... 143



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes a microscopía electrónica de partículas de rotavirus .....	8
Figura 2. Estructura del virión de rotavirus y su genoma .....	11
Figura 3. Diagrama de flujo para la clasificación de los genotipos de rotavirus según el RCWG .....	18
Figura 4. Reordenamiento genético y transmisión interespecie .....	27
Figura 5. Ciclo de infección y replicación de rotavirus .....	33
Figura 6. Mecanismo de producción de diarrea por rotavirus .....	36
Figura 7. Mapa representativo de la introducción de la vacuna frente a rotavirus por región geográfica .....	49
Figura 8. Estructura de los antígenos A, B, H y Lewis .....	65
Figura 9. Biosíntesis de los antígenos ABO, H y Lewis derivados de los precursores Tipo 1 y Tipo 2 .....	71
Figura 10. Biosíntesis de los HBGA tipo 1 .....	77
Figura 11. Rotavirus reconoce los antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) .....	79
Figura 12. Análisis estructural de la unión de VP8* del genotipo P[14] con el antígeno histo-sanguíneo tipo A .....	82
Figura 13. Esquema de la amplificación de fragmentos de PCR de ocho genotipos G (G1 a G4, G8, G9, G10 y G12) .....	104

Figura 14. Esquema de la amplificación de fragmentos de PCR correspondientes a seis genotipos P (P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] y P[11]) .....	108
Figura 15. Identificación mediante RT-PCR de genotipos G y P de cepas de rotavirus según los tamaños de los amplicones .....	110
Figura 16. Identificación del genotipo secretor de los individuos del estudio según la digestión con la enzima Avall .....	119
Figura 17. Distribución de los pacientes según edad y sexo .....	124
Figura 18. Distribución de los pacientes según su edad y estado de vacunación frente a rotavirus .....	125
Figura 19. Distribución de genotipos G/P de rotavirus infectantes .....	127
Figura 20. Distribución temporal de la frecuencia de infección por rotavirus .....	128
Figura 21. Distribución temporal de la incidencia de genotipos G de rotavirus infectantes .....	129

## SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN / DNA: Ácido desoxirribonucleico

ADNc / DNAc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AEP: Asociación Española de Pediatría

ARN / RNA: Ácido ribonucleico

ARNm / RNAm: Ácido ribonucleico mensajero

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

cols: Colaboradores

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DEPC: Dietilpirocarbonato

DLP: *Double-layered particle*

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTPs: Desoxinucleósido trifosfatos

EDIM: *Epizootic diarrhea of infant mice*

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

EEUU: Estados Unidos

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ENS: *Enteric nervous system*

ESPGHAN: *European Society for Paediatric Gastroenterology  
Hepatology and Nutrition*

EuroRotaNet: *European rotavirus strain surveillance network*

FDA: *Food and Drug Administration*

FUT: Fucosiltransferasa

g: Gramo

GEA: Gastroenteritis aguda

HBGAs: *Histo-blood group antigens*

HIV: *Human immunodeficiency virus*

HRP: *Horseradish peroxidase*

HRVL: *Human reovirus-like agent*

Hsc70: *Heat shock cognate 70 protein*

IC95%: Intervalo de confianza al 95%

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IgG: Inmunoglobulina G

IGV: *Infantile gastroenteritis virus*

IP: Inositol-fosfatasa

ISBT: *International Society of Blood Transfusion*

kDa: Kilodaltons

LGG: *Lactobacillus rhamnosus GG*

M: Molar

min: Minuto

ml: Mililitro

mM: Milimolar

NCDV: *Nebraska calf diarrhea virus*

nm: Nanometro

NSP: *Non-structural protein*

nt: Nucleótido

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPD: O-fenilendiaminadihidroclorida

ORF: *Open reading frame*

p/v: Peso/volumen

PAGE: *Polyacrylamide gel electrophoresis*

pb: *Pares de bases*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PBS-BSA: *Phosphate buffered saline - bovine serum albumin*

PBS-T: *Phosphate buffered saline conTween-20*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PCR-RFLP: *Polymerase chain reaction - Restriction fragment length  
polymorphism*

PLC: Fosfolipasa C

RCWG: *Rotavirus Classification Working Group*

RdRp: RNA-dependiente RNA polimerasa

RNAse: Ribonucleasa

rpm: Revoluciones por minuto

RT: *Reverse transcription*

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*

SA11: *Simian Agent 11*

SIA: Sialidasa sensible

SLP: *Single-layered particle*

TBE: Tris-borato-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)

TLP: *Triple-layered particle*

TMB: *3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina*

UEA: *Ulex europaeus agglutinin*

UFC: Unidades formadoras de colonias

UTR: *Untranslated region*

VP: *Viral protein*

μl: Microlitro

μM: Micromolar

## **INTRODUCCIÓN**



# INTRODUCCIÓN

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. GENERALIDADES

La infección por rotavirus es, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la principal causa de gastroenteritis aguda (GEA) en niños menores de 5 años en todo el mundo. A esta edad la práctica totalidad de los niños habrán sufrido una infección por rotavirus de mayor o menor gravedad (WHO, 2013). Además, es probable que un mismo niño se infecte varias veces durante los primeros años de vida, si bien la sintomatología de las segundas infecciones suele ser más leve, siendo las terceras típicamente asintomáticas (Velázquez, 2009). En el adulto, la infección por rotavirus es normalmente asintomática o leve, aunque puede ser grave en individuos inmunocomprometidos o en personas de edad avanzada (Anderson y Weber, 2004). Tanto los niños como los adultos infectados excretan virus en sus heces, lo que les convierte en una fuente de virus que facilita su diseminación en la comunidad. Según un estudio realizado en Dinamarca en niños menores de 5 años con GEA por rotavirus, en un 43% de las infecciones estudiadas se encontró al menos otro miembro familiar, incluyendo a los adultos, que había experimentado también síntomas gastrointestinales (Hoffmann et al., 2011). Por otra parte, rotavirus es también una causa importante de diarrea nosocomial (Marinosci et al., 2016). El hecho de que las infecciones por rotavirus se produzcan incluso en entornos con un alto estándar de higiene corrobora la elevada transmisibilidad del virus.

En la mayor parte de los países en vías de desarrollo de Asia y África, la infección por rotavirus se caracteriza por una transmisión ininterrumpida a lo largo de todo el año, con la presencia de algunos periodos en los que su circulación es relativamente más intensa. Sin

embargo, en los países desarrollados con climas templados se suele observar una marcada estacionalidad invernal (Patel et al., 2013). Este hecho, unido a las grandes diferencias existentes en el estado nutricional y de salud de la población, la disponibilidad de asistencia médica y la comorbilidad en la infancia explican la marcada desigualdad en la carga de enfermedad existente entre los países en vías de desarrollo y los países desarrollados (WHO, 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en 2008 se produjeron 453.000 muertes de niños en todo el mundo asociadas a gastroenteritis aguda por rotavirus. Estas muertes representaron el 5% del total de muertes en niños y el 37% de muertes debidas a diarrea, siendo la tasa de mortalidad por rotavirus en niños menores de 5 años a nivel mundial de 86 muertes por 100.000 casos (Tate et al., 2012). En un estudio más reciente llevado a cabo por el *Global Burden of Disease*, la infección por rotavirus fue responsable a nivel mundial de 128.500 muertes en niños menores de 5 años durante el año 2016, con un 29% de muertes por diarrea atribuidas a rotavirus (Troeger et al., 2018). En los países en vías de desarrollo, la práctica totalidad de estas muertes (90%) se producen por deshidratación y están relacionadas con una asistencia sanitaria deficiente (WHO, 2013). En los países desarrollados la mortalidad por rotavirus es muy baja, sin embargo es la principal causa de hospitalización infantil debida a GEA (2 millones de hospitalizaciones cada año) y, a nivel mundial, es responsable de 25 millones de consultas ambulatorias cada año (Parashar et al., 2003). En España la mortalidad debida a rotavirus es casi inexistente, no obstante, el virus es responsable del 14 al 30% de todos los casos diagnosticados de GEA y, de éstos, una cuarta parte requiere hospitalización (Alvarez-Aldeán et al., 2014). Se ha estimado que la GEA por rotavirus cuesta al Sistema Nacional de Salud español alrededor de 28 millones de euros al año (Díez-Domingo et al., 2010).

## INTRODUCCIÓN

---

La OMS recomienda la inclusión de la vacuna frente a rotavirus en el Programa Nacional de Vacunaciones de la infancia en los países con alta incidencia de rotavirus (WHO, 2010). Las dos vacunas principalmente comercializadas en el mundo desde el año 2006 *Rotarix*® (GSK Biologicals, Rixensart, Belgium) y *RotaTeq*® (Merck and Co, PA, USA) han demostrado una gran efectividad en los países industrializados (Ruiz-Palacios et al., 2006; Vesikari et al., 2006), sin embargo, estudios realizados en países del África subsahariana han revelado una eficacia mucho más reducida (Armah et al., 2010; Madhi et al., 2010). Las razones para esta diferencia son aún desconocidas. Así, la malnutrición, las infecciones concomitantes, los factores genéticos relacionados con el huésped (Glass et al., 2014; Lopman et al., 2012), la prevalencia de distintos genotipos de rotavirus (el genotipo P[6] es más prevalente en África que en Europa o Norteamérica donde predominan los genotipos P[4] y P[8]) (Todd et al., 2010) o diferencias en la microbiota intestinal (Harris et al., 2017, 2018) son causas que se postulan como posibles factores que interfieren en la eficacia de la vacunación en estos países. Por otro lado, se ha postulado el hecho de que los antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) actúan como receptores celulares para distintos genotipos de rotavirus, facilitando su unión y posterior penetración en la célula. La presencia o ausencia de estos receptores en los individuos expuestos modificaría sustancialmente la capacidad de infección de los diferentes rotavirus y, por tanto, permitiría una selección natural de los genotipos circulantes en una población determinada (Nordgren et al., 2014; Tan y Jiang, 2014). Este hallazgo podría explicar la distribución geográfica actual de los diferentes genotipos de rotavirus en el mundo y las diferencias encontradas en la eficacia vacunal de unas regiones a otras, puesto que el genotipo P[8] es el principal componente en ambas vacunas.

### 1.2. ROTAVIRUS

#### 1.2.1. Antecedentes históricos

En 1943 Light y Hodes aislaron un agente filtrable, obtenido a partir de heces de recién nacidos con diarrea infecciosa, que era capaz de causar diarrea en terneros (Light y Hodes, 1949). Años más tarde se demostraría que este agente era rotavirus (Mebus et al., 1976). En 1947 se observó la presencia de unas partículas víricas de morfología esférica en el interior de las células epiteliales del intestino delgado en ratones de laboratorio afectados por una enfermedad denominada diarrea epizoótica de ratones lactantes (*epizootic diarrhea of infant mice*, EDIM) (Cheever y Mueller, 1958). Pero no fue hasta el año 1963 cuando se identificó y se puso nombre al virus aislado de estos ratones, el virus de la diarrea epizoótica de los ratones lactantes (Adams y Kraft, 1963). Ese mismo año, en otro laboratorio, se aislaron en cultivos celulares partículas víricas a partir del tejido rectal de un mono “vervet” o cercopiteco verde (*Chlorocebus pygerythrus*) sano, a las que se llamó SA11 del inglés “*simian agent 11*” (Malherbe y Harwin, 1963). En 1969, investigadores de un laboratorio de patología animal demostraron la presencia de otro virus de similares características a los ya descritos en heces de terneros con diarrea, al que denominaron con las siglas NCDV (*Nebraska calf diarrhea virus*) (Mebus et al., 1969). Más recientemente, en 1973, dos grupos de investigadores, el equipo de Ruth Bishop y el grupo de Thomas H. Flewett, identificaron de manera independiente las mismas partículas virales en biopsias intestinales y en las heces de niños con gastroenteritis aguda (Bishop et al., 1973; Flewett et al., 1973). Bishop y colaboradores observaron por microscopía electrónica la presencia de un virus de morfología esférica en el interior de las células epiteliales del intestino

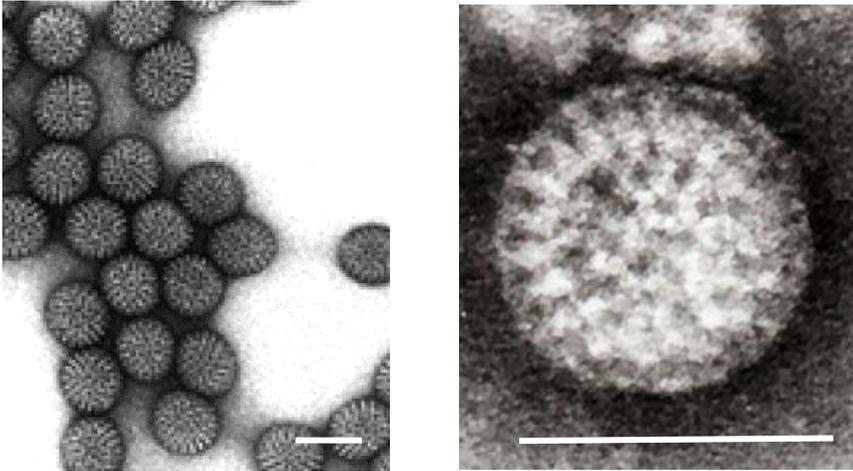
## INTRODUCCIÓN

---

delgado de niños afectados de gastroenteritis aguda (Bishop et al., 1973). En 1976 se informó sobre la detección de rotavirus en otras especies animales (Woode et al., 1976).

Todos estos virus causantes de gastroenteritis fueron llamados de diferente forma por sus descubridores: *orbivirus*, *rotavirus*, *reovirus-like agent*, *human reovirus-like agent* (HRVL), *duovirus* e *infantile gastroenteritis virus* (IGV), pero todos ellos tenían una característica en común, su morfología esférica en forma de rueda (Figura 1). Por ello, en 1974 Flewett sugirió el nombre de rotavirus, del término en latín “rota” que significa rueda, como nombre oficial para este nuevo virus, aunque no fue hasta el año 1978 cuando el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) reconoció oficialmente este nombre. Finalmente, en 1979 se estableció el género *Rotavirus* y se incorporó este nuevo género a la familia *Reoviridae* (Matthews, 1979).

Los serotipos de *Rotavirus* fueron descritos por primera vez en el año 1980 (Beards et al., 1980) y en 1981 se logró su crecimiento en cultivos celulares derivados de riñón de simio, con la adición de tripsina en el medio de cultivo (Urasawa et al., 1981). La capacidad de cultivar rotavirus aceleró el ritmo de su investigación, lo que permitió, entre otras cosas, comenzar a evaluar las primeras vacunas frente a rotavirus en la década de los años 80 (Kapikian et al., 1980).



(barra = 100 nm)

**Figura 1. Imágenes a microscopía electrónica de partículas de rotavirus.**

### 1.2.2. Estructura de la partícula vírica

Los rotavirus son virus aparentemente redondos, desnudos o carentes de membrana lipídica, que presentan una estructura icosaédrica de 100 nm de diámetro que conforma el virión. Los viriones están formados por 3 capas proteicas concéntricas que rodean al genoma viral denominadas de dentro a fuera *core*, cápside interna y cápside externa (Figura 2) (Chanock y Kapikian, 2001).

El *core* es una estructura esférica, de 55 nm de diámetro, compuesta por 60 dímeros de la proteína VP2 (94 kDa) que rodean al genoma viral y a las proteínas VP1 (125 kDa) y VP3 (88 kDa) (Liu et al., 1992; Lu et al., 2008). Cada unidad asimétrica de esta estructura está formada por dos subunidades de VP2 con forma de coma. Los dímeros de VP2 se organizan en una red  $T = 1$  (Figura 2). Esta disposición arquitectónica, presente en la mayoría de los virus con genoma ARN bicatenario, una vez articulada no se desacoplará nunca durante el ciclo

## INTRODUCCIÓN

---

viral. De esta forma, las moléculas de ARN genómico viral quedan protegidas de los mecanismos centinelas del huésped evitando la inducción de la respuesta antiviral innata. Este entramado continuo presenta pequeños poros en los cinco ejes que albergan residuos cargados positivamente en su cara exterior. Se ha sugerido que sería necesaria una flexión de los monómeros, en la cara interna de estos canales, para permitir el paso de los transcritos de ARN durante la transcripción del genoma (Rodríguez y Luque, 2019). Dentro del *core*, cada uno de los 11 segmentos de ARN bicatenario del genoma viral está asociado con una copia de la RNA polimerasa dependiente del ARN (RdRp). La polimerasa VP1 se encuentra anclada a la superficie interna mediante contactos con los extremos N-terminales de VP2 (Rodríguez y Luque, 2019).

Las proteínas VP1, VP2 y VP3, junto con el genoma de ARN de doble cadena, forman el núcleo del virión. Sobre éstas, y formando la segunda capa o cápside interna se encuentran distribuidas 260 proteínas VP6 en forma de trímeros en red  $T = 13$  interrumpidos por 132 canales acuosos que conectan la superficie externa con la capa interna. Las características antigénicas de estas proteínas VP6 han permitido diferenciar 8 serogrupos o especies de rotavirus (A-H), siendo el serogrupo A el que infecta mayoritariamente a la especie humana.

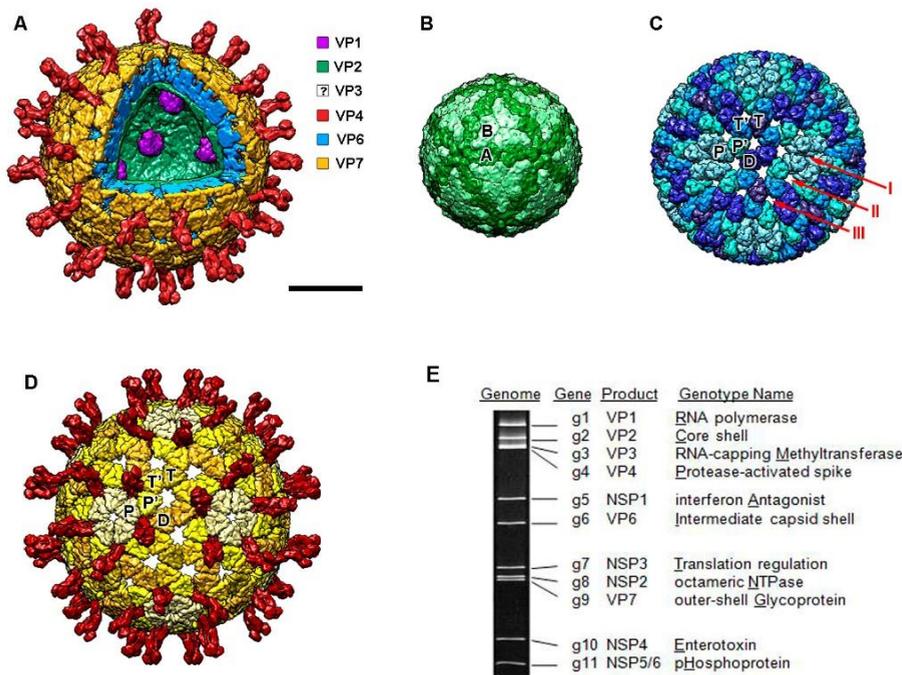
En la capa más superficial del virus o cápside externa se encuentran las proteínas estructurales VP7 y VP4. La proteína VP7 es el principal componente de esta capa, con 260 trímeros distribuidos en la superficie del virus en red  $T = 13$ . La proteína VP4 constituye trímeros que forman 60 espículas hacia el exterior que interactúan con VP7 y VP6 (Yeager et al., 1990). En el proceso de infección en el huésped susceptible, las proteasas intestinales tipo tripsina escinden la espícula

VP4 en dos polipéptidos, VP5\* (tallo y base de la espícula) y VP8\* (cabeza globular de la espícula), estimulando la interacción del virus y facilitando así su penetración en las células intestinales del huésped (Arias et al., 1996; Settembre et al., 2011). Las proteínas VP7 y VP4 contienen múltiples epítomos antigénicos capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, por lo que se consideran importantes para la inmunidad protectora (Aoki et al., 2009).

Existen tres tipos de partículas virales con diferentes características estructurales: la partícula completa que contiene las tres capas proteicas, llamada TLP (*triple-layered particle*), la cual es infecciosa, dado que la presencia de las proteínas VP4 y VP7 en la capa externa le permiten unirse y penetrar en la célula huésped; la partícula con dos capas proteicas o DLP (*double-layered particle*), no infecciosa pero con capacidad de transcripción, y la partícula que contiene una sola capa de proteínas, *core* o nucleocápside (SLP, *single-layered particle*) que tiene la actividad de replicar el genoma viral (Estes et al., 2001).

El genoma viral está constituido por 11 segmentos de ARN de doble cadena, numerados del 1 al 11 según su velocidad de migración electroforética en gel de poliacrilamida (Figura 2). Los segmentos genómicos, con tamaños que oscilan entre 667 pb (segmento 11) y 3.302 pb (segmento 1) según la cepa de referencia SA11, suman un total de 18.555 pb con un peso molecular de 6.120 kDa (Chanock y Kapikian, 2001). Cada segmento genómico contiene dos regiones no traducidas (*untranslated region*, UTR) que flanquean un marco abierto de lectura (*open reading frame*, ORF). Los genes comienzan siempre con una secuencia consenso 5'-GGC-3', seguida de la zona codificante de la proteína y terminan con la secuencia 5'-UGACC-3' (Desselberger y McCrae, 1994).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 2. Estructura del virión de rotavirus y su genoma.** (A) Estructura de una partícula de triple capa (TLP) según imagen obtenida por criomicroscopía electrónica, con la VP1 (RpRd) conectada al núcleo interno, imagen obtenida a partir del modelo atómico. Se indican las proteínas por código de colores excepto para la VP3, que no se observa en la figura. La escala corresponde a 25 nm. (B) Estructura del core interno VP2, T = 1. Dos tipos de monómeros de VP2 (VP2-A y VP2-B) están indicados y coloreados en distintos tonos de verde. (C) Estructura de la cápside interna con VP6, T = 13. Los 13 monómeros de VP6 en unidades asimétricas están dispuestos en 5 tipos de capsómeros triméricos, coloreados con diferentes tonos de azul e indicados como P, el más cercano al eje quintuple; P', adyacente a P; T, en el eje triple; T', adyacente a T; D, más cercano al eje doble. Los tres tipos de orificios/canales en la cápside (I, II y III) se indican en color rojo. (D) Estructura de la cápside externa. Los trímeros de la glicoproteína VP7 se localizan en fase con los trímeros de VP6 en una arquitectura T = 13. Los cinco tipos de capsómeros triméricos se indican con la misma nomenclatura que la de los trímeros VP6 subyacentes (P, P', T, T' y D) y coloreados con diferentes tonalidades de amarillo. Las 60 espículas de VP4 triméricas protuberantes están coloreadas en rojo. (E) Gel de electroforesis en el que se muestran los 11 segmentos de ARN de doble cadena. Los segmentos se han denominado como g1 - g11 (g = gen) y se han enumerado los productos proteicos y sus funciones o propiedades asociadas. La letra subrayada identifica

Cada segmento de ARN genómico codifica una proteína viral, excepto el segmento 11 que puede codificar dos. Todos ellos codifican un total de 6 proteínas estructurales, que forman la partícula viral, denominadas con las iniciales VP (*viral protein*) seguido de un número y 6 proteínas no estructurales, que se encuentran en las células infectadas pero no en las partículas maduras, que se nombran con las iniciales NSP (*non-structural protein*) seguido de un número (Estes et al., 2001). Las proteínas no estructurales tienen diversas funciones: replicación del genoma, ensamblaje de la partícula, regulación de la respuesta innata del huésped y estimulación de la expresión génica viral (Tabla 1) (González et al., 1998). Las proteínas NSP2, NSP5 y NSP6 intervienen en la replicación viral, pero la proteína NSP4 tiene un papel especial en el proceso de maduración de los viriones, ya que actúa como receptor intracelular para VP6. Además, esta proteína se comporta como una enterotoxina, siendo capaz por sí sola de producir diarrea en el ratón (Kirkwood y Palombo, 1997). Por otro lado, el genoma de rotavirus puede evolucionar, ya sea por mutación puntual o por reorganización de los distintos segmentos genómicos. La naturaleza segmentada de su ARN viral facilita el intercambio de segmentos genómicos entre distintas cepas de rotavirus, en el caso de infecciones mixtas en una misma célula (Chanock y Kapikian, 2001).

---

el segmento en el acrónimo de la constelación de genes: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx.

(Adaptado del original de Rodríguez y Luque, 2019).

# INTRODUCCIÓN

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

**Tabla 1. Funciones de las proteínas de rotavirus.** Cada proteína está asociada al número del segmento génico que la codifica, el nombre del genotipo con la letra utilizada en el acrónimo de la constelación de genes, el número de genotipos descritos, la longitud del gen, la localización en la partícula viral y sus funciones y/o propiedades.

1.2.3. Clasificación y nomenclatura

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae* y están incluidos en la subfamilia *Sedoreovirinae*. La familia *Reoviridae* está formada por 15 géneros diferentes: *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Seadornavirus*, que afectan a vertebrados; *Cypovirus* y *Cardoreovirus* que afectan a invertebrados; *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Mimoreovirus* y *Oryzavirus* que afectan a plantas y *Dinovernavirus*, *Idnoreovirus* y *Mycoreovirus* que afectan a insectos (Tabla 2). Esta clasificación no se ha modificado en las últimas reuniones del Comité Ejecutivo del *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV).

FAMILIA	SUBFAMILIA	GÉNERO	ESPECIE TIPO
<i>Reoviridae</i>	<i>Sedoreovirinae</i>	<i>Cardoreovirus</i>	<i>Eriocheir sinensis reovirus</i>
		<i>Mimoreovirus</i>	<i>Micromonas pusilla reovirus</i>
		<i>Orbivirus</i>	<i>Virus de la lengua azul</i>
		<i>Phytoreovirus</i>	<i>Virus del tumor de las heridas</i>
		<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus A</i>
		<i>Seadornavirus</i>	<i>Virus Banna</i>
	<i>Spinareovirinae</i>	<i>Aquareovirus</i>	<i>Aquareovirus A</i>
		<i>Coltivirus</i>	<i>Virus de la fiebre de Colorado por garrapata</i>
		<i>Cypovirus</i>	<i>Cypovirus 1</i>
		<i>Dinovernavirus</i>	<i>Aedes pseudoscutellaris reovirus</i>
		<i>Fijivirus</i>	<i>Virus de la enfermedad de Fiji</i>
		<i>Idnoreovirus</i>	<i>Idnoreovirus 1</i>
		<i>Mycoreovirus</i>	<i>Mycoreovirus 1</i>
		<i>Orthoreovirus</i>	<i>Orthoreovirus de mamíferos</i>
		<i>Oryzavirus</i>	<i>Virus del arroz mellado atrofiado</i>

**Tabla 2. Géneros clasificados en la familia *Reoviridae*** (9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011, y 2018b Release [<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>]).

## INTRODUCCIÓN

---

Los rotavirus se clasifican en grupos o especies, subgrupos y tipos según las características de las proteínas de su cápside. Así, la proteína VP6, situada en la cápside intermedia, es la determinante de la especificidad de grupo y de subgrupo en este género. Además, gracias a su capacidad antigénica, esta proteína es la diana en la mayor parte de los análisis que se realizan como diagnóstico para la infección por rotavirus (ELISA, inmunocromatografía, aglutinación de partículas de látex). En la actualidad, los rotavirus se clasifican en 8 grupos denominados con las letras de la A a la H, aunque hay evidencia filogenética de que existe un noveno grupo, I (Mihalov-Kovács et al., 2015). Además, el grupo A se divide en 4 subgrupos denominados: I, II, I y II y ni I ni II (Matthijnssens et al., 2008). Los rotavirus del grupo A infectan tanto a humanos como a animales y son los responsables de la mayor parte de la morbilidad y mortalidad por rotavirus en humanos, lo que los convierte en el objetivo de los programas de vacunación actuales. Los grupos B, C, E, H e I se han aislado mayoritariamente en mamíferos domesticados, y los grupos D, F y G se han detectado preferentemente en aves (Dóro et al., 2015).

Las proteínas estructurales de la superficie del virus (VP7 y VP4) han sido utilizadas para clasificar a los rotavirus según el sistema binario de tipado G/P. Dependiendo del método utilizado para la detección de estas proteínas se nombra a los rotavirus como serotipos o como genotipos. Si el método utilizado es inmunológico (anticuerpos policlonales o monoclonales tipo-específicos dirigidos contra los epítomos antigénicos de las proteínas VP7 y VP4) se habla de serotipos (Coulson, 1996), mientras que si el método de detección es molecular (RT-PCR con cebadores tipo-específicos, así como secuenciación de los genes que codifican las proteínas VP7 y VP4) se denominan genotipos (Gouvea et al., 1990). Si nos basamos en la secuencia génica que codifica la

proteína VP7 (glicoproteína, G) se han descrito al menos 27 genotipos (G1 - G27). Si por el contrario, nos basamos en la secuencia génica que codifica la proteína VP4 (proteasa sensible, P) los rotavirus se subdividen en 37 genotipos (P[1] - P[37]) repartidos en 5 genogrupos (P[I] - P[V]). Así tenemos que los genogrupos P[I] y P[V] infectan principalmente animales, el genogrupo P[II] infecta exclusivamente a humanos (siendo los genotipos P[4], P[6] y P[8] los que producen el 90% de las infecciones) y los genogrupos P[III] y P[IV] infectan tanto humanos como animales (Matthijnsens et al., 2011). Según el *Rotavirus Classification Working Group* (RCWG), en su última actualización de 29 de mayo de 2019, existen 51 genotipos P y 36 genotipos G de rotavirus reconocidos ([www.rega.kuleuven.be/cev/viralmetagénomics/virus-classification/rcwg](http://www.rega.kuleuven.be/cev/viralmetagénomics/virus-classification/rcwg))

Los estudios de vigilancia epidemiológica de rotavirus han identificado como responsables de las infecciones en humanos 15 G-tipos (G1 - G6, G8 - G12, G14, G20, G24 y G26) y 17 P-tipos (P[1] - P[11], P[14], P[15], P[19], P[24], P[25] y P[28]) con cerca de 90 combinaciones G/P en todo el mundo (Dóro et al., 2015). Aunque cabría pensar que los genotipos G y P son independientes, existen asociaciones que se repiten con mayor frecuencia, como G1, G3 y G4 con el genotipo P[8] y G2 con P[4] (Gentsch et al., 1996). 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). Según esta clasificación, las cepas humanas más comunes son G1P[8] (31 - 53%), G2P[4] (10 - 13%), G3P[8] (5 - 11%), G4P[8] (5 - 14%), G9P[8] (10 - 11%) y G12P[8] (1 - 3%) (Dóro et al., 2015).

Otra posible forma de clasificar a los rotavirus se basa en las diferencias encontradas en los genes que codifican la proteína no estructural NSP4. Estos genes han sido estudiados tanto en cepas de origen animal como humano y hasta la actualidad se han descrito seis

## INTRODUCCIÓN

---

genotipos distintos de NSP4 (A - F). Los genotipos A, B, C y D se han detectado en mamíferos, mientras que los genotipos E y F se han hallado en aves. En los seres humanos, los genotipos aislados con mayor frecuencia han sido los genotipos A, B y C, especialmente el genotipo B (Ciarlet et al., 2000; Lin y Tian, 2003; Mori et al., 2002).

Actualmente existe un nuevo sistema de clasificación para rotavirus que utiliza la identidad de los 11 segmentos genómicos de ARN para definir los diferentes genotipos (Matthijssens et al., 2011; Matthijssens et al., 2008). En esta nueva nomenclatura, los rotavirus se nombran mediante el siguiente acrónimo: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, donde cada letra mayúscula va seguida de un número (x = número arábigo  $\geq 1$ ) que define el genotipo de los segmentos genómicos que codifican las proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 respectivamente. De esta forma, al estudiar los genomas completos de las distintas cepas de rotavirus se minimizan los errores de identidad y se evitan duplicaciones. Este nuevo sistema busca establecer un orden tanto para los genotipos actuales como para aquellos genotipos que se puedan descubrir en el futuro (Figura 3).

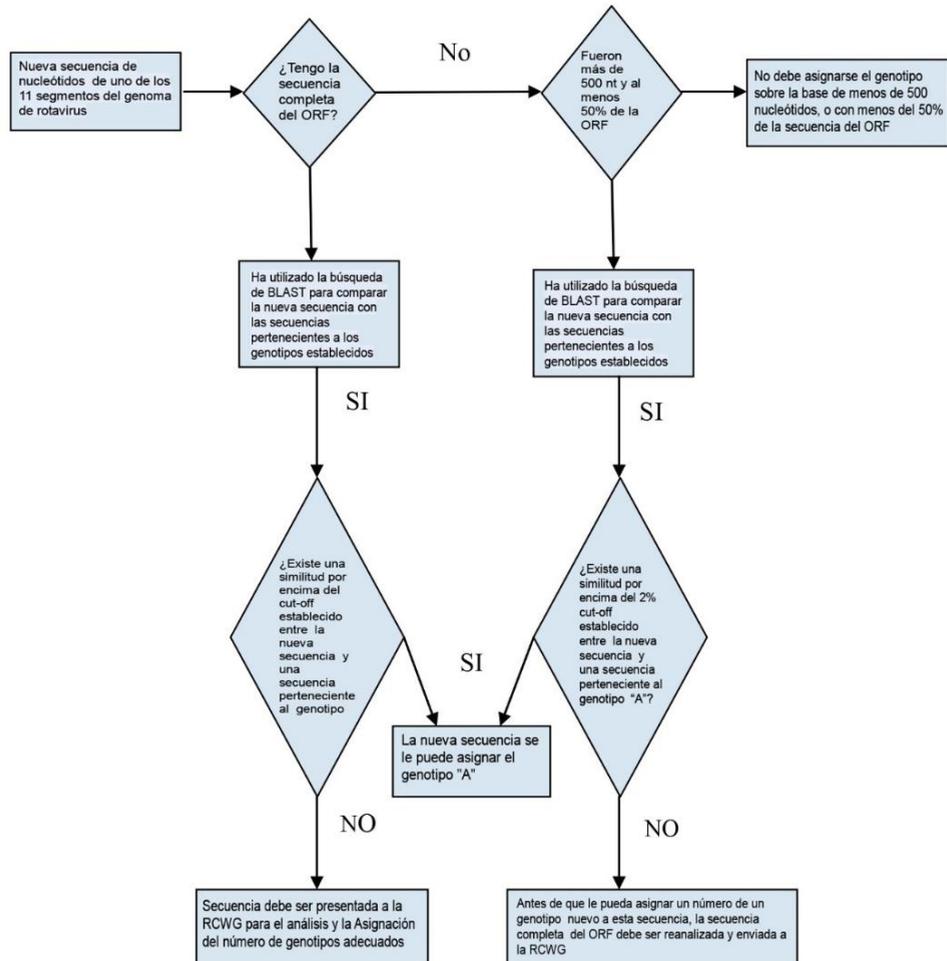


Figura 3. Diagrama de flujo para la clasificación de los genotipos de rotavirus según el RCWG (*Rotavirus Classification Working Group*).

Los genotipos VP7 y VP4 utilizados en este nuevo sistema de clasificación del genoma completo son los mismos que los descritos anteriormente en el sistema binario de tipado G/P. Los nueve segmentos genómicos restantes (también denominados genes internos) se utilizan para clasificar a los rotavirus en 3 constelaciones genotípicas: Wa-like o genotipo 1 (I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), DS-1-like o genotipo 2 (I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) y AU-1-like o genotipo 3 (I3-R3-C3-M3-A3-

## INTRODUCCIÓN

---

N3-T3-E3-H3) (Heiman et al., 2008). Para que una cepa de rotavirus se clasifique dentro de una constelación u otra al menos siete de sus once segmentos genómicos deben de coincidir con la cepa prototipo de ese genogrupo (cepa Wa, DS-1 y AU-1) (Matthijssens et al., 2008). Las cepas G1P[8], G3P[8], G4P[8] y G9P[8] habitualmente pertenecen a la constelación Wa-like (McDonald et al., 2009). Las cepas G2P[4] normalmente pertenecen a la constelación DS-1-like y las cepas G3P[9] a la constelación AU-1-like (Tabla 3) (Heiman et al., 2008; Jere et al., 2011).

Las cepas de rotavirus humanos tienen una estrecha relación con algunas cepas de rotavirus animales. Por un lado, las cepas humanas Wa-like parecen tener un origen común con rotavirus de origen porcino y por otro lado, existe una estrecha relación evolutiva entre las cepas humanas DS-1-like y cepas bovinas (Matthijssens et al., 2008) y las cepas AU-1-like con cepas felinas (Gauchan et al., 2015). Sin embargo, las cepas humanas con constelaciones puras de genes del genogrupo Wa-like ó DS-1-like son raramente aisladas en animales, lo que sugiere que son especialmente adecuadas para la replicación en humanos (Patton, 2012).

CEPA		ORIGEN							GENOTIPO						
		VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5			
Cepas comunes	Wa	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1			
	DS-1	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2			
	P	G3	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1			
	ST3	G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1			
	WI61	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1			
	Dhaka25-02	G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1			
Cepas vacunales	Rotarix RIX441	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1			
	Rota Teq W179-9	G1	P[5]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3			
	Rota Teq SC2-9	G2	P[5]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3			
	Rota Teq W178-8	G3	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3			
	Rota Teq BrB-9	G4	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3			
	Rota Teq W179-4	G6	P[8]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3			
Cepas inusuales	AU-1	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3			
	MWI	G8	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2			
	GR 10924/99	G9	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2			
	6717/2002/ARN	G10	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1			
	Dhaka 12-03	G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1			
	Cepas animales	SA11-H96	G3	P[2]	I3	R2	C5	M5	A5	N5	T5	E2	H6		
RRV		G8	P[3]	I2	R2	C3	M3	A9	N2	T3	E3	H6			
OSU		G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1			
WC3		G6	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3			

**Tabla 3. Constelaciones de genes de cepas de rotavirus comunes, vacunales, inusuales y animales.** Los genes correspondientes al genotipo 1 o Wa-like están marcados con verde, los genes correspondientes al genotipo 2 o DS-1-like están marcados con naranja y los correspondientes al genotipo 3 o AU-1-like con amarillo.

## INTRODUCCIÓN

---

### 1.2.4. Epidemiología. Epidemiología molecular. Distribución geográfica

Las infecciones por rotavirus tienen un carácter estacional en los climas templados, con un pico de incidencia en los meses de otoño-invierno y una disminución importante de su actividad en los meses de verano. Sin embargo, este carácter estacional no se observa en los climas tropicales, donde la infección se mantiene en niveles elevados durante todo el año, aunque con más intensidad en los meses fríos y secos (Patel et al., 2013).

La epidemiología molecular es un área de trabajo dentro de la investigación epidemiológica tradicional que integra métodos de biología molecular en sus estudios. Su objetivo es analizar la contribución de posibles factores de riesgo genéticos y ambientales a nivel molecular en la etiología, distribución y prevención de enfermedades en una población determinada.

El hecho de que rotavirus sea la principal causa de gastroenteritis aguda en niños pequeños promovió pronto la investigación epidemiológica de estas infecciones. Para ello se aplicaron diferentes técnicas moleculares con el objetivo de analizar los diferentes genotipos de rotavirus que circulaban en una zona geográfica determinada (imprescindible para el estudio de la evolución viral, su interacción con los huéspedes y el diseño y monitorización de planes de vacunación). Hasta mediados de los años 90, la detección de los serotipos G y P de rotavirus se realizaba mediante técnicas inmunológicas, utilizando anticuerpos monoclonales específicos (ELISA). El problema es que estas técnicas presentan limitaciones importantes, como son la necesidad de emplear un anticuerpo monoclonal para cada serotipo G, no poder cubrir variantes atípicas y la falta de un suministro adecuado de anticuerpos

anti-serotipo P fiables. En consecuencia, actualmente estas técnicas han sido prácticamente reemplazadas por otras nuevas que ofrecen mayor fiabilidad y adaptabilidad. Algunas de estas nuevas técnicas son: el análisis del ARN viral de las cepas de rotavirus mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) o la caracterización del genogrupo (“*genogrouping*”) mediante una combinación de hibridación de ácidos nucleicos corrida en geles de poliacrilamida. La descripción de perfiles o patrones electroforéticos por PAGE (electroforetipos) sirve para vigilar la diseminación de las distintas cepas de rotavirus en una zona geográfica, en un periodo de tiempo, caracterizar virus aislados de diferentes brotes epidémicos, etc. Por otro lado, la técnica del *genogrouping* ha permitido evidenciar relaciones de homología entre segmentos genómicos de distintas cepas de rotavirus (usado para clasificar a los rotavirus en genogrupos: tipo Wa “*Wa-like*”, tipo DS-1 “*DS-1-like*” y tipo AU-1 “*AU-1-like*”) e identificar el origen de algunos segmentos específicos del ARN viral en algunos rotavirus con reordenamientos genómicos, “reassortants” (tal y como ocurre en los rotavirus implicados en la transmisión interespecie) (Matthijnssens y Van Ranst, 2012).

Los rotavirus presentan una gran variabilidad geográfica, de manera que los genotipos más prevalentes en un área geográfica determinada pueden variar de una temporada a otra e incluso pueden circular simultáneamente diferentes genotipos en la misma zona durante una misma temporada (Iturriza-Gómara et al., 2011). Este hecho también ha sido descrito en nuestro país (Buesa et al., 2000; Téllez Castillo et al., 2010). En Europa, la Red Europea de Vigilancia de Rotavirus (EuroRotaNet) está proporcionando información sobre la diversidad de 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 su epidemiología molecular y la evolución genética.

## INTRODUCCIÓN

---

En los países desarrollados, las cepas de rotavirus responsables de la mayor parte de las infecciones en humanos son G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] y G12P[8] (Hungerford et al., 2016). En los países en vías de desarrollo, por el contrario, existe mayor diversidad, lo que origina que haya periodos de tiempo en los que no se puede identificar un único genotipo dominante en un área determinada (Armah et al., 2010). Además, son comunes las infecciones causadas por diferentes genotipos de rotavirus al mismo tiempo (infecciones mixtas), situación que favorece la formación de virus con reordenamientos (*reassortants*) que en ocasiones pueden originar combinaciones G/P atípicas o de origen zoonótico (Binka et al., 2011; Jere et al., 2011).

### 1.2.5. Mecanismos de evolución. Transferencia interespecie

Los rotavirus presentan un alto grado de diversidad genética entre las distintas cepas circulantes, tal y como sucede con otros virus ARN (Sanders, 1985). A pesar de que existen combinaciones G/P típicas de rotavirus para cada especie animal, se ha documentado la circulación de algunas cepas humanas recombinantes que poseen combinaciones infrecuentes o segmentos genómicos adquiridos de cepas animales (Steyer et al., 2008). Gracias a técnicas como el mapeo de oligonucleótidos o el análisis de hibridación se ha podido comprobar que estas variaciones pueden responder a tres mecanismos diferentes: (1) “*drift*” (derivadas o deslizamientos); las mutaciones puntuales son frecuentes en todos los segmentos genómicos del rotavirus. La tasa de mutación calculada para algunos segmentos es de  $5 \times 10^{-5}$  mutaciones por repetición, originando por lo menos una mutación en cada nuevo genoma de rotavirus. Estas mutaciones pueden acumularse y dar lugar a

variaciones intratípicas (identificadas como linajes dentro de los genes que codifican las proteínas VP7 y VP4) o dar lugar a cambios antigénicos (ocasionando la aparición de mutantes de escape para anticuerpos neutralizantes) (Blackhall et al., 1996; Hemming y Vesikari, 2014), (2) “*shift*” (saltos o cambios bruscos); la infección de una misma célula por dos o más cepas diferentes de rotavirus puede producir multitud de virus recombinantes o con reordenamientos (*reassortants*), con segmentos de ARN de cada uno de los virus progenitores (Figura 4A). Al mismo tiempo, estos reordenamientos genómicos, a través de alteraciones en la interacción proteína-proteína, pueden originar cambios en los epítomos conformacionales que contribuyen a la evolución de los tipos antigénicos (Iturriza-Gómara et al., 2001). Los reordenamientos son más frecuentes entre cepas de un mismo genogrupo (constelación genotípica) que entre cepas de diferente genogrupo (reordenamiento intergrupo), donde se cree que las diferencias que existen en el extremo 3' del ARN viral de los distintos grupos dificultan el intercambio de material genético (McDonald et al., 2009). Existe una evidencia creciente de que estos reordenamientos se llevan a cabo “in vivo”. Así, la transmisión entre especies y la consiguiente aparición de fenómenos de recombinación entre rotavirus animales y humanos ocasionarían un aumento en la diversidad de las cepas circulantes de rotavirus (Luchs y Timenetsky, 2014; Mullick et al., 2013) (3) “*rearrangement*” (reorganización); consiste en un proceso de duplicación (concatenación) o delección (truncamiento) de parte de un segmento genómico del virus (recombinación intragénica). No está claro el mecanismo por el que se producen, pero se cree que se debe a una disociación y reasociación de la ARN polimerasa viral con la hebra molde durante la transcripción (Navarro et al., 2013). Este reordenamiento genético puede originar la producción de nuevas proteínas (con funciones que pueden estar alteradas) contribuyendo de esta forma a la evolución de los rotavirus (Desselberger, 1996).

## INTRODUCCIÓN

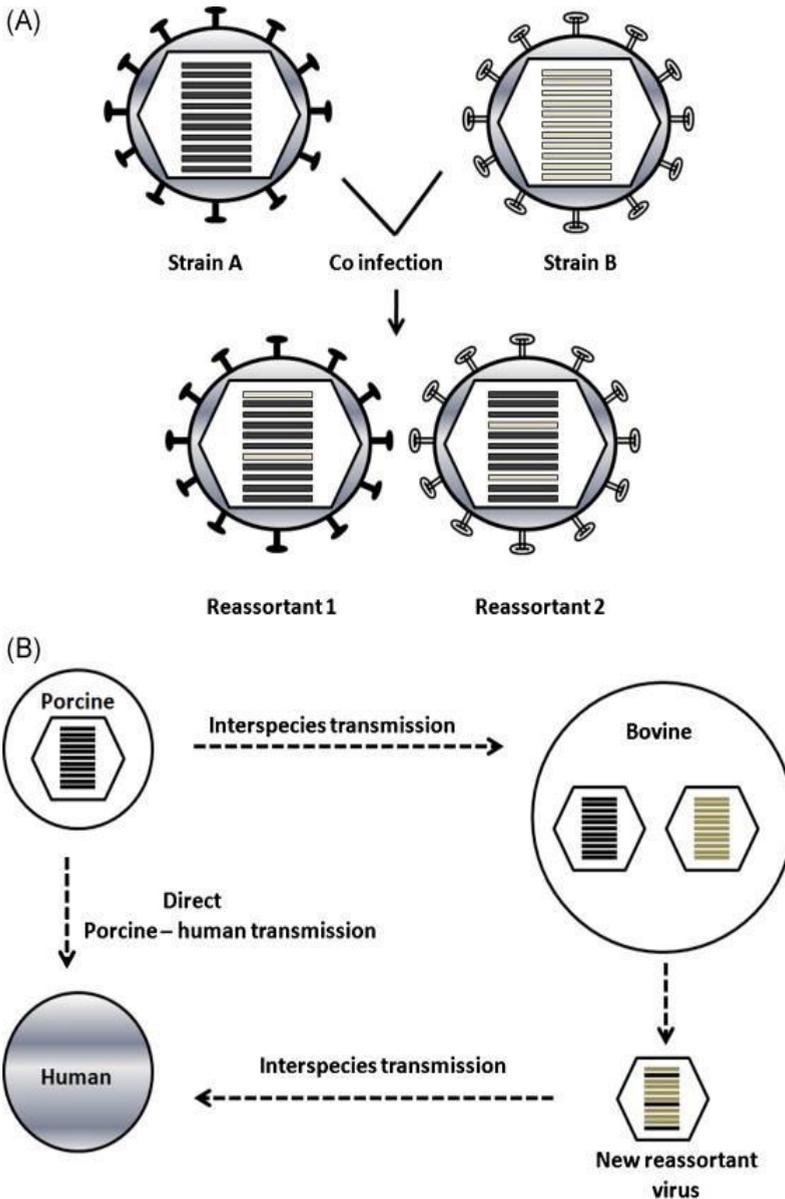
---

El mecanismo principal de evolución del rotavirus parece ser el de las mutaciones puntuales, aunque estos cambios no tienen por qué ocurrir de forma aislada, pudiendo existir una mezcla de diferentes mecanismos en un mismo virus.

La transferencia interespecie puede producirse de manera directa o mediante reordenamiento genético (Figura 4B) cuando se produce una infección simultánea (coinfeción) del huésped con una cepa de rotavirus animal y otra de rotavirus humano (Martella et al., 2010). La adquisición por parte de los rotavirus de animales de genes de rotavirus humanos podría mejorar su eficiencia replicativa en humanos, facilitando así su diseminación a nivel global (Dóro et al., 2015; Maestri et al., 2012). Sin embargo, las constelaciones genómicas de las cepas de rotavirus de animales son habitualmente únicas y diferentes de las constelaciones genómicas de las cepas de rotavirus humanos (Matthijssens et al., 2012). Esto refleja la coevolución de los rotavirus con su huésped natural, fenómeno conocido como coespeciación. Proceso que podría explicar el hecho de que las infecciones zoonóticas no deriven en brotes a gran escala en humanos (Martella et al., 2010).

Las infecciones por cepas de rotavirus animal son más frecuentes en los países en vías de desarrollo que en los países desarrollados, debido a la mala calidad del suministro de agua y al hecho de compartir espacio vital con animales domésticos (Cook, 2004). La transmisión de cepas de rotavirus animal a humanos puede ocurrir directamente mediante contacto estrecho con animales o indirectamente mediante contacto con fómites contaminados. Además, el agua con contaminación fecal puede contener, al mismo tiempo, cepas de rotavirus humano y animal, facilitando así las infecciones simultáneas y por tanto, las oportunidades para que se produzcan reordenamientos genéticos *in vivo* (Dóro et al., 2015; Jain et al., 2014).

A pesar de que los humanos son susceptibles a la infección por cepas de rotavirus de especies animales, la infección sintomática con estas cepas suele ser rara (Arana et al., 2016; Park et al., 2011). El hecho de que la vigilancia de cepas circulantes se centre principalmente en pacientes enfermos y que las infecciones por cepas de rotavirus animal tiendan a ser menos virulentas en humanos, hace posible que los casos documentados de transmisión de rotavirus interespecie representen solamente la punta del iceberg.



**Figura 4. Reordenamiento genético y transmisión interespecie.** (A) Reordenamiento genético. La co infección de una misma célula por dos cepas diferentes de rotavirus (A y B) resulta en la aparición de nuevos virus recombinantes originados por el intercambio de segmentos génicos entre los virus progenitores. (B) Transmisión interespecie. La transmisión directa del rotavirus animal a humanos o el intercambio de segmentos génicos entre rotavirus de diferentes especies resulta en la aparición de nuevas cepas de rotavirus que pueden infectar a humanos (Jain et al., 2014).

### 1.2.6. Transmisión de la infección

Los rotavirus se pueden replicar en cultivos celulares de forma estable cuando se mantienen a una temperatura de 20 a 40°C, con una concentración 1'5 mM de calcio y a un rango de pH de 3 a 9. La línea celular clásicamente utilizada para su cultivo ha sido MA104 con la incorporación de tripsina (1 µg/ml) al medio (Ramia y Sattar, 1980; Wyatt et al., 1983). La cepa de simio SA11 es estable a valores de pH entre 3'3 y 10, y no se inactiva por éter, cloroformo, fluorocarbonos, proteasas ni ciclos de congelación-descongelación. Además, se ha demostrado que los rotavirus sobreviven al tratamiento estándar con cloro en depósitos de agua contaminada (Smith y Gerba, 1982). Sin embargo, los rotavirus pierden infectividad después de su incubación en Cl<sub>2</sub>Mg, Cl<sub>2</sub>Ca, EDTA o tras calentamiento en ClNa durante 15 minutos a 50°C, así como bajo la acción de agentes quelantes del calcio (producen la pérdida de su cápside externa) (Estes et al., 1979). Entre los desinfectantes más efectivos frente a rotavirus se encuentran el etanol al 95% y el hipoclorito sódico (Abad et al., 1994; Tan y Schnagl, 1983).

Los rotavirus son considerados agentes virales muy contagiosos por diferentes razones: 1ª) Poseen una baja ratio de infección (número partículas virales / número unidades infectantes) lo que significa que son necesarios muy pocos virus para producir infección en un individuo susceptible. Se estima que la dosis infectiva es de 100 a 1000 partículas virales (Graham et al., 1987; Ward et al., 1986). 2ª) Se eliminan con las heces en concentraciones muy elevadas. Un niño puede excretar rotavirus en sus heces o vómitos (en número de 10<sup>11</sup> partículas/g heces) desde 2 días antes hasta 10 días después del inicio de los síntomas (Ward et al., 1984) o incluso durante más tiempo en individuos inmunocomprometidos (Patel et al., 2010), en los que las infecciones

## INTRODUCCIÓN

---

pueden llegar a ser persistentes (Riepenhoff-Talty et al., 1987). 3ª) Son muy resistentes a las condiciones medioambientales, pudiendo sobrevivir durante días en algunas superficies inertes y durante horas en las manos (Keswick et al., 1983).

El mecanismo de transmisión de la infección por rotavirus es fecal-oral, bien sea de forma directa entre individuos o de forma indirecta mediante fómites contaminados. El periodo de incubación es de 24 a 72 horas. Los lugares más habituales donde se puede adquirir la infección, llegando en ocasiones a crear verdaderos brotes epidémicos, son las guarderías, las residencias de ancianos e incluso los hospitales, donde las infecciones nosocomiales son difíciles de erradicar (Dennehy et al., 2006; Gleizes et al., 2006).

### 1.2.7. Replicación vírica

Los rotavirus del grupo A infectan a enterocitos maduros de las porciones distal y media de las vellosidades del intestino delgado de humanos y animales (Ramig, 2004). Para que se produzca la infección, el rotavirus debe adherirse a la membrana celular de los enterocitos e introducir su ARN en el citoplasma mediante una serie de mecanismos complejos (Figura 5). La penetración en la célula de la partícula infecciosa de rotavirus (TLP) se produce tanto por penetración directa de la membrana celular (Ludert et al., 1987) como por endocitosis mediada por receptor (López y Arias, 2004). En este último caso, la porción VP8\*, parte distal de la espícula del virión formada por la proteína VP4, interacciona con un glicano de la membrana celular del enterocito que contiene residuos de ácido siálico (sialorreceptor) (Dormitzer et al., 2002) o bien interacciona con los antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) expresados en

la superficie celular (Huang et al., 2012). Esto induce un cambio conformacional en VP4 que hace que VP5\*, la porción proximal de la espícula, se exponga en la superficie del virus. Una vez en esta posición, VP5\* realiza complejos mecanismos de readaptación en la membrana de la célula para conseguir la fusión de ésta con la capa superficial del virus (López y Arias, 2004). Tras el acoplamiento inicial, otras moléculas de la superficie celular pueden actuar como co-receptores virales, como es el caso de algunas integrinas que reaccionan con VP5\* o VP7 (Gutiérrez et al., 2010) o la proteína humana del shock térmico 70 (Hsc70) que interacciona con VP5\* (Pérez-Vargas et al., 2006). Una vez internalizado el virión en la célula, éste es transportado por el citoplasma mediante endosomas con un bajo nivel de calcio, lo que da lugar a la pérdida del revestimiento de las TLPs, convirtiéndose en partículas de doble capa (DLPs) (Ludert et al., 1987). Las DLPs atraviesan la membrana endosomal y salen al citoplasma, donde se vuelven transcripcionalmente activas y sintetizan segmentos de ARN de una sola hebra de sentido (+) no-poliadenilados con capuchón (5'cap) gracias a las enzimas virales VP1 (ARN polimerasa ARN dependiente) y VP3 (enzima de "capping" con actividad fosfodiesterasa, guanililtransferasa y metilasa) (Cohen et al., 1997). Estos ARN recién sintetizados abandonan las DLPs a través de los canales existentes en la estructura del virus y, una vez en el exterior, se utilizan como molde para la creación de ARN viral de doble cadena o para la producción de nuevas proteínas virales (McDonald y Patton, 2011).

La replicación viral se realiza en distintas regiones del citoplasma de la célula huésped que poseen diferentes concentraciones de calcio (Estes et al., 2001). El primer paso en la replicación es la creación de unas nuevas estructuras, llamadas viroplasmos, localizadas cerca del núcleo y el retículo endoplasmático y que actúan como fábricas virales que

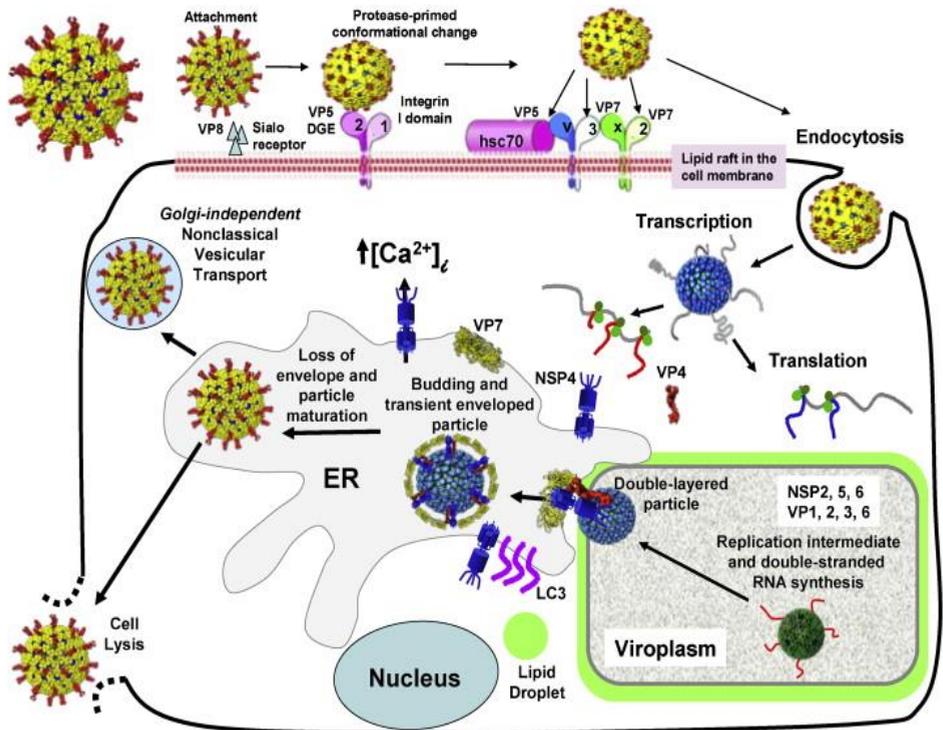
## INTRODUCCIÓN

---

contienen todos los componentes necesarios para la replicación y el empaquetado inicial del nuevo genoma viral. Estos viroplasmos están compuestos principalmente por las proteínas virales NSP2 y NSP5, que rodean a las partículas DLPs activas y a los productos de su transcripción (Pesavento et al., 2006). Los mecanismos exactos que producen la encapsidación del ARN viral no están del todo aclarados, pero se cree que las proteínas NSP2 y NSP5 actúan sobre el complejo transcriptor de VP2-VP1-VP3, favoreciendo la creación del *core* viral (Berois et al., 2003). Una vez formadas las partículas de capa única o *core* se recubren rápidamente por la proteína VP6 dando lugar a las partículas de doble capa, DLPs (Desselberger et al., 2013). Las DLPs recién formadas abandonan el viroplasma y viajan hasta el retículo endoplasmático para terminar allí su maduración. En este proceso, las proteínas NSP4, presentes en la membrana del retículo endoplasmático, actúan a modo de receptor e interactúan con VP6 (Taylor et al., 1996). La internalización ocurre por gemación y, durante este proceso, las partículas virales adquieren transitoriamente una cubierta lipídica que contiene la proteína estructural VP7. Al mismo tiempo, se produce la internalización desde el citoplasma celular de la otra proteína externa, VP4, probablemente a través de una asociación con NSP4 y/o VP7, pero se desconocen los detalles de cómo se produce este proceso. Finalmente, y dentro del retículo endoplasmático, se produce la exclusión de NSP4 y de los lípidos de la membrana. Al mismo tiempo, las proteínas VP7 y VP4 son reubicadas sobre la superficie de las partículas virales formando la última capa proteica o cápside externa (60 trímeros de VP4 y 260 trímeros de VP7) dando lugar así a las partículas virales de triple capa (TLPs) totalmente desarrolladas. El tiempo de producción de estos viriones maduros es de 10 - 12 horas (Estes y Greenberg, 2013). Finalizado el proceso completo de formación de los viriones se produce su liberación al espacio extracelular, mediante lisis celular en el caso de las células no

polarizadas MA104 (McNulty et al., 1976) o por un proceso de gemación, que no implica la muerte inmediata de la célula, en el caso de las células epiteliales del intestino (Gardet et al., 2006). Una vez en el espacio extracelular, los rotavirus recién creados pueden infectar a las células vecinas dando lugar así a una continua replicación y excreción que deriva en una elevada carga viral para el individuo.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 5. Ciclo de infección y replicación de rotavirus.** Las partículas de triple capa (TLPs) de rotavirus penetran en la célula mediante endocitosis directa o con la ayuda de receptores celulares (sialorreceptores o HBGAs). En este proceso se produce la pérdida de la capa externa del virión dando lugar a las partículas de doble capa (DLPs) que son transcripcionalmente activas y producen moléculas ARNm (+) presentes en el citoplasma celular. Las moléculas de ARNm son traducidas para sintetizar las proteínas virales necesarias para el ensamblaje del virión o para la síntesis del genoma viral (ARN de doble cadena). La replicación y ensamblaje inicial de los componentes del virus ocurre en el viroplasma, donde se producen las nuevas partículas de doble capa. Estas partículas viajan hasta el retículo endoplasmático para su maduración y allí adquieren la capa proteica más externa formando de nuevo las partículas de triple capa. Finalmente, los viriones maduros salen de la célula mediante lisis celular o por un proceso de gemación (Estes y Greenberg, 2013).

### 1.2.8. Fisiopatogenia y manifestaciones clínicas

La mayor parte de las infecciones por rotavirus ocurren antes de los 3 a 5 años de edad, con un pico máximo de incidencia entre los 4 y los 24 meses de vida. Aunque se detectan infecciones neonatales, éstas suelen ser asintomáticas o leves, probablemente debido a la protección indirecta que ofrecen los anticuerpos maternos (Parashar et al., 2013). En el adulto sano, las infecciones por rotavirus suelen ser asintomáticas o leves en la mayoría de las ocasiones, pero pueden llegar a ser graves en inmunodeprimidos y en ancianos (Anderson y Weber, 2004).

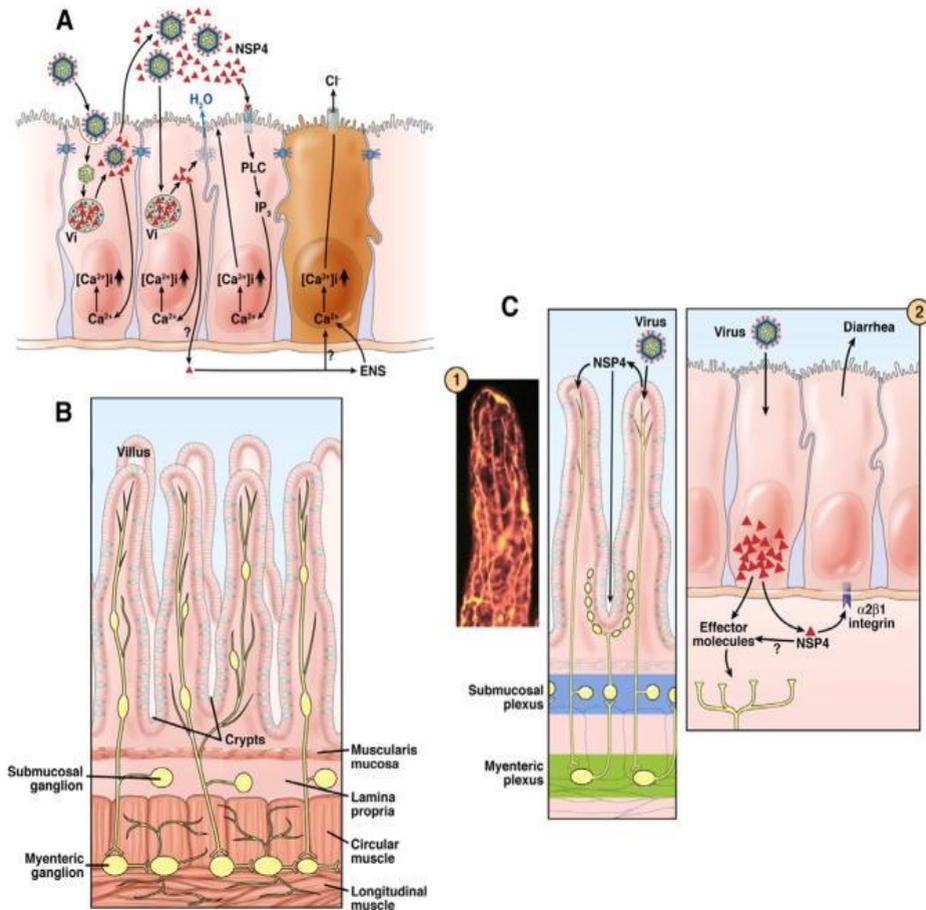
Los rotavirus infectan principalmente a los enterocitos maduros situados en la zona distal y media de las microvellosidades intestinales de los mamíferos, produciendo su muerte y desprendimiento (Ramig, 2004). La pérdida de estas células absorptivas y la proliferación de las células secretoras en las criptas producen efectos de malabsorción e hipersecreción intestinal (Boshuizen et al., 2003). Al mismo tiempo, la proteína viral no estructural 4 (NSP4) actúa como enterotoxina directa produciendo disminución en la expresión de las enzimas absorptivas, alterando las uniones intercelulares de los enterocitos y activando el sistema nervioso entérico. Estos cambios derivan en un aumento de la motilidad e hipersecreción intestinal que originan una diarrea secretora (Greenberg y Estes, 2009). Por otro lado, la pérdida de las enzimas sacarasa e isomaltasa, situadas en el borde en cepillo de las vellosidades, condiciona una acumulación de azúcares no digeridos en la luz intestinal que aumenta el gradiente osmótico, lo que favorece a su vez el incremento de la secreción intestinal (Parashar et al., 2013). Todos estos mecanismos son los responsables de la diarrea secretora observada en las infecciones por rotavirus (Figura 6).

## INTRODUCCIÓN

---

El mecanismo fisiopatológico que explica la aparición de vómitos en la gastroenteritis por rotavirus es consecuencia de la infección de las células enterocromafines del intestino delgado. El virus estimula la producción por parte de estas células intestinales de serotonina, que a su vez activa los nervios vagales aferentes y las estructuras cerebrales que controlan el vómito (Hagbom et al., 2011).

Inicialmente se creía que la infección por rotavirus se limitaba a los enterocitos de la mucosa intestinal, pero diferentes estudios han demostrado tanto la presencia de viremia como de ARN viral o partículas infectivas en otras localizaciones del cuerpo (Blutt et al., 2003; Blatt y Conner, 2007). Aunque la relevancia clínica de estos hallazgos en individuos inmunocompetentes es todavía controvertida, podría explicar las manifestaciones clínicas extraintestinales de la infección por rotavirus en estos pacientes (Fenau et al., 2006; Liu et al., 2011). En individuos inmunocomprometidos, los rotavirus pueden replicar en el hígado, en la vía biliar y en el páncreas originando atresia biliar y pancreatitis (Feng et al., 2008; Gilger et al., 1992).



**Figura 6. Mecanismo de producción de diarrea por rotavirus.** A) Secuencia de acontecimientos que ocurren en el interior de los enterocitos tras sufrir infección por rotavirus, mostrados de izquierda a derecha: 1) Infección del enterocito y replicación del rotavirus con excreción de nuevos virus y proteínas virales (NSP4, triángulo rojo) a la luz intestinal. A nivel intracelular, NSP4 induce la liberación de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) desde el retículo endoplasmático aumentando la concentración de calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 2) NSP4 altera la unión intercelular de los enterocitos facilitando el flujo paracelular de agua y electrolitos a la luz intestinal (flecha azul) 3) la NSP4 intraluminal se une a receptores celulares específicos y activa la cascada de la fosfolipasa C (PLC) e inositol-fosfatasa (IP) que producen liberación de calcio intracelular aumentando aún más su concentración en la célula. 4) las células de las criptas (marrón) son estimuladas directamente por NSP4, o de forma indirecta, por medio de la activación del sistema nervioso entérico (ENS) aumentando su concentración de calcio intracelular y facilitando la secreción de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) a la luz intestinal.

## INTRODUCCIÓN

---

La infección por rotavirus suele manifestarse, en la mayor parte de las ocasiones, en forma de gastroenteritis aguda. La gastroenteritis por rotavirus presenta un amplio abanico de manifestaciones clínicas que pueden variar, desde una leve sintomatología infecciosa con diarrea moderada y de corta duración, hasta un cuadro severo con diarrea frecuente y profusa, vómitos continuados y fiebre elevada. En este último caso, el paciente puede llegar a presentar deshidratación grave o alteraciones hidroelectrolíticas capaces de producir shock o muerte. La gastroenteritis aguda por rotavirus suele comenzar de forma brusca con fiebre y vómitos, que ceden habitualmente en las primeras 24 - 48 horas y dan paso a una diarrea líquida y frecuente que suele persistir durante 3 - 7 días, para luego desaparecer sin dejar secuelas (WHO, 2013). Aunque es común que un individuo pueda sufrir varias infecciones por rotavirus a lo largo de su vida, los síntomas que aparecen son más leves con cada infección (Velázquez et al., 1996).

---

B) Estructura normal del intestino delgado (sin el sistema circulatorio). Localización del sistema nervioso entérico (ENS) y de sus ganglios nerviosos en la submucosa intestinal. C) Estructura del sistema nervioso entérico (ENS) capaz de recibir señales del epitelio veloso y activar el epitelio de las criptas. La imagen 1 muestra una vellosidad intestinal de un ratón adulto marcada con anticuerpos contra productos neuroendocrinos que revelan la rica inervación nerviosa que recibe (amarillo). La figura 2 muestra como los enterocitos infectados de las microvellosidades intestinales pueden estimular el sistema nervioso entérico (ENS) mediante la liberación basolateral de NSP4 o de otras moléculas efectoras. NSP4 puede a su vez unirse a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y provocar diarrea en neonatos de ratón (Ramig, 2004).

Otras posibles formas clínicas de manifestarse la infección por rotavirus, aunque menos frecuentes, son las alteraciones neurológicas (convulsiones benignas, encefalitis, cerebelitis) (Le Saux et al., 2010; Martí et al., 2010; Ramig, 2007) o algunas enfermedades con las que todavía no ha podido establecerse una relación causal, pero aparecen relacionadas con la infección por rotavirus, como es el síndrome de muerte súbita del lactante, la enterocolitis necrotizante, la invaginación intestinal, la atresia biliar, la enfermedad de Kawasaki o la diabetes mellitus tipo I (Parashar et al., 2013).

La mortalidad asociada a la infección por rotavirus se debe principalmente a la deshidratación severa con fallo cardiovascular que puede llegar a producir. Aunque las cifras de mortalidad son bajas en los países desarrollados gracias, entre otras cosas, a la rápida instauración de las medidas adecuadas de rehidratación. La mortalidad en países de África subsahariana y sudeste asiático es muy elevada debido a la dificultad que tiene la población para acceder a los cuidados médicos necesarios (Tate et al., 2012). Además, la infección por rotavirus es la principal causa de hospitalización por gastroenteritis en cualquier región del mundo analizada (Lanata et al., 2013). Por otro lado, en individuos inmunocomprometidos, la infección por rotavirus puede ser más grave, prolongada en el tiempo y con posibilidad de diseminación sistémica (Gilger et al., 1992). En individuos sanos, se consideran factores de riesgo de sufrir hospitalización e infecciones graves por rotavirus la prematuridad, el bajo peso al nacimiento y el fallo en la lactancia materna (Newman et al., 1999).

### 1.2.9. Diagnóstico de laboratorio

Las características de la gastroenteritis causada por rotavirus son indistinguibles, en términos clínicos, de las producidas por otros agentes enteropatógenos, por lo tanto, debemos recurrir a técnicas de laboratorio para poder diferenciarlas. Los rotavirus pueden detectarse en muestras de heces de pacientes con gastroenteritis por diferentes técnicas de laboratorio como microscopía electrónica, electroforesis en gel de poliacrilamida, detección de antígenos por inmunoensayo, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) o aislamiento del virus (Iturriza-Gómara, Kang, y Gray, 2004).

En la Unidad de Urgencias Médicas no se realiza de forma rutinaria el diagnóstico etiológico de la gastroenteritis porque en la mayor parte de las ocasiones el resultado de estos análisis no modifica el tratamiento médico a instaurar (Parashar et al., 2013). No obstante, cuando se necesita un diagnóstico etiológico las técnicas más utilizadas son los test de inmunoensayo tipo ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) o los test de inmunocromatografía o de difusión lateral, que presentan una alta sensibilidad y especificidad (90 - 95%) (Thomas et al., 1988). En los laboratorios de investigación se utiliza preferiblemente la RT-PCR para detectar el genoma viral, pues permite obtener información sobre los genotipos G y P del rotavirus infectante (Iturriza-Gómara, Kang, y Gray, 2004).

El diagnóstico diferencial debe realizarse principalmente con las infecciones por calicivirus (norovirus, sapovirus), astrovirus, adenovirus entéricos y Aichi virus, para ello puede utilizarse RT-PCR múltiple (Liu et al., 2011). En los individuos inmunocomprometidos, debemos descartar además de los anteriores otros virus patógenos como picobirnavirus,

citomegalovirus y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Desselberger y Gray, 2013).

### 1.2.10. Tratamiento de la infección

Los síntomas más habituales en la gastroenteritis aguda por rotavirus en los niños son vómitos, diarrea y fiebre. Estos síntomas son inespecíficos, no obstante, diversos estudios han demostrado que las gastroenteritis agudas asociadas a rotavirus son más severas, con mayor deshidratación y mayor incidencia de vómitos y fiebre que aquellas gastroenteritis en las que no se ha aislado el virus (Dennehy, 2013). Actualmente, no existe un tratamiento antiviral específico, por lo tanto, el tratamiento debe estar encaminado a solventar estos problemas y reinstaurar la homeostasis corporal lo antes posible.

### **Rehidratación y alimentación**

Las medidas habituales para el tratamiento de la gastroenteritis aguda por rotavirus incluyen la administración de fluidos y electrolitos para prevenir o tratar la deshidratación y la reintroducción temprana de la alimentación enteral (King et al., 2003). La rehidratación vía oral es la pauta de elección siempre que sea posible, recurriendo al sondaje nasogástrico si es necesario por vómitos incoercibles. La OMS recomienda, para el uso en niños, una solución de rehidratación oral con baja osmolaridad (75 mmol/L de sodio, 75 mmol/L de glucosa y 224 mmol/L de osmolaridad total) (WHO, 2005). La rehidratación intravenosa se reserva para los casos severos en los que el paciente está letárgico, en shock o pre-shock, o bien presenta íleo paralítico intestinal o malabsorción de la glucosa (Hartling et al., 2006; Nelson et al., 2003). La reintroducción precoz de la alimentación oral es otra de las bases del

## **INTRODUCCIÓN**

---

tratamiento, ayuda a la reparación de la mucosa intestinal dañada y acorta el tiempo de enfermedad. Se ha observado que la instauración de la alimentación completa habitual del niño tras 4 horas de rehidratación oral conduce a una mayor ganancia de peso y no prolonga la duración de la diarrea ni aumenta la incidencia de intolerancia a la lactosa. No obstante, se deben evitar alimentos con alto contenido en azúcares elementales, que pueden empeorar la diarrea por su efecto osmótico (Gregorio et al., 2011). Los lactantes alimentados exclusivamente con leche de fórmula pueden ser realimentados con la misma fórmula o leche sin diluir y aquellos alimentados con lactancia materna exclusiva pueden continuarla sin ninguna restricción (WHO, 2005). En nuestro medio, en la mayor parte de los niños con diarrea no está indicada una fórmula sin lactosa, hipoalergénica o hidrolizada. La leche sin lactosa solo estaría indicada en los casos de diarrea prolongada o recidivante que presentan un pH menor de 5'5 y/o la presencia de más de un 0'5% de sustancias reductoras en el análisis de heces (Dalby-Payne y Elliott, 2011). Por otro lado, en países en vías de desarrollo donde los niños están afectados de desnutrición, la suplementación con zinc reduce de manera significativa la gravedad de la diarrea y la recurrencia de nuevos episodios. Sin embargo, no hay suficiente evidencia científica para su uso de forma habitual en niños normnutridos (Lazzerini y Wanzira, 2016).

### **Terapia adyuvante**

La elevada incidencia y, en algunos casos, severidad de la infección por rotavirus justifica la búsqueda de otras modalidades de tratamiento que se asocien a las medidas habituales de rehidratación y alimentación precoz. Por ello, se han propuesto múltiples opciones de tratamiento, pero pocas de ellas han demostrado su eficacia real. De manera que, los fármacos habitualmente utilizados en estos procesos como son los inhibidores de la motilidad intestinal (loperamida, opiáceos

y anticolinérgicos), moduladores de la secreción intestinal (sales de bismuto) y sustancias adsorbentes (colestiramina y sales de aluminio), no están indicados en la población infantil por no haberse demostrado su eficacia y por la posibilidad de producir importantes efectos secundarios (American Academy of Pediatrics, 1996).

En los países desarrollados, se ha demostrado el papel que representan algunos probióticos intestinales asociados a la terapia de rehidratación oral en la mejoría de la gastroenteritis aguda. Este es el caso de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) y *Saccharomyces boulardii* que administrados en una dosis diaria de 10.000 millones de unidades formadoras de colonias (UFC) reducen el riesgo de diarrea prolongada y los días de hospitalización por esta enfermedad (Guandalini, 2011).

Otros estudios han demostrado la efectividad de fármacos como la nitazoxanida (agente antimicrobiano con actividad frente a bacterias anaerobias, *Cryptosporidium parvum* y algunos protozoos) para el tratamiento de la gastroenteritis por rotavirus en niños mayores de 1 año de vida. Los resultados obtenidos indican que se produce una significativa disminución en el tiempo de resolución de los síntomas (La Frazia et al., 2013; Rossignol y El-Gohary, 2006; Teran et al., 2009). Sin embargo, son necesarios más estudios antes de considerar el uso rutinario de este fármaco para el tratamiento.

El mecanismo de infección de algunos agentes virales se ha relacionado con el estrés oxidativo de la célula huésped. Estas reacciones redox también parecen estar implicadas en la infección por rotavirus, por lo que se postula que el uso de la N-acetilcisteína en dosis de 60 mg/kg/día – similar a la utilizada para las infecciones respiratorias de los niños – podría actuar como agente inhibidor de la infección por el virus (Guerrero et al., 2014).

## INTRODUCCIÓN

---

Otro posible tratamiento se basa en el uso del racecadotril, un fármaco antisecretor que actúa inhibiendo la encefalinasa intestinal, enzima que degrada los opioides endógenos (encefalinas). Estos opioides estimulan el receptor delta antisecretor y reducen así la hipersecreción de agua y electrolitos en la luz intestinal (que ocurre por activación del sistema nervioso entérico tras la infección por rotavirus), sin disminuir el peristaltismo intestinal ni facilitar el sobrecrecimiento bacteriano. Estudios disponibles concluyen que, añadido a la rehidratación oral, es eficaz en el tratamiento sintomático de la diarrea porque disminuye su intensidad y duración, con escasos efectos adversos (King et al., 2003; Szajewska et al., 2007). Sin embargo, se aconseja realizar estudios prospectivos bien diseñados para valorar la seguridad y eficacia de estos tratamientos en niños no ingresados.

Los fármacos antieméticos no son necesarios, de forma rutinaria, en el tratamiento de la gastroenteritis aguda. El ondansetrón, antagonista selectivo de los receptores de serotonina, puede ser efectivo en ocasiones disminuyendo los vómitos y limitando la necesidad de ingreso hospitalario. A propósito de este tema, la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN, *European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) considera que no existe evidencia científica suficiente para recomendar su uso de forma rutinaria (aunque podría valorarse su empleo en casos seleccionados), pudiendo incluso aparecer, como efecto secundario, un aumento en el número de deposiciones (DeCamp et al., 2008). Sin embargo, un trabajo de investigación reciente indica la posibilidad de que los beneficios del ondansetrón pueden ser diferentes según sea la etiología de la gastroenteritis a tratar. De acuerdo con este estudio, el uso de ondansetrón disminuye los vómitos y la diarrea en 2 días de media en las gastroenteritis virales, en las que se activan

mecanismos serotoninérgicos causantes de la sintomatología, pero no así en las gastroenteritis bacterianas, en las que los vómitos se producen por la activación de otro tipo de mecanismos (Hagbom et al., 2017). Los autores concluyen que los beneficios potenciales de su uso, además de acortar el tiempo de enfermedad, serían una disminución en los días de hospitalización, menor número de días de diseminación viral y por lo tanto, un importante ahorro económico.

Actualmente existen otras líneas de investigación, con estudios experimentales en animales, que estudian el uso de ciertas sustancias antivirales tanto para la profilaxis como para el tratamiento de la infección por rotavirus. En estos estudios se utilizan soluciones orales con altas concentraciones de anticuerpos antirrotavirus obtenidos de animales o de la modificación genética de algunos vegetales para conseguir el efecto antiviral deseado (Aladin et al., 2012; Juárez et al., 2012; Kang, 2013; Tokuhara et al., 2013; Vega et al., 2015).

### 1.2.11. Prevención. Vacunas

Desde el descubrimiento, hace más de 40 años, del rotavirus como un importante patógeno intestinal con una elevada morbimortalidad en niños de todo el mundo, científicos y médicos han unido fuerzas para desarrollar medidas de prevención efectivas frente a la infección por este virus.

Rotavirus infecta en igual proporción a los niños en los países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo, por lo que las medidas de higiene, correcta alimentación y cuidados sanitarios se han visto insuficientes para la prevención de la infección. La lactancia materna, dado el aporte de anticuerpos maternos que conlleva, podría

## INTRODUCCIÓN

---

ser un arma efectiva frente a la prevención de este patógeno intestinal, pero existen estudios que parecen indicar que sólo retrasa la infección a edades más avanzadas en las que se ha retirado este aporte nutricional (Clemens et al., 1993). Estudios realizados con modelos animales demostraron que se podía conseguir protección frente a la infección por rotavirus mediante la administración pasiva de anticuerpos antirrotavirus o por vacunación (Franco et al., 2006; Matsui et al., 1989; Offit et al., 1986). Esto llevó a realizar los primeros ensayos con vacunas siguiendo una estrategia “jenneriana”, administrando cepas de rotavirus animal a humanos, incluso en dosis elevadas, ya que no suelen producir enfermedad (Vesikari et al., 1986) pero si inducen una respuesta inmunológica protectora (Christy et al., 1988; Vesikari, 1996). Por otro lado, conocido el hecho de que rotavirus puede infectar más de una vez al mismo individuo, pero que las infecciones son cada vez menos severas (Velázquez et al., 1996) y que tras ellas persisten anticuerpos antirrotavirus tanto en el suero como en el intestino (Coulson et al., 1992), se pensó en un virus vacunal humano atenuado que imitase el efecto de la infección natural y previniera de las infecciones graves (método jenneriano) (Kapikian et al., 1996). Así, en 1998, tras varios intentos fallidos, se desarrolló en Estados Unidos una vacuna recombinante frente a rotavirus (Rotashield<sup>®</sup>, Wyeth-Lederle Vaccines, Filadelfia, Estados Unidos) que, aunque efectiva (Santosham et al., 1997), hubo de retirarse tiempo después por aumentar los índices de invaginación intestinal entre los niños que habían sido vacunados con esta vacuna (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1999; Zanardi et al., 2001). Esta medida supuso una gran controversia, porque se consideraba que el aumento del riesgo de invaginación intestinal no era significativo frente a la alta mortalidad que suponía la infección por este virus en los países en vías de desarrollo (Weijer, 2000). Sin embargo, dos vacunas recombinantes de rotavirus atenuados se probaron con éxito

posteriormente, una vacuna pentavalente de origen bovino-humano (RotaTeq<sup>®</sup>, Sanofi Pasteur MSD, Lyon, Francia) que contiene genes VP4 (P[8]) y VP7 (G1-G4) de rotavirus humanos incorporados por ingeniería genética en un rotavirus bovino y una vacuna monovalente de origen únicamente humano (Rotarix<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) constituida a partir de un rotavirus humano G1P[8] (Vesikari, 2012). Tanto en los ensayos clínicos iniciales, como en los estudios realizados posteriormente en países de ingresos altos y medio-altos de América, Asia y Europa, ambas vacunas mostraron una elevada efectividad (85 - 98 %) en el control de la gastroenteritis severa por rotavirus (Araki et al., 2018; Chavers et al., 2018; Glass et al., 2014; Karafillakis et al., 2015), sin incrementar el riesgo de invaginación intestinal (Ruiz-Palacios et al., 2006; Vesikari et al., 2006). Además, estas vacunas ofrecían protección cruzada incluso frente a otros genotipos de rotavirus no incluidos en la vacuna (Buttery y Kirkwood, 2014; Leshem et al., 2014). Desde la comercialización de ambas vacunas en 2006, en Europa han supuesto un gran impacto en la atención sanitaria relacionada con gastroenteritis por rotavirus, disminuyendo en gran medida las hospitalizaciones, infecciones nosocomiales y consultas en los centros de Atención Primaria (Karafillakis et al., 2015). Similares resultados se han obtenido en Australia (Giaquinto et al., 2011) y Estados Unidos (Pindyck et al., 2018; Rha et al., 2014). Una revisión sistemática llevada a cabo con diferentes estudios ecológicos de 8 países distintos, demostró que pasados 2 años desde la introducción de la vacunación sistemática frente a rotavirus en un territorio se observaba, en niños menores de 5 años, una disminución de un 22 - 50 % de la mortalidad asociada a gastroenteritis, una disminución de entre un 49 - 89 % de las hospitalizaciones debidas a rotavirus, una disminución del 17 - 55 % de las hospitalizaciones debidas a gastroenteritis por otras causas y una disminución de la infección por rotavirus en niños no vacunados y adultos

## INTRODUCCIÓN

---

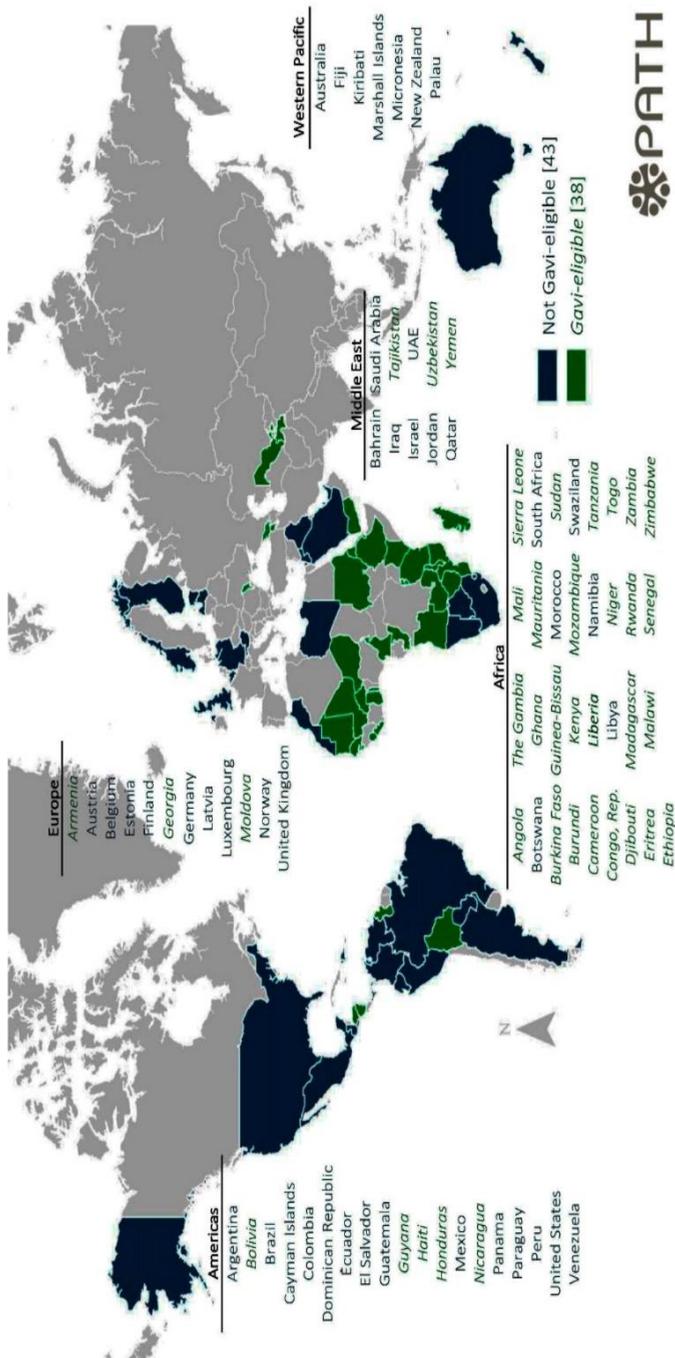
(inmunidad de grupo) (Gastañaduy et al., 2013; Leshem et al., 2014; Patel et al., 2012). Además, otro de los efectos observados tras la vacunación generalizada fue una reducción de la infección nosocomial por rotavirus (Zlamy et al., 2013). Sin embargo, diversos estudios llevados a cabo con ambas vacunas en países en vías de desarrollo de África y Asia mostraron una efectividad moderada (50 - 64%) frente a la gastroenteritis severa producida por rotavirus (Armah et al., 2010; Madhi et al., 2010; Zaman et al., 2010). Aunque se desconocen las razones que llevan a esta variabilidad de respuesta entre unas regiones y otras, se cree que puede ser debido a factores que pueden generar interferencias en la asimilación de la vacuna viva oral. En esta línea de trabajo, se ha postulado sobre el efecto que pueden tener los anticuerpos transmitidos por la leche materna o la coadministración con la vacuna oral frente a poliovirus (Patel et al., 2012). Así como, la presencia de otras circunstancias que pueden afectar a la respuesta inmune frente a la vacuna, como son la malnutrición, la presencia de otras infecciones (por ejemplo VIH, malaria y tuberculosis) o situaciones como son la elevada frecuencia de infecciones por enteropatógenos en estas zonas y las diferencias en el microbioma y/o vellosidades intestinales entre los niños que viven en entornos con pocos recursos y los que viven en entornos desarrollados (Glass et al., 2014; Harris et al., 2017, 2018; Lopman et al., 2012). A pesar de todo ello, la OMS recomienda también la vacunación sistemática frente a rotavirus en estos países (WHO, 2010). De hecho, un estudio reciente indica una clara efectividad de los programas de vacunación frente a rotavirus en los países de África subsahariana (Mwenda et al., 2018).

En cuanto a la seguridad de las vacunas, se han llevado a cabo diferentes estudios en diversos países que han identificado un menor riesgo de invaginación intestinal tras la vacunación con estas vacunas

que con la vacuna comercializada en 1998 (Carlin et al., 2013; Patel et al., 2011; Shui et al., 2012). De esta forma, considerar mayores los efectos beneficiosos de la vacunación que los posibles riesgos inherentes a ella fue lo que llevó a la OMS a recomendar la vacunación global frente a rotavirus en octubre del año 2009 (WHO, 2010). Actualmente, estas vacunas están siendo incluidas en los calendarios de vacunación de un número creciente de países (81 en mayo de 2016) (Figura 7). En España, la Asociación Española de Pediatría (AEP) recomienda la vacunación sistemática frente a rotavirus desde el año 2008 (Bernaola Iturbe et al., 2008). Ambas vacunas están comercializadas en nuestro país desde agosto del año 2006 (Rotarix®) y enero del año 2007 (RotaTeq®) pero no están financiadas por el Sistema Nacional de Salud, debiendo pagar el importe total de la vacunación las familias de los niños vacunados. A pesar de ello, las tasas de cobertura vacunal son significativas. Así, según un cálculo de dosis vendidas respecto al censo de población, la cobertura a nivel nacional aumentó de un 17% en 2007, a un 35% en 2008 y a un 38% en 2009 (47% Rotarix® y 53% RotaTeq®) (Gil-Prieto et al., 2013).

La elevada efectividad de los programas de vacunación ha determinado que la principal causa de hospitalización de niños con gastroenteritis aguda cambie de rotavirus a norovirus (Bucardo et al., 2014; Hemming et al., 2013; Koo et al., 2013; Payne et al., 2013).

PATH (ONG internacional dedicada a mejorar los recursos sanitarios en los países menos desarrollados). GAVI (Vaccine Alliance - Asociación internacional cuyo objetivo es mejorar el acceso de los niños a la vacunación en los países más pobres).



**Figura 7. Mapa representativo de la introducción de la vacuna frente a rotavirus por región geográfica.** En este mapamundi se muestran 81 países que tienen incluida la vacunación frente a rotavirus dentro del Calendario Vacunal Oficial del país (mayo de 2016).

En marzo de 2010, la *Food and Drug Administration* (FDA) informó sobre la contaminación de la vacuna Rotarix® con ADN completo de circovirus porcino tipo 1 y recomendó suspender su comercialización de forma preventiva hasta finalizar una investigación completa sobre este hecho. En mayo de este mismo año se detectaron niveles bajos de fragmentos de ADN de circovirus porcino tipo 1 y tipo 2 en la vacuna RotaTeq® (Victoria et al., 2010), sin embargo, la FDA recomendó continuar el uso de ambas vacunas, ya que eran ampliamente conocidos sus beneficiosos y no había evidencia de que el circovirus porcino causara enfermedad en humanos (Kuehn, 2010). En España, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) prohibió la comercialización de ambas vacunas de forma preventiva durante 5 meses (de junio a noviembre de 2010) pasados los cuales se reanudó la comercialización de la vacuna RotaTeq®, pero no se retiró la prohibición de comercialización para la vacuna Rotarix® hasta junio de 2016. La suspensión de ambas vacunas durante 5 meses supuso una bajada de la cobertura vacunal nacional de un 38% en 2009 a un 19% en 2010, y originó que algunas zonas como Galicia, tardaran 3 años en alcanzar los niveles de cobertura vacunal previos (Martín-Torres et al., 2013). Además, según un estudio realizado en España, durante este periodo de suspensión alrededor de 85.000 niños dejaron de ser vacunados, casi 500.000 hospitalizaciones no pudieron ser evitadas y supuso un coste de 2 millones de euros en gastos directos e indirectos relacionados con la vacunación (Bouzón-Alejandro et al., 2011).

En un intento por mejorar la eficacia de las vacunas y disminuir los costes de producción en los países en vías de desarrollo, se estudió la posibilidad de fabricar las vacunas *in situ*. Este hecho llevó a la producción de otras vacunas de virus vivos atenuados que han sido comercializadas en algunos lugares del mundo, pero que no han tenido

## INTRODUCCIÓN

---

reconocimiento internacional en todos los casos (Yen et al., 2014). En estas circunstancias tenemos la vacuna monovalente ovina Lanzhou Lamb Rotavirus - LLR (Lanzhou Institute of Biomedical Products, China), comercializada en China para su uso en humanos, pero con resultados clínicos inconsistentes (Fu et al., 2012). La vacuna monovalente humana Rotavin-M1™ (Center for Research and Production of Vaccines and Biologicals, Polivac, Vietnam), aprobada para su uso en Vietnam en el año 2012, que parece tener un perfil de seguridad y de inmunogenicidad similar a Rotarix®, aunque es necesario realizar más estudios (Anh et al., 2012). La vacuna monovalente humano-ovina Rotavac® (Bharat Biotech, Hyderabad, India), comercializada en India desde enero del año 2014, es una vacuna obtenida de un virus recombinante natural. Su efectividad frente a la infección severa por rotavirus es de un 56% en el primer año de vida y de un 49% en el segundo año de vida (Bhandari et al., 2014).

Actualmente están en estudio otras vacunas vivas atenuadas frente a rotavirus. Este es el caso de la vacuna monovalente humana RV3-BB (Biofarma, Indonesia) que podría ser utilizada en neonatos desde el nacimiento y que está siendo estudiada con éxito en ensayos clínicos llevados a cabo en Indonesia (Bines et al., 2015). Las vacunas recombinantes humano-ovinas *Bovine-Rotavirus* - BRV (tetra, penta y hexavalente) han sido autorizadas por el *National Institutes of Health* (Estados Unidos) a varias compañías de tres países diferentes: India, China y Brasil, en los que se están llevando a cabo estudios de eficacia y seguridad (Dhingra et al., 2014; Zade et al., 2014).

Otras posibilidades que se están explorando como alternativa a las vacunas vivas atenuadas son partículas de virus inactivados (Jiang et al., 2013; Wang et al., 2010), partículas pseudovíricas (*virus-like particles*) expresadas en células de insecto infectadas por baculovirus

recombinantes (Azevedo et al., 2013; Crawford et al., 1999) o por hongos (Rodríguez-Limas et al., 2014), vacunas basadas en ADN (García-Díaz et al., 2004; Herrmann et al., 1996), vacunas combinadas de rotavirus y norovirus (Rodríguez et al., 2014; Vega et al., 2013) o incluso el uso de anticuerpos protectores obtenidos de llamas (Garaicoechea et al., 2008; Vega et al., 2013).

En la tabla 4 se muestra un resumen de las vacunas comercializadas a nivel regional o en fase de desarrollo.

NOMBRE	COMPOSICIÓN	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	ORGANIZACIÓN / COMPAÑÍA	ETAPA DE DESARROLLO
<b>Lanzhou Lamb Rotavirus (LLR)</b>	Cepa de RVA de cordero viva atenuada G10P[12]	Oral	Lanzhou Institute of Biological Products, China	Autorizado para su uso en China
<b>Rotavin - M1</b>	Cepa de RVA humano viva atenuada G1P[8]	Oral	POLYVAC, Vietnam	Autorizado para su uso en Vietnam
<b>ROTAVAC</b>	Cepa de RVA neonatal viva atenuada G9P[11] (aka 116E)	Oral	Bharat Biotech, India	Autorizado en 2014 para su uso en India; en proceso de preselección por la OMS.
<b>Recombinantes LLR</b>	Cepa de RVA recombinante ovino-humano viva atenuada, G2, G3, G4	Oral	Lanzhou Institute of Biological Products, China	Fase III
<b>RotaShield</b>	Cepa de RVA recombinante rhesus-humano tetravalente viva atenuada	Oral	International Medical Foundation, USA	Fase II completa Fase III pendiente
<b>RV3</b>	Cepa de RVA neonatal viva atenuada G3P[6]	Oral	Biofarma, Indonesia	Fase II
<b>Recombinantes UK</b>	Cepas de RVA recombinantes bovino-humano tetravalente, pentavalente, hexavalente vivas atenuadas	Oral	National Institutes of Health, USA; Instituto Butantan, Brazil; Serum Institute of India, India; Shantha Biotech, India; Minghai Biotechnology Co., China; Wuhan Institute of Biological Products, China	Fase I y II, En investigación
<b>NF-R7</b>	Cepa de RVA recombinante ovino-humano viva atenuada, G4	Oral	Shenzhen Kangtai Biological Products Company, China	Fase I
<b>Subunidad</b>	VP8 truncado de P[4], P[6], P[8]	Intramuscular	National Institutes of Health and PATH, USA	Fase I
<b>IRV</b>	G1P[8], G2P[4] inactivados	Intramuscular o intradérmica	US CDC; múltiple (China, Europe, India)	Pre-clínico
<b>Subunidad</b>	Partículas tipo virus (VLPs): VP2/6/7 y VP2/4/6/7	Sin determinar	Baylor College of Medicine, USA	En investigación
<b>Subunidad</b>	VP8 truncado en partículas P de norovirus	Sin determinar	Cincinnati Children's Hospital Medical Center, USA	En investigación
<b>Subunidad</b>	VP6 combinado con VLPs de norovirus G1 y GII	Sin determinar	University of Tampere School of Medicine, Finland	En investigación

Tabla 4. Resumen de las características de las vacunas que se utilizan a nivel regional, recientemente autorizadas o en desarrollo (Yen et al., 2014).

### 1.3. ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS

#### 1.3.1. Antecedentes históricos

La inmunohematología comenzó a dar sus primeros pasos en el año 1900 con los estudios de Landsteiner, cuando descubrió la capacidad del suero sanguíneo humano de individuos sanos de aglutinar los hematíes de otros individuos. En sus estudios clasificó los diferentes tipos de sangre en 3 grupos: A, B y C (más tarde llamado O) (Landsteiner, 1900, 1901). Posteriormente, Decastello y Sturli añadieron un cuarto grupo, AB (Tabla 5) (von Decastello y Stürli, 1902). En 1910, von Dungern y Hirschfeld confirmaron que la herencia de los antígenos A y B seguía las leyes de Mendel y que tenía un carácter dominante (von Dungern y Hirschfeld, 1910). En 1924, Bernstein demostró que sólo eran necesarios tres alelos en un locus para explicar la herencia ABO (Bernstein, 1924). Actualmente, se conocen diferentes subgrupos de A y B.

Grupo ABO	Antígenos en hematíes	Anticuerpos en suero	Genotipo
<b>O</b>	Ninguno	Anti-A, Anti-B	O/O
<b>A</b>	A	Anti-B	A/A o A/O
<b>B</b>	B	Anti-A	B/B o B/O
<b>AB</b>	A y B	Ninguno	A/B

**Tabla 5. El sistema ABO simplificado.**

El descubrimiento de los anticuerpos no-hemaglutinantes y el desarrollo de los test antiglobulínicos por Coombs, Mourant y Race en

## INTRODUCCIÓN

---

1945 propició un importante avance en el estudio de la serología de los grupos sanguíneos (Coombs et al., 1945). Los primeros pasos en el descubrimiento de los anticuerpos anti-Lewis fueron descritos por Mourant, anti-Lewis a (Mourant, 1946) y por Andresen, anti-Lewis b (Andresen, 1948), pero la estructura y biosíntesis de los antígenos ABO, antígeno H y antígenos Lewis se describió en los años 50 en los trabajos de Morgan y Watkins (Morgan y Watkins, 1959) y los de Kabat (Kabat, 1955). Por otro lado, aunque los antígenos Lewis a y Lewis b expresados en los glóbulos rojos no son sintetizados por ellos, sino adquiridos desde el plasma, se consideran antígenos de grupo sanguíneo porque fueron identificados inicialmente en los eritrocitos.

### 1.3.2. Concepto

El término grupo sanguíneo se utiliza habitualmente para describir el polimorfismo de los antígenos de superficie de los hematíes de la sangre. Estas variaciones son detectadas por aloanticuerpos y aunque es posible detectar estos polimorfismos mediante el uso de otros métodos (secuenciación del ADN), no son considerados grupos sanguíneos si no están definidos por un anticuerpo.

Actualmente, existen 230 antígenos de grupo sanguíneo que se clasifican en 26 sistemas genéticamente distintos (Tabla 6). La mayor parte de ellos son sintetizados por las células rojas de la sangre, sin embargo, los antígenos Lewis o los Chido/Rodgers son adheridos a la membrana celular de los eritrocitos desde el plasma. Algunos antígenos de grupo sanguíneo se expresan solamente en los hematíes, pero otros pueden ser aislados tanto en la sangre como en otros tejidos del cuerpo (este es el caso de los antígenos ABO, antígeno H y antígenos Lewis), por lo que se denominan antígenos histo-sanguíneos.

### 1.3.3. Clasificación y nomenclatura

Los antígenos de grupo sanguíneo pueden ser de dos tipos según su estructura bioquímica, determinantes proteicos, que son codificados directamente por los genes de grupo o determinantes carbohidratos (glicoproteínas y glicolípidos) que son sintetizados gracias a las enzimas glicosiltransferasas codificadas por los genes de grupo.

Según la clasificación propuesta por la *International Society of Blood Transfusion* (ISBT) los antígenos de grupo sanguíneo se organizan en 26 sistemas, 5 colecciones y 2 series (Tablas 6 a 9) (Daniels et al., 2009; Daniels et al., 1995).

Un sistema de grupo sanguíneo consiste en uno o más antígenos controlados por un único gen o por un conjunto de genes homólogos muy relacionados entre sí. Cada sistema es genéticamente diferente del resto y la adición de un nuevo antígeno se realiza tras comprobar que éste es controlado por el gen que dirige el sistema (Tabla 6).

## INTRODUCCIÓN

Nº	Nombre	Símbolo	Número de antígenos	Estructuras de la membrana	Nombre del gen	Cromosoma
001	ABO	ABO	4	Carbohidratos	ABO	9
002	MNS	MNS	43	GPA (CD235A), GPB (CD235B)	GYPB, GYPB, GYPE	4
003	P	P1	1	Carbohidratos	P1	22
004	Rh	RH	46	RhD (CD240D), RhCcEe (CD240CE)	RHD, RHCE	1
005	Lutheran	LU	18	CD239, IgSF	LU	19
006	Kell	KEL	24	CD238, endopeptidasa	KEL	7
007	Lewis	LE	6	Carbohidratos	FUT3	19
008	Duffy	FY	6	CD234, receptor quimiocinas	FY	1
009	Kidd	JK	3	Transportador urea	SLC14A1	18
010	Diego	DI	21	Band 3, intercambiador aniones (CD233)	SLC4AE1 (AE1)	17
011	Yt	YT	2	Acetilcolinesterasa	ACHE	7
012	Xg	XG	2	Glicoproteínas, CD99	XG, MIC2	X/Y
013	Scianna	SC	3	Glicoproteínas	SC	1

<b>014</b>	Dombrock	DO	5	ADP-ribosiltransferasa	DO	12
<b>015</b>	Colton	CO	3	Aquaporina-1	AQP1	7
<b>016</b>	Landsteiner- Wiener	LW	3	ICAM-4, IgSF, CD242	LW	19
<b>017</b>	Chido/ Rodgers	CH/RG	9	C4A, C4B (C')	C4A, C4B	6
<b>018</b>	Hh	H	1	CD173 (Tipo 2 H), carbohidratos	FUT1	19
<b>019</b>	Kx	XK	1	Proteínas	XK	X
<b>020</b>	Gerbich	GE	7	GPC, GPD (CD236)	GYPC	2
<b>021</b>	Cromer	CROM	10	CD55, DAF, C' regulador	DAF	1
<b>022</b>	Knops	KN	7	CD35, CR1, C' regulador	CR1	1
<b>023</b>	Indian	IN	2	CD44	CD44	11
<b>024</b>	Ok	OK	1	CD147, EMMPRIN, IgSF	CD147	19
<b>025</b>	Raph	RAPH	1	Glicoproteínas	MER2	11
<b>026</b>	John Milton Hagen	JMH	1	CDw108, semaforina	SEMA7A	15

C', complemento; IgSF, superfamilia inmunoglobulinas.

**Tabla 6. Sistemas de grupo sanguíneo.**

## INTRODUCCIÓN

---

Las colecciones hacen referencia a un conjunto de antígenos que se relacionan genética, bioquímica o serológicamente, pero que no alcanzan la categoría de sistema (Tabla 7).

Número	Nombre	Símbolo	Número de antígenos
205	Cost	COST	2
207	II	I	2
208	Er	ER	2
209	Globoside	GLOB	3
210	(Lewis c y Lewis d)		2

**Tabla 7. Colecciones de grupo sanguíneo.**

Las series son conjuntos de antígenos que no se pueden clasificar dentro de ningún sistema ni colección. Existen dos series, la serie de baja frecuencia, formada por 22 antígenos que tienen una incidencia en la población menor al 1% (Tabla 8) y la serie de alta frecuencia, formada por 11 antígenos cuya incidencia poblacional es mayor al 99% (Tabla 9).

Número	Nombre	Símbolo
700002	Batty	By
700003	Christiansen	Chr <sup>a</sup>
700005	Biles	Bi
700006	Box	Bx <sup>a</sup>
700015	Radin	Rd
700017	Torkildsen	To <sup>a</sup>
700018	Peters	Pt <sup>a</sup>
700019	Reid	Re <sup>a</sup>
700021	Jensen	Je <sup>a</sup>
700023	Hey	Hey
700028	Livesay	Lj <sup>a</sup>
700039	Milne	
700040	Rasmussen	RASM
700043	Oldeide	Oj <sup>a</sup>
700044		JFV
700045	Katagiri	Kg
700047	Jones	JONES
700049		HJK
700050		HOFM
700052		SARA
700053		LOCR
700054		REIT SHIN

**Tabla 8. Serie de baja frecuencia. Serie 700.**

## INTRODUCCIÓN

---

Número	Nombre	Símbolo
901001		Vel
901002	Langereis	Lan
901003	August	At <sup>a</sup>
901005		Jr <sup>a</sup>
901008		Emm
901009	Anton	AnWj
901012	Sid	Sd <sup>a</sup>
901013	Duclos	
901014		PEL
901015		ABTI
901016		MAM

**Tabla 9. Serie de alta frecuencia. Serie 901.**

En relación a su nomenclatura, cada antígeno de grupo sanguíneo se identifica con un número de seis dígitos. Los primeros tres dígitos representan el sistema (001 – 026), colección (205 – 210) o serie (700 para baja frecuencia y 901 para alta frecuencia). Los segundos tres dígitos identifican el antígeno, con números arábigos correlativos (001, 002, 003...). Además, cada sistema tiene un símbolo alfabético propio que lo define, por ejemplo, el sistema Lutheran es el sistema 005 o LU. Los antígenos pueden identificarse además de por sus números también por letras alfabéticas (a, b, c ...). Así, el antígeno 005001 también puede ser denominado Lu<sup>a</sup> o LU001 (que para no ser redundante en ceros puede ser escrito como LU1).

Los fenotipos se identifican por el símbolo del sistema seguido de dos puntos y de la lista de antígenos separados por coma. En el caso de que alguno de ellos esté ausente, su número se precede de un signo menos. Ejemplo: Lu(a-b+) sería LU:-1,2

Los genes que forman un sistema se nombran por el símbolo del sistema seguido de un espacio o un asterisco y a continuación el número de antígeno al que representa el gen. Se escriben en cursiva o subrayados. Ejemplo: el gen Lu<sup>a</sup> sería *LU 1* o *LU\*1*.

Los genotipos se nombran mediante el símbolo del sistema seguido de un espacio o asterisco y a continuación los dos alelos o haplotipos separados por una barra. Al igual que los genes, se escriben en cursiva o subrayados. Ejemplo: Lu<sup>a</sup>/Lu<sup>b</sup> sería *LU 1/2* o *LU\*1/2* y Lu<sup>a</sup>Lu<sup>6</sup>/Lu<sup>b</sup>Lu<sup>9</sup> sería *LU 1,6/2,9* o *LU\*1,6/2,9*.

Un ejemplo de esta nomenclatura expresada en el sistema Kell pueden verse en la Tabla 10.

	Original	Numérico
<b>Antígeno</b>	K, k, Kp <sup>a</sup> , Kp <sup>b</sup>	KEL1, KEL2, KEL3, KEL4
<b>Fenotipo</b>	K-k+ Kp(a-b+)	KEL:-1,2,-3,4
<b>Gen</b>	<i>K, k, Kp<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup></i> <i>K<sup>0</sup></i>	<i>KEL 1, KEL 2, KEL 3, KEL 4</i> <i>KEL 0</i>
<b>Genotipo</b>	<i>kKp<sup>b</sup>/kKp<sup>b</sup></i> <i>U<sup>a</sup>/U<sup>i</sup></i> <i>kKp<sup>a</sup>/K<sup>0</sup></i>	<i>KEL 2,4/2,4</i> <i>KEL 10/-10</i> <i>KEL 2,3/0</i>

**Tabla 10. Ejemplos de nomenclatura en el sistema Kell.** Los genes y genotipos también se pueden escribir con un asterisco (\*) a continuación del símbolo de sistema (Ej: KEL\*1).

## INTRODUCCIÓN

---

En este trabajo, en las secciones siguientes, utilizaremos la nomenclatura alternativa "popular" recomendada por la ISBT (Daniels et al., 1995). Esto no indica una falta de confianza en la terminología numérica, sino más bien un intento, por parte de los autores, de facilitar la lectura y comprensión de los textos al utilizar nombres más familiares.

### 1.3.4. Estructura molecular

Los antígenos histo-sanguíneos son estructuras complejas de carbohidratos formadas por adición de monosacáridos específicos al extremo no reductor de diversos precursores disacáridos (Tabla 11). Estas cadenas de oligosacáridos se pueden conjugar con polipéptidos, para formar glicoproteínas (presentes en algunas secreciones corporales) o con ceramidas, para formar glicoesfingolípidos (presentes en el plasma sanguíneo y desde donde algunos de ellos pueden pasar a formar parte de la membrana de los hematíes) (Watkins, 1980). Sin embargo, también es posible aislar cadenas de oligosacáridos libres con actividad ABO, H y Lewis en algunas secreciones corporales, como saliva, leche u orina (Kobata et al., 1969; Lundblad, 1978).

Nombre	Estructura
<b>Tipo 1</b>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ R
<b>Tipo 2</b>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ R
<b>Tipo 3</b>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ R
<b>Tipo 4</b>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ R
<b>Tipo 5</b>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ R
<b>Tipo 6</b>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ R

Gal: D-galactosa; GalNAc: N-acetil-D-galactosa; Glc: glucosa;  
GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina; R: resto de la molécula

**Tabla 11. Precursores disacáridos.** El precursor tipo 5 no existe en humanos, ha sido sintetizado químicamente.

En nuestro trabajo, nos centraremos en los antígenos histo-sanguíneos sintetizados a partir de los precursores tipo 1 y tipo 2 (Figura 8). Los que tienen origen en el resto de precursores no son de interés para este estudio.

# INTRODUCCIÓN

Tipo 1		Tipo 2	
Precursor (Le <sup>c</sup> )	Galβ1→3GlcNAcβ1→R*	Precursor	Galβ1→4GlcNAcβ1→R
H (Le <sup>d</sup> )	Galβ1→3GlcNAcβ1→R* 2 ↑ Fucα1	H	Galβ1→4GlcNAcβ1→R† 2 ↑ Fucα1
A	GalNAcα1→3Galβ1→3GlcNAcβ1→R* 2 ↑ Fucα1	A	GalNAcα1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→R† 2 ↑ Fucα1
B	Galα1→3Galβ1→3GlcNAcβ1→R* 2 ↑ Fucα1	B	Galα1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→R† 2 ↑ Fucα1
Le <sup>a</sup>	Galβ1→3GlcNAcβ1→R* 4 ↑ Fucα1	Le <sup>x</sup>	Galβ1→4GlcNAcβ1→R 3 ↑ Fucα1
Le <sup>b</sup>	Galβ1→3GlcNAcβ1→R* 2 4 ↑ ↑ Fucα1 Fucα1	Le <sup>y</sup>	Galβ1→4GlcNAcβ1→R 2 3 ↑ ↑ Fucα1 Fucα1
ALe <sup>b</sup>	GalNAcα1→3Galβ1→3GlcNAcβ1→R* 2 4 ↑ ↑ Fucα1 Fucα1	ALe <sup>y</sup>	GalNAcα1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→R 2 3 ↑ ↑ Fucα1 Fucα1
BLe <sup>b</sup>	Galα1→3Galβ1→3GlcNAcβ1→R* 2 4 ↑ ↑ Fucα1 Fucα1	BLe <sup>y</sup>	Galα1→3Galβ1→4GlcNAcβ1→R 2 3 ↑ ↑ Fucα1 Fucα1
sialil-Le <sup>a</sup>	Galβ1→3GlcNAcβ1→R 3 4 ↑ ↑ NeuAcα2 Fucα1	sialil-Le <sup>x</sup>	Galβ1→4GlcNAcβ1→R 3 3 ↑ ↑ NeuAcα2 Fucα1

Fuc: L-fucosa; Gal: D-galactosa; GalNAc: N-acetil-D-galactosa; Glc: glucosa; GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina; NeuAc: Ácido Siálico (ácido N-acetilneuramínico); R: resto de la molécula

\* Adheridos a los hematíes desde el plasma en individuos con genotipo apropiado.  
 † Intrínsecos a los hematíes y detectados en cantidad significativa en individuos con genotipo apropiado.

**Figura 8. Estructura de los antígenos A, B, H y Lewis.** El azúcar inmunodominante en la molécula del antígeno H activa es la L-fucosa unida por un enlace α al carbono 2, ya que su pérdida origina inactividad del antígeno H.

### 1.3.5. Formación y expresión de los antígenos ABO, H y Lewis

La síntesis de los antígenos histo-sanguíneos está mediada por unas enzimas glicosiltransferasas codificadas genéticamente a partir de los genes *ABO*, *FUT1* (H), *FUT2* (secretor) y *FUT3* (Lewis) (Tabla 12). Estas enzimas catalizan la transferencia de monosacáridos desde un nucleótido donante a un sustrato receptor mediante una unión glicosídica específica. Los mecanismos de regulación en la producción de estas cadenas de oligosacáridos son complejos. Así, la presencia o ausencia de ciertas enzimas, según el genotipo del individuo, o la competición entre las diferentes enzimas por el mismo donante o receptor, determinan la cadena de carbohidratos finalmente producida (Hakomori, 1981).

Los antígenos ABO, H y Lewis ( $Le^a$  y  $Le^b$ ) formados a partir del precursor tipo 1 están presentes en secreciones, plasma y tejidos endodérmicos. No son sintetizados por los glóbulos rojos, pero son incorporados a su membrana desde el plasma (Mollicone et al., 1995). Los antígenos ABO y H formados a partir del precursor tipo 2 representan la mayor parte de los oligosacáridos activos en la membrana de los glóbulos rojos, pero también han sido detectados en secreciones, tejidos mesodérmicos y ectodérmicos (Mollicone et al., 1995). Sin embargo, a nivel de secreciones estos antígenos se encuentran con más frecuencia difucosilados (Lewis y, ALewis y, BLewis y) que monofucosilados (H, A, B) (Furukawa et al., 1990).

---

Lo mismo ocurre con la N-acetilgalactosamina en el antígeno A y la galactosa en el antígeno B, ambos azúcares unidos por un enlace  $\alpha$  al carbono 3 (Lloyd et al., 1966). Los antígenos Lewis a y Lewis b se expresan cuando una fucosa se une a la N-acetilglucosamina del precursor tipo 1 ó del antígeno H tipo 1 respectivamente. Los antígenos Lewis x y Lewis y son los isómeros tipo 2 de Lewis a y Lewis b. Los Lewis a y Lewis x pueden unir ácido siálico en el carbono 3 (Watkins y Morgan, 1957).

## INTRODUCCIÓN

Locus	Alelo	Enzima glicosiltransferasa
<b>FUT1 (H)</b>	H	$\alpha$ 1,2-L-fucosiltransferasa
	h	Ninguna
<b>FUT2 (SE)</b>	Se	$\alpha$ 1,2-L-fucosiltransferasa
	se	Ninguna
<b>ABO</b>	A	$\alpha$ 1,3-N-acetil-D-galactosaminiltransferasa
	B	$\alpha$ 1,3-D-galactosiltransferasa
	O	Ninguna
<b>FUT3 (LE)</b>	Le	$\alpha$ 1,3/4-L-fucosiltransferasa
	le	Ninguna

**Tabla 12. Algunos genes de sistema de grupo sanguíneo y las enzimas que codifican.**

### 1.3.5.1. Antígeno H

El antígeno H se forma a partir de dos precursores disacáridos denominados tipo 1 y tipo 2, mediante la adición de nuevos monosacáridos específicos (L-fucosa) al carbono 2 de la galactosa terminal. Esta reacción química está mediada por dos enzimas glicosiltransferasas codificadas por los genes *FUT1* (H) y *FUT2* (SE), localizados en el brazo largo del cromosoma 19 (Tabla 12). La enzima H-transferasa, el producto del gen *FUT1*, es la encargada de sintetizar el antígeno H en los glóbulos rojos y en los tejidos mesodérmicos y ectodérmicos. Esta enzima tiene mayor afinidad por el precursor tipo 2, dando lugar al antígeno H tipo 2. La enzima secretor-transferasa, el

producto del gen *FUT2*, es la responsable de sintetizar el antígeno H en las secreciones corporales y en los tejidos endodérmicos. Esta enzima presenta mayor afinidad por el precursor tipo 1, originando antígeno H tipo 1 o secretor (Costache et al., 1997).

La mayor parte de la población expresa el antígeno H tipo 2 en sus glóbulos rojos y, muy excepcionalmente, es posible encontrar individuos homocigotos para alelos modificados del gen *FUT1* que presentan escasa o nula expresión de este antígeno en sus hematíes (fenotipo Bombay) (Fernandez-Mateos et al., 1998). Sin embargo, a nivel de las secreciones, se conocen diversas mutaciones genéticas que modifican el gen *FUT2*, de forma que se minimiza o anula la secreción del antígeno H tipo 1 en los fluidos. Así, aproximadamente el 80% de los europeos expresa el antígeno H tipo 1 en sus secreciones – también el antígeno A ó B si poseen los genes que los codifican – son los llamados individuos ABH secretores. El otro 20% de europeos no secretan el antígeno H, A ó B en sus fluidos, independientemente de su genotipo ABO, son los llamados individuos ABH no secretores (Kelly et al., 1995). Entre los europeos, el estado ABH secretor parece estar controlado por un par de alelos, *Se* y *se*, del gen *FUT2* (secretor), siendo el alelo *Se* el responsable de la secreción y dominante sobre el alelo *se* (Oriol et al., 1981). Sin embargo, en algunas poblaciones de Oriente y del Pacífico Sur, existe un alelo modificado de *FUT2* (*Se*<sup>w385</sup>) que codifica una glicosiltransferasa con la misma afinidad por el sustrato que la *FUT2* normal pero con una actividad cinco veces menor. De forma que, individuos homocigotos para este alelo o heterocigotos de este alelo con no-secretor, producen menores niveles de antígeno H tipo 1 en sus secreciones y dan lugar al fenotipo Le(a+b+) en sus células rojas (Tabla 13). Son los denominados individuos ABH secretores parciales (Henry et al., 1996).

## INTRODUCCIÓN

Genotipo		Antígenos		
LEWIS	SECRETOR	HEMATÍES	SECRECIONES	
			Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>
Le/Le	Se/Se	Le(a-b+)	+	+
Le/le	Se/se			
Le/Le	Se <sup>w385</sup> /Se <sup>w385</sup>	Le(a+b+)	+	+
Le/le	Se <sup>w385</sup> /se			
Le/Le	se/se	Le(a+b-)	+	-
Le/le				
le/le	cualquiera	Le(a-b-)	-	-

**Tabla 13. Expresión de diferentes antígenos en hematíes y secreciones corporales según los distintos genotipos de los genes *FUT2* y *FUT3* (en individuos del grupo O).** Los individuos con gen *Le* activo expresan Lewis a y/o Lewis b en sus hematíes y secreciones corporales. Son denominados individuos Lewis positivos. Los individuos con gen *LE* inactivo (homocigoto *le/le*) no expresan en los hematíes ni en las secreciones corporales ningún tipo de antígeno Lewis, independientemente de cuál sea su fenotipo ABH, secretor o no-secretor. Son los denominados individuos Lewis negativos, Le(a-b-).

### 1.3.5.2. Antígenos ABO

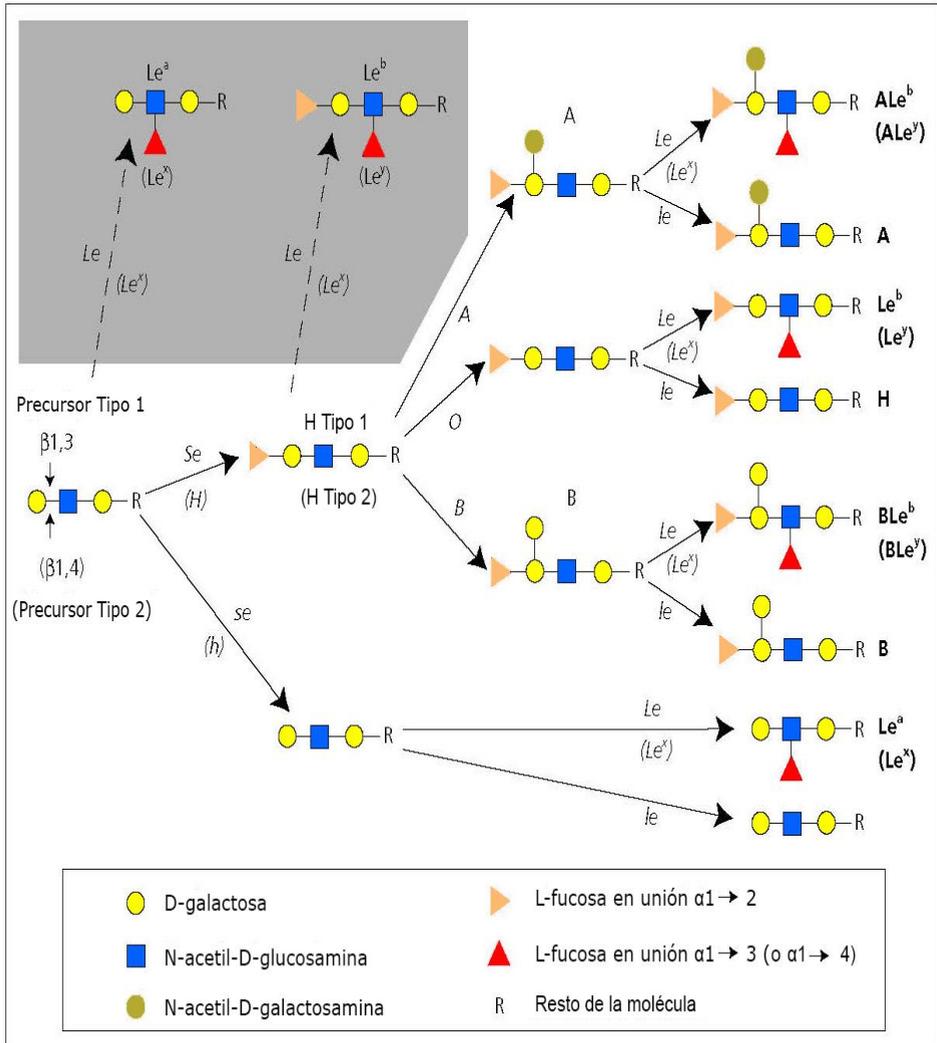
Los antígenos A y B se forman a partir de un mismo precursor, el antígeno H, bien sea el producido por la H-transferasa (tipo 2) o por la secretor-transferasa (tipo 1). Las dos enzimas glicosiltransferasas, A y B, que catalizan esta reacción se codifican en los genes *A* y *B* del locus *ABO* del cromosoma 9 (Tabla 12). Existe un tercer alelo, *O*, que no produce enzima glicosiltransferasa activa, por lo que las personas homocigotas para este alelo, no tienen la capacidad para modificar el antígeno H precursor (Watkins, 1980). Estos genes se heredan con carácter mendeliano, siendo los genes *A* y *B* dominantes sobre el alelo *O* y codominantes entre ellos.

La expresión de los antígenos A y B en las células rojas dependerá de la presencia o ausencia del antígeno H (fenotipo Bombay) y de los distintos genes *A*, *B* y *O* presentes en el individuo (Tabla 5). Los individuos secretores pueden expresar los antígenos A y B a nivel de las secreciones corporales si poseen los genes que los codifican, sin embargo, los individuos no secretores, al no secretar el antígeno H tipo 1, no expresarán los antígenos A y B a pesar de poseer los genes codificantes (Clausen et al., 1994).

### 1.3.5.3. Antígenos Lewis

Los antígenos Lewis se sintetizan a partir de diferentes sustratos y cada sustrato origina un antígeno Lewis distinto (Figura 9). La mayor parte de estas reacciones están catalizadas por una enzima glicosiltransferasa codificada por el gen *FUT3* (*LE*), localizado en el cromosoma 19 (Tabla 12). Este gen presenta 2 alelos, *Le* y *le*, donde el alelo *Le* es dominante y produce enzima Lewis-transferasa, y el alelo *le* es recesivo y aparentemente inactivo (Grubb, 1951).

# INTRODUCCIÓN



**Figura 9. Biosíntesis de los antígenos ABO, H y Lewis derivados de los precursores tipo 1 y tipo 2.** Los genes están marcados en cursiva y las enzimas están descritas en la Tabla 12. Las estructuras tipo 2 y los genes que actúan sobre ellas están señalados entre paréntesis. Los precursores tipo 1 y tipo 2 se diferencian por la naturaleza de su unión entre la galactosa terminal del extremo no reductor y la N-acetil-D-glucosamina: β1→3 en el tipo 1 y β1→4 en el tipo 2. Las líneas discontinuas muestran como Le<sup>a</sup> (Le<sup>x</sup>) y Le<sup>b</sup> (Le<sup>y</sup>), generados a partir del precursor o del antígeno H respectivamente, no son sustratos para las transferasas H, Se o ABO por lo que permanecen inalterados.

Los antígenos Lewis a y Lewis b se sintetizan a partir del precursor tipo 1 y el antígeno H tipo 1, respectivamente. Sin embargo, la enzima Lewis-transferasa que los sintetiza también puede utilizar como sustrato los antígenos A y B para formar antígenos ALe<sup>b</sup> y BLe<sup>b</sup> (Figura 9). La expresión de estos antígenos en las células rojas, en el plasma y en las secreciones corporales depende de un conjunto de interacciones entre los genes *FUT2* (Secretor) y *FUT3* (Lewis). Los diferentes fenotipos expresados en las células rojas por la combinación de estos dos genes se muestran en la Tabla 13, aunque pueden encontrarse algunas excepciones a estas reglas. Así, las células rojas de fetos, sangre de cordón y neonatos son generalmente Le(a-b-); los lactantes pueden ser transitoriamente Le(a+b+) antes de convertirse en Le(a+b-) (Cutbush et al., 1956); las mujeres embarazadas Lewis positivas pueden expresar el fenotipo Le(a-b-) temporalmente durante el embarazo, llegando a producir incluso anticuerpos anti-Lewis b en este periodo (Hammar et al., 1981). También podemos encontrarnos con situaciones en las que la expresión del antígeno Lewis a es más elevada de lo esperable. Por un lado, aunque la enzima secretor-transferasa compite activamente con la Lewis-transferasa por el precursor tipo 1, no puede actuar sobre dicho sustrato si ya ha actuado la Lewis-transferasa previamente (Henry et al., 1995). Por otro lado, en los países de Oriente, es común encontrar individuos con una enzima secretor-transferasa que, aunque presente, es menos activa que en el resto de la población (mutación Se<sup>w385</sup>). Este hecho implica que la competencia con la Lewis-transferasa sea mucho menor y, por lo tanto, se expresen niveles de Lewis a más elevados de lo esperable, Lewis(a+b+) (Henry et al., 1990).

Los antígenos Lewis se pueden detectar en saliva por hemaglutinación con anticuerpos específicos. Los individuos ABH secretores pueden expresar Lewis a y Lewis b en su saliva. Lewis a está

## INTRODUCCIÓN

---

presente en individuos con fenotipo Le(a+b-) o Le(a-b+) en sus células rojas, siendo más intensa la reacción en el primer caso. Lewis b se aísla en saliva de individuos Le(a-b+) y ambos antígenos se manifiestan en individuos Le(a+b+). Los individuos ABH no secretores expresan sólo Lewis a en su saliva (Brendemoen, 1950). Los antígenos Lewis detectados en saliva de neonatos con gen *FUT3* activo son los mismos que los aislados en saliva de individuos adultos (Lawler y Marshall, 1961).

A nivel del plasma, el antígeno Lewis a se detecta en individuos con fenotipo Le(a+b-) en sus células rojas. Al contrario que en saliva, sólo unas trazas pueden encontrarse en los individuos Le(a-b+). El antígeno Lewis b está presente en individuos con fenotipo Le(a-b+) (Sneath y Sneath, 1955). El antígeno Lewis a es el primero en aparecer tras el nacimiento. En población blanca, a los 3 meses de vida el 80% de los individuos con gen *FUT3* activo es Le(a+), cifra que disminuye hasta el nivel de adulto del 20% a los 2 años de vida. Durante este periodo no es raro encontrar el fenotipo Le(a+b+) en las células rojas de estos individuos. El antígeno Lewis b alcanza el nivel de adulto en plasma a los 6 años de vida (Jordal, 1956). La aparición de los antígenos Lewis a y b en plasma se correlaciona con su determinación a nivel de las células rojas (Lawler y Marshall, 1961).

Existen estudios en los que se ha analizado la frecuencia de los distintos fenotipos Lewis expresados en las células rojas en diferentes poblaciones humanas (Mak et al., 1994; Molthan, 1980; Mourant et al., 1976; Salmon y Malassenet, 1953). Los resultados de estos estudios se muestran en la tabla 14.

FENOTIPO	EUROPEOS Y BLANCOS AMERICANOS	AFRICANOS AMERICANOS	CHINOS (Hong Kong)
	POBLACIÓN (%)		
<b>Le(a-b+)</b>	70 – 72	52 – 55	62
<b>Le(a+b-)</b>	19 – 22	19 – 23	0
<b>Le(a+b+)</b>	0	0	27
<b>Le(a-b-)</b>	4 – 11	22 – 29	11

**Tabla 14. Frecuencia de fenotipo Lewis en las células rojas de tres poblaciones humanas.**

Estudios similares se han realizado en saliva para determinar la actividad del gen *FUT3*. Para ello se han utilizado anticuerpos anti-Le<sup>a</sup>. Los individuos Lewis positivos (poseen gen *Le*) expresan antígeno Lewis a en saliva, pero los individuos Lewis negativos (genotipo *le/le*) no lo expresan. Las frecuencias de fenotipos Lewis encontradas en la población con esta técnica son similares a las determinadas en las células rojas (Grubb, 1951; Mourant et al., 1976; Race y Sanger, 1975; Tills et al., 1983).

Los antígenos Lewis c y Lewis d se encuentran en las células rojas de individuos adultos Lewis negativos, Le(a-b-), ABH no secretores y ABH secretores respectivamente. Son sintetizados en el plasma, desde donde se incorporan a la membrana de los hematíes, aunque no están sintetizados por una Lewis-transferasa dependiente del gen *FUT3* (Hirsch y Graham, 1980). La estructura del antígeno Lewis c es poco conocida actualmente, sin embargo, se sabe que el antígeno Lewis d es en realidad el antígeno H tipo 1. Ambos antígenos actúan como precursores de los antígenos Lewis (Figura 8) (Lemieux et al., 1981).

## INTRODUCCIÓN

---

Los antígenos Lewis x y Lewis y son en realidad isómeros de Lewis a y Lewis b sintetizados a partir del precursor tipo 2 y del antígeno H tipo 2, respectivamente (François et al., 1986). Al igual que sus isómeros, también pueden originarse a partir de los antígenos A y B, dando lugar a los antígenos ALe<sup>y</sup> y BLe<sup>y</sup> (Figura 9). En analogía con el resto de estructuras Lewis, los antígenos Lewis x no pueden convertirse en Lewis y por acción de la H-transferasa o secretor-transferasa, y los antígenos Lewis y no pueden ser convertidos en ALe<sup>y</sup> ni BLe<sup>y</sup> por acción de la A- o B-transferasa.

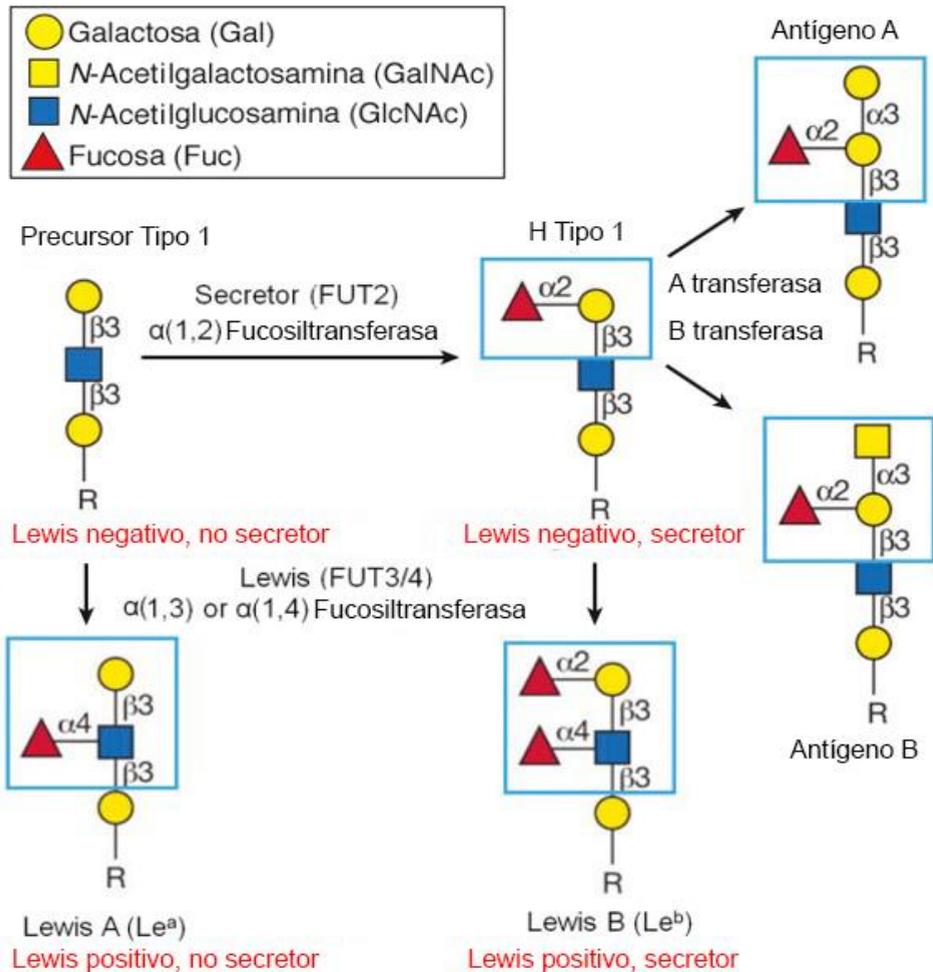
Los antígenos Lewis x y Lewis a también pueden unir ácido siálico a su galactosa terminal (Figura 8). Esta unión les permite adherir selectinas, una familia de moléculas con capacidad de adhesión a las células endoteliales. Esta propiedad es muy importante para leucocitos y plaquetas, sobre todo en las zonas de inflamación (Kansas, 1996). Por otro lado, los niveles en plasma de siálico-Le<sup>a</sup> (también conocido como antígeno CA 19-9) se usan como marcadores tumorales para el diagnóstico de cáncer gástrico, colorrectal y pancreático (Orntoft y Bech, 1995).

En este trabajo se han estudiado los antígenos Lewis a y Lewis b, por lo tanto, cuando hablemos de antígenos Lewis de manera genérica nos referimos a estos dos antígenos y no al resto.

### 1.4. INTERACCIÓN ENTRE ROTAVIRUS Y ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS

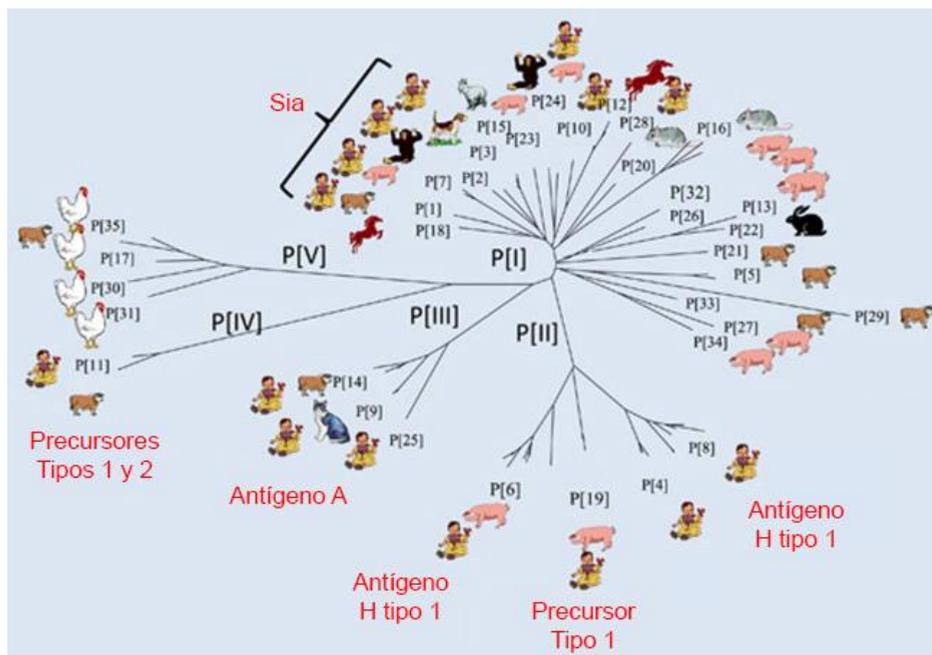
Desde el descubrimiento del grupo sanguíneo ABO a principios del siglo XX y su expresión genéticamente determinada ha habido un interés creciente por estudiar el potencial papel que juegan los diferentes grupos sanguíneos en algunas enfermedades infecciosas. Así, muchos grupos sanguíneos actúan como receptores para toxinas, parásitos, virus o bacterias. En algunos casos facilitan la invasión por el agente infeccioso o evitan los mecanismos de defensa del huésped, sin embargo, en otras ocasiones actúan como falsos receptores evitando así la unión a los verdaderos receptores diana en los tejidos (Cooling, 2015). Los antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) son carbohidratos complejos presentes en las secreciones corporales y en la superficie de las células epiteliales de las mucosas que pueden actuar como receptores celulares (Figura 10). Además, están ampliamente distribuidos en el organismo y presentan un gran polimorfismo (Cooling, 2015). Su expresión está regulada por unas enzimas codificadas por los genes *FUT2* (antígenos A, B y H - secretor) y *FUT3* (antígenos Lewis). La presencia de mutaciones en estos genes puede dar lugar a enzimas inactivas que conducen a individuos no secretores (*FUT2*-) o Lewis negativos (*FUT3*-) (Ramani et al., 2016).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 10. Biosíntesis de los HBGA tipo 1.** El precursor tipo 1 contiene los azúcares galactosa y N-acetilgalactosamina unidos por una unión  $\beta 1-3$ . La biosíntesis del antígeno H tipo 1 supone la adición de una fucosa en la posición  $\alpha 1,2$  de la galactosa terminal del precursor tipo 1 mediada por la enzima FUT2 (gen secretor). Los individuos que no poseen una FUT2 activa no pueden expresar fucosa en la posición  $\alpha 1,2$  y son los denominados no secretores. La modificación del antígeno H por la A- o B-glicosiltransferasa da lugar al antígeno A o B, respectivamente. El antígeno Lewis a se sintetiza por la unión de una fucosa en la posición  $\alpha 1,3$  o  $\alpha 1,4$  de la N-acetilglucosamina terminal del precursor tipo 1 mediante la enzima FUT3/4 (gen Lewis). El antígeno Lewis b se forma por la unión al antígeno H tipo 1 de una fucosa en la posición  $\alpha 1,3$  o  $\alpha 1,4$  de la N-acetilglucosamina mediada por estas mismas enzimas. Los individuos que no poseen una FUT3/4 activa no pueden expresar fucosa en la posición  $\alpha 1,3$  o  $\alpha 1,4$  y son los denominados Lewis negativos.

La unión a un receptor en el huésped es un primer paso esencial durante el proceso de infección de muchos virus y bacterias. En el caso de rotavirus, este contacto inicial está mediado por VP8\*, el dominio distal de la proteína VP4 (Pesavento et al., 2005). Hace más de tres décadas que se conoce el hecho de que esta proteína es capaz de unirse a residuos externos de ácido siálico en los rotavirus sialidasa sensibles (Bastardo y Holmes, 1980), así como a residuos internos de ácido siálico en algunos rotavirus sialidasa insensibles (Haselhorst et al., 2009). Sin embargo, análisis recientes revelan que algunos rotavirus humanos tienen la capacidad de adhesión de su VP8\* a oligosacáridos de la familia de los HBGAs, siendo esta unión diferente en los distintos genotipos de rotavirus (Böhm et al., 2015; Huang et al., 2012). Así, la proteína recombinante VP8\* de los genotipos P[4], P[6] y P[8] del genogrupo P[II], reconoce los antígenos secretores. Los genotipos P[4] y P[8] se adhieren a los antígenos H tipo 1 y Lewis b, pero no a los Lewis a. El genotipo P[6] se une solamente al antígeno H tipo 1 (Huang et al., 2012). Los genotipos P[9], P[14] y P[25] del genogrupo P[III], que infectan a humanos, se unen específicamente al antígeno A (Liu et al., 2012) y el genotipo P[11] del genogrupo P[IV], que infecta a lactantes, se une a los precursores tipo 1 y tipo 2 (Figura 11) (Liu et al., 2013; Ramani et al., 2013).



Sia: Sialidasa sensible.

**Figura 11. Rotavirus reconoce los antígenos histo-sanguíneos (HBGAs).** En esta figura se expresan un total de 35 genotipos P[1] – P[35] clasificados en 5 genogrupos P[I] – P[V] según la secuencia proteica de la proteína VP4 de la cápside viral (Liu et al., 2012). Tanto los huéspedes diana como los carbohidratos que actúan como receptores para cada genotipo están basados en publicaciones recientes (Huang et al., 2012; Liu et al., 2012, 2013; Ramani et al., 2013), sin embargo, estos datos son todavía desconocidos para muchos rotavirus animales.

Los antígenos secretores (antígeno H tipo 1 y Lewis b) están presentes en el 80% de la población de Norte América y Europa (Le Pendu, 2004), y posiblemente sea así también en otras regiones del mundo. El hecho de que los rotavirus P[4], P[6] y P[8] reconozcan estos antígenos parece tener relación con la mayor prevalencia que presentan estos genotipos en las infecciones humanas. Los genotipos P[4] y P[8] son los más frecuentes, con una prevalencia algo mayor para el genotipo [P8] (Santos y Hoshino, 2005). Además, el genotipo [P8] es el componente más importante en las vacunas Rotarix® y Rotateq®. Estos

hechos estimularon la producción de diversos estudios epidemiológicos en diferentes partes del mundo que buscaban determinar la relación entre el estado secretor y la infección por rotavirus (Imbert-Marcille et al., 2014; Kambhampati et al., 2016; Lee et al., 2018; Payne et al., 2015; Trang et al., 2014; Zhang et al., 2016). En general, los datos obtenidos en estos estudios indican que los individuos no secretores presentan protección, de forma natural, frente a la infección por los genotipos P[4] y P[8] de rotavirus.

El genotipo P[6] es más prevalente en las infecciones por rotavirus en algunos países de África y Asia que en otras regiones del mundo (Das et al., 2004; Waggle et al., 2010). Por otra parte, algunos estudios han demostrado mayor número de individuos secretores Lewis negativos en países africanos y asiáticos que en Norte América o Europa (Nordgren et al., 2013; Soejima et al., 2009; Trang et al., 2014). Puesto que estos individuos pueden secretar antígeno H tipo 1 pero no antígeno Lewis b, esta situación podría indicar que el antígeno Lewis b es un factor necesario para la infección por los genotipos P[4] y P[8], pero no para el genotipo P[6]. Incluso se especula con la posibilidad de que el genotipo P[6] pueda unirse al precursor del antígeno H tipo 1 (el precursor tipo 1) en individuos no secretores (Yu et al., 2014). Esto, de ser cierto, explicaría la mayor prevalencia de infección por rotavirus P[6] en poblaciones con gran cantidad de individuos Lewis negativos, independientemente de cual sea su estado secretor. Esta circunstancia se observa en el estudio llevado a cabo por Nordgren et al. en Burkina Faso y Nicaragua (Nordgren et al., 2014). Algo similar ocurriría con los neonatos no africanos. En ellos, la prevalencia de infección por genotipo P[6] es mayor que en el resto de la población (Shim et al., 2012). Así, aunque sean genéticamente Lewis b positivos, se sabe que la expresión de estos antígenos en la superficie de los eritrocitos puede retrasarse hasta los primeros 2 meses de vida, de manera que se comportarían como Lewis negativos hasta entonces

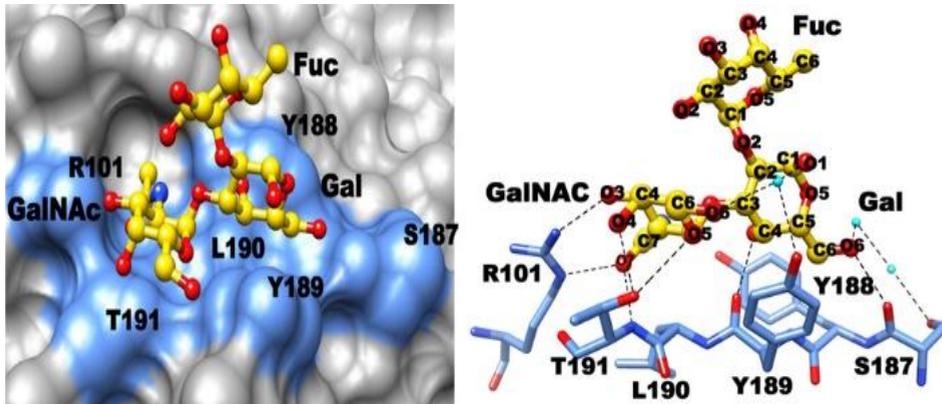
## INTRODUCCIÓN

---

(Ameno et al., 2001). Sin embargo, es importante resaltar que estos estudios se han realizado en hematíes y la expresión de los antígenos Lewis en su membrana puede no tener una relación directa con la presencia de estos antígenos en el tracto intestinal. Además, se conoce muy poco acerca de la expresión de los HBGAs en los niños y de sus posibles cambios con el desarrollo o con infecciones concomitantes (Nordgren et al., 2014). Estos acontecimientos plantean, por otro lado, la cuestión de si los factores genéticos del huésped pueden influir en la susceptibilidad a las cepas vacunales (en su mayoría basadas en el genotipo P[8]) y en su capacidad de protección frente a la infección por rotavirus. De tal forma que si consideramos que los niños Lewis negativos son resistentes a la infección por el genotipo P[8], también son menos susceptibles a la cepa vacunal y, sin embargo, sí que son susceptibles a la infección por el genotipo P[6]. Este dato podría explicar la menor efectividad que presentan las vacunas en algunas poblaciones africanas y asiáticas (con gran cantidad de individuos Lewis negativos), aunque son necesarios más estudios para confirmarlo.

En cuanto a los antígenos ABO, existen estudios recientes en diferentes partes del mundo que relacionan el antígeno A con la infección por rotavirus (Bekdas et al., 2014; Elnady et al., 2017; Sun et al., 2018; Trang et al., 2014). Sin embargo, otros trabajos no encuentran ningún tipo de relación (Mohanty et al., 2016; Yazgan et al., 2013) y aunque se ha comprobado la unión de rotavirus al antígeno A mediante análisis estructural por cristalografía (Figura 12) (Hu et al., 2012; Sun et al., 2018) todavía existe controversia sobre el tipo de relación que existe entre ambos, siendo necesarios estudios epidemiológicos que aporten más datos sobre el carácter de esta relación. Incluso se especula con la posibilidad de que el antígeno A, presente en la mucosa intestinal de diferentes especies animales, incluidas las domésticas (Zakhour et al.,

2009), pueda actuar como posible factor responsable en la transmisión interespecies de rotavirus (Matthijnsens et al., 2009; M. Tan y Jiang, 2014).



**Figura 12. Análisis estructural de la unión de VP8\* del genotipo P[14] con el antígeno histo-sanguíneo tipo A.** El trisacárido de unión del antígeno A (GalNAC: N-acetilgalactosamina; Gal: galactosa; Fuc: fucosa) está representado en forma tridimensional (amarillo) con sus átomos de carbono numerados según convención. Los átomos de nitrógeno y oxígeno están marcados en azul y rojo respectivamente. La superficie de unión de la proteína VP8\* en el genotipo P[14] está representada en gris y los residuos de aminoácidos que participan coloreados en azul. La red de enlaces de hidrógeno entre los residuos de aminoácidos de VP8\* y el trisacárido de unión del antígeno A está representada en forma de líneas discontinuas. Las moléculas de agua que interactúan están dibujadas como pequeñas esferas de color celeste.

Por otra parte, en estudios *in vitro* realizados con saliva, se ha observado una menor afinidad de unión del genotipo P[8] en individuos con grupo sanguíneo B, respecto al resto de grupos sanguíneos. Como explicación, se ha sugerido la posibilidad de que el antígeno B interfiera en la unión de rotavirus al antígeno H tipo 1 o Lewis b (Huang et al., 2012; Ma et al., 2015). Así mismo, se ha observado menor incidencia de gastroenteritis por rotavirus (Elnady et al., 2017; Kazi et al., 2017) y menor grado de seroconversión después de una dosis de vacuna en los

## **INTRODUCCIÓN**

---

individuos con grupo sanguíneo B, que en aquellos que expresan el grupo sanguíneo A o O (Bucardo et al., 2018).

En otra línea de trabajo, Mohanty et al. indican la posibilidad de que el antígeno O pueda actuar como protector frente a la infección por rotavirus en un estudio llevado a cabo en India (Mohanty et al., 2016). Nordgren et al. encontraron mayor incidencia de infección por genotipo P[6] respecto a P[8] en niños secretores positivos con grupo sanguíneo O en un estudio realizado en Burkina Faso (Nordgren et al., 2014).

En lo referente al grupo sanguíneo AB, no se han encontrado datos relevantes en la bibliografía revisada para este trabajo.

Por todo lo anteriormente expuesto, consideramos que son necesarios más estudios estructurales, virológicos y epidemiológicos que ayuden a conocer con más detalle el papel que representan los antígenos histo-sanguíneos en la infección por rotavirus.



## **OBJETIVOS**



### 2. OBJETIVOS

#### 2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es analizar la relación entre los antígenos histo-sanguíneos (HBGAs) de niños infectados con rotavirus y los genotipos virales G/P infectantes.

#### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos planteados son:

1. Caracterizar los genotipos G (VP7) y P (VP4) de los rotavirus aislados en las heces de niños afectados de gastroenteritis aguda, diagnosticados en el departamento de salud 5 de Valencia durante el periodo de tiempo en que se realiza el estudio: enero de 2013 a diciembre de 2015.
2. Analizar los datos clínicos y demográficos de los niños infectados por rotavirus incluidos en el estudio.
3. Determinar los antígenos ABO y Lewis en la saliva de los niños infectados y en un grupo control.
4. Determinar el estado secretor (FUT2+) de los pacientes infectados con rotavirus.
5. Analizar la relación entre los genotipos detectados y los factores genéticos (estado secretor, Lewis, grupo sanguíneo) en los niños con infección por rotavirus en nuestra área geográfica.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. PERIODO DE INVESTIGACIÓN Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el periodo de tiempo comprendido entre enero de 2013 y diciembre de 2015 con pacientes pediátricos de 0 a 5 años de edad procedentes del área metropolitana y de las áreas rurales dependientes del Hospital Clínico Universitario de Valencia. La población total atendida por este hospital era de 345.498 personas, de las cuales 20.091 (5'82%) pertenecían al grupo de 0 a 5 años.

En esta área, así como en el resto de la Comunidad Valenciana, la vacunación con rotavirus no está incorporada en el Programa Nacional de Vacunaciones, por lo que no existe financiación pública para su adquisición. El coste íntegro de la vacuna es asumido por los padres o tutores que deseen vacunar a los niños.

El estudio se realizó con un total de 217 pacientes pediátricos diagnosticados de gastroenteritis aguda por rotavirus. Se tomaron muestras de heces y de saliva de cada uno de los niños en las consultas de Pediatría de los Centros de Salud o en el Servicio de Urgencias de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valencia y se realizó el diagnóstico de infección por rotavirus en el Servicio de Microbiología de este hospital. Se conservó a -80°C la primera muestra de heces de cada paciente en la que se había detectado la presencia de rotavirus y se excluyeron posteriores muestras de un mismo sujeto, así como aquellas de las que se carecía de los datos demográficos y vacunales completos (edad, sexo, procedencia, estado vacunal frente a rotavirus) o de una muestra de saliva del individuo. De 133 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión (apartado 3.2), 71 (53'4%) procedían del área metropolitana y 62 (46'6%) de zonas rurales dependientes del hospital. Los pacientes tenían edades comprendidas entre 13 días y 5 años, con

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

una edad media de 1 año y 10 meses. Además, la mayor parte de ellos, 112 (84'2%), eran menores de 3 años. En cuanto a la distribución por sexos, 62 fueron niñas (46'6%) y 71 fueron niños (53'4%).

Asimismo, se incluyó un grupo control de 50 niños sanos que presentaban unas características similares a las del grupo de pacientes en cuanto a edad, sexo y país de origen de los progenitores, de forma que pudiese servir como orientación de las características generales que presentaba la población de esta área. Este grupo estaba formado por 24 niños (48%) y 26 niñas (52%). La edad, en el momento del análisis, estaba comprendida entre 1 mes y 5 años, con una edad media de 2 años y 10 meses y, de todos ellos, 31 (62%) eran menores de 3 años. Respecto al estado de vacunación frente a rotavirus, 28 niños (56%) habían sido vacunados frente a rotavirus.

Por otro lado, se solicitaron al Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública, Generalitat Valenciana, los datos relativos a la expresión de los antígenos histo-sanguíneos de los donantes de sangre analizados en la provincia de Valencia, a fin de realizar una comparación con la población de estudio. De esta forma, se obtuvieron los datos de grupos sanguíneos y antígenos Lewis de un total de 283.399 donantes. No se pudieron obtener los datos referentes al fenotipo secretor de los individuos porque este análisis no se realiza de forma rutinaria en las muestras. Por cuestiones de privacidad y política de protección de datos no se facilitaron los datos demográficos referentes a edad, sexo, lugar de nacimiento o localización de los donantes analizados.

### 3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se consideraron criterios de inclusión para formar parte del grupo de pacientes los siguientes:

- Infección por rotavirus del grupo A, diagnosticada por métodos de laboratorio.
- Edad comprendida entre 0 y 5 años.
- Disponibilidad de muestras de heces y saliva.
- Aceptación de la inclusión del niño en el estudio y firma del consentimiento informado por los padres o tutores.
- Datos demográficos completos.
- Información disponible en el Sistema de Información Vacunal (SIV) de la Generalitat Valenciana sobre el estado vacunal (vacuna anti-rotavirus).

El incumplimiento de alguno de estos criterios fue motivo para excluir a los niños del estudio.

### 3.3. MUESTRAS CLÍNICAS

#### 3.3.1. Obtención de las muestras

A los pacientes afectados de gastroenteritis aguda se les recogió una muestra de heces en las primeras 24 horas tras acudir al centro sanitario. Una vez seleccionados los pacientes con muestras de heces positivas para rotavirus, se contactó con sus cuidadores para ofrecerles la posibilidad de colaborar en el estudio. Se les explicó el protocolo completo del estudio y se les informó de los posibles riesgos de su participación. A aquellos que aceptaron voluntariamente participar, se les

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

entregó un consentimiento informado que firmaron previamente a la recogida de muestras. El protocolo de estudio y el consentimiento informado habían sido previamente aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por el Comité Ético de Investigación Clínica Corporativo de Atención Primaria de la Comunidad Valenciana y por la Fiscalía de Menores de Valencia. Así, se tomaron tanto muestras de saliva como de escobillado bucal de 133 niños infectados por rotavirus, cuyos cuidadores habían aceptado participar en el estudio y habían firmado el consentimiento informado. Siguiendo el mismo procedimiento, se tomó una muestra de saliva y escobillado bucal a los 50 niños del grupo control.

### **3.3.2. Conservación de las muestras**

Las muestras de heces y saliva se conservaron a 4°C si su procesamiento iba a realizarse en un periodo breve de tiempo, y se congelaron a - 80°C si su análisis iba a demorarse en el tiempo.

## **3.4. ESTUDIO VIROLÓGICO**

### **3.4.1. Detección de rotavirus en heces por técnicas inmunológicas**

La detección de antígeno de rotavirus en las muestras fecales de los pacientes se realizó por método inmunocromatográfico o de difusión lateral (Rotavirus-Adenovirus, Certest Biotec) o por ELISA (Premier Rotaclone®, Meridian Diagnostics).

El diagnóstico por método inmunocromatográfico o de difusión lateral se realizó de la siguiente manera:

- Se tomó una muestra de heces del paciente y se diluyó al 20% en el tampón de preparación del test.
- Se colocaron 4 gotas de esta dilución en la ventana marcada para la muestra.
- Se interpretó el resultado obtenido (aparición de bandas correspondientes a antígenos de rotavirus, adenovirus y control) transcurridos 10 minutos.

El diagnóstico por método ELISA se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del ensayo Premier Rotaclone<sup>®</sup>, Meridian Diagnostics:

- Se realizaron diluciones al 20% (p/v) de cada una de las muestras fecales a analizar en 1 ml de diluyente.
- Se tomaron 2 gotas (100 µl) de cada una de las muestras fecales diluidas, del control positivo y del control negativo y se colocaron en la placa de microtitulación.
- Se añadieron 2 gotas (100 µl) de conjugado enzimático y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min.
- Se vació el contenido de los pocillos en un recipiente de desecho y se realizaron 5 lavados con agua desionizada.
- Se añadieron 2 gotas de sustrato A (100 µl) y 2 gotas de sustrato B (100 µl) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Se procedió a la lectura de la placa en espectrofotómetro (Multiskan FC, Thermo Scientific) a 450 nm, utilizando como referencia el filtro de 600 nm.

Las muestras con valores de absorbancia superiores a 0'150 unidades se consideraron positivas.

### 3.4.2. Detección de rotavirus en heces por técnicas moleculares. Caracterización de genotipos G y P mediante transcripción inversa y amplificación de ácidos nucleicos (RT-PCR)

Se prepararon suspensiones fecales al 20% (p/v) en tampón fosfato salino (PBS, de sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*) que pudieran ser conservadas a -80°C y se obtuvo el ARN viral por el método de isotiocianato de guanidina y matriz de sílica (método de Boom) o mediante el método de extracción con Trizol® (Invitrogen).

El método de Boom (Boom et al., 1990) para aislar ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas consistió en 4 pasos:

#### 1. *Lisis y homogenización de la muestra.*

Se mezclaban 200 µl de cada suspensión fecal al 20% (p/v) en PBS con 800 µl de la solución de lisis L6 (60 g de isotiocianato de guanidina GTC; 50 ml de 0'1 M Tris-HCl pH 6'4; 11 ml de 0'2 M EDTA pH 8; 1'3 g de Triton X-100).

#### 2. *Mezcla de la muestra previamente tratada con isotiocianato de guanidina y partículas de sílica.*

Se añadían 20 µl de \*matriz de sílica y se agitaba intensamente (vórtex) durante 10 segundos y se incubaba durante 10 - 15 minutos a temperatura ambiente.

### \*Preparación de la matriz de sílica:

- Añadir 60 gramos de dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) (Sigma, S5631) a un volumen total de 500 ml de agua desionizada contenida en una probeta.
- Permitir que la sílica sedimente por gravedad durante 24 horas a temperatura ambiente.
- Extraer 430 ml del sobrenadante del preparado, agregar agua desionizada hasta 500 ml y agitar vigorosamente.
- Sedimentar 24 horas a temperatura ambiente.
- Extraer 440 ml de sobrenadante y agregar 0'6 ml de HCl (32% p/v) para ajustar la suspensión de sílica a pH 2'0.
- Dispensar la suspensión de sílica en alícuotas de 4 ml y esterilizar en autoclave. Conservar a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3. *Lavar los complejos ácido nucleico-sílica.*

En este paso, los complejos ácido nucleico-sílica se lavaban varias veces para eliminar los contaminantes. Este proceso constaba de las siguientes fases:

- Se recogían los complejos ácido nucleico-sílica del líquido mediante centrifugación durante 10 minutos a 2.600 rpm y tras eliminar el sobrenadante por succión.
- Se lavaba el sedimento dos veces con 400  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado L2 (180 g de isotiocianato de guanidina; 150 ml de 0'1M Tris-HCl pH 6'4) utilizando un agitador tipo vórtex.
- Se centrifugaba a 2.600 rpm durante 2 minutos y se recogían de nuevo los complejos ácido nucleico-sílica descartando el sobrenadante.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- Se procedía a lavar dos veces con etanol 70%, centrifugando a 3.100 rpm durante 2 minutos y una vez con acetona, centrifugando a 10.000 rpm durante 2 minutos.
- Se secaban los complejos ácido nucleico-sílica a 50°C durante 10 minutos.

#### 4. *Separar los ácidos nucleicos de los granos de sílica.*

La técnica consiste en disolver los complejos ácido nucleico-sílica en un tampón con menor concentración de la sustancia caotrópica. De esta manera, los ácidos nucleicos puros son aislados del material de partida. Para ello seguimos los siguientes pasos:

- Resuspender los complejos ácido nucleico-sílica del sedimento en 30 µl de H<sub>2</sub>O tratada con dietilpircarbonato (DEPC) y con 1 µl de RNasin® (Promega), incubando 10 minutos a 65 °C.
- Centrifugar a 10.000 rpm durante 1 minuto.
- Recoger el sobrenadante. Incubar a 56°C durante 5 minutos y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 segundos para sedimentar los restos de sílica.

El método de extracción con Trizol® (Invitrogen) (Chomzynski, 1987) consistió en:

1. Homogenizar el material de partida con 1 ml de reactivo Trizol® (Invitrogen) e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
2. Centrifugar durante 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C y transferir la fase acuosa a un tubo de reacción limpio.

3. Adicionar 0'2 ml de cloroformo, agitar vigorosamente e incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
4. Repetir el paso 3.
5. Añadir 0'5 ml de isopropanol e incubar durante la noche a 4°C.
6. Centrifugar durante 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C y eliminar el sobrenadante.
7. Añadir 1 ml de etanol 70%, agitar vigorosamente y centrifugar durante 5 minutos a 7.500 rpm a 4°C, eliminar el sobrenadante.
8. Dejar secar el sedimento de ARN y resuspender en 30 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).
9. Incubar durante 10 minutos a 65°C.

Una vez extraído el ARN viral se conservó a -80°C hasta su procesamiento.

Rotavirus es un virus de ARN de doble cadena, por lo que una vez extraído el ácido nucleico hay que realizar una transcripción inversa (RT) para obtener el ADN complementario (ADNc) que se utilizará como molde en las reacciones de PCR. La reacción de transcripción inversa y amplificación de ácidos nucleicos (RT-PCR) se realizó con cebadores aleatorios ("*random primers*") utilizando la enzima *SuperScript® III Reverse Transcriptase* (Life Technologies). El procedimiento utilizado fue el siguiente:

1. Añadir 1 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a 9 µl de extracto de ácidos nucleicos e incubar a 65°C durante 5 minutos y mantener a 4°C durante 2 minutos.
2. Agregar 20 µl de la \*solución "master" de transcripción inversa al extracto de ácidos nucleicos (10 µl).

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

\*Reacción para transcripción inversa (RT). Solución "master":

Tampón de transcriptasa inversa 5X	6 µl
Inhibidor de RNAsas (40 U/µl, Biotools)	0'25 µl
"Random primers" (50 µM, Invitrogen)	0'5 µl
DDT (0,1 M, Invitrogen)	1'5 µl
dNTPs (10 mM, Biotools)	1 µl
SuperScript® III (200 U/µl, Invitrogen)	0'2 µl
H <sub>2</sub> O tratada con DEPC	10'55 µl
TOTAL	20 µl

3. Incubar 50 minutos a 50°C, 15 minutos a 70°C y finalmente 2 minutos a 92 °C para inactivar la transcriptasa inversa.

La detección de rotavirus en heces se realizó mediante amplificación por PCR de un fragmento del gen VP6. Para ello, se utilizaron cebadores específicos descritos por Iturriza-Gómara y cols. (Iturriza-Gómara et al., 2002) con el siguiente protocolo:

- Cebadores:
  - VP6-F: 5' GAC GGV GCR ACT ACA TGG T 3'
  - VP6-R: 5' GTC CAA TTC ATN CCT GGT G 3'

Producto de la amplificación: 382 pb.

- Mezcla de la reacción:

ADNc	5 $\mu$ l
Tampón de PCR 10X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 $\mu$ l
dNTPs (10 mM, Biotools)	1 $\mu$ l
Cebador VP6-F (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Cebador VP6-R (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l Biotools)	0'5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O desionizada	34'5 $\mu$ l
TOTAL	50 $\mu$ l

- Protocolo de PCR:

- Un ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C.
- 35 ciclos de:
  - o Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C .
  - o Hibridación: 1 minuto a 50 °C.
  - o Extensión: 1 minuto a 72 °C.
- Un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72 °C.

- Electroforesis de los amplificados:

- Gel de agarosa al 1'5% (p/v) en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0'5X con RedSafe<sup>®</sup> (Intron Biotechnology, Burlington, MA, EEUU) 0'5%.
- 80 voltios durante 45 minutos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Los amplicones se observaban con un captador de imágenes y un transiluminador de luz ultravioleta (Gelprinter Ultra, T.D.I.).

A continuación, se amplificaron en dos reacciones de PCR diferentes los genes codificantes de las proteínas VP7 y VP4. Posteriormente, se utilizaron reacciones de PCR 'multiplex' que permitieron identificar el genotipo G (VP7) y P (VP4) de cada cepa, siguiendo procedimientos descritos (Iturriza-Gómara et al., 2009) y establecidos por la red Europea de Vigilancia de Rotavirus "EuroRotaNet" (<https://www.eurorotanet.com/>).

Para tipificar el gen de la glicoproteína VP7 (G) se realizaron 2 reacciones de PCR. En la primera se realizó la amplificación del gen con cebadores comunes VP7-F y VP7-R (Iturriza-Gómara et al., 2001).

### 1ª PCR de VP7. Amplificación VP7:

- Cebadores:
  - 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:

ADNc	5 $\mu$ l
Tampón de PCR 10X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 $\mu$ l
dNTPs (10 mM, Biotools)	1 $\mu$ l
Cebador VP7-F (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Cebador VP7-R (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/ $\mu$ l Biotools)	0'5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O desionizada	34'5 $\mu$ l
TOTAL	50 $\mu$ l

- Protocolo de PCR:
  - Un ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C.
  - 35 ciclos de:
    - o Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C .
    - o Hibridación: 1 minuto a 52 °C.
    - o Extensión: 1 minuto a 72 °C.
  - Un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72 °C.

Se analizaron los amplificados con electroforesis en gel de agarosa, según técnica descrita anteriormente para el gen de VP6.

El producto de la primera reacción de PCR se sometió a una segunda PCR según la región hipervariable del gen. Para ello se utilizó un cebador común a todos los genotipos G (VP7-R) y un cebador específico para cada genotipo G estudiado (G1-G4, G8-G10 y G12) (Tabla 15) que crea un amplicón de tamaño característico (Figura 13) (Aladin et al., 2010; Gouvea et al., 1990; Iturriza-Gómara et al., 2004).

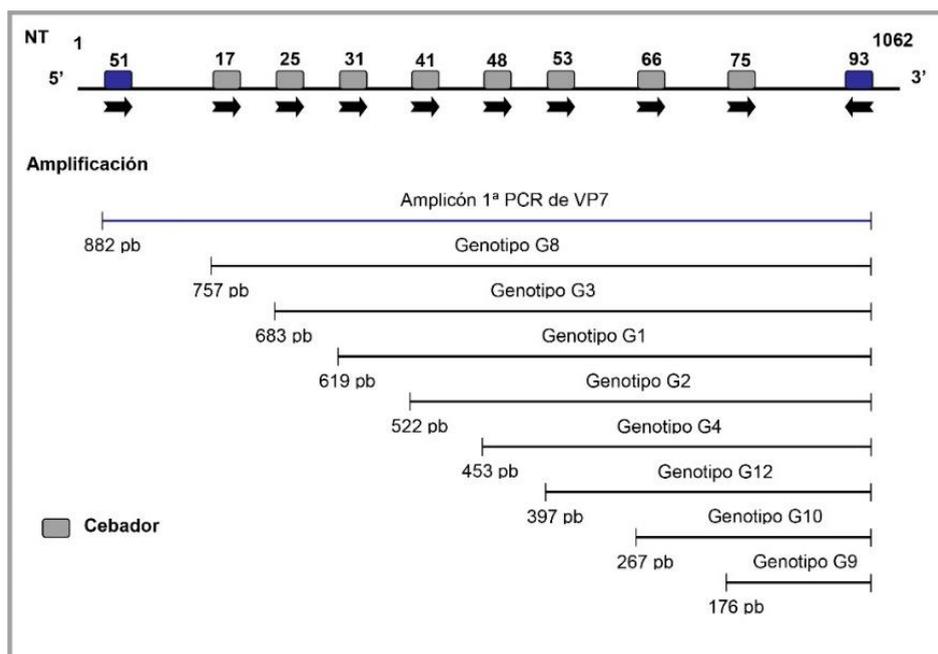
## MATERIAL Y MÉTODOS

### 2ª PCR de VP7. Diferenciación G múltiple:

- Cebadores:

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

**Tabla 15. Secuencias de cebadores específicos de genotipos G (VP7).**



**Figura 13. Esquema de la amplificación de fragmentos de PCR de ocho genotipos G (G1 a G4, G8, G9, G10 y G12).** Estos genotipos se identifican según su tamaño mediante análisis por electroforesis en gel de agarosa.

- Mezcla de la reacción:

ADN de la PCR de amplificación de VP7	1 $\mu$ l
Tampón de PCR 10X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2'5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM, Biotools)	0'5 $\mu$ l
Cebador VP7-R	1 $\mu$ l
Cebador G1 (aBT1)	1 $\mu$ l
Cebador G2 (aCT2)	1 $\mu$ l
Cebador G3 (aET3)	1 $\mu$ l
Cebador G4 (aDT4)	1 $\mu$ l
Cebador G8 (aAT8)	1 $\mu$ l
Cebador G9 (aFT9)	1 $\mu$ l
Cebador G10	1 $\mu$ l
Cebador G12	1 $\mu$ l
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/ $\mu$ l, Biotools)	0'5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O desionizada	31'5 $\mu$ l
TOTAL	50 $\mu$ l

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- Protocolo de PCR:
  - Un ciclo inicial de 4 minutos a 94 °C.
  - 30 ciclos de:
    - Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C .
    - Hibridación: 2 minutos a 42 °C.
    - Extensión: 1 minuto a 72 °C.
  - Un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72 °C.

Para tipificar el gen de la proteína VP4 (P) se realizaron dos reacciones de PCR mediante RT-PCR semi-anidada. En la primera reacción de PCR se realizó la amplificación del gen con cebadores comunes VP4-F y VP4-R (Gentsch et al., 1992).

### 1ª PCR de VP4. Amplificación VP4:

- Cebadores:
  - VP4-F: 5' TAT GCT CCA GTN AAT TGG 3' (nt 132-149)
  - VP4-R: 5' ATT GCA TTT CTT TCC ATA ATG 3' (nt 775-795)

Producto de la amplificación: 664 pb.

- Mezcla de la reacción:

ADNc	5 $\mu$ l
Tampón de PCR 10X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 $\mu$ l
dNTPs (10 mM, Biotools)	1 $\mu$ l
Cebador VP4-F (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Cebador VP4-R (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/ $\mu$ l Biotools)	0'5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O desionizada	34'5 $\mu$ l
TOTAL	50 $\mu$ l

- Protocolo de PCR:
  - Un ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C.
  - 35 ciclos de:
    - Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C .
    - Hibridación: 1 minuto a 50 °C.
    - Extensión: 1 minuto a 72 °C.
  - Un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72 °C.

El producto de la primera reacción de PCR se sometió a una segunda PCR para identificar los genotipos P de rotavirus según la región hipervariable del gen. Para ello se utilizó un cebador común a todos los genotipos P (VP4-F) y un cebador específico para cada uno de los genotipos P estudiados (P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] y P[11]) (Tabla 16) que generaba un amplicón de tamaño característico (Figura 14) (Gentsch et al., 1992; Iturriza-Gómara et al., 2004).

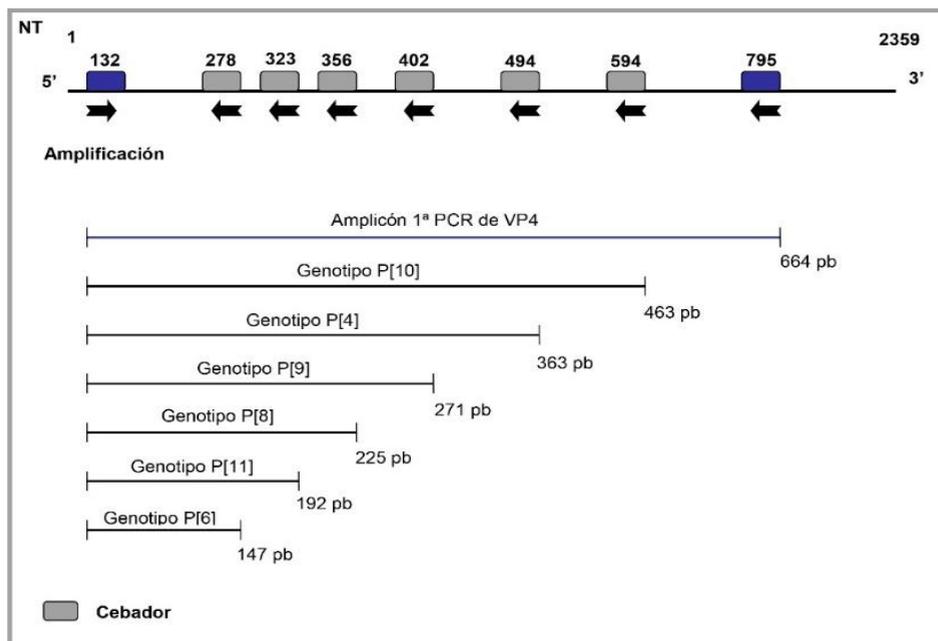
## MATERIAL Y MÉTODOS

### 2ª PCR de VP4. Diferenciación P múltiple:

- Cebadores:

CEBADOR	SECUENCIA	NUCLEÓTIDOS	AMPLICIÓN
Genotipo P[4]	5' CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC 3'	474-494	363 pb
Genotipo P[6]	5' TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA 3'	259-278	147 pb
Genotipo P[8]	5' TCT ACT GGR TTR ACN TGC 3'	339-356	225 pb
Genotipo P[9]	5' TGA GAC ATG CAA TTG GAC 3'	385-402	271 pb
Genotipo P[10]	5' ATC ATA GTT AGT AGT CGG 3'	575-594	463 pb
Genotipo P[11]	5' GTA AAC ATC CAG AAT GTG 3'	305-323	192 pb

**Tabla 16. Secuencias de los cebadores específicos de genotipo P (VP4).**



**Figura 14. Esquema de la amplificación de fragmentos de PCR correspondientes a seis genotipos P (P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] y P[11]).** Estos genotipos se identifican según su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa.

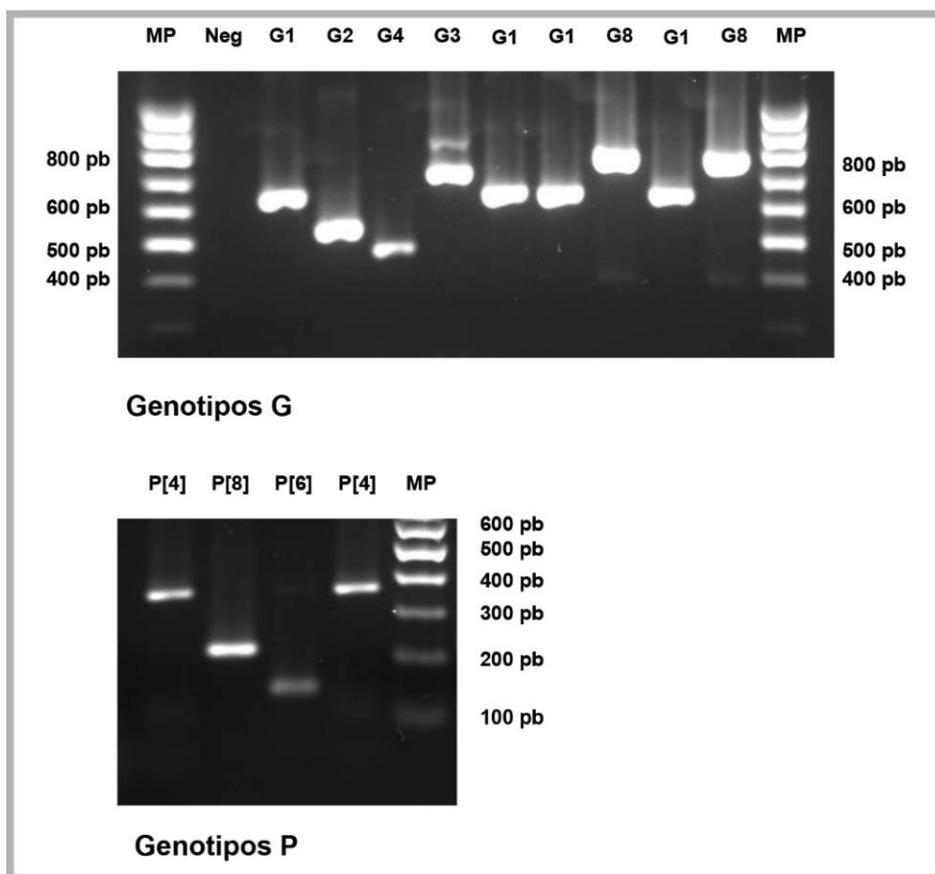
- Mezcla de la reacción:

ADN de la PCR de amplificación de VP4	1 µl
Tampón de PCR 10X	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2'5 µl
dNTPs (10 mM, Biotools)	0'5 µl
Cebador VP4-F	1 µl
Cebador P[4] (2T-1)	1 µl
Cebador P[6] (3T-1)	1 µl
Cebador P[8] (1T-1D)	1 µl
Cebador P[9] (4T-1)	1 µl
Cebador P[10] (5T-1)	1 µl
Cebador P[11]	1 µl
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/µl, Biotools)	0'5 µl
H <sub>2</sub> O desionizada	31'5 µl
TOTAL	50 µl

- Protocolo de PCR:
  - Un ciclo inicial de 4 minutos a 94 °C.
  - 30 ciclos de:
    - Desnaturalización: 1 minuto a 94 °C.
    - Hibridación: 2 minutos a 45 °C.
    - Extensión: 1 minuto a 72 °C.
  - Un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72 °C.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez amplificados los genes de las proteínas VP4 y VP7 mediante las técnicas de PCR descritas en el procedimiento anterior, se realizaba electroforesis en gel de agarosa al 1'5% (p/v) en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0'5X con RedSafe® (Intron Biotechnology, Burlington, MA, EEUU) 0'5%, aplicando una tensión de 80 voltios durante 45 minutos. Posteriormente, se visualizaban los amplicones con un captador de imágenes y un transiluminador de luz ultravioleta (Gelprinter Ultra, T.D.I.) (Figura 15).



MP: Marcador de peso molecular. Neg: Control negativo.

**Figura 15. Identificación mediante RT-PCR de genotipos G y P de cepas de rotavirus según los tamaños de los amplicones.**

### 3.5. ESTUDIO DE LOS ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS

#### 3.5.1. Determinación del grupo sanguíneo ABO y de los antígenos Lewis a y Lewis b

La tipificación de grupo sanguíneo ABO se realizó en una muestra de saliva recogida de cada uno de los individuos del estudio. Para su determinación se utilizó la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) con anticuerpos monoclonales (Nordgren et al., 2013). La técnica utilizada fue la siguiente:

1. Se sensibilizaron las placas de microtitulación (Costar, ref. 3590, Corning, NY, EEUU) con cada una de las muestras de saliva, previamente hervidas, diluidas a 1/500 en tampón carbonato/bicarbonato pH 9'6, y se incubaron a 4°C durante la noche en atmósfera húmeda.
2. Se lavaron los pocillos con 300 µl de PBS-T al 0'05%.
3. Se bloquearon los pocillos con PBS-BSA (siglas en inglés de *phosphate buffered saline - bovine serum albumin*) al 3% durante 30 minutos a 37°C.
4. Se realizaron 3 lavados con 300 µl de PBS-T al 0'05%.
5. Se añadieron los anticuerpos monoclonales IgG de ratón anti-A (ABO1, Diagast, Loos Cedex, Francia) y anti-B (ABO2, Diagast) diluidos a 1/100 en PBS-BSA al 1% durante 1 hora a 37°C.
6. Se realizaron 3 lavados con 300 µl de PBS-T al 0'05%.
7. Se agregaron anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (*goat anti-mouse IgG-HRP*,

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO, EEUU) diluidos 1/2000 en PBS-BSA al 1% y se incubaron durante 1 hora a 37°C.

8. Se realizaron 3 lavados con 300  $\mu$ l de PBS-T al 0'05%.
9. Se añadió OPD-Fast (Sigma Aldrich) durante 10 minutos para detectar y cuantificar la actividad peroxidasa.
10. Se detuvo la reacción añadiendo 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M.

Una vez finalizada la reacción se visualizaron los resultados obtenidos por espectrofotometría a 492 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific), según la absorbancia de las muestras.

En todos los análisis realizados se incluyeron marcadores que sirvieran de comparación con los resultados obtenidos. Se aplicó un control negativo, con agua bidestilada y dos controles positivos, para los que se utilizaron muestras conocidas de saliva claramente positivas para el grupo A y el grupo B. Para calcular el punto de corte (*cut-off*) y considerar una muestra positiva se requería que el valor de absorbancia fuera igual o mayor al triple del valor obtenido con la muestra negativa de control. Así, consideramos que un individuo pertenecía al grupo sanguíneo A o B cuando el resultado era positivo solamente para los anticuerpos específicos de uno de ambos grupos, del grupo AB cuando era positivo para ambos y del grupo O cuando era negativo para los dos.

Para determinar los antígenos Lewis a y Lewis b en las muestras de saliva, se utilizó la misma técnica descrita para la determinación del grupo sanguíneo ABO pero utilizando anticuerpos monoclonales IgG de ratón anti-Lewis a (BG-5 *monoclonal antibody*, Covance Signet, Dedham, MA, EEUU) y anti-Lewis b (BG-6 *monoclonal antibody*, Covance Signet) diluidos a 1/100 en PBS-BSA al 1%. En todos los análisis realizados se utilizó un control negativo y un control positivo para cada uno de los

antígenos a analizar. Para calcular el punto de corte (*cut-off*) y considerar una muestra positiva utilizamos como referencia que fuera igual o mayor al triple del valor obtenido para la muestra negativa de control. De esta forma, obtuvimos cuatro grupos de individuos distintos según el resultado de los análisis, Lewis a+b+, Lewis a+b-, Lewis a-b+ y Lewis a-b-.

### 3.5.2. Caracterización del fenotipo / genotipo secretor (gen FUT2)

El fenotipo secretor se determinó en saliva mediante un ensayo de ELISA con una lectina *Ulex europaeus* específica del oligosacárido Fuc $\alpha$ 1-2Gal-R, presente en individuos secretores pero no así en los individuos no secretores (Nordgren et al., 2013). Para su análisis se utilizó una técnica de ELISA similar a la llevada a cabo para determinar el grupo sanguíneo ABO o los antígenos Lewis, pero en este caso se utilizó la lectina *Ulex europaeus agglutinin-1* (UEA-1) como marcador específico:

1. Se tapizaron las placas de microtitulación (Costar) con muestras de saliva de cada individuo previamente hervidas y diluidas a 1/500 en tampón carbonato/bicarbonato pH 9'6 a 4°C durante la noche en atmósfera húmeda.
2. Se lavaron los pocillos 3 veces con 300  $\mu$ l de PBS-T al 0'05%.
3. Se bloquearon los pocillos con PBS-BSA al 3% durante 30 minutos a 37°C.
4. Se lavaron 3 veces con 300  $\mu$ l de PBS-T al 0'05%.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

5. Se añadió HRP-conjugated *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-I, Sigma Aldrich) diluido 1/3200 y se incubó durante 90 minutos a 37°C.
6. Se lavaron 3 veces con 300 µl de PBS-T al 0'05%.
7. Se agregó al preparado 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina-TMB (Dako Cytomation, Carpintería, California, EEUU) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Se paró la reacción añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M.

Una vez finalizada la reacción se leyeron los resultados por espectrofotometría a 450 nm.

En todos los análisis realizados se utilizó un control negativo (agua bidestilada) y una muestra positiva (saliva de un individuo secretor conocido) que sirvieran de comparación para los resultados obtenidos. Para calcular el punto de corte (*cut-off*) y considerar una muestra positiva utilizamos como referencia que fuera igual o mayor al triple del valor obtenido para el control negativo.

Por otro lado, se determinó el genotipo secretor, homocigoto o heterocigoto, mediante PCR-RFLP del gen *FUT2* tras digestión de los amplicones con *Avall* y análisis en gel de agarosa (Lindesmith et al., 2003; Serpa et al., 2004). El primer paso consistió en la extracción del ADN celular mediante técnica de purificación del ADN con JetFlex Genomic DNA Purification Kits (Genomed, Vilnius, Lituania):

1. Añadir 250 µl de tampón de lisis celular a una muestra de 50 µl de saliva (5 µl de tampón por cada 1 µl de muestra).
2. Añadir 20 µl de proteinasa K (1 µl por cada 2'5 µl de muestra de saliva).

3. Incubar a 58°C entre 1 y 12 horas hasta que la mezcla sea clara y homogénea. Si hay restos celulares visibles, centrifugar la mezcla y transferir el sobrenadante claro a un tubo limpio.
4. Añadir 10 µl de RNAsa A (1 µl por cada 5 µl de muestra de saliva). Incubar a 37°C durante 5 minutos.
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Añadir 150 µl de tampón de precipitación de proteínas (1 µl por cada 2 µl de mezcla de lisado celular).
7. Mezclar vigorosamente con vortex durante 20 segundos.
8. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas precipitadas forman un sedimento compacto y el sobrenadante debe ser claro.
9. Trasferir el sobrenadante a un tubo limpio.
10. Añadir 150 µl de isopropanol (mismo volumen que el tampón de precipitación de proteínas) y agitar la mezcla. No utilizar vortex.
11. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. El ADN precipitado forma un sedimento blanco en el fondo del tubo.
12. Decantar el sobrenadante y dejar secar el tubo.
13. Añadir 1 ml de etanol 70% y lavar el pellet de ADN por inversión del tubo varias veces.
14. Centrifugar a 12.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Decantar cuidadosamente el sobrenadante para no perder el sedimento de ADN y dejar secar el tubo completamente.
16. Resuspender el sedimento de ADN en 50 µl de tampón de disolución de ADN.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

17. Incubar a temperatura ambiente durante la noche o a 65°C durante 1 hora. Las soluciones con ADN se conservaron a 4°C si se pensaba hacer un uso inmediato, o se congelaron a -20°C cuando iba a demorarse su procesamiento.

Extraído el ADN de las muestras se realizó amplificación del gen *FUT2* mediante PCR con cebadores específicos, tal y como fueron descritos en la literatura (Lindesmith et al., 2003; Serpa et al., 2004).

- Cebadores:
  - *Forward*: 5'-GAGGAATACCGCCACATCCCGGGGGAGTAC-3'
  - *Reverse*: 5'-AGCCGGCCGGGCACCTTTGTAGGGGTCCAT-3'
- Mezcla de la reacción:

Solución de ADN	5 µl
Tampón de PCR 10X	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2'5 µl
dNTPs (10 mM, Biotools)	1 µl
Primer Forward (10 µM)	2 µl
Primer Reverse (10 µM)	2 µl
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/µl Biotools)	0'5 µl
H <sub>2</sub> O DEPC	32 µl
TOTAL	50 µl

- Protocolo de PCR:
  - Un ciclo inicial de 5 minutos a 95 °C.
  - 35 ciclos de:
    - Desnaturalización: 30 segundos a 94 °C.
    - Hibridación: 30 segundos a 70°C.
    - Extensión: 1 minuto a 72 °C.
  - Un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72 °C.
  
- Visualización:
  - Gel de agarosa al 1'5% (p/v) en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0'5 X con bromuro de etidio 0'5%.
  - 70 voltios durante 1 hora.

Los amplicones se observaron con un captador de imágenes conectado a un transiluminador de luz ultravioleta (Gelprinter Ultra, T.D.I.). Se obtuvieron fragmentos de 195 pares de bases.

Una vez amplificado el fragmento del gen *FUT2*, se procedió a su digestión mediante el enzima *AvaI* (Thermo Scientific). Esta enzima realiza un corte en el ADN, a nivel de este gen, siempre que no haya sufrido la mutación 428G→A (Se<sup>428</sup>). Este análisis nos permite discriminar a los individuos de una población en secretores, no poseen la mutación o solo está presente en uno de los dos alelos del gen y no secretores, cuando presentan esta mutación en ambos alelos del gen.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

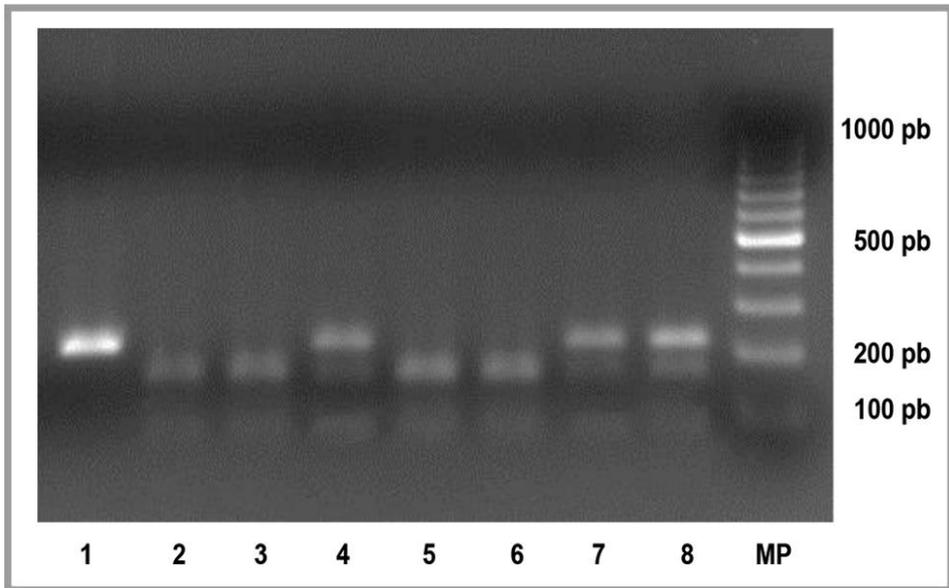
- Mezcla de la reacción:

Producto de la PCR	10 $\mu$ l
Tampón R 10X	2 $\mu$ l
Eco471 ( <i>Avall</i> )	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O DEPC	18 $\mu$ l
TOTAL	31 $\mu$ l

- Protocolo de digestión:
  - Mezclar durante 20 segundos.
  - Incubar a 37°C entre 1 y 3 horas.
  - Incubar a 65°C durante 20 minutos para inactivar la enzima.
- Visualización:
  - Electroforesis en gel de agarosa al 1'5% (p/v) en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0'5 X con 0'5% RedSafe (Intron Biotechnology).
  - Someter a 70 voltios durante 1 hora.

En los individuos no secretores, “sese”, el producto de la PCR no se digiere con *Avall* y tiene 195 pb de tamaño. Los individuos secretores, por otro lado, son aquellos que presentan un patrón de digestión de su ADN con la enzima. Entre los individuos secretores diferenciamos dos grupos: individuos heterocigotos, “Sese”, con una digestión incompleta del amplificado que muestra un patrón de tres bandas de distinto tamaño (195, 136 y 59 pb) y los individuos homocigotos, “SeSe”, que presentan

una digestión completa del amplificado observándose sólo dos bandas en el gel de agarosa (136 y 59 pb) (Figura 16).



MP: Marcador de peso molecular.

**Figura 16. Identificación del genotipo secretor de los individuos del estudio según la digestión con la enzima *Avall*.** Los individuos no secretores no presentan digestión con la enzima (muestra 1). Los individuos secretores homocigotos presentan digestión completa de sus dos alelos (muestras 2, 3, 5 y 6) y los individuos secretores heterocigotos presentan digestión incompleta, un solo alelo del gen (muestras 4, 7 y 8).

### 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se realizó mediante el software R Core Team 2015 (versión 3.2.2). Para cada variable se calculó la frecuencia estimada en forma de porcentaje, con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados obtenidos para cada una de las variables, en una misma población de estudio, se compararon mediante el método de estimación insesgada de la mediana. Para ello se tomó como referencia la primera categoría de cada variable y se comparó con el resto de categorías analizadas para esa misma variable. Para comparar las diferentes variables entre el grupo de pacientes y el grupo control se utilizó la prueba de Chi-cuadrado, excepto en aquellos casos en los que la frecuencia obtenida fue menor de 5, donde se utilizó el test exacto de Fisher. Se consideró que había diferencia significativa cuando el valor de  $p < 0.05$ . (Weaver et al., 2017).

## **RESULTADOS**



## **4. RESULTADOS**

### **4.1. ANÁLISIS DEMOGRÁFICO DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO**

#### **4.1.1. Población de estudio**

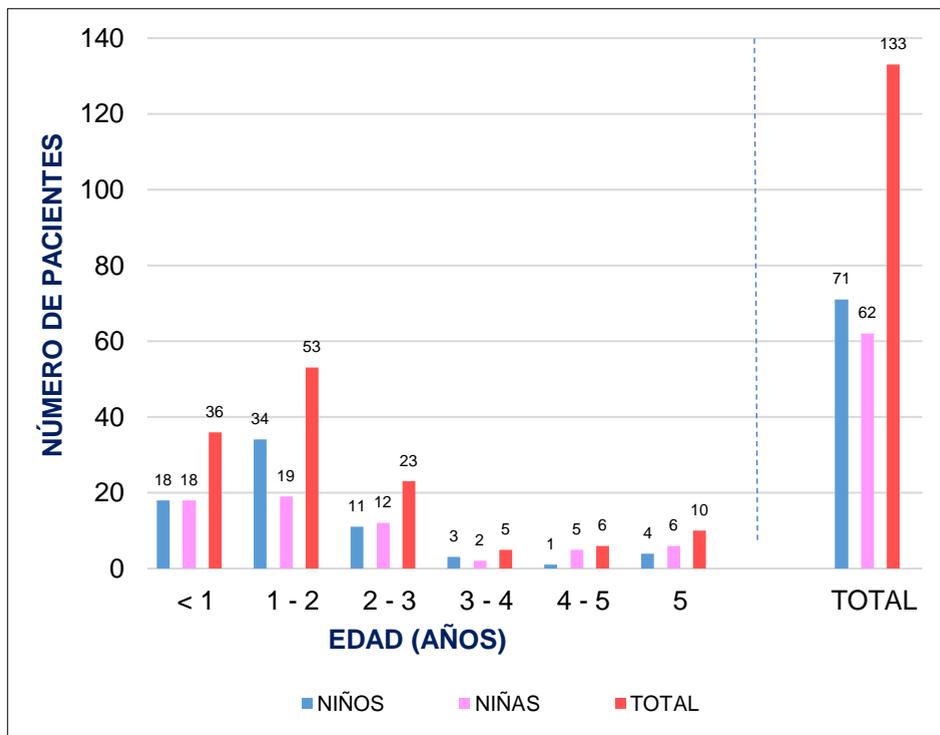
En el área de Valencia es difícil establecer una separación clara entre ámbito rural y urbano, puesto que ambos ambientes están estrechamente relacionados al estar las poblaciones y pedanías de l'Horta Nord, l'Horta Oest y l'Horta Sud situadas muy próximas a la capital. Para nuestro estudio, consideramos ámbito rural al conjunto de poblaciones con menos de 10.000 habitantes y con un alto grado de dispersión, y ámbito urbano a la capital, donde la densidad de población es más elevada y con menor grado de dispersión.

El estudio se realizó durante los meses de enero de 2013 a diciembre de 2015 con pacientes pediátricos del área metropolitana y de las áreas rurales dependientes del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se tomaron muestras de heces y de saliva a 133 pacientes que cumplían los criterios de inclusión (ver sección 3.2). De todos ellos, 71 pacientes (53'4%) procedían del área metropolitana y 62 pacientes (46'6%) de las zonas rurales dependientes de este hospital.

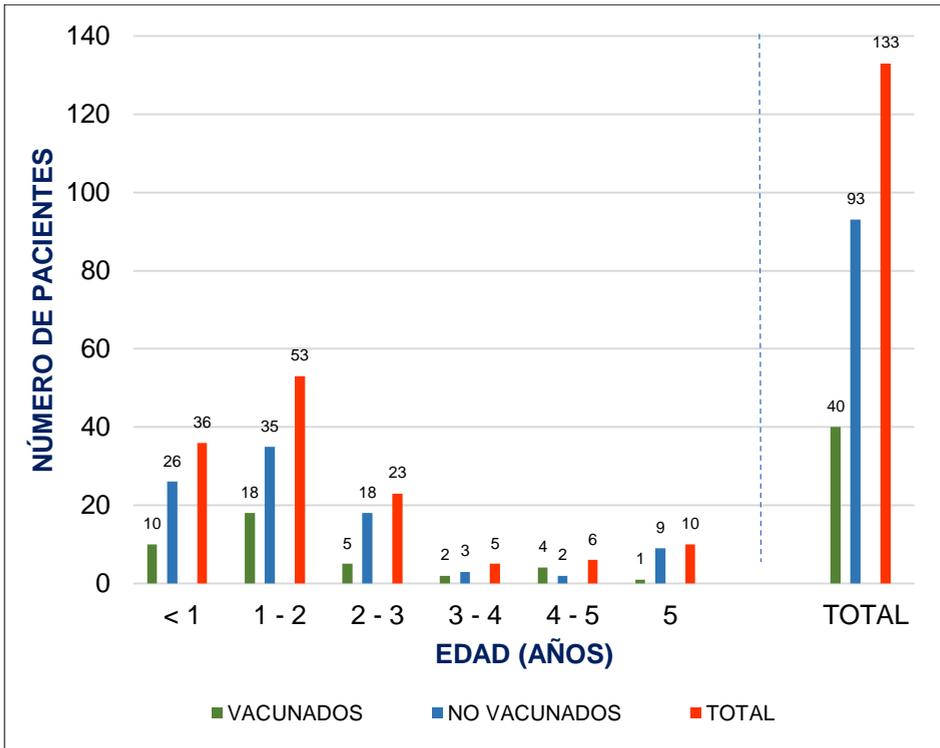
Los pacientes tenían edades comprendidas entre 13 días y 5 años, con una edad media de 1 año y 10 meses. Además, la mayor parte de los pacientes, 112 (84'2%), eran menores de 3 años. En cuanto a la distribución por sexos, 62 fueron niñas (46'6%; IC95%: 37'9 - 55'5) y 71 fueron niños (53'4%; IC95%: 44'5 - 62'1) (Figura 17). Respecto al estado de vacunación frente a rotavirus, 93 pacientes (69'9%; IC95%: 62'1 - 77'7)

## RESULTADOS

no habían recibido ninguna dosis de vacuna en el momento de la infección (Figura 18).



**Figura 17. Distribución de los pacientes según edad y sexo.** La mayor frecuencia de infección ocurre en los individuos menores de 3 años, con un pequeño repunte a los 5 años.



**Figura 18. Distribución de los pacientes según su edad y estado de vacunación frente a rotavirus.** En esta figura se observa un mayor nivel de vacunación entre los niños menores de 3 años, sin embargo, es precisamente este grupo de edad el que ha sufrido el mayor número de infecciones.

#### 4.1.2. Población de control

Para poder realizar análisis comparativos con el grupo de pacientes se decidió incluir un grupo control de 50 niños sanos que presentaban unas características similares al grupo de estudio. Este grupo estaba formado por 24 niños (48%; IC95%: 33'7 - 62'6) y 26 niñas (52%; IC95%: 37'4 - 66'3). La edad, en el momento del análisis, estaba comprendida entre 1 mes y 5 años, con una edad media de 2 años y 10 meses y, de todos ellos, 31 (62%) eran menores de 3 años. Respecto al

## RESULTADOS

---

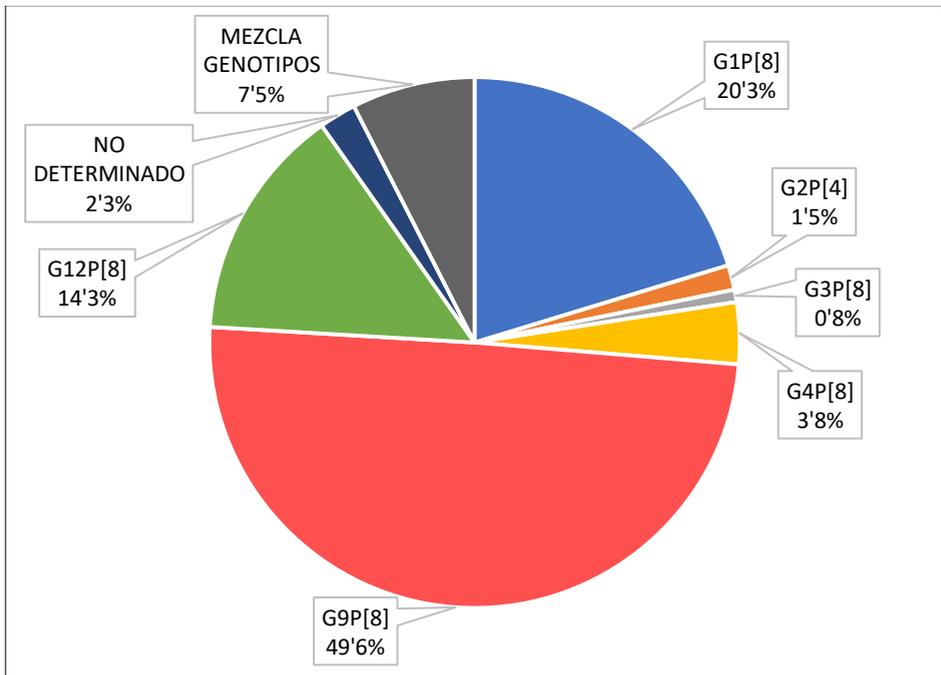
estado de vacunación frente a rotavirus, 28 niños del total (56%; IC95%: 41'3 - 70) habían sido vacunados.

Por otro lado, se solicitaron al Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, Conselleria de Sanitat i Salut Pública, Generalitat Valenciana, los datos relativos a grupos sanguíneos y antígenos Lewis de los donantes de sangre analizados en la provincia de Valencia. De esta forma, se obtuvieron datos de un total de 283.399 donantes que se utilizaron también como grupo control en nuestro estudio. Por cuestiones de privacidad y política de protección de datos no se facilitaron los datos demográficos referentes a edad, sexo, lugar de nacimiento o localización de los donantes analizados.

### 4.2. ANÁLISIS DE LOS ROTAVIRUS INFECTANTES

La mayor parte de los pacientes (90'2%) se infectaron por un solo genotipo de rotavirus, 10 (7'5%) niños presentaron infección mixta y en 3 (2'3%) casos el genotipo G/P infectante no pudo determinarse con las técnicas aplicadas (Figura 19). Los genotipos G detectados fueron G1, G2, G3, G4, G9 y G12. El genotipo P más frecuentemente aislado fue P[8] (97'5%; IC95%: 93'5 - 99'5) encontrándose sólo 2 pacientes infectados por un genotipo P[4] (1'5%; IC95%: 0'2 - 5'3) y ningún paciente con genotipo P[6]. El genotipo G/P predominante fue el rotavirus G9P[8] (49'6%; IC95%: 40'8 - 58'4), seguido por los rotavirus G1P[8] (20'3%; IC95%: 13'8 - 28'1), G12P[8] (14'3%; IC95%: 8'8 - 21'4), G4P[8] (3'8%; IC95%: 1'2 - 8'6), G2P[4] (1'5%; IC95%: 0'2 - 5'3) y G3P[8] (0'8%; IC95%: 0'0 - 4'1). En los niños con infección mixta se aisló un máximo de 2 genotipos diferentes. Las infecciones mixtas fueron causadas por

rotavirus G1P[8] + G3P[8] (cuatro casos), G1P[8] + G9P[8] (tres casos), G3P[8] + G9P[8] (dos casos) y G9P[8] + G12P[8] (un caso).



**Figura 19. Distribución de genotipos G/P de rotavirus infectantes.** El 98% de los rotavirus detectados fue genotipo P[8] con una mayor frecuencia del genotipo G9[P8] frente al resto de genotipos.

La infección por rotavirus experimentó variaciones importantes a lo largo de todo el periodo de estudio, tanto en la frecuencia del número de casos (Figura 20) como en la incidencia de los distintos genotipos G infectantes (Figura 21).

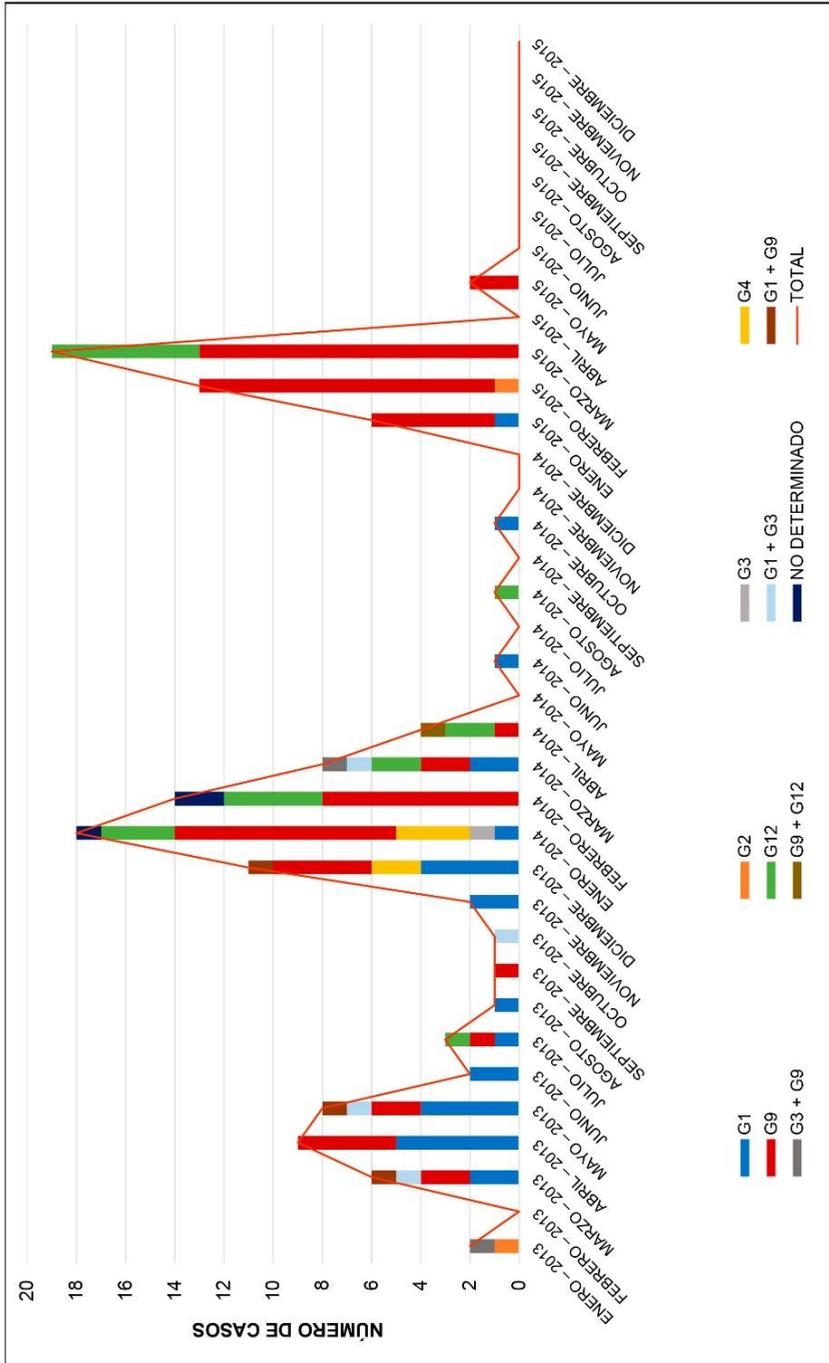
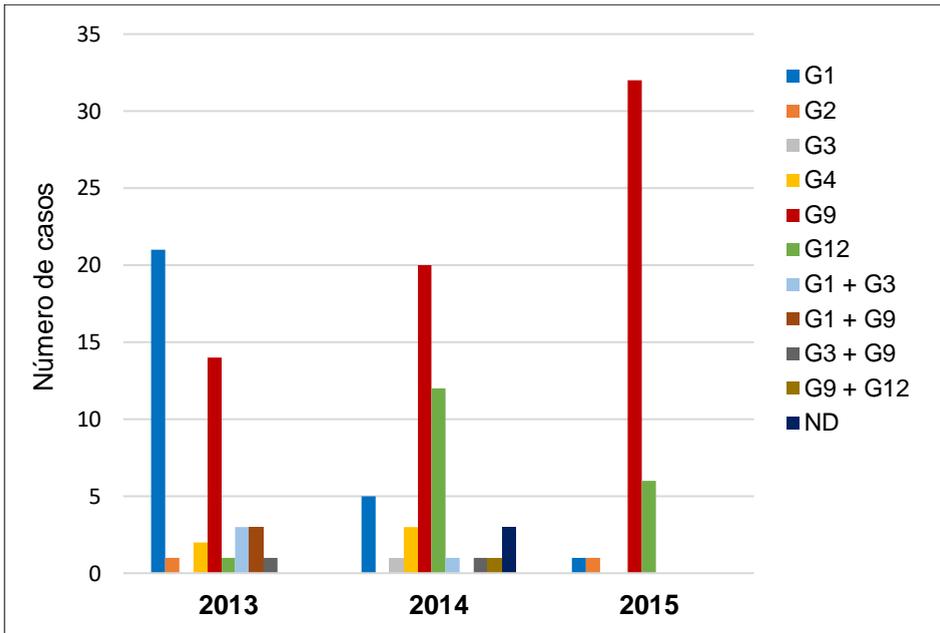


Figura 20. Distribución temporal de la frecuencia de infección por rotavirus. Durante el tiempo de estudio se observaron variaciones importantes en la incidencia de infección por rotavirus en los diferentes periodos analizados.



ND: No determinado

**Figura 21. Distribución temporal de la incidencia de genotipos G de rotavirus infectantes.** La frecuencia de infección de los distintos genotipos G fue diferente en cada periodo del estudio, con un predominio importante de G9P[8] sobre el resto de genotipos.

Los picos máximos de infección ocurrieron los meses más fríos del año (noviembre a abril) siendo el genotipo G9P[8] el más frecuente en estos periodos. En el año 2013, además del pico invernal, hubo un brote durante los meses de marzo a julio debido principalmente al genotipo G1P[8], aunque fue de menor intensidad. El número de infecciones por el genotipo G1P[8] permaneció estable durante la mayor parte del periodo de estudio, con mínimas oscilaciones en los periodos de máxima incidencia de infección. Sin embargo los genotipos G9P[8] y G12P[8] presentaron variaciones importantes entre los periodos de pico y valle de infección, siendo muy frecuentes en los periodos de máxima incidencia y escasos o inexistentes en los periodos de menor intensidad. En el periodo de junio a diciembre del año 2015 no se muestran datos de

## RESULTADOS

---

infección por rotavirus en nuestra área. Sin embargo, este hecho no significa que no hubiera casos de infección, sino que, debido a que no todos los padres de niños infectados aceptaron su participación en el estudio, no existen muestras analizadas.

### 4.3. ANÁLISIS DE LOS ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS

#### 4.3.1. Grupo sanguíneo ABO

La distribución de grupos sanguíneos en la población española durante el periodo de estudio era de un 44% de individuos del grupo O, 43% del grupo A, 10% del grupo B y 3% del grupo AB (datos obtenidos de Cruz Roja en España, [www.donarsangre.org/grupos-sanguineos/](http://www.donarsangre.org/grupos-sanguineos/)). Esta distribución fue semejante a la encontrada en el grupo de donantes de sangre de nuestro entorno. En nuestro grupo de pacientes, la distribución por grupo sanguíneo fue un 37'6% para el grupo O, un 48'1% para el grupo A, un 7'5% para el grupo B y un 6'8% para el grupo AB (Tabla 17). Al analizar los datos se observó que esta distribución seguía un patrón similar al encontrado en los individuos del grupo control, sin hallarse diferencias significativas entre ambos grupos ( $p = 0.365$ ) (Tabla 17). Sin embargo, sí que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes y el grupo de donantes ( $p = 0.003$ ). De manera que, el antígeno A fue más frecuente en el grupo de pacientes que en el grupo de donantes, donde predominó el antígeno O (Tabla 18).

	PACIENTES (n = 133) (%)	CONTROLES (n = 50)* (%)	p VALOR
<b>SEXO</b>			
FEMENINO	62 (46'6)	24 (48)	0.999
MASCULINO	71 (53'4)	26 (52)	
<b>ESTADO VACUNAL</b>			
VACUNADO	42 (68'4)	28 (56)	0.004
NO VACUNADO	91 (31'6)	22 (44)	
<b>GRUPO ABO</b>			
O	50 (37'6)	15 (36'6)	0.365
A	64 (48'1)	17 (41'4)	
B	10 (7'5)	7 (17'1)	
AB	9 (6'8)	2 (4'9)	
<b>SECRETOR (FUT2)</b>			
SECRETOR	131 (98'5)	35 (70)	0.000
NO SECRETOR	2 (1'5)	15 (30)	
<b>LEWIS (FUT3)</b>			
POSITIVO	125 (94)	47 (94)	1.000
NEGATIVO	8 (6)	3 (6)	
<b>LEWIS A</b>			
POSITIVO	60 (45'1)	35 (70)	0.005
NEGATIVO	73 (54'9)	15 (30)	
<b>LEWIS B</b>			
POSITIVO	123 (92'5)	32 (64)	0.000
NEGATIVO	10 (7'5)	18 (36)	
<b>LEWIS A / B</b>			
Le a- b-	8 (6)	3 (6)	0.000
Le a- b+	65 (48'9)	12 (24)	
Le a+ b-	2 (1'5)	15 (30)	
Le a+ b+	58 (43'6)	20 (40)	

\* El fenotipo ABO se realizó sobre una muestra n = 41 porque no se pudo determinar el grupo sanguíneo en saliva a 9 niños del grupo control.

Tabla 17. Comparación del grupo de pacientes frente al grupo controles.

## RESULTADOS

	PACIENTES (n = 133) (%)		DONANTES (n= 283.399) (%)		<i>p</i> VALOR
<b>GRUPO ABO</b>					
O	50	(37'6)	146.454	(51'7)	0.003
A	64	(48'1)	110.273	(38'9)	
B	10	(7'5)	19.054	(6'7)	
AB	9	(6'8)	7.618	(2'7)	
<b>LEWIS (<i>FUT3</i>)</b>					
POSITIVO	125	(94)	252.309	(89)	0.091
NEGATIVO	8	(6)	31.090	(11)	
<b>LEWIS A</b>					
POSITIVO	60	(45'1)	56.180	(20'5)	0.000
NEGATIVO	73	(54'9)	225.219	(79'5)	
<b>LEWIS B</b>					
POSITIVO	123	(92'5)	194.615	(68'7)	0.000
NEGATIVO	10	(7'5)	88.784	(31'3)	
<b>LEWIS A / B</b>					
Le a- b-	8	(6)	31.090	(11)	0.000
Le a- b+	65	(48'9)	194.129	(68'5)	
Le a+ b-	2	(1'5)	57.694	(20'3)	
Le a+ b+	58	(43'6)	486	(0'2)	

**Tabla 18. Comparación del grupo de pacientes frente al grupo donantes.**  
Análisis estadístico de los datos obtenidos.

4.3.2. Fenotipo secretor (FUT2)

En cuanto al antígeno H tipo 1, el 98'5% (IC95%: 94'7 - 99'8) de los pacientes expresaba un fenotipo secretor. De ellos, el 61'8% (IC95%: 52'1 - 69'2) tenían el gen *FUT2* en su forma heterocigota, es decir, con una mutación 428G→A en uno de sus alelos, y un 38'2% (IC95%: 29'3 - 46'4) en su forma homocigota, no presentaban mutación (Tabla 19). En el grupo control, un 70% (IC95%: 55'4 - 82'1) de los niños fueron secretores (*FUT2* +) (Tabla 17). No pudimos obtener los datos relativos a la expresión del gen *FUT2* en el grupo de donantes de sangre, por lo que no se pudieron realizar comparaciones con esta población.

	PACIENTES		
	(n = 133)	(%)	(IC95%)
<b>SECRETOR</b>	131	(98'5)	(94'70 – 99'80)
<b>HETEROCIGOTO</b>	81	(61'8)	(52'10 – 69'20)
<b>HOMOCIGOTO</b>	50	(38'2)	(29'30 – 46'40)
<b>NO SECRETOR</b>	2	(1'5)	(0'20 – 5'30)

**Tabla 19. Distribución del grupo de pacientes según su estado secretor.** Se observa un predominio de pacientes secretores, de los cuales la mayoría son heterocigotos para el gen *FUT2*.

4.3.3. Antígenos Lewis (a y b)

Los datos referentes a la expresión de los antígenos Lewis en el grupo de pacientes mostraron un 94% (IC95%: 88'5 - 97'4) de individuos Lewis positivos y un 6% (IC95%: 2'6 - 11'5) de individuos Lewis negativos,

## RESULTADOS

---

distribución semejante a la encontrada en los grupos control y donantes (Tabla 17 y 18). La distribución según el tipo de antígeno Lewis evidenció que un 54'9% (IC95%: 46'0 - 63'5) de los pacientes eran Lewis a negativo, frente a un 30% (IC95%: 17'9 - 44'6) de Lewis a negativo entre los niños del grupo control ( $p = 0.005$ ). En cuanto a la expresión del antígeno Lewis b, un 92'5% (IC95%: 86'6 - 96'3) de los pacientes fue Lewis b positivo, frente a un 64% (IC95%: 49'2 - 77'1) de los niños del grupo control ( $p = 0.000$ ) (Tabla 17). En el grupo de donantes ambos antígenos Lewis presentaron una distribución significativamente diferente de la encontrada en el grupo de pacientes ( $p = 0.000$ ) (Tabla 18).

Analizando ambos tipos de antígenos en conjunto, los pacientes Lewis a negativo - Lewis b positivo fueron los que más frecuentemente se infectaron con rotavirus (48'9%; IC95%: 40'1 – 57'7), seguidos por los Lewis a positivo - Lewis b positivo (43'6%; IC95%: 35'0 – 52'5). Por otra parte, los niños Lewis a positivo - Lewis b negativo parecían presentar menor frecuencia de infección por rotavirus que los que expresaban el fenotipo Lewis a negativo - Lewis b negativo, hallazgo que se confirmaba al compararlos tanto con el grupo control ( $p = 0.002$ ) (Tabla 20) como con el grupo de donantes, aunque en este último caso la diferencia no fue tan significativa ( $p = 0.005$ ) (Tabla 21).

FENOTIPO / GENOTIPO	PACIENTES (n = 133) (%)	CONTROLES (n = 50) (%)*	ODDS RATIO (IC95%)	p VALOR
<b>LEWIS</b>				
Le a- b-	8 (6)	3 (6)	-	-
Le a- b+	65 (48'9)	12 (24)	0'49 (0'12 - 2'60)	0.367
Le a+ b-	2 (1'5)	15 (30)	16'47 (2'61 - 169'74)	0.002
Le a+ b+	58 (43'6)	20 (40)	0'9 (0'23 - 4'65)	0.884
<b>SECRETOR</b>				
SECRETOR	131 (98'5)	35 (70)	-	-
NO SECRETOR	2 (1'5)	15 (30)	25 (6'67 - 100)	0.000
<b>GRUPO ABO</b>				
O	50 (37'6)	15 (36'6)	-	-
A	64 (48'1)	17 (41'4)	0'89 (0'40 - 1'97)	0.764
B	10 (7'5)	7 (17'1)	2'31 (0'72 - 7'25)	0.157
AB	9 (6'8)	2 (4'9)	0'78 (0'10 - 3'56)	0.769

\* El fenotipo ABO está realizado sobre una muestra n = 41 porque no se pudo determinar el grupo sanguíneo en saliva a 9 niños del grupo control.

**Tabla 20. Distribución de antígenos histo-sanguíneos en el grupo de pacientes y grupo control.** Análisis estadístico. Se observa un claro factor de riesgo en los individuos secretores.

## RESULTADOS

FENOTIPO / GENOTIPO	PACIENTES (n = 133) (%)	DONANTES (n = 283.399) (%)	ODDS RATIO (IC95%)	p VALOR
<b>LEWIS</b>				
Le a- b-	8 (6)	31.090 (11)	-	-
Le a- b+	65 (48'9)	194.129 (68'5)	0'78 (0'34 – 1'54)	0.500
Le a+ b-	2 (1'5)	57.694 (20'3)	7'03 (1'72 - 51'16)	0.005
Le a+ b+	58 (43'6)	486 (0'2)	0'0 (0'0 – 0'0)	0.000
<b>GRUPO ABO</b>				
O	50 (37'6)	146.454 (51'7)	-	-
A	64 (48'1)	110.273 (38'9)	0'59 (0'4 – 0'85)	0.005
B	10 (7'5)	19.054 (6'7)	0'64 (0'34 – 1'35)	0.227
AB	9 (6'8)	7.618 (2'7)	0'28 (0'15 – 0'62)	0.003

**Tabla 21. Distribución de antígenos histo-sanguíneos en el grupo de pacientes y en el grupo de donantes.** Análisis estadístico. Los individuos Lewis b positivos predominan entre los pacientes infectados. Los individuos de grupo sanguíneo A o AB tienen mayor probabilidad de infectarse que los individuos del grupo O.

#### 4.4. RELACIÓN ENTRE LOS ANTÍGENOS HISTO-SANGUÍNEOS DE LOS PACIENTES Y LOS GENOTIPOS DE ROTAVIRUS INFECTANTES

Los rotavirus más frecuentemente aislados en nuestro estudio fueron los genotipos G1P[8], G9P[8] y G12P[8] (Figura 19). Todos ellos infectaron con mayor frecuencia a niños con grupos sanguíneos A y O. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa cuando lo comparamos con el grupo control (Tabla 20), sin embargo, al comparar los datos con el grupo de donantes se observó una mayor tendencia a la infección entre los pacientes de los grupos A ( $p = 0.005$ ) y AB ( $p = 0.003$ )

que los pertenecientes al grupo O (Tabla 21). Así, los genotipos G1P[8] y G9P[8] infectaron sobre todo a pacientes del grupo A (51'8% y 45'4%, respectivamente), mientras que el genotipo G12P[8] se aisló con más frecuencia en los pacientes del grupo O (47'4% de los pacientes) (Tabla 22). No se hallaron diferencias en la relación entre la expresión de los antígenos ABO y el genotipo G de los rotavirus infectantes.

La expresión del antígeno secretor (*FUT2*+) en los niños que formaban el grupo de pacientes fue un factor claramente determinante a la hora de adquirir la infección por rotavirus comparado con el grupo control (OR: 25; IC95%: 6'67 - 100;  $p = 0.00$ ) (Tabla 20). Sólo 2 pacientes (1'5%; IC95%: 0'2 - 5'3) con fenotipo no secretor (*FUT2*-) fueron infectados por rotavirus, siendo en un caso un genotipo G1P[8] y en el otro caso una infección mixta por genotipos G1P[8] + G9P[8]. En los individuos secretores, se determinó el estado homocigoto o heterocigoto del gen *FUT2*. Los resultados obtenidos indican que todos los genotipos de rotavirus encontrados infectaron con mayor frecuencia a individuos heterocigotos, excepto el genotipo G12P[8] que fue discretamente más frecuente (57'9%) entre los individuos homocigotos para este gen (Tabla 22).

	G1P[8]	G2P[4]	G3P[8]	G4P[8]	G9P[8]	G12P[8]
	(n = 27) (%)	(n = 2) (%)	(n = 1) (%)	(n = 5) (%)	(n = 66) (%)	(n = 19) (%)
<b>GRUPO ABO</b>						
<b>O</b>	10 (37'1)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	24 (36'4)	9 (47'4)
<b>A</b>	14 (51'8)	2 (100)	1 (100)	3 (60)	30 (45'4)	7 (36'8)
<b>B</b>	2 (7'4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (10'6)	1 (5'3)
<b>AB</b>	1 (3'7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (7'6)	2 (10'5)
<b>SECRETOR</b>						
<b>HETEROCIGOTO</b>	16 (59'3)	2 (100)	1 (100)	3 (60)	44 (66'7)	8 (42'1)
<b>HOMOCIGOTO</b>	10 (37)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	22 (33'3)	11 (57'9)
<b>NO SECRETOR</b>	1 (3'7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tabla 22. Relación de los genotipos G/P infectantes de rotavirus con el grupo sanguíneo y genotipo FUT2 del paciente.** Se observa mayor frecuencia de individuos con grupo sanguíneo A y genotipo secretor heterocigoto entre los niños infectados por los rotavirus más habituales en nuestro área, excepto en la infección por el genotipo G12P[8] donde la incidencia es discretamente mayor para el grupo sanguíneo O y para los individuos homocigotos para el gen FUT2.

La expresión de los antígenos Lewis en el individuo viene determinada por la actividad del gen *FUT3*. Entre los pacientes de nuestro estudio, los niños Lewis positivos se infectaron con mayor frecuencia que los Lewis negativos. Estos resultados coinciden en el análisis comparativo realizado tanto con el grupo control como con el grupo de donantes, aunque no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos casos (Tablas 17 y 18). Sin embargo, si se realiza un análisis conjunto del fenotipo Lewis y secretor de los individuos del estudio, los pacientes secretores Lewis positivos mostraron, de forma significativa ( $p = 0.000$ ), una mayor predisposición a la infección por rotavirus (Tabla 23).

FENOTIPO	PACIENTES (n = 125) (%)	CONTROLES (n = 47) (%)	ODDS RATIO (IC95%)	p VALOR
<b>LEWIS POSITIVO</b>				
<b>SECRETOR</b>	123 (98'4)	32 (68'1)	-	0.000
<b>NO SECRETOR</b>	2 (1'6)	15 (31'9)	25 (7'14 -100)	

**Tabla 23. Relación entre fenotipo Lewis positivo y antígeno secretor. Estadística comparativa entre ambos grupos de estudio.** Los datos estadísticos evidencian una clara predisposición de los individuos secretores Lewis positivo a presentar infección con rotavirus.

En cuanto a la distribución según el tipo de antígeno Lewis, se infectaron en mayor medida los pacientes Lewis a negativos (OR: 0'36; IC95%: 0'17-0'70;  $p = 0.003$ ) y los Lewis b positivos (OR: 6'67; IC95%: 2'86 - 16'67;  $p = 0.000$ ) comparado con el grupo control (Tabla 24). Esta diferencia es igualmente significativa cuando comparamos el grupo de pacientes con el grupo de donantes (Tabla 25).

## RESULTADOS

FENOTIPO	PACIENTES (n = 133) (%)	CONTROLES (n = 50) (%)	ODDS RATIO (IC 95%)	p VALOR
<b>LEWIS A</b>				
POSITIVO	60 (45'1)	35 (70)	-	0.003
NEGATIVO	73 (54'9)	15 (30)	0'36 (0'17 - 0'70)	
<b>LEWIS B</b>				
POSITIVO	123 (92'5)	32 (64)	-	0.000
NEGATIVO	10 (7'5)	18 (36)	6'67 (2'86 - 16'67)	

**Tabla 24. Distribución según el fenotipo Lewis a y Lewis b. Comparación estadística entre pacientes y controles.** Los niños Lewis b positivos tienen mayor predisposición a presentar infección por rotavirus.

FENOTIPO	PACIENTES (n = 133) (%)	DONANTES (n = 283.399) (%)	ODDS RATIO (IC 95%)	p VALOR
<b>LEWIS A</b>				
POSITIVO	60 (45'1)	58.180 (20'5)	-	0.000
NEGATIVO	73 (54'9)	225.219 (79'5)	0'31 (0'22 - 0'44)	
<b>LEWIS B</b>				
POSITIVO	123 (92'5)	194.615 (68'7)	-	0.000
NEGATIVO	10 (7'5)	88.784 (31'3)	5'55 (3'03 - 11'11)	

**Tabla 25. Distribución según el fenotipo Lewis a y Lewis b. Comparación estadística entre pacientes y donantes.** Los niños Lewis b positivos tienen mayor predisposición a presentar infección por rotavirus.

La distribución de los genotipos G/P de rotavirus según la expresión de los antígenos Lewis en los pacientes no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.146$ ) (Tabla 26).

GENOTIPOS	PACIENTES			
	Le a+b+ (n = 58) (%)	Le a+b- (n = 2) (%)	Le a-b+ (n = 65) (%)	Le a-b- (n = 8) (%)
<b>G1P[8]</b>	7 (12'1)	1 (50)	15 (23'1)	4 (50)
<b>G2P[4]</b>	1 (1'7)	0 (0)	1 (1'6)	0 (0)
<b>G3P[8]</b>	1 (1'7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>G4P[8]</b>	2 (3'5)	0 (0)	3 (4'6)	0 (0)
<b>G9P[8]</b>	34 (58'6)	0 (0)	30 (46'2)	2 (25)
<b>G12P[8]</b>	7 (12'1)	0 (0)	11 (16'9)	1 (12'5)
<b>G1 + G3P[8]</b>	2 (3'4)	0 (0)	1 (1'5)	1 (12'5)
<b>G1 + G9P[8]</b>	1 (1'7)	1 (50)	1 (1'5)	0 (0)
<b>G3 + G9P[8]</b>	0 (0)	0 (0)	2 (3'1)	0 (0)
<b>G9 + G12P[8]</b>	0 (0)	0 (0)	1 (1'5)	0 (0)
<b>NO DETERMINADO</b>	3 (5'2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

(p valor = 0.146)

**Tabla 26. Distribución de genotipos G/P de rotavirus detectados según la expresión de los antígenos Lewis a y Lewis b de los pacientes.** Se observa una clara predisposición de los individuos Lewis b positivos a presentar infección por rotavirus.

## RESULTADOS

---

### 4.5. RELACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR ROTAVIRUS Y ESTADO VACUNAL DE LOS PACIENTES

El 30'1% (IC95%: 22'3 - 37'9) de los pacientes infectados por rotavirus había sido previamente vacunado con una de las dos vacunas comercializadas en España. La proporción de niños vacunados en el grupo de pacientes fue menor que en el grupo de controles (OR: 2'96; IC95%: 1'51 - 5'78;  $p = 0.003$ ) (Tabla 27).

	<b>PACIENTES</b> (n = 133) (%)	<b>CONTROLES</b> (n = 50) (%)	<b>ODDS RATIO</b> (IC95%)	<b>p VALOR</b>
<b>NO VACUNADOS</b>	93 (69'9)	22 (44)	-	-
<b>VACUNADOS</b>	40 (30'1)	28 (56)	2'96 (1'51 - 5'78)	0.003

**Tabla 27. Análisis estadístico de los individuos vacunados y no vacunados en cada grupo de estudio.** El análisis de los datos muestra una predisposición de los individuos no vacunados a presentar infección por rotavirus. El análisis se ha realizado con los datos totales de vacunación, sin tener en cuenta el tipo de vacuna utilizado.

La distribución de los genotipos G/P de rotavirus en los pacientes según su estado vacunal no evidenció diferencias significativas ( $p = 0.706$ ) (Tabla 28).

GENOTIPOS	PACIENTES			
	VACUNADOS (n = 42) (%)		NO VACUNADOS (n = 91) (%)	
<b>G1P[8]</b>	6	(14'3)	21	(23'1)
<b>G2P[4]</b>	0	(0)	2	(2'2)
<b>G3P[8]</b>	0	(0)	1	(1'1)
<b>G4P[8]</b>	2	(4'8)	3	(3'3)
<b>G9P[8]</b>	22	(52'4)	44	(48'3)
<b>G12P[8]</b>	8	(19'1)	11	(12'1)
<b>G1 + G3P[8]</b>	0	(0)	4	(4'4)
<b>G1 + G9P[8]</b>	2	(4'7)	1	(1'1)
<b>G3 + G9P[8]</b>	2	(4'7)	0	(0)
<b>G9 + G12P[8]</b>	0	(0)	1	(1'1)
<b>NO DETERMINADO</b>	0	(0)	3	(3'3)

( $p$  valor = 0.706)

**Tabla 28. Distribución de genotipos G/P de rotavirus detectados según el estado de vacunación de los pacientes.** Se observa una clara predisposición de los individuos no vacunados a sufrir infección por los rotavirus más frecuentes de nuestra área.



## **DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

La infección por rotavirus es una de las principales causas de gastroenteritis aguda a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) a los 5 años de vida la práctica totalidad de los niños habrá sufrido una infección por rotavirus de mayor o menor gravedad (WHO, 2013). En nuestro estudio observamos que se cumple esta afirmación, puesto que la media de edad estimada de los pacientes fue de 22 meses, siendo un 84% del total de los niños menores de 3 años de edad. Por otro lado, no encontramos diferencias significativas en los casos de infección según fuera el sexo o el hábitat geográfico (urbano o rural) de los pacientes.

Desde el año 2010, la OMS recomienda la inclusión de la vacuna frente a rotavirus en el Programa Nacional de Vacunaciones de la infancia en los países con alta incidencia de rotavirus (WHO, 2010). En España, estas vacunas están comercializadas desde agosto de 2006, Rotarix<sup>®</sup>, y enero de 2007, RotaTeq<sup>®</sup>. Según los datos obtenidos en nuestro trabajo, un 68% de los niños infectados por rotavirus no habían recibido previamente ninguna dosis de vacuna, circunstancia que resultó ser un condicionante significativo a la hora de adquirir la infección ( $p = 0.003$ ). Esta escasa cobertura vacunal se observó también en los niños que formaban el grupo control (56% vacunados) y en un estudio previo realizado en nuestra ciudad, en el que se estimó una cobertura vacunal de alrededor del 40% de la población (Orrico-Sanchez et al., 2017). Aunque este nivel de vacunación puede considerarse bajo, hemos de recordar que en la Comunidad Valenciana, como en el resto de España, esta vacuna no tiene financiación pública para su adquisición y su administración depende de la iniciativa de los padres y tutores. Otra posible explicación para esta baja cobertura vacunal es el hecho de que

## DISCUSIÓN

---

3 años antes de comenzar el estudio, en el año 2010, la *Food and Drug Administration* (FDA) informó sobre la contaminación de las vacunas Rotarix® y RotaTeq® con ADN completo de circovirus porcino tipo 1 y recomendó suspender su comercialización de forma preventiva mientras se analizaban los hechos (Victoria et al., 2010). En España, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) prohibió la comercialización de ambas vacunas durante 5 meses (de junio a noviembre de 2010) tras los cuales se reanudó la comercialización de la vacuna RotaTeq®, pero no fue hasta 6 años después, en junio de 2016 (finalizado el periodo de estudio) cuando se autorizó de nuevo la comercialización de la vacuna Rotarix®. La suspensión de ambas vacunas supuso una caída de la cobertura vacunal nacional de un 38% en 2009 a un 19% en 2010 y originó que zonas como Galicia tardaran 3 años en alcanzar los niveles de cobertura vacunal previos (Martín-Torres et al., 2013). A nivel de la Comunidad Valenciana, se desconoce el impacto que pudo tener esta medida cautelar, pero podría ser un condicionante más que justifique el bajo nivel de vacunación observado en la población. La suspensión de la comercialización de la vacuna Rotarix® durante 6 años frente a los 5 meses de prohibición para la vacuna RotaTeq®, supuso que la mayoría de los niños vacunados en nuestro estudio hubiesen recibido esta última vacuna, por ello no se han realizado análisis comparativos según el tipo de vacunación recibido.

Las vacunas actuales contra rotavirus se diseñaron en la década de 1980 cuando G1, G2, G3, G4, P[4] y P[8] eran los genotipos más prevalentes y G1P[8] era el rotavirus predominante en la mayoría de los países occidentales (Bányai et al., 2012; Bernstein et al., 1998). Sin embargo, los rotavirus circulantes en la actualidad son diferentes, habiéndose diversificado gracias a sus mecanismos evolutivos y a las fluctuaciones de genotipo (Dóro et al., 2014). En un trabajo realizado en

Bélgica se observaron diferencias antigénicas significativas entre los componentes G1 y P[8] presentes en las cepas vacunales y en las cepas circulantes (Zeller et al., 2012). Además, un estudio llevado a cabo en Nashville (EE.UU) indica que las diferencias antigénicas observadas entre rotavirus circulantes y vacunales son mayores en G9P[8] y G12P[8] que en otros genotipos (Ogden et al., 2018). Este hecho podría reducir la presión selectiva de los anticuerpos generados por la vacunación a la hora de neutralizar estos genotipos, lo que explicaría el aumento epidemiológico global de estos rotavirus. A la vista de estos resultados, podría considerarse que algunos factores pueden causar una selección en las cepas de rotavirus que circulan en una zona geográfica, y tal vez la vacunación podría ser uno de ellos. Por ello, desde la comercialización en 2006 de las vacunas Rotarix® y Rotateq®, diversos estudios han analizado los efectos de la vacunación generalizada sobre la evolución de las cepas de rotavirus y el nivel de protección cruzada proporcionado por estas vacunas contra rotavirus antigénicamente distintos (Araki et al., 2018; Buttery y Kirkwood, 2014; Chavers et al., 2018; Leshem et al., 2014). En algunos de ellos, se concluye que no existe evidencia suficiente de que haya cambios en la distribución de los diferentes genotipos circulantes tras la introducción de la vacunación (Dóro et al., 2014; Hemming y Vesikari, 2013). Sin embargo, estudios más recientes especulan sobre esta posibilidad y afirman lo contrario. En esta línea, algunos autores han encontrado un aumento de los casos de infección por el genotipo G2P[4], que escaparía a la protección vacunal, hallazgo más evidente cuando se utiliza la vacuna monovalente (Carvalho-Costa et al., 2019; Hungerford et al., 2019). En un estudio en el ámbito hospitalario en Nicaragua se encontró un marcado aumento de las infecciones por el genotipo G12P[8], asociado con un predominio de esta cepa a nivel nacional, en una población con alta cobertura de vacuna pentavalente (Bucardo et al., 2015). Este hallazgo es similar al

## DISCUSIÓN

---

encontrado por Ogden y cols. en su estudio llevado a cabo en Nashville (EE.UU) (Ogden et al., 2018). Por otro lado, se ha sugerido que algunos factores del huésped podrían influir en la protección inducida por las vacunas contra rotavirus en los niños, como son la lactancia materna, la presencia o ausencia de componentes inmunes y no inmunes en la composición de la leche materna y la microbiota bacteriana intestinal (Monedero et al., 2018; Vesikari et al., 2012). Además, el uso de vacunas contra rotavirus puede tener consecuencias inesperadas, ya que se ha descubierto que pueden originarse cepas atípicas de rotavirus circulantes a través de un reordenamiento entre las cepas humanas G1P[8] y las cepas de la vacuna pentavalente (Bucardo et al., 2012). Con estos datos no se pretende negar la eficacia de las vacunas, sobradamente demostrada en muchos estudios, sino más bien incidir en la necesidad de realizar un estricto control sobre los posibles cambios que puede generar el uso de la vacunación sistemática de la población en la epidemiología de rotavirus.

En nuestro estudio, los genotipos G9P[8], G12P[8] y G1P[8] fueron los más frecuentemente detectados en niños vacunados, así como en la población no vacunada, de forma que la distribución de los genotipos G/P de rotavirus en los pacientes según su estado vacunal no evidenció resultados significativos ( $p = 0.706$ ). Estos resultados indicarían que en nuestra área de estudio no existe selección de genotipos condicionada por la presión vacunal, pero estos datos no son concluyentes, puesto que existe un bajo nivel de vacunación en la población (no existe vacunación sistemática) y durante el periodo de estudio la población sólo tuvo acceso a un tipo de vacuna.

En la mayor parte de los países en vías de desarrollo de Asia y África, la infección por rotavirus se caracteriza por una transmisión ininterrumpida a lo largo de todo el año, con la presencia de algunos

periodos en los que su circulación es relativamente más intensa. Sin embargo, en los países desarrollados con climas templados se suele observar una marcada estacionalidad invernal (Patel et al., 2013). En nuestra área geográfica observamos como los picos máximos de infección presentaban una distribución estacional propia de los climas templados, con mayor incidencia en los meses más fríos (noviembre a abril) y una caída significativa en el resto del año. Sin embargo, en la primavera del año 2013, hubo un aumento considerable del número de infecciones respecto al volumen esperado para ese periodo, sin ser tan elevado como en el pico invernal. Además, el genotipo predominante en ese periodo fue G1P[8], dato que tampoco coincidió con el genotipo predominante en los picos invernales, que fue G9P[8]. Se desconocen las causas que pudieron originar este aumento en la frecuencia de G1P[8] durante ese periodo.

La mayor parte de los pacientes (82%) se infectaron por un solo genotipo de rotavirus y en los casos de infecciones mixtas se aislaron dos genotipos distintos. Los genotipos G detectados fueron: G1, G2, G3, G4, G9 y G12. Respecto al genotipo P, el 97'5% de los pacientes fueron infectados por un genotipo P[8] y 1'5% por un genotipo P[4], no hallándose ningún paciente con genotipo P[6]. Estos datos coinciden plenamente con el resultado obtenido en otros estudios realizados en países desarrollados (Dóro et al., 2015; Hungerford et al., 2016; Iturriza-Gómara et al., 2009), así como con los datos facilitados por la red de vigilancia europea EuroRotaNet de distribución de genotipos circulantes en España en los últimos 10 años (<https://www.eurorotnet.com>). El genotipo G/P aislado con mayor frecuencia fue G9P[8] (49'6%), seguido por los rotavirus G1P[8] (20'3%) y G12P[8] (14'3%). Sin embargo, el genotipo G1P[8] fue el que presentó una prevalencia más estable a lo largo todo el estudio. Este genotipo se aisló de forma constante durante

## DISCUSIÓN

---

todo el tiempo analizado, con pequeñas variaciones en los periodos invernales (además del repunte primaveral del año 2013 ya mencionado). Sin embargo, los genotipos G9P[8] y G12P[8] sufrieron variaciones importantes entre los periodos de pico y valle de infección. Ambos genotipos fueron aislados sobre todo en los periodos de máxima infección y fueron escasos o inexistentes en los periodos de menor incidencia, coincidiendo así con las variaciones estacionales esperables para un clima templado como el nuestro.

Los antígenos histo-sanguíneos son carbohidratos complejos sintetizados por fucosiltransferasas codificadas por los genes *FUT2* (H tipo 1) y *FUT3* (antígenos Lewis). La síntesis de los antígenos A y B depende de las transferasas A y B, respectivamente (Ramani et al., 2016). En el análisis del grupo sanguíneo ABO realizado en el conjunto de pacientes observamos que los grupos sanguíneos A y O fueron los más prevalentes, tal y como se describe en la población general española ([www.donarsangre.org/grupos-sanguineos/](http://www.donarsangre.org/grupos-sanguineos/)). Sin embargo, al analizar la presencia de infección en este mismo grupo observamos que los individuos de los grupos A y AB se infectaban con mayor frecuencia que los pacientes del grupo O, tomados como grupo control ( $p = 0.005$  y  $p = 0.003$ , respectivamente). Estos resultados coinciden con la hipótesis propuesta por algunos investigadores según la cual el antígeno A actuaría como receptor para algunos genotipos P de rotavirus, como P[9], P[14] y P[25] del genogrupo P[III] (Bekdas et al., 2014; Elnady et al., 2017; Sun et al., 2018; Trang et al., 2014). Además, se ha comprobado mediante análisis cristalográfico que el antígeno A es capaz de interactuar con algunos genotipos P (Hu et al., 2012, 2018; Sun et al., 2018). Por otro lado, estudios recientes defienden la hipótesis de que el antígeno B podría actuar como protector frente a la infección por el genotipo P[8] (Bucardo et al., 2018; Elnady et al., 2017; Huang et al., 2012; Kazi et al.,

2017; Ma et al., 2015). En nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias significativas en la probabilidad de infección que tienen los individuos del grupo B frente a los del grupo O ( $p = 0.227$ ), utilizados como grupo control en el análisis estadístico.

Según datos publicados recientemente, la subunidad VP8\* del genogrupo P[II] de rotavirus, que incluye a los genotipos comunes P[4], P[6] y P[8] y al raro P[19], se comporta como una galectina y se une al antígeno H tipo 1 (Hu et al., 2018; Liu et al., 2016). Gozalbo-Rovira y cols. han establecido las bases moleculares de la interacción entre el dominio VP8\* de la proteína VP4 de rotavirus con el antígeno H tipo 1 (Fuc- $\alpha$ 1,2-Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc; H1) y con su precursor la lacto-N-biosa (Gal- $\beta$ 1,3-GlcNAc; LNB). Mediante estudios de cristalografía de rayos X, mutagénesis dirigida y resonancia de plasmones superficiales se demuestra la interacción de VP8\* con la lacto-N-biosa. Este hecho podría tener interés para el uso terapéutico de este disacárido en las infecciones por rotavirus. En nuestro trabajo, la mayor parte de los pacientes (98'5%) expresaba el fenotipo secretor, y de ellos, un 62% poseían el gen *FUT2* en su forma heterocigota (con una mutación 428G→A en uno de sus alelos). Sin embargo, en el grupo control, sólo un 70% de los niños fueron secretores, porcentaje que se aproxima al 80% estimado para la población general europea (Le Pendu, 2004). Así, la presencia del antígeno secretor en el grupo de pacientes fue un factor claramente favorecedor para adquirir la infección sintomática por rotavirus ( $p = 0.000$ ). Sólo se infectaron 2 pacientes (1'5%) con fenotipo no secretor, siendo en un caso por un genotipo G1P[8] y en el otro una infección mixta por los genotipos G1P[8] y G9P[8]. Así, nuestros resultados refuerzan esta idea de que los individuos secretores presentan mayor susceptibilidad a la infección sintomática por algunos genotipos de rotavirus y por lo tanto, que los individuos no secretores poseerían cierta

## DISCUSIÓN

---

protección natural frente a ellos (Imbert-Marcille et al., 2014; Kambhampati et al., 2016; Lee et al., 2018; Payne et al., 2015; Pérez-Ortín et al., 2019; Trang et al., 2014; Zhang et al., 2016). Además, al comparar los distintos genotipos aislados con el estado homocigoto o heterocigoto del gen *FUT2* de los pacientes, se observó que todos los rotavirus infectaron con mayor frecuencia a individuos heterocigotos, excepto el genotipo G12P[8] que fue discretamente más prevalente (58%) entre los individuos homocigotos para este gen.

La expresión de los antígenos Lewis en un individuo viene determinada por la actividad del gen *FUT3*. En nuestro grupo de pacientes se encontró un 94% de individuos Lewis positivos frente a un 6% Lewis negativos. Esta distribución fue semejante a la observada en los grupos control y donantes, sin hallarse diferencias significativas en la comparación estadística entre grupos. Además, esta distribución es similar a la observada en la población general europea (Mourant et al., 1976). Al analizar la presencia de los antígenos Lewis a y Lewis b en los individuos del estudio observamos que el grupo de donantes presentó una distribución muy similar a la estimada para la población europea (Mourant et al., 1976), pero significativamente diferente a la observada en el grupo de pacientes ( $p = 0.000$ ). Cuando se analizó la presencia o ausencia de cada antígeno por separado, se observó que se infectaron en mayor medida los pacientes Lewis a negativos ( $p = 0.003$ ) y los Lewis b positivos ( $p = 0.000$ ). Por otro lado, si en el análisis teníamos en cuenta la presencia de ambos antígenos, los pacientes Lewis a negativo-Lewis b positivo eran los que más frecuentemente se infectaban con rotavirus (48'9%), seguidos por los Lewis a positivo-Lewis b positivo (43'6%). Un dato importante a destacar de nuestros resultados es el hecho de que los individuos Lewis a positivo-Lewis b negativo parecían presentar mayor protección frente a la infección al compararlos con los pacientes Lewis a

negativo-Lewis b negativo. Este hallazgo coincide con algunos estudios *in vitro* que indican que los genotipos P[4] y P[8] no se unen a los antígenos Lewis a (Huang et al., 2012; Ma et al., 2015; Sun et al., 2016). Además, algunos estudios epidemiológicos indican que los individuos no secretores Lewis a positivos son menos susceptibles a la infección por el genotipo P[8] (Imbert-Marcille et al., 2014; Payne et al., 2015; Trang et al., 2014; Zhang et al., 2016). La mayor parte de estos estudios analiza el fenotipo no secretor del individuo, por lo que no existen datos concluyentes sobre la protección que pueda proporcionar el fenotipo Lewis a de forma independiente. Por otro lado, un estudio reciente llevado a cabo en Nicaragua por Bucardo y cols. sugiere que los individuos Lewis a positivos presentan una menor protección con las vacunas Rotarix® y RotaTeq® (Bucardo et al., 2018). Puesto que el genotipo P[8] está presente en ambas vacunas, de confirmarse esta circunstancia, avalaría también la hipótesis de una cierta protección conferida por el antígeno Lewis a frente a la infección por este genotipo P[8]. En nuestro estudio, aunque encontramos un alto porcentaje de individuos secretores, se confirmaría esta protección del antígeno Lewis a frente a los rotavirus del genotipo P[8]. La distribución de los genotipos G de rotavirus según la expresión de los diferentes antígenos Lewis en los pacientes, no demostró relaciones estadísticamente significativas ( $p = 0.146$ ).

El análisis conjunto de los antígenos Lewis y secretor de los individuos del estudio demostró que los pacientes secretores Lewis positivos mostraban, de forma significativa, mayor predisposición a la infección por rotavirus ( $p = 0.000$ ). Estos resultados son similares a los observados en estudios previos llevados a cabo en Francia, Vietnam, Estados Unidos y China (Imbert-Marcille et al., 2014; Payne et al., 2015; Trang et al., 2014; Zhang et al., 2016). En ellos se confirma que sólo los niños con feno- o genotipo secretor, por lo tanto con al menos un alelo

## DISCUSIÓN

---

*FUT2* funcional, se infectan con los genotipos P[8] y P[4] de rotavirus. En un estudio llevado a cabo en Burkina Faso no se encontró ningún niño no secretor Lewis negativo infectado con cepas P[8] (Nordgren et al., 2014). En cambio, en dicho estudio los niños Lewis negativos tenían mayor riesgo de infectarse con cepas del genotipo P[6] que los niños Lewis positivos, independientemente de su estado secretor. El genotipo P[8] fue el más prevalente en nuestra área, con un escaso número de casos de infección por genotipo P[4], por lo que no tenemos datos referentes a otros genotipos P, como P[6].

De los resultados de nuestro estudio y de los de otros autores, se obtiene la conclusión de que el polimorfismo genético de *FUT2* (secretor) y *FUT3* (Lewis) influye en la susceptibilidad a las infecciones por los distintos genotipos de rotavirus (Pérez-Ortín et al., 2019). Es evidente, por tanto, que los antígenos histo-sanguíneos intervienen en el proceso de infección. Sin embargo, se ha demostrado que la infección in vitro de rotavirus en líneas celulares transformadas (Caco-2, HT-29, Vero) es independiente de la expresión de HBGAs, indicando que los HBGAs no son los únicos receptores necesarios para la infección (Barbé et al., 2018). Estas células expresan antígenos H, A y Lewis cultivadas en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO). Barbé y cols. inhibieron la expresión de HBGAs con 2F-fucosa, un inhibidor metabólico de la fucosilación, y después las infectaron con distintas cepas de rotavirus: SA11 P[2] (dependiente de ácido siálico), DS-1 P[4], Wa P[8], Rotarix P[8] y RotaTeq P[8] y P[5] (independientes de ácido siálico). El tratamiento previo con 2F-fucosa de las células infectadas con las cepas de rotavirus no inhibió ni redujo la intensidad de la infección, demostrando que la fucosilación, y por lo tanto la expresión de HBGAs, no es necesaria para la infección de células susceptibles (Barbé et al., 2018). Estos autores encontraron también que la presencia de anticuerpos neutralizantes

frente a rotavirus Wa P[8] en sueros de 76 individuos jóvenes sanos se asociaba significativamente con la presencia del alelo silvestre de *FUT2*. Concluyeron que el polimorfismo genético de *FUT2* desempeña un papel importante en la susceptibilidad a la infección por rotavirus, que se traduce en la producción de anticuerpos neutralizantes (Barbé et al., 2018).

Sin embargo, estudios serológicos llevados a cabo en nuestro laboratorio con sueros de individuos secretores y no secretores han demostrado que estos últimos presentan anticuerpos séricos IgG frente a VP8\* de distintas cepas de rotavirus (Vila-Vicent et al., manuscrito en preparación). Esto confirmaría que los individuos no secretores pueden infectarse, aunque probablemente en ellos la infección sea clínicamente más leve o asintomática.

A modo de resumen destacar que, el genotipo G9P[8] resultó ser el rotavirus más prevalente en nuestra área geográfica durante el periodo de estudio, infectando mayoritariamente a individuos de grupo sanguíneo A y AB. Como en el resto de Europa y Norteamérica, la mayor parte de la población española y de nuestro área expresa el fenotipo secretor Lewis positivo, lo que se relaciona con infección por los genotipos P[4] y P[8], pero no por el genotipo P[6]. Este hecho explicaría que un 98% de los rotavirus aislados fueran genotipo P[8] y no se encontrara ningún genotipo P[6]. Sin embargo, un 6% de los pacientes que se infectaron con un genotipo P[8] fueron secretores Lewis negativos, hallazgo que contrasta con lo descrito por algunos autores (Nordgren et al., 2014) y confirma lo encontrado por otros (Ayouni et al., 2015). Esta circunstancia plantea la posibilidad de que el antígeno secretor sea un factor más importante que el antígeno Lewis en el proceso de infección por rotavirus, pero son necesarios más estudios para confirmar este hecho. Otra hipótesis planteada es que en individuos no secretores Lewis b negativos

## DISCUSIÓN

---

existe cierto grado de protección frente a la infección por el genotipo P[8] cuando expresan el antígeno Lewis a (Trang et al., 2014; Zhang et al., 2016). En nuestro trabajo se cumple la hipótesis de protección del antígeno Lewis a en los niños Lewis b negativos, pero hemos de tener en cuenta el sesgo que supone el hecho de que la mayor parte de los individuos estudiados son secretores, condición que supone mayor predisposición a la infección por este genotipo. Por otra parte, la presencia de antígeno Lewis b en los pacientes estudiados (92'5%) fue superior a la descrita para la población general (69%). Este hecho coincidiría con lo descrito en la literatura, ya que se publicó que el antígeno Lewis b actuaría como receptor para rotavirus (Huang et al., 2012), aunque no se ha confirmado en otros estudios recientes (Gozalbo-Rovira et al., 2019; Hu et al., 2018).

Finalmente, y aunque no era uno de los objetivos principales del estudio, se ha podido comprobar la eficacia de las dos vacunas comercializadas en España, Rotarix® y RotaTeq®. La proporción de niños vacunados entre los pacientes infectados por rotavirus (30%) fue menor que en el grupo control (56%), con una probabilidad de sufrir la infección para los niños no vacunados casi 2 veces superior ( $p = 0.003$ ) a la que presentan los niños vacunados. Ambos preparados han demostrado ser muy seguros y eficaces en ensayos clínicos realizados por todo el mundo a gran escala, y ofrecen protección contra las cepas homotípicas y heterotípicas del rotavirus (Armah et al., 2010; Ruiz-Palacios et al., 2006; Steele et al., 2012; Vesikari et al., 2006). Incluso una sola dosis de vacuna puede considerarse como protección, según un estudio previo realizado en nuestra Comunidad Autónoma (Pérez-Vilar et al., 2015). Sin embargo, en nuestro trabajo se ha revelado la existencia de infección sintomática por rotavirus en niños vacunados, lo que podría considerarse un fracaso vacunal. Así, cuarenta niños (30%) de los 133

incluidos en el trabajo fueron diagnosticados de infección sintomática por rotavirus a pesar de haber sido vacunados previamente. Podría pensarse que este hecho puede estar influido por la excreción de cepas de rotavirus vacunales en las heces de los individuos vacunados, ya que se ha observado que los niños vacunados pueden excretar las cepas vacunales en muestras de heces hasta 13 días después de la vacunación (Bucardo et al., 2019). Sin embargo, los genotipos detectados en los pacientes de nuestro estudio no están presentes en la composición de las vacunas, excepto G1P[8], o bien el período de tiempo entre la última dosis y el momento de la infección excedió al tiempo de excreción potencial de las cepas vacunales en pacientes inmunocompetentes (Anderson, 2008). Por otro lado, aunque se observó una mayor cobertura vacunal en los niños menores de 3 años, fue precisamente este grupo de edad el que experimentó el mayor número de infecciones (Pérez-Ortín, R., Santiso-Bellón, C., Vila-Vicent, S., Carmona-Vicente, N., Rodríguez-Díaz, J. y Buesa, J., *Rotavirus symptomatic infection among unvaccinated and vaccinated children in Valencia, Spain*. BMC Infectious Diseases, en prensa). En este sentido, algunos autores apuntan la posibilidad de que los altos porcentajes de resultados positivos para rotavirus determinados por métodos inmunocromatográficos, en niños previamente vacunados, podrían deberse a falsos positivos, especialmente cuando las pruebas se realizan fuera de las temporadas epidémicas de rotavirus (Lopez-Lacort et al., 2016). Sin embargo, todos los resultados positivos reportados en nuestro estudio fueron confirmados por RT-PCR y se identificaron los genotipos infectantes de rotavirus.



## **CONCLUSIONES**



### 6. CONCLUSIONES

1. La distribución anual de la infección por rotavirus presentó, durante el periodo de estudio (enero 2013 – diciembre 2015), una mayor incidencia durante los meses de noviembre a abril, con disminución del número de casos durante el resto del año, distribución propia de climas templados.
2. La edad media de los pacientes fue de 22 meses, siendo el 84% menores de 3 años de edad.
3. La mayor parte de los pacientes (82%) se infectaron con un solo genotipo de rotavirus, mientras que en los casos con infección mixta se detectaron dos genotipos distintos.
4. Los genotipos G detectados fueron G1, G2, G3, G4, G9 y G12. Los genotipos P fueron P[4] y P[8]. El genotipo más frecuentemente aislado fue G9P[8], que predominó durante los periodos epidémicos, mientras que el genotipo G1P[8] fue el más prevalente a lo largo de todo el estudio.
5. El 70% de los niños infectados no había recibido previamente ninguna dosis de vacuna. No se encontró ninguna relación entre la distribución de los genotipos G y P de los rotavirus detectados y el estado de vacunación de los pacientes.
6. La infección por rotavirus fue más frecuente en los niños de los grupos sanguíneos A y AB, en comparación con los niños del grupo O.

## CONCLUSIONES

---

7. El fenotipo secretor (FUT2+) se asocia a la infección sintomática por rotavirus, ya que un 98'5% de los pacientes eran secretores, frente a un 70% de los niños en el grupo control.
8. Los niños Lewis b positivos muestran mayor predisposición a la infección por rotavirus ( $p = 0.000$ ).
9. Los individuos secretores Lewis positivos muestran mayor predisposición a padecer una infección sintomática por rotavirus ( $p = 0.000$ ).
10. La vacunación frente a rotavirus disminuye el riesgo de padecer una infección sintomática por rotavirus ( $p = 0.003$ ), aunque se han detectado fallos vacunales.

## **BIBLIOGRAFÍA**



---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, F. X., Pintó, R. M., Diez, J. M., y Bosch, A. (1994). Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(7), 2377-83.
- Adams, W. R., y Kraft, L. M. (1963). Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, *141*(3578), 359-360.
- Aladin, F., Einerhand, A. W. C., Bouma, J., Bezemer, S., Hermans, P., Wolvers, D., Bellamy, K., Frenken, L. G. J., Gray, J., y Iturriza-Gómara, M. (2012). In vitro neutralisation of rotavirus infection by two broadly specific recombinant monovalent llama-derived antibody fragments. *PloS One*, *7*(3), e32949.
- Aladin, F., Nawaz, S., Iturriza-Gómara, M., y Gray, J. (2010). Identification of G8 rotavirus strains determined as G12 by rotavirus genotyping PCR: Updating the current genotyping methods. *Journal of Clinical Virology*, *47*(4), 340-344.
- Alvarez-Aldeán, J., Aristegui, J., López-Belmonte, J. L., Pedrós, M., y García-Sicilia, J. (2014). Economic and psychosocial impact of rotavirus infection in Spain: a literature review. *Vaccine*, *32*(30), 3740-51.
- Ameno, S., Kimura, H., Ameno, K., Zhang, X., Kinoshita, H., Kubota, T., y Ijiri, I. (2001). Lewis and secretor gene effects on Lewis antigen and postnatal development of Lewis blood type. *Neonatology*, *79*(2), 91-96.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- American Academy of Pediatrics. (1996). Practice parameter: the management of acute gastroenteritis in young children. American Academy of Pediatrics, Provisional Committee on Quality Improvement, Subcommittee on Acute Gastroenteritis. *Pediatrics*, 97(3), 424-35.
- Anderson, E. J. (2008). Rotavirus vaccines: viral shedding and risk of transmission. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(10), 642-9.
- Anderson, E. J., y Weber, S. G. (2004). Rotavirus infection in adults. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(2), 91-99.
- Andresen, P. H. (1948). The blood group system L: a new blood group L2. A case of epistasy within the blood groups. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 25, 728-31.
- Anh, D. D., Van Trang, N., Thiem, V. D., Anh, N. T. H., Mao, N. D., Wang, Y., Jiang, B., Hien, N. D., y Luan, L. T. (2012). A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine*, 30, A114-A121.
- Aoki, S. T., Settembre, E. C., Trask, S. D., Greenberg, H. B., Harrison, S. C., y Dormitzer, P. R. (2009). Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing fab. *Science*, 324(5933), 1444-1447.
- Araki, K., Hara, M., Tsugawa, T., Shimano, C., Nishida, Y., Matsuo, M., y Tanaka, K. (2018). Effectiveness of monovalent and pentavalent rotavirus vaccines in Japanese children. *Vaccine*, 36(34), 5187-5193.

- Arana, A., Montes, M., Jere, K. C., Alkorta, M., Iturriza-Gómara, M., y Cilla, G. (2016). Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015. *Infection, Genetics and Evolution*, 44, 137-144.
- Arias, C. F., Romero, P., Alvarez, V., y López, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of Virology*, 70(9), 5832-9.
- Armah, G. E., Sow, S. O., Breiman, R. F., Dallas, M. J., Tapia, M. D., Feikin, D. R., Binka, F. N., Steele, A. D., Laserson, K. F., Ansah, N. A., Levine, M. M., Lewis, K., Coia, M. L., Attah-Poku, M., Ojwando, J., Rivers, S. B., Victor, J. C., Nyambane, G., Hodgson, A., Schödel, F., Ciarlet, M., y Neuzil, K. M. (2010). Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 376(9741), 606-614.
- Armah, G. E., Steele, A. D., Esona, M. D., Akran, V. A., Nimzing, L., y Pennap, G. (2010). Diversity of rotavirus strains circulating in West Africa from 1996 to 2000. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(S1), S64-S71.
- Ayouni, S., Sdiri-Loulizi, K., de Rougemont, A., Estienney, M., Ambert-Balay, K., Aho, S., Hamami, S., Aouni, M., Neji-Guediche, M., Pothier, P., y Belliot, G. (2015). Rotavirus P[8] infections in persons with secretor and nonsecretor phenotypes, Tunisia. *Emerging Infectious Diseases*, 21(11), 2055-2058.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Azevedo, M. P., Vlasova, A. N., y Saif, L. J. (2013). Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Review of Vaccines*, 12(2), 169-181.
- Bányai, K., László, B., Duque, J., Steele, A. D., Nelson, E. A. S., Gentsch, J. R., y Parashar, U. D. (2012). Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*, 30, A122-A130.
- Barbé, L., Le Moullac-Vaidye, B., Echasserieau, K., Bernardeau, K., Carton, T., Bovin, N., Nordgren, J., Svensson, L., Ruvoën-Clouet, N., y Le Pendu, J. (2018). Histo-blood group antigen-binding specificities of human rotaviruses are associated with gastroenteritis but not with in vitro infection. *Scientific Reports*, 8(1), 12961.
- Bastardo, J. W., y Holmes, I. H. (1980). Attachment of SA-11 rotavirus to erythrocyte receptors. *Infection and Immunity*, 29(3), 1134-40.
- Beards, G. M., Pilfold, J. N., Thouless, M. E., y Flewett, T. H. (1980). Rotavirus serotypes by serum neutralisation. *Journal of Medical Virology*, 5(3), 231-7.
- Bekdas, M., Demircioglu, F., Goksugur, S. B., Kucukbayrak, B., y Kismet, E. (2014). ¿Existe una relación entre la gastroenteritis rotavirus positivo y los grupos sanguíneos ABO?: Estudio retrospectivo de cohorte. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 112(4), 345-7.

- Bernaola Iturbe, E., Giménez Sánchez, F., Baca Cots, M., de Juan Martín, F., Díez Domingo, J., Garcés Sánchez, M., Gómez-Campderá, A., Martínón Torres, F., Picazo, J. J., y Pineda Solás, V. (2008). Calendario de vacunaciones de la Asociación Española de Pediatría: recomendaciones 2008. *Anales de Pediatría*, 68(1), 63-9.
- Bernstein, D. I., Smith, V. E., Sherwood, J. R., Schiff, G. M., Sander, D. S., DeFeudis, D., Spriggs, D. R., y Ward, R. L. (1998). Safety and immunogenicity of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12. *Vaccine*, 16(4), 381-7.
- Bernstein, F. (1924). Ergebnisse einer biostatistischen zusammenfassenden Betrachtung über die erblichen Blutstrukturen des Menschen. *Klinische Wochenschr*, 3(33), 1495–7.
- Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D., y Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *Journal of Virology*, 77(3), 1757-63.
- Bhandari, N., Rongsen-Chandola, T., Bavdekar, A., John, J., Antony, K., Taneja, S., Goyal, N., Kawade, A., Kang, G., Rathore, S. S., Juvekar, S., Muliylil, J., Arya, A., Shaikh, H., Abraham, V., Vрати, S., Proschan, M., Kohberger, R., Thiry, G., Glass, R. I., Greenberg, H. B., Curlin, G., Mohan, K., Harshavardhan, G. V. J. A., Prasad, S., Rao, T. S., Boslego, J. W., y Bhan, M. K. (2014). Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 383(9935), 2136-2143.
- Bines, J. E., Danchin, M., Jackson, P., Handley, A., Watts, E., Lee, K. J., West, A., Cowley, D., Chen, M.-Y., Barnes, G. L., Justice, F., Buttery, J. P., Carlin, J. B., Bishop, R. F., Taylor, B., y Kirkwood, C. D. (2015). Safety and immunogenicity of RV3-BB human neonatal rotavirus

## BIBLIOGRAFÍA

---

- vaccine administered at birth or in infancy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(12), 1389-1397.
- Binka, E., Vermund, S. H., y Armah, G. E. (2011). Rotavirus diarrhea among children less than 5 years of age in Urban Ghana. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30(8), 718-720.
- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., y Ruck, B. J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet*, 302(7841), 1281-1283.
- Blackhall, J., Fuentes, A., y Magnusson, G. (1996). Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology*, 225(1), 181-90.
- Blutt, S. E., y Conner, M. E. (2007). Rotavirus: to the gut and beyond!. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23(1), 39-43.
- Blutt, S. E., Kirkwood, C. D., Parreño, V., Warfield, K. L., Ciarlet, M., Estes, M. K., Bok, K., Bishop, R. F., y Conner, M. E. (2003). Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event?. *The Lancet*, 362(9394), 1445-1449.
- Böhm, R., Fleming, F. E., Maggioni, A., Dang, V. T., Holloway, G., Coulson, B. S., von Itzstein, M., y Haselhorst, T. (2015). Revisiting the role of histo-blood group antigens in rotavirus host-cell invasion. *Nature Communications*, 6(1), 5907.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., y van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495-503.

- Boshuizen, J. A., Reimerink, J. H. J., Korteland-van Male, A. M., van Ham, V. J. J., Koopmans, M. P. G., Buller, H. A., Dekker, J., y Einerhand, A. W. C. (2003). Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *Journal of Virology*, 77(24), 13005-13016.
- Bouzón-Alejandro, M., Diez Domingo, J., y Martín-Torres, F. (2011). Circovirus and impact of temporary withdrawal of rotavirus vaccines in Spain. *Human Vaccines*, 7(7), 798-9.
- Brendemoen, O. J. (1950). Further studies of agglutination and inhibition in the Lea-Leb system. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 36(3), 335-41.
- Bucardo, F., Mercado, J., Reyes, Y., González, F., Balmaseda, A., y Nordgren, J. (2015). Large increase of rotavirus diarrhoea in the hospital setting associated with emergence of G12 genotype in a highly vaccinated population in Nicaragua. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(6), 603.e1-603.e7.
- Bucardo, F., Nordgren, J., Reyes, Y., Gonzalez, F., Sharma, S., y Svensson, L. (2018). The Lewis A phenotype is a restriction factor for Rotateq and Rotarix vaccine-take in Nicaraguan children. *Scientific Reports*, 8(1), 1502.
- Bucardo, F., Reyes, Y., Rönnelid, Y., González, F., Sharma, S., Svensson, L., y Nordgren, J. (2019). Histo-blood group antigens and rotavirus vaccine shedding in Nicaraguan infants. *Scientific Reports*, 9(1), 10764.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Bucardo, F., Reyes, Y., Svensson, L., y Nordgren, J. (2014). Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. *PloS One*, 9(5), e98201.
- Bucardo, F., Rippinger, C. M., Svensson, L., y Patton, J. T. (2012). Vaccine-derived NSP2 segment in rotaviruses from vaccinated children with gastroenteritis in Nicaragua. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(6), 1282-1294.
- Buesa, J., de Souza, C. O., Asensi, M., Martínez, C., Prat, J., y Gil, M. T. (2000). VP7 and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from children with gastroenteritis over a 3-year period in Valencia, Spain. *European Journal of Epidemiology*, 16(6), 501-6.
- Buttery, J. P., y Kirkwood, C. D. (2014). What can rotavirus vaccines teach us about rotavirus?. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(9), 786-788.
- Carlin, J. B., Macartney, K. K., Lee, K. J., Quinn, H. E., Buttery, J. P., Lopert, R., Bines, J. E., y McIntyre, P. B. (2013). Intussusception risk and disease prevention associated with rotavirus vaccines in Australia's National Immunization Program. *Clinical Infectious Diseases*, 57(10), 1427-1434.
- Carvalho-Costa, F. A., de Assis, R. M. S., Fialho, A. M., Araújo, I. T., Silva, M. F., Gómez, M. M., Andrade, J. S., Rose, T. L., Fumian, T. M., Volotão, E. M., Miagostovich, M. P., y Leite, J. P. G. (2019). The evolving epidemiology of rotavirus A infection in Brazil a decade after the introduction of universal vaccination with Rotarix®. *BMC Pediatrics*, 19(1), 42.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1999). Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--United States, 1998-1999. *CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 48(27), 577-81.
- Chanock, R. M., y Kapikian, A. Z. (2001). Rotaviruses. *Fields Virology* (Vol. 2). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Chavers, T., De Oliveira, L. H., Parashar, U. D., y Tate, J. E. (2018). Post-licensure experience with rotavirus vaccination in Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis. *Expert Review of Vaccines*, 17(11), 1037-1051.
- Cheever, F. S., y Mueller, J. H. (1958). Epidemic diarrheal diseases of suckling mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(4), 405-416.
- Chomzynski, P. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Christy, C., Madore, H. P., Pichichero, M. E., Gala, C., Pincus, P., Vosefski, D., Hoshino, Y., Kapikian, A., y Dolin, R. (1988). Field trial of rhesus rotavirus vaccine in infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 7(9), 645-50.
- Ciarlet, M., Liprandi, F., Conner, M. E., y Estes, M. K. (2000). Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. *Archives of Virology*, 145(2), 371-83.
- Clausen, H., Bennett, E. P., y Grunnet, N. (1994). Molecular genetics of ABO histo-blood groups. *Transfusion Clinique et Biologique: Journal de La Société Française de Transfusion Sanguine*, 1(2), 79-89.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Clemens, J., Rao, M., Ahmed, F., Ward, R., Huda, S., Chakraborty, J., Yunus, M., Khan, M. R., Ali, M., y Kay, B. (1993). Breast-feeding and the risk of life-threatening rotavirus diarrhea: prevention or postponement?. *Pediatrics*, 92(5), 680-5.
- Cohen, J., Abad, M. J., Ruiz, M. C., Michelangeli, F., y Charpilienne, A. (1997). Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *Journal of General Virology*, 78(11), 2883-2893.
- Cook, N. (2004). The zoonotic potential of rotavirus. *Journal of Infection*, 48(4), 289-302.
- Cooling, L. (2015). Blood groups in infection and host susceptibility. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 801-870.
- Coombs, R. R. A., Mourant, A. E., y Race, R. R. (1945). A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *British Journal of Experimental Pathology*, 26, 255-66.
- Costache, M., Cailleau, A., Fernandez-Mateos, P., Oriol, R., y Mollicone, R. (1997). Advances in molecular genetics of alpha-2- and alpha-3/4-fucosyltransferases. *Transfusion Clinique et Biologique: Journal de La Société Française de Transfusion Sanguine*, 4(4), 367-82.
- Coulson, B. S. (1996). VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies. *Archives of Virology. Supplementum*, 12, 113-8.
- Coulson, B. S., Grimwood, K., Hudson, I. L., Barnes, G. L., y Bishop, R. F. (1992). Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(7), 1678-84.

- Crawford, S. E., Estes, M. K., Ciarlet, M., Barone, C., O'Neal, C. M., Cohen, J., y Conner, M. E. (1999). Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *Journal of Virology*, 73(6), 4813-22.
- Cutbush, M., Giblett, E. R., y Mollison, P. L. (1956). Demonstration of the phenotype Le (a+b+) in infants and in adults. *British Journal of Haematology*, 2(2), 210-220.
- Dalby-Payne, J. R., y Elliott, E. J. (2011). Gastroenteritis in children. *British Medical Journal. Clinical Evidence*, 2011:0314.
- Daniels, G., Castilho, L., Flegel, W. A., Fletcher, A., Garratty, G., Levene, C., Lomas-Francis, C., Moulds, J. M., Moulds, J. J., Olsson, M. L., Overbeeke, M., Poole, J., Reid, M. E., Rouger, P., van der Schoot, E., Scott, M., Sistonen, P., Smart, E., Storry, J. R., Tani, Y., Yu, L. C., Wendel, S., Westhoff, C., Yahalom, V., y Zelinski, T. (2009). International society of blood transfusion committee on terminology for red blood cell surface antigens: Macao report. *Vox Sanguinis*, 96(2), 153-156.
- Daniels, G. L., Anstee, D. J., Cartron, J. P., Dahr, W., Issitt, P. D., Jørgensen, J., Kornstad, L., Levene, C., Lomas-Francis, C., y Lubenko, A. (1995). Blood group terminology 1995. ISBT Working Party on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sanguinis*, 69(3), 265-79.
- Das, S., Varghese, V., Chaudhuri, S., Barman, P., Kojima, K., Dutta, P., Bhattacharya, S. K., Krishnan, T., Kobayashi, N., y Naik, T. N. (2004). Genetic variability of human rotavirus strains isolated from Eastern and Northern India. *Journal of Medical Virology*, 72(1), 156-161.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- DeCamp, L. R., Byerley, J. S., Doshi, N., y Steiner, M. J. (2008). Use of antiemetic agents in acute gastroenteritis. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 162(9), 858.
- Dennehy, P. H. (2013). Treatment and prevention of rotavirus infection in children. *Current Infectious Disease Reports*, 15(3), 242-250.
- Dennehy, P. H., Cortese, M. M., Bégué, R. E., Jaeger, J. L., Roberts, N. E., Zhang, R., Rhodes, P., Gentsch, J., Ward, R., Bernstein, D. I., Vitek, C., Bresee, J. S., y Staat, M. A. (2006). A case-control study to determine risk factors for hospitalization for rotavirus gastroenteritis in U.S. children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 25(12), 1123-31.
- Desselberger, U. (1996). Genome rearrangements of rotaviruses. *Archives of Virology. Supplementum*, 12, 37-51.
- Desselberger, U., y Gray, J. (2013). Viral gastroenteritis. *Medicine*, 41(12), 700-704.
- Desselberger, U., y McCrae, M. A. (1994). The rotavirus genome. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 185, 31-66.
- Desselberger, U., Richards, J., Tchertanov, L., Lepault, J., Lever, A., Burrone, O. R., y Cohen, J. (2013). Further characterisation of rotavirus cores: Ss(+)RNAs can be packaged in vitro but packaging lacks sequence specificity. *Virus Research*, 178(2), 252-263.
- Dhingra, M. S., Kundu, R., Gupta, M., Kanungo, S., Ganguly, N., Singh, M. P., Bhattacharya, M. K., Ghosh, R., Kumar, R., Sur, D., Chadha, S. M., y Saluja, T. (2014). Evaluation of safety and immunogenicity of a live attenuated tetravalent (G1–G4) bovine-human reassortant rotavirus vaccine (BRV-TV) in healthy Indian adults and infants. *Vaccine*, 32, A117-A123.

- Díez-Domingo, J., Suriñach, N. L., Alcalde, N. M., Betegón, L., Largeton, N., y Trichard, M. (2010). Burden of paediatric rotavirus gastroenteritis (RVGE) and potential benefits of a universal rotavirus vaccination programme with a pentavalent vaccine in Spain. *BMC Public Health*, 10(1), 469.
- Dormitzer, P. R., Sun, Z.-Y. J., Blixt, O., Paulson, J. C., Wagner, G., y Harrison, S. C. (2002). Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8\* core. *Journal of Virology*, 76(20), 10512-10517.
- Dóro, R., Farkas, S. L., Martella, V., y Bányai, K. (2015). Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(11), 1337-1350.
- Dóro, R., László, B., Martella, V., Leshem, E., Gentsch, J., Parashar, U., y Bányai, K. (2014). Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure?. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 446-461.
- Elnady, H. G., Samie, O. M. A., Saleh, M. T., Sherif, L. S., Abdalmoneam, N., Kholoussi, N. M., Kholoussi, S. M., y EL-Taweel, A. N. (2017). ABO blood grouping in Egyptian children with rotavirus gastroenteritis. *Gastroenterology Review*, 3(3), 175-180.
- Estes, M. K. (2001). Rotaviruses and their replication. *Fields Virology* (Vol. 2). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Estes, M. K., Graham, D. Y., Gerba, C. P., y Smith, E. M. (1979). Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. *Journal of Virology*, 31(3), 810-5.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Estes, M. K., y Greenberg, H. B. (2013). Rotaviruses. (B. N. Fields, D. M. Knipe, & P. M. Howley, Eds.), *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Fenaux, M., Cuadras, M. A., Feng, N., Jaimes, M., y Greenberg, H. B. (2006). Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *Journal of Virology*, 80(11), 5219-32.
- Feng, N., Kim, B., Fenaux, M., Nguyen, H., Vo, P. T., Omary, M. B., y Greenberg, H. B. (2008). Role of interferon in homologous and heterologous rotavirus infection in the intestines and extraintestinal organs of suckling mice. *Journal of Virology*, 82(15), 7578-90.
- Fernandez-Mateos, P., Cailleau, A., Henry, S., Costache, M., Elmgren, A., Svensson, L., Larson, G., Samuelsson, B. E., Oriol, R., y Mollicone, R. (1998). Point mutations and deletion responsible for the Bombay H null and the Reunion H weak blood groups. *Vox Sanguinis*, 75(1), 37-46.
- Flewett, T. H., Bryden, A. S., y Davies, H. (1973). Letter: virus particles in gastroenteritis. *The Lancet*, 2(7844), 1497.
- Franco, M. A., Angel, J., y Greenberg, H. B. (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*, 24(15), 2718-2731.
- François, A., Sansonetti, N., Mollicone, R., Le Pendu, J., Galton, J., Jaulmes, B., y Oriol, R. (1986). Heterogeneity of Lewis antibodies. A comparison of the reaction of human and animal reagents with synthetic oligosaccharides. *Vox Sanguinis*, 50(4), 227-34.

- Fu, C., He, Q., Xu, J., Xie, H., Ding, P., Hu, W., Dong, Z., Liu, X., y Wang, M. (2012). Effectiveness of the Lanzhou lamb rotavirus vaccine against gastroenteritis among children. *Vaccine*, 31(1), 154-158.
- Furukawa, K., Welt, S., Yin, B. W., Feickert, H. J., Takahashi, T., Ueda, R., y Lloyd, K. O. (1990). Analysis of the fine specificities of 11 mouse monoclonal antibodies reactive with type 2 blood group determinants. *Molecular Immunology*, 27(8), 723-32.
- Garaicoechea, L., Olichon, A., Marcoppido, G., Wigdorovitz, A., Mozgovoij, M., Saif, L., Surrey, T., y Parreño, V. (2008). Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice. *Journal of Virology*, 82(19), 9753-64.
- García-Díaz, A., López-Andújar, P., Rodríguez-Díaz, J., Montava, R., Torres Barceló, C., Ribes, J. M., y Buesa, J. (2004). Nasal immunization of mice with a rotavirus DNA vaccine that induces protective intestinal IgA antibodies. *Vaccine*, 23(4), 489-98.
- Gardet, A., Breton, M., Fontanges, P., Trugnan, G., y Chwetzoff, S. (2006). Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. *Journal of Virology*, 80(8), 3947-56.
- Gastañaduy, P. A., Curns, A. T., Parashar, U. D., y Lopman, B. A. (2013). Gastroenteritis hospitalizations in older children and adults in the United States before and after implementation of infant rotavirus vaccination. *JAMA*, 310(8), 851.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Gauchan, P., Sasaki, E., Nakagomi, T., Do, L. P., Doan, Y. H., Mochizuki, M., y Nakagomi, O. (2015). Whole genotype constellation of prototype feline rotavirus strains FRV-1 and FRV-64 and their phylogenetic relationships with feline-like human rotavirus strains. *Journal of General Virology*, 96(Pt\_2), 338-350.
- Gentsch, J., Glass, R. I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B. K., y Bhan, M. K. (1992). Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(6), 1365-73.
- Gentsch, J., Woods, P. A., Ramachandran, M., Das, B. K., Leite, J. P., Alfieri, A., Kumar, R., Bhan, M. K., y Glass, R. I. (1996). Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *The Journal of Infectious Diseases*, 174 Suppl, S30-S36.
- Giaquinto, C., Dominiak-Felden, G., Van Damme, P., Htar Myint, T. T., Maldonado, Y. A., Spoulou, V., Mast, T. C., y Staat, M. A. (2011). Summary of effectiveness and impact of rotavirus vaccination with the oral pentavalent rotavirus vaccine: a systematic review of the experience in industrialized countries. *Human Vaccines*, 7(7), 734-748.
- Gil-Prieto, R., Gonzalez-Escalada, A., Alvaro-Meca, A., Garcia-Garcia, L., San-Martin, M., González-López, A., y Gil-de-Miguel, A. (2013). Impact of non-routine rotavirus vaccination on hospitalizations for diarrhoea and rotavirus infections in Spain. *Vaccine*, 31(43), 5000-5004.

- Gilger, M. A., Matson, D. O., Conner, M. E., Rosenblatt, H. M., Finegold, M. J., y Estes, M. K. (1992). Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *The Journal of Pediatrics*, 120(6), 912-7.
- Glass, R. I., Parashar, U., Patel, M. M., Gentsch, J., y Jiang, B. (2014). Rotavirus vaccines: successes and challenges. *Journal of Infection*, 68, S9-S18.
- Gleizes, O., Desselberger, U., Tatochenko, V., Rodrigo, C., Salman, N., Mezner, Z., Giaquinto, C., y Grimprel, E. (2006). Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 25(1 Suppl), S12-21.
- González, R. A., Torres-Vega, M. A., López, S., y Arias, C. F. (1998). In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Archives of Virology*, 143(5), 981-96.
- Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B., y Fang, Z. Y. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(2), 276-82.
- Gozalbo-Rovira, R., Ciges-Tomas, J. R., Vila-Vicent, S., Buesa, J., Santiso-Bellón, C., Monedero, V., Yebra, M. J., Marina, A., y Rodríguez-Díaz, J. (2019). Unraveling the role of the secretor antigen in human rotavirus attachment to histo-blood group antigens. *PLoS Pathogens*, 15(6), e1007865.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Graham, D. Y., Dufour, G. R., y Estes, M. K. (1987). Minimal infective dose of rotavirus. *Archives of Virology*, 92(3-4), 261-71.
- Greenberg, H. B., y Estes, M. K. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 136(6), 1939-51.
- Gregorio, G. V., Dans, L. F., y Silvestre, M. A. (2011). Early versus delayed refeeding for children with acute diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (7), CD007296.
- Grubb, R. (1951). Observations on the human group system Lewis. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 28(1), 61-81.
- Guandalini, S. (2011). Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45(December), S149-S153.
- Guerrero, C. A., Torres, D. P., García, L. L., Guerrero, R. A., y Acosta, O. (2014). N-acetylcysteine treatment of rotavirus-associated diarrhea in children. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 34(11), e333-e340.
- Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C. F., y López, S. (2010). Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, 84(18), 9161-9.
- Hagbom, M., Istrate, C., Engblom, D., Karlsson, T., Rodríguez-Díaz, J., Buesa, J., Taylor, J. A., Loitto, V.-M., Magnusson, K.-E., Ahlman, H., Lundgren, O., y Svensson, L. (2011). Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002115.

- Hagbom, M., Novak, D., Ekström, M., Khalid, Y., Andersson, M., Lindh, M., Nordgren, J., y Svensson, L. (2017). Ondansetron treatment reduces rotavirus symptoms-A randomized double-blinded placebo-controlled trial. *PloS One*, 12(10), e0186824.
- Hakomori, S. (1981). Blood group ABH and li antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism, and their developmental change. *Seminars in Hematology*, 18(1), 39-62.
- Hammar, L., Mansson, S., Rohr, T., Chester, M. A., Ginsburg, V., Lundblad, A., y Zopf, D. (1981). Lewis phenotype of erythrocytes and Leb-active glycolipid in serum of pregnant women. *Vox Sanguinis*, 40(1), 27-33.
- Harris, V. C., Armah, G., Fuentes, S., Korpela, K. E., Parashar, U., Victor, J. C., Tate, J., de Weerth, C., Giaquinto, C., Wiersinga, W. J., Lewis, K. D. C., y de Vos, W. M. (2017). Significant correlation between the infant gut microbiome and rotavirus vaccine response in rural Ghana. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(1), 34-41.
- Harris, V. C., Haak, B. W., Handley, S. A., Jiang, B., Velasquez, D. E., Hykes, B. L., Droit, L., Berbers, G. A. M., Kemper, E. M., van Leeuwen, E. M. M., Boele van Hensbroek, M., y Wiersinga, W. J. (2018). Effect of antibiotic-mediated microbiome modulation on rotavirus vaccine immunogenicity: a human, randomized-control proof-of-concept trial. *Cell Host & Microbe*, 24(2), 197-207.e4.
- Hartling, L., Bellemare, S., Wiebe, N., Russell, K. F., Klassen, T. P., y Craig, W. R. (2006). Oral versus intravenous rehydration for treating dehydration due to gastroenteritis in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3), CD004390.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Haselhorst, T., Fleming, F. E., Dyason, J. C., Hartnell, R. D., Yu, X., Holloway, G., Santegoets, K., Kiefel, M. J., Blanchard, H., Coulson, B. S., y von Itzstein, M. (2009). Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nature Chemical Biology*, 5(2), 91-93.
- Heiman, E. M., McDonald, S. M., Barro, M., Taraporewala, Z. F., Bar-Magen, T., y Patton, J. T. (2008). Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *Journal of Virology*, 82(22), 11106-16.
- Hemming, M., Räsänen, S., Huhti, L., Paloniemi, M., Salminen, M., y Vesikari, T. (2013). Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTaq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *European Journal of Pediatrics*, 172(6), 739-746.
- Hemming, M., y Vesikari, T. (2013). Genetic diversity of G1P[8] rotavirus VP7 and VP8\* antigens in Finland over a 20-year period: No evidence for selection pressure by universal mass vaccination with RotaTaq(R) vaccine. *Infection, Genetics and Evolution*, 19, 51-58.
- Hemming, M., y Vesikari, T. (2014). Detection of rotateq vaccine-derived, double-reassortant rotavirus in a 7-year-old child with acute gastroenteritis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 33(6), 655-6.
- Henry, S. M., Benny, A. G., y Woodfield, D. G. (1990). Investigation of Lewis phenotypes in Polynesians: evidence of a weak secretor phenotype. *Vox Sanguinis*, 58(1), 61-6.
- Henry, S., Mollicone, R., Fernandez, P., Samuelsson, B., Oriol, R., y Larson, G. (1996). Molecular basis for erythrocyte Le(a+ b+) and salivary ABH partial-secretor phenotypes: expression of a FUT2

- secretor allele with an A-->T mutation at nucleotide 385 correlates with reduced alpha(1,2) fucosyltransferase activity. *Glycoconjugate Journal*, 13(6), 985-93.
- Henry, S., Oriol, R., y Samuelsson, B. (1995). Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sanguinis*, 69(3), 166-82.
- Herrmann, J. E., Chen, S. C., Fynan, E. F., Santoro, J. C., Greenberg, H. B., Wang, S., y Robinson, H. L. (1996). Protection against rotavirus infections by DNA vaccination. *The Journal of Infectious Diseases*, 174 Suppl, S93-7.
- Hirsch, H. F., y Graham, H. A. (1980). Adsorption of Lec and Led from plasma onto red blood cells. *Transfusion*, 20(4), 474-475.
- Hoffmann, T., Iturriza-Gómara, M., Faaborg-Andersen, J., Kraaer, C., Nielsen, C. P., Gray, J., y Hogh, B. (2011). Prospective study of the burden of rotavirus gastroenteritis in Danish children and their families. *European Journal of Pediatrics*, 170(12), 1535-1539.
- Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Cortes-Penfield, N. W., Smith, D. F., Le Pendu, J., Estes, M. K., y Prasad, B. V. V. (2012). Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*, 485(7397), 256-259.
- Hu, L., Sankaran, B., Laucirica, D. R., Patil, K., Salmen, W., Ferreon, A. C. M., Tsoi, P. S., Lasanajak, Y., Smith, D. F., Ramani, S., Atmar, R. L., Estes, M. K., Ferreon, J. C., y Prasad, B. V. V. (2018). Glycan recognition in globally dominant human rotaviruses. *Nature Communications*, 9(1), 2631.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Huang, P., Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A., y Jiang, X. (2012). Spike protein VP8\* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *Journal of Virology*, 86(9), 4833-4843.
- Hungerford, D., Allen, D. J., Nawaz, S., Collins, S., Ladhani, S., Vivancos, R., y Iturriza-Gómara, M. (2019). Impact of rotavirus vaccination on rotavirus genotype distribution and diversity in England, September 2006 to August 2016. *Eurosurveillance: European Communicable Disease Bulletin*, 24(6).
- Hungerford, D., Vivancos, R., Read, J. M., Pitzer, V. E., Cunliffe, N., French, N., y Iturriza-Gómara, M. (2016). In-season and out-of-season variation of rotavirus genotype distribution and age of infection across 12 European countries before the introduction of routine vaccination, 2007/08 to 2012/13. *Eurosurveillance*, 21(2), 30106.
- Imbert-Marcille, B.-M. M., Barbé, L., Dupé, M., Le Moullac-Vaidye, B., Besse, B., Peltier, C., Ruvoën-Clouet, N., y Le Pendu, J. (2014). A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus a of the P[8] genotype. *Journal of Infectious Diseases*, 209(8), 1227-1230.
- Iturriza-Gómara, M., Cubitt, D., Desselberger, U., y Gray, J. (2001). Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3796-3798.

- Iturriza-Gómara, M., Dallman, T., Bányai, K., Böttiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., Fiore, L., Johansen, K., Korsun, N., Kroneman, A., Lappalainen, M., László, B., Maunula, L., Matthijnssens, J., Midgley, S., Mladenova, Z., Poljsak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F. M., Sanchez-Fauquier, A., Schreier, E., Steyer, A., Sidaraviciute, I., Tran, A. N., Usonis, V., Van Ranst, M., de Rougemont, A., y Gray, J. (2009). Rotavirus surveillance in Europe, 2005–2008: Web-Enabled reporting and Real-Time analysis of genotyping and epidemiological data. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(s1), S215-S221.
- Iturriza-Gómara, M., Dallman, T., Bányai, K., Böttiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., Fiore, L., Johansen, K., Koopmans, M., Korsun, N., Koukou, D., Kroneman, A., László, B., Lappalainen, M., Maunula, L., Marques, A. M., Matthijnssens, J., Midgley, S., Mladenova, Z., Nawaz, S., Poljsak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F. M., Sanchez-Fauquier, A., Steyer, A., Sidaraviciute-Ivaskeviciene, I., Syriopoulou, V., Tran, A. N., Usonis, V., Van Ranst, M., De Rougemont, A., y Gray, J. (2011). Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiology and Infection*, 139(6), 895-909.
- Iturriza-Gómara, M., Isherwood, B., Desselberger, U., y Gray, J. (2001). Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *Journal of Virology*, 75(8), 3696-705.
- Iturriza-Gómara, M., Kang, G., y Gray, J. (2004). Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 31(4), 259-265.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Iturriza-Gómara, M., Kang, G., Mammen, A., Jana, A. K., Abraham, M., Desselberger, U., Brown, D., y Gray, J. (2004). Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2541-2547.
- Iturriza-Gómara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U., y Gray, J. (2002). Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *Journal of Virology*, 76(13), 6596-601.
- Jain, S., Vashistt, J., y Changotra, H. (2014). Rotaviruses: is their surveillance needed?. *Vaccine*, 32(27), 3367-78.
- Jere, K. C., Sawyerr, T., Seheri, L. M., Peenze, I., Page, N. A., Geyer, A., y Steele, A. D. (2011). A first report on the characterization of rotavirus strains in Sierra Leone. *Journal of Medical Virology*, 83(3), 540-550.
- Jere, Khuzwayo C., Mlera, L., O'Neill, H. G., Potgieter, A. C., Page, N. A., Seheri, M. L., y van Dijk, A. A. (2011). Whole genome analyses of African G2, G8, G9, and G12 rotavirus strains using sequence-independent amplification and 454® pyrosequencing. *Journal of Medical Virology*, 83(11), 2018-2042.
- Jiang, B., Wang, Y., y Glass, R. I. (2013). Does a monovalent inactivated human rotavirus vaccine induce heterotypic immunity?. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(8), 1634-1637.
- Jordal, K. (1956). The Lewis blood groups in children. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 39(6), 399-406.

- Juárez, P., Presa, S., Espí, J., Pineda, B., Antón, M. T., Moreno, V., Buesa, J., Granell, A., y Orzaez, D. (2012). Neutralizing antibodies against rotavirus produced in transgenically labelled purple tomatoes. *Plant Biotechnology Journal*, 10(3), 341-352.
- Kabat, E. A. (1955). *Blood group substances*. New York: Academic Press.
- Kambhampati, A., Payne, D. C., Costantini, V., y Lopman, B. A. (2016). Host genetic susceptibility to enteric viruses: a systematic review and metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases*, 62(1), 11-18.
- Kang, G. (2013). New-generation treatment? Targeted antiviral therapy for rotavirus. *Gastroenterology*, 145(4), 711-4.
- Kansas, G. S. (1996). Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 88(9), 3259-3287.
- Kapikian, A. Z., Hoshino, Y., Chanock, R. M., y Perez-Schael, I. (1996). Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine. *Archives of Virology. Supplementum*, 12, 163-75.
- Kapikian, Albert Z., Wyatt, R. G., Greenberg, H. B., Kalica, A. R., Kim, H. W., Brandt, C. D., Rodriguez, W. J., Parrott, R. H., y Chanock, R. M. (1980). Approaches to immunization of infants and young children against gastroenteritis due to rotaviruses. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(3), 459-69.
- Karafillakis, E., Hassounah, S., y Atchison, C. (2015). Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in Europe, 2006–2014. *Vaccine*, 33(18), 2097-2107.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Kazi, A. M., Cortese, M. M., Yu, Y., Lopman, B., Morrow, A. L., Fleming, J. A., McNeal, M. M., Steele, A. D., Parashar, U. D., Zaidi, A. K. M., y Ali, A. (2017). Secretor and salivary ABO blood group antigen status predict rotavirus vaccine take in infants. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(5), 786-789.
- Kelly, R. J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G. G., y Lowe, J. B. (1995). Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(9), 4640-9.
- Keswick, B. H., Pickering, L. K., DuPont, H. L., y Woodward, W. E. (1983). Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centers. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4), 813-6.
- King, C. K., Glass, R. I., Bresee, J. S., y Duggan, C. (2003). Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. *CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 52(RR-16), 1-16.
- Kobata, A., Ginsburg, V., y Tsuda, M. (1969). Oligosaccharides of human milk. Isolation and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 130(1), 509-13.
- Koo, H. L., Neill, F. H., Estes, M. K., Munoz, F. M., Cameron, A., DuPont, H. L., y Atmar, R. L. (2013). Noroviruses: the most common pediatric viral enteric pathogen at a large university hospital after introduction of rotavirus vaccination. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 2(1), 57-60.

- Kuehn, B. M. (2010). FDA: benefits of rotavirus vaccination outweigh potential contamination risk. *JAMA*, 304(1), 30.
- La Frazia, S., Ciucci, A., Arnoldi, F., Coira, M., Gianferretti, P., Angelini, M., Belardo, G., Burrone, O. R., Rossignol, J.-F., y Santoro, M. G. (2013). Thiazolides, a new class of antiviral agents effective against rotavirus infection, target viral morphogenesis, inhibiting viroplasm formation. *Journal of Virology*, 87(20), 11096-106.
- Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J., y Black, R. E. (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*, 8(9), e72788.
- Landsteiner, K. (1900). Zur kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinetenden wirkungen des blutserums und der lympe. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 27, 357-66.
- Landsteiner, K. (1901). Über agglutinationserscheinungen normalen menschlichen blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 14, 1132-34.
- Lawler, S. D., y Marshall, R. (1961). Lewis and secretor characters in infancy. *Vox Sanguinis*, 6, 541-54.
- Lazzerini, M., y Wanzira, H. (2016). Oral zinc for treating diarrhoea in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD005436.
- Le Pendu, J. (2004). Histo-blood group antigen and human milk oligosaccharides: genetic polymorphism and risk of infectious diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 554(2), 135-43.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Le Saux, N., Bettinger, J. A., Halperin, S. A., Vaudry, W., y Scheifele, D. W. (2010). Substantial morbidity for hospitalized children with community-acquired rotavirus infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 29(9), 879-882.
- Lee, B., Dickson, D. M., DeCamp, A. C., Ross Colgate, E., Diehl, S. A., Uddin, M. I., Sharmin, S., Islam, S., Bhuiyan, T. R., Alam, M., Nayak, U., Mychaleckyj, J. C., Taniuchi, M., Petri, W. A., Haque, R., Qadri, F., y Kirkpatrick, B. D. (2018). Histo-blood group antigen phenotype determines susceptibility to genotype-specific rotavirus infections and impacts measures of rotavirus vaccine efficacy. *The Journal of Infectious Diseases*, 217(9), 1399-1407.
- Lemieux, R. U., Baker, D. A., Weinstein, W. M., y Switzer, C. M. (1981). Artificial antigens. Antibody preparations for the localization of Lewis determinants in tissues. *Biochemistry*, 20(1), 199-205.
- Leshem, E., Lopman, B., Glass, R. I., Gentsch, J., Bányai, K., Parashar, U., y Patel, M. M. (2014). Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(9), 847-856.
- Leshem, E., Moritz, R. E., Curns, A. T., Zhou, F., Tate, J. E., Lopman, B. A., y Parashar, U. D. (2014). Rotavirus vaccines and health care utilization for diarrhea in the United States (2007-2011). *Pediatrics*, 134(1), 15-23.
- Light, J. S., y Hodes, H. L. (1949). Isolation from cases of infantile diarrhea of a filtrable agent causing diarrhea in calves. *The Journal of Experimental Medicine*, 90(2), 113-35.

- Lin, S. L., y Tian, P. (2003). Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A rotavirus NSP4 proteins. *Virus Genes*, 26(3), 271-82.
- Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., LePendou, J., y Baric, R. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature Medicine*, 9(5), 548-553.
- Liu, J., Kibiki, G., Maro, V., Maro, A., Kumburu, H., Swai, N., Taniuchi, M., Gratz, J., Toney, D., Kang, G., y Houpt, E. (2011). Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology*, 50(4), 308-313.
- Liu, M., Mattion, N. M., y Estes, M. K. (1992). Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology*, 188(1), 77-84.
- Liu, Y., Huang, P., Jiang, B., Tan, M., Morrow, A. L., y Jiang, X. (2013). Poly-LacNAc as an age-specific ligand for rotavirus P[11] in neonates and infants. *PLoS One*, 8(11), e78113.
- Liu, Y., Huang, P., Tan, M., Yiliu, L., Biesiada, J., Meller, J., Castello, A. A., Jiang, B., y Jiang, X. (2012). Rotavirus VP8\*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *Journal of Virology*, 86(18), 9899-9910.
- Liu, Y., Ramelot, T. A., Huang, P., Liu, Y., Li, Z., Feizi, T., Zhong, W., Wu, F.-T., Tan, M., Kennedy, M. A., y Jiang, X. (2016). Glycan specificity of P[19] rotavirus and comparison with those of related P genotypes. *Journal of Virology*, 90(21), 9983-9996.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Lloyd, K. O., Kabat, E. A., Layug, E. J., y Gruezo, F. (1966). Immunochemical studies on blood groups. Structures of some oligosaccharides produced by alkaline degradation of blood group A, B, and H substances. *Biochemistry*, 5(5), 1489-501.
- Lopez-Lacort, M., Collado, S., Díez-Gandía, A., y Díez-Domingo, J. (2016). Rotavirus, vaccine failure or diagnostic error?. *Vaccine*, 34(48), 5912-5915.
- López, S., y Arias, C. F. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends in Microbiology*, 12(6), 271-278.
- Lopman, B. A., Pitzer, V. E., Sarkar, R., Gladstone, B., Patel, M. M., Glasser, J., Gambhir, M., Atchison, C., Grenfell, B. T., Edmunds, W. J., Kang, G., y Parashar, U. D. (2012). Understanding reduced rotavirus vaccine efficacy in low socio-economic settings. *PloS One*, 7(8), e41720.
- Lu, X., McDonald, S. M., Tortorici, M. A., Tao, Y. J., Vasquez-Del Carpio, R., Nibert, M. L., Patton, J. T., y Harrison, S. C. (2008). Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure*, 16(11), 1678-1688.
- Luchs, A., y Timenetsky, M. do C. S. T. (2014). G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains. *Journal of General Virology*, 95(Pt\_3), 627-641.
- Ludert, J. E., Michelangeli, F., Gil, F., Liprandi, F., y Esparza, J. (1987). Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology*, 27(2), 95-101.

- Lundblad, A. (1978). Oligosaccharides from human urine. *Methods in Enzymology*, 50, 226-35.
- Ma, X., Li, D. Di, Sun, X. M., Guo, Y. Q., Xiang, J. Y., Wang, W. H., Zhang, L. X., Gu, Q. J., y Duan, Z. J. (2015). Binding patterns of rotavirus genotypes P[4], P[6], and P[8] in China with histo-blood group antigens. *PLoS One*, 10(8), 1-10.
- Madhi, S. A., Cunliffe, N. A., Steele, D., Witte, D., Kirsten, M., Louw, C., Ngwira, B., Victor, J. C., Gillard, P. H., Chevart, B. B., Han, H. H., y Neuzil, K. M. (2010). Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 289-298.
- Maestri, R. P., Kaiano, J. H. L., Neri, D. L., Soares, L. da S., Guerra, S. de F. D. S., Oliveira, D. de S., Farias, Y. N., Gabbay, Y. B., Leite, J. P. G., Linhares, A. da C., y Mascarenhas, J. D. P. (2012). Phylogenetic analysis of probable non-human genes of group A rotaviruses isolated from children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil. *Journal of Medical Virology*, 84(12), 1993-2002.
- Mak, K. H., Cheng, S., y Yuen, C. (1994). Survey of blood group distribution among Chinese blood donors in Hong Kong. *Vox Sanguinis*, 67, 50.
- Malherbe, H., y Harwin, R. (1963). The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *South African Medical Journal*, 37, 407-11.
- Marinosci, A., Doit, C., Koehl, B., Belhacel, K., Mariani Kurkdjian, P., Melki, I., Renaud, A., Lemaitre, C., Ammar Khodja, N., Blachier, A., Bonacorsi, S., Faye, A., y Lorrot, M. (2016). Gastro-entérites nosocomiales à rotavirus: étude rétrospective dans un service de pédiatrie générale. *Archives de Pédiatrie*, 23(11), 1118-1123.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., y Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 246-255.
- Martí, I., Cilla, G., Gomáriz, M., Eizaguirre, J., García-Pardos, C., y Pérez-Yarza, E. G. (2010). Rotavirus y crisis convulsivas. Una asociación poco frecuente aunque bien definida. *Anales de Pediatría*, 73(2), 70-73.
- Martinón-Torres, F., Aramburo, A., Martinón-Torres, N., Cebey, M., Seoane-Pillado, M. T., Redondo-Collazo, L., y Martinón-Sánchez, J. M. (2013). A reverse evidence of rotavirus vaccines impact. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(6), 1289-1291.
- Matsui, S. M., Offit, P. A., Vo, P. T., Mackow, E. R., Benfield, D. A., Shaw, R. D., Padilla-Noriega, L., y Greenberg, H. B. (1989). Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(4), 780-2.
- Matthews, R. E. (1979). The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague, September 1978. *Intervirology*, 11(3), 133-135.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S. M., Palombo, E. A., Iturriza-Gómara, M., Maes, P., Patton, J. T., Rahman, M., y Van Ranst, M. (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. *Journal of Virology*, 82(7), 3204-19.

- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P. C., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U., y Van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of Virology*, 156(8), 1397-1413.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P. C., Nakagomi, O., Patton, J. T., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U., y Van Ranst, M. (2008). Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of Virology*, 153(8), 1621-1629.
- Matthijnssens, J., Mino, S., Papp, H., Potgieter, C., Novo, L., Heylen, E., Zeller, M., Garaicoechea, L., Badaracco, A., Lengyel, G., Kisfali, P., Cullinane, A., Collins, P. J., Ciarlet, M., O'Shea, H., Parreno, V., Banyai, K., Barrandeguy, M., y Van Ranst, M. (2012). Complete molecular genome analyses of equine rotavirus A strains from different continents reveal several novel genotypes and a largely conserved genotype constellation. *Journal of General Virology*, 93(Pt\_4), 866-875.
- Matthijnssens, J., Potgieter, C. A., Ciarlet, M., Parreno, V., Martella, V., Banyai, K., Garaicoechea, L., Palombo, E. A., Novo, L., Zeller, M., Arista, S., Gerna, G., Rahman, M., y Van Ranst, M. (2009). Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order

## BIBLIOGRAFÍA

---

- artiodactyla?. *Journal of Virology*, 83(7), 2917-2929.
- Matthijnssens, J., y Van Ranst, M. (2012). Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current Opinion in Virology*, 2(4), 426-433.
- McDonald, S. M., Matthijnssens, J., McAllen, J. K., Hine, E., Overton, L., Wang, S., Lemey, P., Zeller, M., Van Ranst, M., Spiro, D. J., y Patton, J. T. (2009). Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000634.
- McDonald, S. M., y Patton, J. T. (2011). Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends in Microbiology*, 19(3), 136-144.
- McNulty, M. S., Curran, W. L., y McFerran, J. B. (1976). The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells. *The Journal of General Virology*, 33(3), 503-8.
- Mebus, C. A., Underdahl, N. R., Rhodes, M. B., y Twiehaus, M. J. (1969). Further studies on neonatal calf diarrhea virus. *Proceedings. Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, 73, 97-9.
- Mebus, C. A., Wyatt, R. G., Sharpee, R. L., Sereno, M. M., Kalica, A. R., Kapikian, A. Z., y Twiehaus, M. J. (1976). Diarrhea in gnotobiotic calves caused by the reovirus-like agent of human infantile gastroenteritis. *Infection and Immunity*, 14(2), 471-4.
- Mihalov-Kovács, E., Gellért, Á., Marton, S., Farkas, S. L., Fehér, E., Oldal, M., Jakab, F., Martella, V., y Bányai, K. (2015). Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerging Infectious Diseases*, 21(4), 660-663.

- Mohanty, E., Dwivedi, B., Kar, S. K., y Pandey, R. M. (2016). Association of rotavirus gastroenteritis with histo-blood group antigens. *Indian Pediatrics*, 53(7), 653-4.
- Mollicone, R., Cailleau, A., y Oriol, R. (1995). Molecular genetics of H, Se, Lewis and other fucosyltransferase genes. *Transfusion Clinique et Biologique: Journal de La Société Française de Transfusion Sanguine*, 2(4), 235-42.
- Molthan, L. (1980). Lewis phenotypes of American Caucasians, American Negroes and their children. *Vox Sanguinis*, 39(6), 327-330.
- Monedero, V., Buesa, J., y Rodríguez-Díaz, J. (2018). The interactions between host glycobiology, bacterial microbiota, and viruses in the gut. *Viruses*, 10(2), 96.
- Morgan, W. T., y Watkins, W. M. (1959). Some aspects of the biochemistry of the human blood-group substances. *British Medical Bulletin*, 15(2), 109-13.
- Mori, Y., Borgan, M. A., Ito, N., Sugiyama, M., y Minamoto, N. (2002). Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from Group A avian rotaviruses. *Virus Research*, 89(1), 145-151.
- Mourant, A. E. (1946). A new human blood group antigen of frequent occurrence. *Nature*, 158, 237.
- Mourant, A. E., Kopec, A. C., y Domaniewska, K. (1976). *The distribution of human blood groups and other polymorphisms*. London: Oxford University Press.
- Mullick, S., Mukherjee, A., Ghosh, S., Pazhani, G. P., Sur, D., Manna, B., Nataro, J. P., Levine, M. M., Ramamurthy, T., y Chawla-Sarkar, M. (2013). Genomic analysis of human rotavirus strains G6P[14] and

## BIBLIOGRAFÍA

---

- G11P[25] isolated from Kolkata in 2009 reveals interspecies transmission and complex reassortment events. *Infection, Genetics and Evolution*, 14, 15-21.
- Mwenda, J. M., Parashar, U. D., Cohen, A. L., y Tate, J. E. (2018). Impact of rotavirus vaccines in Sub-Saharan African countries. *Vaccine*, 36(47), 7119-7123.
- Navarro, A., Trask, S. D., y Patton, J. T. (2013). Generation of genetically stable recombinant rotaviruses containing novel genome rearrangements and heterologous sequences by reverse genetics. *Journal of Virology*, 87(11), 6211-20.
- Nelson, E. A. S., Ko, W. K., Kwan, E., Leung, S. F., Poon, K. H., Chow, C. B., Sin, W. K., Wong, Y. K., y Yeung, C. Y. (2003). Clinical guideline: guidelines for the management of acute diarrhoea in young children. *Hong Kong. Journal of Paediatrics (new series)*, 203-236.
- Newman, R. D., Grupp-Phelan, J., Shay, D. K., y Davis, R. L. (1999). Perinatal risk factors for infant hospitalization with viral gastroenteritis. *Pediatrics*, 103(1), E3.
- Nordgren, J., Nitiema, L. W., Ouermi, D., Simpre, J., y Svensson, L. (2013). Host genetic factors affect susceptibility to norovirus infections in Burkina Faso. *PLoS One*, 8(7), e69557.
- Nordgren, J., Sharma, S., Bucardo, F., Nasir, W., Günaydin, G., Ouermi, D., Nitiema, L. W., Becker-Dreps, S., Simpre, J., Hammarström, L., Larson, G., y Svensson, L. (2014). Both lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clinical Infectious Diseases*, 59(11), 1567-1573.

- Offit, P. A., Shaw, R. D., y Greenberg, H. B. (1986). Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *Journal of Virology*, 58(2), 700-3.
- Ogden, K. M., Tan, Y., Akopov, A., Stewart, L. S., McHenry, R., Fannesbeck, C. J., Piya, B., Carter, M. H., Fedorova, N. B., Halpin, R. A., Shilts, M. H., Edwards, K. M., Payne, D. C., Esona, M. D., Mijatovic-Rustempasic, S., Chappell, J. D., Patton, J. T., Halasa, N. B., y Das, S. R. (2018). Multiple introductions and antigenic mismatch with vaccines may contribute to increased predominance of G12P[8] rotaviruses in the United States. *Journal of Virology*, 93(1).
- Oriol, R., Danilovs, J., y Hawkins, B. R. (1981). A new genetic model proposing that the Se gene is a structural gene closely linked to the H gene. *American Journal of Human Genetics*, 33(3), 421-31.
- Orntoft, T. F., y Bech, E. (1995). Circulating blood group related carbohydrate antigens as tumour markers. *Glycoconjugate Journal*, 12(3), 200-205.
- Orrico-Sanchez, A., López-Lacort, M., Pérez-Vilar, S., y Díez-Domingo, J. (2017). Long-term impact of self-financed rotavirus vaccines on rotavirus-associated hospitalizations and costs in the Valencia Region, Spain. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 267.
- Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A., y Glass, R. I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*, 9(5), 565-572.
- Parashar, U. D., Nelson, E. A. S., y Kang, G. (2013). Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *British Medical Journal*, 347(dec30 1), f7204-f7204.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Park, S.-I., Matthijssens, J., Saif, L. J., Kim, H.-J., Park, J.-G., Alfajaro, M. M., Kim, D.-S., Son, K.-Y., Yang, D.-K., Hyun, B.-H., Kang, M.-I., y Cho, K.-O. (2011). Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in South Korea. *Veterinary Microbiology*, 152(1-2), 55-66.
- Patel, M. M., Glass, R. I., Desai, R., Tate, J. E., y Parashar, U. D. (2012). Fulfilling the promise of rotavirus vaccines: how far have we come since licensure?. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(7), 561-570.
- Patel, M. M., López-Collada, V. R., Bulhões, M. M., De Oliveira, L. H., Márquez, A. B., Flannery, B., Esparza-Aguilar, M., Montenegro Renoiner, E. I., Luna-Cruz, M. E., Sato, H. K., Hernández-Hernández, L. del C., Toledo-Cortina, G., Cerón-Rodríguez, M., Osnaya-Romero, N., Martínez-Alcazar, M., Aguinaga-Villasenor, R. G., Plascencia-Hernández, A., Fojaco-González, F., Hernández-Peredo Rezk, G., Gutierrez-Ramírez, S. F., Dorame-Castillo, R., Tinajero-Pizano, R., Mercado-Villegas, B., Barbosa, M. R., Maluf, E. M., Cesário Ferreira, Lucimar. Bozza de Carvalho, F. M., dos Santos, A. R., Dolabella, C. E., de Oliveira, M. E. P., Osterno Silva, C. L., Cortes, M. de los A., Ruiz Matus, C., Tate, J., Gargiullo, P., y Parashar, U. D. (2011). Intussusception risk and health benefits of rotavirus vaccination in Mexico and Brazil. *New England Journal of Medicine*, 364(24), 2283-2292.
- Patel, M. M., Pitzer, V. E., Alonso, W. J., Vera, D., Lopman, B., Tate, J., Viboud, C., y Parashar, U. D. (2013). Global seasonality of rotavirus disease. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(4), e134-e147.
- Patel, M. M., Steele, A. D., y Parashar, U. D. (2012). Influence of oral polio vaccines on performance of the monovalent and pentavalent rotavirus vaccines. *Vaccine*, 30, A30-A35.

- Patel, N. C., Hertel, P. M., Estes, M. K., de la Morena, M., Petru, A. M., Noroski, L. M., Revell, P. A., Hanson, I. C., Paul, M. E., Rosenblatt, H. M., y Abramson, S. L. (2010). Vaccine-acquired rotavirus in infants with severe combined immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 314-319.
- Patton, J. T. (2012). Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discovery Medicine*, 13(68), 85-97.
- Payne, D. C., Currier, R. L., Staat, M. A., Sahni, L. C., Selvarangan, R., Halasa, N. B., Englund, J. A., Weinberg, G. A., Boom, J. A., Szilagyi, P. G., Klein, E. J., Chappell, J., Harrison, C. J., Davidson, B. S., Mijatovic-Rustempasic, S., Moffatt, M. D., McNeal, M., Wiksw, M., Bowen, M. D., Morrow, A. L., y Parashar, U. D. (2015). Epidemiologic association between FUT2 secretor status and severe rotavirus gastroenteritis in children in the United States. *JAMA Pediatrics*, 169(11), 1040.
- Payne, D. C., Vinjé, J., Szilagyi, P. G., Edwards, K. M., Staat, M. A., Weinberg, G. A., Hall, C. B., Chappell, J., Bernstein, D. I., Curns, A. T., Wiksw, M., Shirley, S. H., Hall, A. J., Lopman, B., y Parashar, U. D. (2013). Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *New England Journal of Medicine*, 368(12), 1121-1130.
- Pérez-Ortín, R., Vila-Vicent, S., Carmona-Vicente, N., Santiso-Bellón, C., Rodríguez-Díaz, J., y Buesa, J. (2019). Histo-blood group antigens in children with symptomatic rotavirus infection. *Viruses*, 11(4), 339.
- Pérez-Vargas, J., Romero, P., López, S., y Arias, C. F. (2006). The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *Journal of Virology*, 80(7), 3322-31.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Pérez-Vilar, S., Díez-Domingo, J., López-Lacort, M., Martínez-Úbeda, S., y Martínez-Beneito, M. A. (2015). Effectiveness of rotavirus vaccines, licensed but not funded, against rotavirus hospitalizations in the Valencia Region, Spain. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 92.
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K., y Prasad, B. V. V. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 309, 189-219.
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Roberts, E., Estes, M. K., y Prasad, B. V. V. (2005). pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization. *Journal of Virology*, 79(13), 8572-8580.
- Pindyck, T., Tate, J. E., y Parashar, U. D. (2018). A decade of experience with rotavirus vaccination in the United States – vaccine uptake, effectiveness, and impact. *Expert Review of Vaccines*, 17(7), 593-606.
- Race, R. R., y Sanger, R. (1975). *Blood groups in man*. (6th ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Ramani, S., Cortes-Penfield, N. W., Hu, L., Crawford, S. E., Czako, R., Smith, D. F., Kang, G., Ramig, R. F., Le Pendu, J., Prasad, B. V. V., y Estes, M. K. (2013). The VP8\* domain of neonatal rotavirus strain G10P[11] binds to type II precursor glycans. *Journal of Virology*, 87(13), 7255-7264.
- Ramani, S., Hu, L., Venkataram Prasad, B. V. V., y Estes, M. K. (2016). Diversity in Rotavirus–Host Glycan Interactions: A “Sweet” Spectrum. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(3), 263-273.

- Ramia, S., y Sattar, S. A. (1980). Rotavirus concentration from cell culture harvests: trypsin treatment followed by hydroextraction. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(6), 1133-5.
- Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology*, 78(19), 10213-10220.
- Ramig, R. F. (2007). Systemic rotavirus infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 5(4), 591-612.
- Rha, B., Tate, J. E., Payne, D. C., Cortese, M. M., Lopman, B. A., Curns, A. T., y Parashar, U. D. (2014). Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in the United States, 2006 – 2012. *Expert Review of Vaccines*, 13(3), 365-376.
- Riepenhoff-Talty, M., Dharakul, T., Kowalski, E., Michalak, S., y Ogra, P. L. (1987). Persistent rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency. *Journal of Virology*, 61(10), 3345-8.
- Rodríguez-Limas, W. A., Pastor, A. R., Esquivel-Soto, E., Esquivel-Guadarrama, F., Ramírez, O. T., y Palomares, L. A. (2014). Immunogenicity and protective efficacy of yeast extracts containing rotavirus-like particles: a potential veterinary vaccine. *Vaccine*, 32(24), 2794-2798.
- Rodríguez, J. M., y Luque, D. (2019). Structural insights into rotavirus entry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1140, 45-68.
- Rodríguez, M., Wood, C., Sanchez-López, R., Castro-Acosta, R. M., Ramírez, O. T., y Palomares, L. A. (2014). Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine. *Archives of Virology*, 159(5), 1005-1015.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Rossignol, J.-F., y El-Gohary, Y. M. (2006). Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 24(10), 1423-1430.
- Ruiz-Palacios, G. M., Pérez-Schael, I., Velázquez, F. R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S. C., Cheuvart, B. B., Espinoza, F., Gillard, P., O’Ryan, M. (2006). Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 354(1), 11-22.
- Salmon, C., y Malassenet, R. (1953). Considerations on the anti-Lewis antibodies and percentage of the different Lewis phenotypes in blood donors of Paris. *Revue d’Hematologie*, 8(2), 183-188.
- Sanders, R. C. (1985). Molecular epidemiology of human rotavirus infections. *European Journal of Epidemiology*, 1(1), 19-32.
- Santos, N., y Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology*, 15(1), 29-56.
- Santosham, M., Moulton, L. H., Reid, R., Croll, J., Weatherholt, R., Ward, R., Forro, J., Zito, E., Mack, M., Brennenan, G., y Davidson, B. L. (1997). Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in Native American populations. *The Journal of Pediatrics*, 131(4), 632-8.

- Serpa, J., Mendes, N., Reis, C. A., Santos Silva, L. F., Almeida, R., Le Pendu, J., y David, L. (2004). Two new FUT2 (fucosyltransferase 2 gene) missense polymorphisms, 739G→A and 839T→C, are partly responsible for non-secretor status in a Caucasian population from Northern Portugal. *Biochemical Journal*, 383(3), 469-474.
- Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N., y Harrison, S. C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *The EMBO Journal*, 30(2), 408-416.
- Shim, J. O., Son, D. W., Shim, S.-Y., Ryoo, E., Kim, W., y Jung, Y.-C. (2012). Clinical characteristics and genotypes of rotaviruses in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics & Neonatology*, 53(1), 18-23.
- Shui, I. M., Baggs, J., Patel, M. M., Parashar, U. D., Rett, M., Belongia, E. A., Hambidge, S. J., Glanz, J. M., Klein, N. P., y Weintraub, E. (2012). Risk of intussusception following administration of a pentavalent rotavirus vaccine in US infants. *JAMA*, 307(6), 598-604.
- Smith, E. M., y Gerba, C. P. (1982). Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), 1440-50.
- Sneath, J. S., y Sneath, P. H. (1955). Transformation of the Lewis groups of human red cells. *Nature*, 176(4473), 172.
- Soejima, M., Munkhtulga, L., Iwamoto, S., y Koda, Y. (2009). Genetic variation of FUT3 in Ghanaians, Caucasians, and Mongolians. *Transfusion*, 49(5), 959-966.
- Steele, A. D., Neuzil, K. M., Cunliffe, N. A., Madhi, S. A., Bos, P., Ngwira, B., Witte, D., Todd, S., Louw, C., Kirsten, M., Aspinall, S., Van Doorn, L. J., Bouckenoghe, A., Suryakiran, P. V., y Han, H. H. (2012). Human rotavirus vaccine Rotarix™ provides protection against

## BIBLIOGRAFÍA

---

- diverse circulating rotavirus strains in African infants: a randomized controlled trial. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 213.
- Steyer, A., Poljsak-Prijatelj, M., Barlic-Maganja, D., y Marin, J. (2008). Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *Journal of General Virology*, 89(7), 1690-1698.
- Sun, X., Wang, L., Qi, J., Li, D., Wang, M., Cong, X., Peng, R., Chai, W., Zhang, Q., Wang, H., Wen, H., Gao, G. F., Tan, M., y Duan, Z. (2018). Human group C rotavirus VP8\* recognize type a histo-blood group antigens as ligands. *Journal of Virology*, 92(11), e00442-18.
- Szajewska, H., Ruszczyński, M., Chmielewska, A., y Wiecek, J. (2007). Systematic review: racecadotril in the treatment of acute diarrhoea in children. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26(6), 807-13.
- Tan, J. A., y Schnagl, R. D. (1983, junio). Rotavirus inactivated by a hypochlorite-based disinfectant: a reappraisal. *The Medical Journal of Australia*. Australia.
- Tan, M., y Jiang, X. (2014). Histo-blood group antigens: a common niche for norovirus and rotavirus. *Expert Review in Molecular Medicine*, 16(March), e5.
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., y Parashar, U. D. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(2), 136-141.

- Taylor, J. A., O'Brien, J. A., y Yeager, M. (1996). The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *The EMBO Journal*, 15(17), 4469-76.
- Téllez Castillo, C. J., Montava Vilaplana, R., Fernández Jiménez, M., Ribes Fernández, J. M., y Buesa, J. (2010). Predominio del genotipo G9 de rotavirus en Valencia y Castellón entre 2005 y 2007. *Anales de Pediatría*, 72(1), 49-54.
- Teran, C. G., Teran-Escalera, C. N., y Villarroel, P. (2009). Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(4), 518-523.
- Thomas, E. E., Puterman, M. L., Kawano, E., y Curran, M. (1988). Evaluation of seven immunoassays for detection of rotavirus in pediatric stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(6), 1189-93.
- Tills, D., Kopec, A. C., y Tills, R. E. (1983). *The distribution of human blood groups and other polymorphisms (Suppl. 1)*. Oxford: Oxford University Press.
- Todd, S., Page, N. A., Duncan Steele, A., Peenze, I., y Cunliffe, N. A. (2010). Rotavirus strain types circulating in Africa: review of studies published during 1997–2006. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(S1), S34-S42.
- Tokuhara, D., Alvarez, B., Mejima, M., Hiroiwa, T., Takahashi, Y., Kurokawa, S., Kuroda, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nochi, T., Sagara, H., Aladin, F., Marcotte, H., Frenken, L. G. J., Iturriza-Gómara, M., Kiyono, H., Hammarström, L., y Yuki, Y. (2013). Rice-

## BIBLIOGRAFÍA

---

- based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3829-3838.
- Trang, N. V., Vu, H. T., Le, N. T., Huang, P., Jiang, X., y Anh, D. D. (2014). Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in Vietnamese children. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1366-1374.
- Troeger, C., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Blacker, B. F., Ahmed, T., Armah, G., Bines, J. E., Brewer, T. G., Colombara, D. V., Kang, G., Kirkpatrick, B. D., Kirkwood, C. D., Mwenda, J. M., Parashar, U. D., Petri, W. A., Riddle, M. S., Steele, A. D., Thompson, R. L., Walson, J. L., Sanders, J. W., Mokdad, A. H., Murray, C. J. L., Hay, S. I., y Reiner, R. C. (2018). Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years. *JAMA Pediatrics*, 172(10), 958-965.
- Urasawa, T., Urasawa, S., y Taniguchi, K. (1981). Sequential passages of human rotavirus in MA-104 cells. *Microbiology and Immunology*, 25(10), 1025-35.
- Vega, C. G., Bok, M., Saif, L., Fernandez, F., y Parreño, V. (2015). Egg yolk IgY antibodies: a therapeutic intervention against group A rotavirus in calves. *Research in Veterinary Science*, 103, 1-10.
- Vega, C. G., Bok, M., Vlasova, A. N., Chattha, K. S., Gómez-Sebastián, S., Nuñez, C., Alvarado, C., Lasa, R., Escribano, J. M., Garaicoechea, L. L., Fernandez, F., Bok, K., Wigdorovitz, A., Saif, L. J., y Parreño, V. (2013). Recombinant monovalent llama-derived antibody fragments (VHH) to rotavirus VP6 protect neonatal gnotobiotic piglets against human rotavirus-induced diarrhea. *PLoS Pathogens*, 9(5), e1003334.

- Velázquez, F. R. (2009). Protective effects of natural rotavirus infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 28(Supplement), S54-S56.
- Velázquez, F. R., Matson, D. O., Calva, J. J., Guerrero, M. L., Morrow, A. L., Carter-Campbell, S., Glass, R. I., Estes, M. K., Pickering, L. K., y Ruiz-Palacios, G. M. (1996). Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *New England Journal of Medicine*, 335(14), 1022-1028.
- Vesikari, T. (1996). Trials of oral bovine and rhesus rotavirus vaccines in Finland: a historical account and present status. *Archives of Virology. Supplementum*, 12, 177-86.
- Vesikari, T. (2012). Rotavirus vaccination: a concise review. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 57-63.
- Vesikari, T., Kapikian, A. Z., Delem, A., y Zissis, G. (1986). A comparative trial of rhesus monkey (RRV-1) and bovine (RIT 4237) oral rotavirus vaccines in young children. *The Journal of Infectious Diseases*, 153(5), 832-839.
- Vesikari, T., Matson, D. O., Dennehy, P., Van Damme, P., Santosham, M., Rodriguez, Z., Dallas, M. J., Heyse, J. F., Goveia, M. G., Black, S. B., Shinefield, H. R., Christie, C. D. C. C., Ylitalo, S., Itzler, R. F., Coia, M. L., Onorato, M. T., Adeyi, B. A., Marshall, G. S., Gothefors, L., Campens, D., Karvonen, A., Watt, J. P., O'Brien, K. L., DiNubile, M. J., Clark, H. F., Boslego, J. W., Offit, P. A., y Heaton, P. M. (2006). Safety and Efficacy of a Pentavalent Human–Bovine (WC3) Reassortant Rotavirus Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 354(1), 23-33.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Vesikari, T., Prymula, R., Schuster, V., Tejedor, J.-C., Cohen, R., Bouckennooghe, A., Damaso, S., y Han, H. H. (2012). Efficacy and immunogenicity of live-attenuated human rotavirus vaccine in breast-fed and formula-fed European infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(5), 509-513.
- Victoria, J. G., Wang, C., Jones, M. S., Jaing, C., McLoughlin, K., Gardner, S., y Delwart, E. L. (2010). Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *Journal of Virology*, 84(12), 6033-6040.
- von Decastello, A., y Stürli, A. (1902). Über die isoagglutininie im serum gesunder und kranker menschen. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 26, 1090-95.
- von Dungern, E., y Hirschfeld, L. (1910). Ueber vererbung gruppenspezifischer strukturen des blutes. *Zeitschrift für Immunitätsforschung*, 6, 284-92.
- Waggie, Z., Hawkridge, A., y Hussey, G. D. (2010). Review of rotavirus studies in Africa: 1976–2006. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(S1), S23-S33.
- Wang, Y., Azevedo, M. P., Saif, L. J., Gentsch, J. R., Glass, R. I., y Jiang, B. (2010). Inactivated rotavirus vaccine induces protective immunity in gnotobiotic piglets. *Vaccine*, 28(33), 5432-5436.
- Ward, R. L., Bernstein, D. I., Young, E. C., Sherwood, J. R., Knowlton, D. R., y Schiff, G. M. (1986). Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 154(5), 871-80.

- Ward, R. L., Knowlton, D. R., y Pierce, M. J. (1984). Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 19(6), 748-53.
- Watkins, W. M. (1980). Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Advances in Human Genetics*, 10, 1-136, 379-85.
- Watkins, W. M., y Morgan, W. T. (1957). Specific inhibition studies relating to the Lewis blood-group system. *Nature*, 180(4594), 1038-40.
- Weaver, K. F., Morales, V., Dunn, S. L., Godde, K., y Weaver, P. F. (2017). *An introduction to statistical analysis in research: with applications in the biological and life sciences*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Weijer, C. (2000). The future of research into rotavirus vaccine. *British Medical Journal. Clinical Research Edition*, 321(7260), 525-6.
- WHO. (2005). *The treatment of diarrhoea. A manual for physicians and other senior health workers*.
- WHO. (2010). Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, October 2009: Conclusions and recommendations. *Biologicals*, 38(1), 170-177.
- WHO. (2013). Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013 – Recommendations. *Vaccine*, 31(52), 6170-6171.
- Woode, G. N., Bridger, J. C., Jones, J. M., Flewett, T. H., Davies, H. A., Davis, H. A., y White, G. B. (1976). Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice, and foals. *Infection and Immunity*, 14(3), 804-10.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Wyatt, R. G., James, H. D., Pittman, A. L., Hoshino, Y., Greenberg, H. B., Kalica, A. R., Flores, J., y Kapikian, A. Z. (1983). Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 18(2), 310-7.
- Yazgan, H., Keleş, E., Gebeşçe, A., Demirdöven, M., y Yazgan, Z. (2013). Blood groups and rotavirus gastroenteritis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(6), 705-706.
- Yeager, M., Dryden, K. A., Olson, N. H., Greenberg, H. B., y Baker, T. S. (1990). Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *The Journal of Cell Biology*, 110(6), 2133-44.
- Yen, C., Tate, J. E., Hyde, T. B., Cortese, M. M., Lopman, B. A., Jiang, B., Glass, R. I., y Parashar, U. D. (2014). Rotavirus vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(6), 1436-1448.
- Yu, Y., Lasanajak, Y., Song, X., Hu, L., Ramani, S., Mickum, M. L., Ashline, D. J., Prasad, B. V. V., Estes, M. K., Reinhold, V. N., Cummings, R. D., y Smith, D. F. (2014). Human milk contains novel glycans that are potential decoy receptors for neonatal rotaviruses. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(11), 2944-2960.
- Zade, J. K., Kulkarni, P. S., Desai, S. A., Sabale, R. N., Naik, S. P., y Dhere, R. M. (2014). Bovine rotavirus pentavalent vaccine development in India. *Vaccine*, 32, A124-A128.
- Zakhour, M., Ruvoën-Clouet, N., Charpilienne, A., Langpap, B., Poncet, D., Peters, T., Bovin, N., y Le Pendu, J. (2009). The  $\alpha$ Gal epitope of the histo-blood group antigen family is a ligand for bovine norovirus Newbury2 expected to prevent cross-species transmission. *PLoS Pathogens*, 5(7), e1000504.

- Zaman, K., Anh, D. D., Victor, J. C., Shin, S., Yunus, M., Dallas, M. J., Podder, G., Thiem, V. D., Mai, L. T. P., Luby, S. P., Tho, L. H., Coia, M. L., Lewis, K., Rivers, S. B., Sack, D. A., Schödel, F., Steele, A. D., Neuzil, K. M., y Ciarlet, M. (2010). Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 376(9741), 615-623.
- Zanardi, L. R., Haber, P., Mootrey, G. T., Niu, M. T., y Wharton, M. (2001). Intussusception among recipients of rotavirus vaccine: reports to the vaccine adverse event reporting system. *Pediatrics*, 107(6), E97.
- Zeller, M., Patton, J. T., Heylen, E., De Coster, S., Ciarlet, M., Van Ranst, M., y Matthijnsens, J. (2012). Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 966-76.
- Zhang, X.-F., Long, Y., Tan, M., Zhang, T., Huang, Q., Jiang, X., Tan, W.-F., Li, J.-D., Hu, G.-F., Tang, S., y Dai, Y.-C. (2016). P[8] and P[4] rotavirus infection associated with secretor phenotypes among children in south China. *Scientific Reports*, 6(1), 34591.
- Zlamy, M., Kofler, S., Orth, D., Würzner, R., Heinz-Erian, P., Streng, A., y Prelog, M. (2013). The impact of rotavirus mass vaccination on hospitalization rates, nosocomial rotavirus gastroenteritis and secondary blood stream infections. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 112.



**ANEXO**



## 8. ANEXO

ANEXO 1. Documento con los datos de edad, sexo, vacunación y HBGAs del grupo de pacientes.

Nº	AÑOS	MESES	Sexo (M/F)	Tipo Vacuna	VP4	VP7	ABO	Ag Lewis a	Ag Lewis b	Ag H Tipo 1 (FUT2)	Sese
1	1	9	M	ROTARIX	P8	G1	A	NEGATIVO	NEGATIVO	HETERO	Sese
2	1	0	M	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
3	1	4	M	NV	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
4	4	9	F	ROTATEQ	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
5	0	4	F	ROTATEQ	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
6	0	7	F	NV	P8	G9	B	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
7	0	10	M	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
8	3	2	M	ROTATEQ	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
9	0	9	F	NV	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
10	3	1	F	NV	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
11	0	1	F	NV	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
12	2	0	F	NV	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
13	1	1	M	NV	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
14	2	6	M	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
15	0	5	F	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
16	1	0	M	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
17	1	8	F	ROTATEQ	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
18	0	0	M	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
19	1	10	M	NV	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
20	0	6	F	NV	P8	G2	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
21	1	9	F	ROTATEQ	P8	G9	B	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
22	4	3	F	ROTATEQ	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
23	1	2	F	NV	P8	G9	B	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
24	2	1	M	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese

# ANEXO

Nº	AÑOS	MESES	Sexo (M/F)	Tipo Vacuna	VP4	VP7	ABO	Ag Lewis a	Ag Lewis b	Ag H Tipo 1 (FUT2)	Sese
25	0	4	M	ROTATEQ	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	SeSe
26	1	6	M	NV	P8	G12	AB	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
27	2	5	F	NV	P8	G12	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
28	5	10	F	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
29	0	6	F	NV	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
30	1	10	M	ROTATEQ	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
31	0	10	M	NV	P8	G9	B	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
32	1	4	M	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
33	2	2	M	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
34	1	6	F	ROTATEQ	P8	G12	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
35	2	10	F	ROTATEQ	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
36	0	9	F	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
37	1	0	M	NV	P8	G12	AB	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
38	0	11	M	NV	P8	G9	B	NEGATIVO	NEGATIVO	HOMO	SeSe
39	0	10	M	ROTATEQ	P8	G12	A	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
40	0	8	F	ROTATEQ	P8	G12	A	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
41	2	0	F	ROTATEQ	P8	G9	AB	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
42	1	6	F	ROTATEQ	P8	G4	A	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
43	1	7	M	NV	P8	G4	O	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
44	0	11	M	ROTATEQ	P8	G12	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
45	2	5	M	NV	P8	G3	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
46	1	10	F	NV	P8	G4	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
47	0	4	M	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
48	1	7	M	ROTATEQ	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese

N°	AÑOS	MESES	Sexo (M/F)	Tipo Vacuna	VP4	VP7	ABO	Ag Lewis a	Ag Lewis b	Ag H Tipo 1 (FUT2)
49	1	8	M	ROTATEQ	P8	G9	B	POSITIVO	POSITIVO	HETERO
50	1	5	F	NV	P8	G12	O	POSITIVO	POSITIVO	HOMO
51	1	7	F	ROTATEQ	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO
52	1	7	M	NV	P8	G1	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO
53	1	4	M	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO
54	1	4	M	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO
55	2	2	F	NV	P8	G12	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO
56	1	2	M	NV	P8	ND	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO
57	0	1	F	ROTATEQ	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO
58	1	8	M	NV	P8	G9	B	POSITIVO	POSITIVO	HETERO
59	1	5	F	NV	P8	ND	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO
60	0	6	M	NV	P8	G12	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO
61	1	10	M	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO
62	0	3	M	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO
63	10	5	F	NV	P8	G1	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO
64	0	6	M	ROTATEQ	P8	G1	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO
65	0	6	M	NV	P8	G9 + G12	A	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO
66	1	3	F	ROTATEQ	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO
67	0	10	M	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO
68	0	9	M	NV	P8	G12	A	NEGATIVO	NEGATIVO	HOMO
69	1	4	M	NV	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO
70	2	7	F	ROTATEQ	P8	G12	B	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO
71	4	1	M	NV	P8	G12	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO
72	1	2	F	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO

# ANEXO

N°	AÑOS	MESES	Sexo (M/F)	Tipo Vacuna	VP4	VP7	ABO	Ag Lewis a	Ag Lewis b	Ag H Tipo 1 (FUT2)
73	4	4	F	ROTARIX	P8	G12	O	POSITIVO	POSITIVO	HOMO SeSe
74	0	7	F	ROTATEQ	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO Sese
75	4	11	F	ROTARIX	P8	G9	A	NEGATIVO	NEGATIVO	HOMO SeSe
76	8	0	F	NV	P8	ND	A	POSITIVO	POSITIVO*	HETERO Sese
77	2	6	M	NV	P8	G1	A	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO SeSe
78	0	7	F	NV	P8	G9	AB	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO Sese
79	7	5	M	NV	P8	G1 + G3	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO SeSe
80	4	4	F	NV	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO Sese
81	1	5	F	ROTATEQ	P8	G3 + G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO SeSe
82	1	2	F	ROTATEQ	P8	G12	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO SeSe
83	3	1	M	ROTATEQ	P8	G12	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO Sese
84	7	11	F	NV	P4 + P8	G1	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO Sese
85	0	7	F	NV	P8	G12	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO Sese
86	0	7	F	NV	P8	G12	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO Sese
87	2	7	F	ROTATEQ	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO Sese
88	0	9	F	ROTATEQ	ND	G3 + G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO SeSe
89	1	0	F	NV	P4 + P8	G2	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO Sese
90	2	5	M	NV	P8	G9	AB	POSITIVO	POSITIVO	HETERO Sese
91	1	1	M	ROTARIX	P8	G1 + G9	O	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR sese
92	1	8	F	ROTATEQ	P8	G1	O	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR sese
93	1	8	M	ROTATEQ	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO Sese
94	1	7	M	ROTATEQ	P8	G1	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO SeSe
95	3	4	M	NV	P8	G1 + G3	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO Sese
96	1	2	F	NV	P8	G1	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO Sese

N°	AÑOS	MESES	Sexo (M/F)	Tipo Vacuna	VP4	VP7	ABO	Ag Lewis a	Ag Lewis b	Ag H Tipo 1 (FUT2)	Sese
97	0	4	M	NV	P8	G1	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
98	1	9	F	NV	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
99	0	5	F	NV	P8	G9	AB	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
100	1	9	M	NV	P8	G1	A	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
101	2	4	M	NV	P8	G1	AB	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
102	1	9	M	NV	P8	G1	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
103	0	2	F	ROTATEQ	P8	G9	AB	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
104	2	6	M	NV	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
105	2	1	F	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
106	2	6	M	NV	P8	G1 + G3	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
107	1	7	F	NV	P8	G9	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
108	6	5	M	NV	P8	G1	A	POSITIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
109	5	10	M	ROTARIX	P8	G1	A	NEGATIVO	NEGATIVO	HETERO	Sese
110	12	8	F	NV	P8	G1	A	NEGATIVO	NEGATIVO	HETERO	Sese
111	1	4	M	ROTATEQ	P8	G1 + G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
112	1	2	M	NV	P8	G1	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
113	2	6	F	NV	P8	G1	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
114	2	5	F	NV	P8	G1	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
115	1	9	M	NV	P8	G9	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
116	2	5	M	NV	P8	G1	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
117	10	0	F	NV	P8	G12	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
118	1	5	M	NV	P8	G1	O	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
119	7	1	M	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
120	1	1	M	NV	P8	G1 + G3	AB	NEGATIVO	NEGATIVO	HETERO	Sese

N°	AÑOS	MESES	Sexo (M/F)	Tipo Vacuna	VP4	VP7	ABO	Ag Lewis a	Ag Lewis b	Ag H Tipo 1 (FUT2)	Sese
121	1	0	M	NV	P8	G1	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
122	0	11	M	NV	P8	G1	B	NEGATIVO	NEGATIVO	HOMO	SeSe
123	0	3	M	ROTATEQ	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
124	2	8	M	ROTATEQ	P8	G1	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
125	3	6	F	NV	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
126	1	6	M	NV	P8	G4	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
127	2	9	F	NV	P8	G1	O	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
128	1	3	F	NV	P8	G1	B	NEGATIVO	POSITIVO	HOMO	SeSe
129	1	1	M	ROTARIX	P8	G4	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
130	0	0	M	NV	P8	G9	O	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
131	2	3	F	NV	P8	G1	A	POSITIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
132	0	5	F	ROTATEQ	P8	G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese
133	1	8	M	NV	P8	G1 + G9	A	NEGATIVO	POSITIVO	HETERO	Sese

M: Masculino. F: Femenino. NV: No vacunado. ND: No determinado

ANEXO 2. Documento con los datos de edad, sexo, vacunación y HBGAs del grupo de controles.

N°	AÑOS	MESES	Sexo (M/F)	TIPO VACUNA	AB0	Ag Lewis a	Ag Lewis b	Ag H Tipo 1 (FUT2)
1	13	0	M	NV	0	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
2	2	7	M	NV	A	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
3	1	2	M	ROTATEQ	B	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
4	1	8	M	ROTATEQ	A	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
5	0	7	M	NV	B	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
6	2	0	F	ROTATEQ	ND	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
7	0	7	M	ROTATEQ	0	NEGATIVO	NEGATIVO	SECRETOR
8	1	6	F	NV	A	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
9	2	0	F	ROTATEQ	A	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
10	0	6	F	ROTARIX	A	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
11	3	3	F	ROTATEQ	0	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
12	4	6	F	NV	0	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
13	1	9	M	NV	A	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
14	1	10	F	NV	A	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
15	2	11	M	ROTATEQ	A	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
16	1	4	M	ROTATEQ	0	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
17	0	1	F	NV	0	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
18	0	9	M	ROTATEQ	A	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
19	8	5	F	NV	B	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
20	1	9	M	ROTATEQ	A	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
21	1	3	F	NV	B	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
22	0	10	M	ROTATEQ	0	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
23	3	2	F	NV	ND	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
24	14	5	F	NV	ND	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
25	1	4	M	NV	0	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
26	4	10	F	ROTATEQ	AB	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR

N°	AÑOS	MESES	Sexo (M/F)	TIPO VACUNA	AB0	Ag Lewis a	Ag Lewis b	Ag H Tipo 1 (FUT2)
27	4	3	M	ROTATEQ	A	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
28	7	3	M	NV	0	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
29	2	9	M	ROTATEQ	A	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
30	3	1	F	NV	B	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
31	4	8	F	ROTATEQ	ND	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
32	11	9	F	NV	A	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
33	5	6	M	ROTATEQ	AB	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
34	3	2	M	ROTATEQ	0	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
35	0	6	M	ROTARIX	0	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
36	3	11	F	NV	ND	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
37	1	8	F	NV	ND	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
38	1	1	F	ROTATEQ	A	NEGATIVO	NEGATIVO	SECRETOR
39	1	0	M	ROTATEQ	ND	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
40	2	3	M	NV	0	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
41	1	8	M	ROTATEQ	0	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
42	5	3	M	ROTATEQ	A	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
43	7	6	F	NV	0	NEGATIVO	NEGATIVO	SECRETOR
44	1	0	M	NV	ND	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
45	6	11	M	NV	B	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
46	0	9	F	ROTATEQ	B	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
47	2	3	F	ROTATEQ	A	POSITIVO	POSITIVO	SECRETOR
48	2	9	F	ROTATEQ	0	NEGATIVO	POSITIVO	SECRETOR
49	0	6	F	ROTATEQ	A	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR
50	4	3	M	ROTATEQ	ND	POSITIVO	NEGATIVO	NO SECRETOR

M: Masculino. F: Femenino. NV: No vacunado. ND: No determinado

ANEXO 3. Documento con los datos de antígenos histo-sanguíneos del grupo de donantes de sangre.

<b>GRUPO ABO</b>	<b>DONANTES</b> (n= 283.399) (%)	
<b>O</b>	146.454	(51'68)
<b>A</b>	110.273	(38'91)
<b>B</b>	19.054	(6'72)
<b>AB</b>	7.618	(2'69)

<b>LEWIS (FUT3)</b>	<b>DONANTES</b> (n= 283.399) (%)	
<b>LEWIS POSITIVO</b>	252.309	89'03 %
<b>LEWIS NEGATIVO</b>	31.090	10'97 %

	<b>LEWIS B POSITIVO</b>	<b>(%)</b>	<b>LEWIS B NEGATIVO</b>	<b>(%)</b>	<b>TOTAL</b>	<b>(%)</b>
<b>LEWIS A POSITIVO</b>	486	(0'17)	57.694	(20'36)	58.180	(20'53)
<b>LEWIS A NEGATIVO</b>	194.129	(68'50)	31.090	(10'97)	225.219	(79'47)
<b>TOTAL</b>	194.615	(68'67)	88.784	(31'33)	283.399	(100)

