



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Gastroenteritis Aguda por Rotavirus en la
Población Infantil Atendida en el Hospital
Universitario Virgen de la Arrixaca**

D. Pedro Francisco Sánchez López

2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Manuel Segovia Hernández
, Catedrático de Universidad del Área de Microbiología Clínica en el
Departamento de Genética y Microbiología, y D^a Carme Salvador
García, Profesora asociada de Universidad del Área de Microbiología
Clínica en el Departamento de Genética y Microbiología

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Gastroenteritis
aguda por rotavirus en la población infantil atendida en el Hospital
Universitario Virgen de la Arrixaca", realizada por D. Pedro Francisco
Sánchez López, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que
presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de
Murcia.

En Murcia, a 26 de junio de 2017

D. Manuel Segovia Hernández

D^a Carme Salvador García

Mod:T-20

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 29/07/2013, acta 07/13 ha evaluado la propuesta del investigador **Pedro Francisco Sánchez López** referida al estudio:

Título: Gastroenteritis aguda por rotavirus en población infantil atendida en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE.**

Lo que firmo en Murcia, a 29 de julio de 2013

Fdo:



Servicio Murciano de Salud
Hospital "Virgen de la Arrixaca"
Comité Ético de Investigación Clínica
MURCIA

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi máximo agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral, al Dr. Manuel Segovia Hernández, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y Catedrático de Microbiología de la Universidad de Murcia, por haberme recibido en su laboratorio desde un ámbito profesional aparentemente distante, y haber confiado en el entusiasmo que le mostré; y a la Dra. Carme Salvador García, facultativo adjunto del Servicio de Microbiología y profesora asociada de la Universidad de Murcia, por su constante apoyo durante todos estos años.

También me siento profundamente agradecido a la Prof. Miren Iturriza-Gómara, del Institute of Infection and Global Health de la Universidad de Liverpool, por acogerme en su laboratorio para realizar las secuenciaciones masivas de algunas cepas de rotavirus interesantes y permitirme vivir una experiencia tan enriquecedora a su lado. Gracias también al Dr. Khuzwayo Jere, que con ese carácter tan afable me enseñó los secretos de la secuenciación masiva.

Gracias a la Dra. Elisa Gómez Campoy, Jefe del Servicio de Sanidad Ambiental de la Consejería de Salud, por su apoyo y su aliento continuos.

Gracias al Dr. Javier Buesa Gómez, médico adjunto del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia, por ese primer empujón en las técnicas de genotipado de los rotavirus.

Gracias a Pedro José Bernal González, del Servicio de Prevención y Protección de la Salud de la Consejería de Salud, por su ayuda con los datos de vacunación.

Gracias a los estadísticos de la Consejería de Salud, Mónica Ballesta Ruiz y Diego Salmerón Martínez, por su ayuda con el análisis estadístico de los datos.

Gracias también a todos los facultativos adjuntos y residentes, y al resto de personal del Servicio de Microbiología del Hospital, con los que he coincidido durante mi trabajo de laboratorio y que siempre me han ayudado.

Y en el ámbito personal, quiero dar las gracias a mi familia, que es el pilar que ha sustentado mi fortaleza; a mi pareja, que es el pilar que mantiene viva mi ilusión; y a mis amigos, que son quienes han mantenido a flote mi cordura.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
EIA	Enzimoimmunoanálisis
GEA	Gastroenteritis aguda
HUVA	Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
MMOH	Hidróxido de metilmercurio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPM	Revoluciones por minuto
TBE	Tris-borato-EDTA
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE GENERAL

I - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS DE ESTA TESIS.....	1
1. Antecedentes e identificación del problema.....	3
2. Motivación y fundamentos del estudio.....	3
3. Objetivo principal y objetivos específicos.....	4
4. Diseño del estudio.....	4
II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1. Breve reseña histórica.....	9
2. Filogenia del rotavirus.....	12
3. Estructura del virión	15
4. Genoma	18
5. Ciclo replicativo.....	21
6. Clasificación y nomenclatura de rotavirus	24
7. Evolución de rotavirus.....	28
8. Detección y caracterización de rotavirus.....	30
9. Patogénesis	35
10. Clínica del rotavirus.....	38
11. Epidemiología de la infección por rotavirus.....	39
12. Tratamiento y prevención.....	45
13. Vacunas	46
14. Microbioma y viroma	52
III- MATERIAL Y MÉTODOS	55
Población de estudio.....	57
Toma de muestras.....	57
Análisis estadístico	58
1. Incidencia de gastroenteritis por rotavirus entre 2010-2013.....	58
1.1. Recogida de información sobre fecha de recogida de la muestra, edad y sexo del paciente.....	58
1.2. Detección de antígeno de rotavirus A en heces mediante el test rápido VIKIA® Rota-Adeno (Biomerieux, Francia).....	59
1.2.1. Fundamento	59
1.2.2. Realización del ensayo	59
1.2.3. Controles de calidad.....	59

1.2.4.	Interpretación de resultados.....	60
2.	Características clínico-epidemiológicas de las gastroenteritis por rotavirus durante 2012	60
2.1.	Recogida de información clínico-epidemiológica de los casos de gastroenteritis positivos a antígeno de rotavirus A.....	60
2.1.1.	Origen de la infección.....	60
2.1.2.	Procedencia de las muestras en los casos comunitarios	60
2.1.3.	Tiempo en desarrollar una gastroenteritis por rotavirus de adquisición nosocomial	61
2.1.4.	Duración de la hospitalización y número de ingresos en urgencias	61
2.1.5.	Procedencia de los casos nosocomiales.....	61
2.1.6.	Motivo de la hospitalización en los casos nosocomiales	61
2.1.7.	Sintomatología de los casos comunitarios.....	61
2.1.8.	Severidad de las gastroenteritis en los casos comunitarios.....	62
2.2.	Estudio de genotipado de cepas de rotavirus.....	63
2.2.1.	Fundamento	63
2.2.2.	Extracción y purificación del ARN de las muestras de heces	66
2.2.3.	Reacción de transcripción inversa para síntesis de ADN copia y amplificación de la secuencia consenso VP7 ó VP4.....	67
2.2.4.	Segunda PCR para la amplificación de productos específicos de genotipo	68
2.2.5.	Visualización de los amplicones	71
2.2.6.	Controles de calidad.....	71
2.2.7.	Interpretación de resultados.....	71
3.	Estudio de gastroenteritis por rotavirus en niños vacunados	72
3.1.	Preparación de bibliotecas genómicas para secuenciación masiva.....	75
3.1.1.	Extracción del ARN de doble cadena de las muestras de heces	76
3.1.2.	Eliminación del ARN de cadena sencilla y de impurezas de proteínas	77
3.1.3.	Eliminación de impurezas de ADN	77
3.1.4.	Purificación del ARN de doble cadena usando el kit Qiagen MinElute Gel Extraction Kit	77
3.1.5.	Cuantificación del ARN de doble cadena con Qubit, utilizando el kit de alta sensibilidad (HS kit)	78
3.1.6.	Fragmentación del ARN purificado e hibridación del primer para síntesis de ADN copia	78
3.1.7.	Síntesis de ADN copia.....	79
3.1.8.	Síntesis de ADN copia etiquetado en 3'	79

3.1.9.	Purificación del ADN copia etiquetado en ambos extremos utilizando Qiagen MinElute PCR Purification Kit	80
3.1.10.	Amplificar las bibliotecas de ADN copia etiquetado en ambos extremos mediante PCR	80
3.1.11.	Purificación de la biblioteca RNA-Seq utilizando el sistema AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU),	80
3.1.12.	Cuantificación del producto de la PCR purificado utilizando Qubit-dsDNA BR kit 81	
3.1.13.	Evaluación de la distribución de tamaños de los ADN copia utilizando el 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU)	81
3.1.14.	Controles de calidad	82
3.2.	Secuenciación masiva	82
3.3.	Análisis y ensamblado de las lecturas	82
3.4.	Genotipado	83
3.5.	Identidad nucleotídica y aminoacídica y análisis filogenético	83
3.6.	Estudio de las diferencias aminoacídicas en los epítomos de la proteína VP4 de las cepas P369 y P370, con la proteína VP4 de la cepa WI79-4 de Rotateq®	83
IV.	RESULTADOS	85
1.	Incidencia de gastroenteritis por rotavirus entre 2010-2013	87
1.1.	Estacionalidad de las gastroenteritis por rotavirus	88
1.2.	Incidencia según edad	89
1.3.	Incidencia según sexo	90
2.	Características clínico-epidemiológicas de las gastroenteritis por rotavirus durante 2012 91	
2.1.	Estudio de la influencia del origen de la infección en la estacionalidad, la edad y el sexo de los casos	91
2.1.1.	Estacionalidad según origen de la infección	94
2.1.2.	Incidencia según edad y origen de la infección	95
2.1.3.	Incidencia según sexo y origen de la infección	96
2.2.	Estudio de genotipos en casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012	97
2.2.1.	Prevalencia de los distintos genotipos	97
2.2.2.	Estacionalidad de genotipos	100
2.2.3.	Relación del genotipo con la edad	103
2.2.4.	Relación del genotipo con los sexos	104
2.2.5.	Relación del genotipo con la procedencia	106
2.2.6.	Relación del genotipo con la sintomatología de los casos	107

2.2.7.	Relación de los genotipos con la hospitalización de los casos.....	113
2.2.8.	Severidad de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria, su estacionalidad y su relación con la edad, el sexo, la procedencia de la muestra y el genotipo	116
2.3.	Estudio de genotipos en casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial	122
2.3.1.	Prevalencia de los distintos genotipos.....	122
2.3.2.	Evolución de genotipos a lo largo del año	124
2.3.3.	Relación de los genotipos con la edad	126
2.3.4.	Relación de los genotipos con el sexo.....	127
2.3.5.	Relación de los genotipos con el diagnóstico motivo del ingreso	128
2.3.6.	Relación de los genotipos con la procedencia de las muestras	129
3.	Estudio de gastroenteritis por rotavirus en niños vacunados	130
3.1.	Características clínico-epidemiológicas de los casos de gastroenteritis por rotavirus A en niños previamente vacunados, desde 2010 a 2013.....	131
3.2.	Caracterización de una cepa que infectó en el hospital a dos niños previamente vacunados	133
3.2.1.	Antecedentes	133
3.2.2.	Constelación de genotipos	133
3.2.3.	Identidad de secuencias entre las cepas P369 y P370	136
3.2.4.	Análisis filogenético del gen VP7.....	136
3.2.5.	Análisis filogenético del gen VP4.....	138
3.2.6.	Análisis filogenético del gen VP6.....	140
3.2.7.	Análisis filogenético del gen VP1.....	142
3.2.8.	Análisis filogenético del gen VP2.....	144
3.2.9.	Análisis filogenético del gen VP3.....	146
3.2.10.	Análisis filogenético del gen NSP1	148
3.2.11.	Análisis filogenético del gen NSP2	150
3.2.12.	Análisis filogenético del gen NSP3	152
3.2.13.	Análisis filogenético del gen NSP4	154
3.2.14.	Análisis filogenético del gen NSP5	156
3.2.15.	Diferencias en la proteína VP4 de las cepas P369 y P370 con Rotateq®	158
V-	DISCUSIÓN	161
	Incidencia de gastroenteritis por rotavirus entre 2010-2013.....	163
	Características clínico-epidemiológicas de las gastroenteritis por rotavirus durante 2012.	166

Estudio de genotipos en casos de gastroenteritis por rotavirus de adquisición comunitaria en 2012..... 168

Estudio de genotipos en casos de gastroenteritis por rotavirus de adquisición nosocomial en 2012..... 173

Estudio de gastroenteritis por rotavirus en niños vacunados 176

VI- CONCLUSIONES..... 179

VII- BIBLIOGRAFÍA..... 183

FIGURAS

Fig. 1: Primera micrografía electrónica de rotavirus humanos dentro de una célula epitelial intestinal, procedente de una biopsia a un niño con gastroenteritis

Fig. 2: Géneros y especies de virus pertenecientes a la familia *Reoviridae*

Fig. 3: Comparación filogenética de las secuencias proteicas de las polimerasas víricas de la familia *Reoviridae*

Fig. 4: Corte de la estructura del virión del rotavirus determinada por reconstrucción de imagen tras criomicroscopía electrónica

Fig. 5: Epítopos de las proteínas VP7 y VP4 del rotavirus

Fig. 6: Electroforesis en gel de poliacrilamida de ARN de rotavirus, y proteínas codificadas por cada segmento

Fig. 7: Ciclo replicativo del rotavirus

Fig. 8: Microfotografía electrónica de rotavirus

Fig. 9: Test rápido inmuno-cromatográfico VIKIA® Rota-Adeno

Fig. 10: Gel de PAGE mostrando los diferentes patrones de migración de segmentos de ARN de los rotavirus A, B y C

Fig. 11: Mecanismo mediante los cuales los rotavirus causan diarrea

Fig. 12: Distribución mundial de la mortalidad infantil producida por rotavirus

Fig. 13: Número de muestras positivas a rotavirus por grupos de edad, analizadas por laboratorios de referencia de rotavirus de 16 países de la UE/EEA de 2006 a 2013, y notificadas a EuroRotaNet.

Fig. 14: Estimaciones acumuladas de eficacia frente a la enfermedad severa por rotavirus según el nivel de desarrollo del país para las vacunas de primera y segunda generación

Fig. 15: Descripción de un intestino delgado sano (izquierda) y uno con una invaginación intestinal (derecha)

Fig. 16: Esquema del proceso de genotipado mediante amplificación de productos de PCR específicos de genotipo

Fig. 17: Esquema de las posiciones de los primers específicos para VP7 (a) y VP4 (b) y el tamaño de los amplicones específicos de genotipo

Fig. 18: Esquema del proceso de secuenciación masiva con Illumina HiSeq 2500

Fig. 19: Esquema del proceso de preparación de bibliotecas genómicas a partir de ARN con ScriptSeq® v2 RNA-Seq Library Preparation Kit

Fig. 20: Perfiles representativos de las bibliotecas ScriptSeq® v2 RNA-Seq

Fig. 21: Relación entre el número total de muestras tomadas y la proporción de muestras positivas a rotavirus A, entre 2010 y 2013

Fig. 22: Número de muestras positivas a rotavirus A por meses, desde 2010 hasta 2013

Fig. 23: Proporción de muestras positivas a rotavirus A por edades, desde 2010 hasta 2013

Fig. 24: Proporción de muestras positivas a rotavirus A por sexos, desde 2010 hasta 2013

Fig. 25: Histograma de frecuencias del número de días que tardaron en desarrollar síntomas los niños que enfermaron de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial durante 2012, desde la fecha de su ingreso en el hospital

Fig. 26: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A durante 2012, tanto de adquisición comunitaria como de adquisición nosocomial

Fig. 27: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o nosocomial por edades (en meses) en 2012

Fig. 28: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o nosocomial por sexos en 2012

Fig. 29: Fotografía de un gel de agarosa tras electroforesis a 120V durante 90 minutos, de las muestras 102-119 de 2012

Fig. 30: Proporción de los distintos genotipos encontrados en las muestras analizadas en 2012

Fig. 31: Distribución temporal de los distintos genotipos identificados en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria a lo largo de 2012

Fig. 32: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria por genotipos y por edades (en meses) en 2012

Fig. 34: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria por genotipos y por procedencia en 2012

Fig. 35: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 que presentaron o no presentaron un determinado síntoma

Fig. 36: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria por genotipos con presencia o ausencia de vómitos en 2012

Fig. 37: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria por genotipos con presencia o ausencia de síntomas catarrales en 2012

Fig. 38: Histograma de frecuencias de la duración en días de la hospitalización de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012

Fig. 39: Histograma de frecuencias del número de ingresos en urgencias de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012.

Fig. 40: Proporción de las distintas severidades encontradas en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012

Fig. 41: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria con severidad moderada y leve, o severa en el primer trimestre, segundo trimestre, o segundo semestre de 2012

Fig. 42: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 con severidad severa, o moderada y leve, en función de la edad de los pacientes

Fig. 43: Distribución temporal de los distintos genotipos identificados en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial a lo largo de 2012

Fig. 44: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial por genotipos y por edades (en meses) en 2012

Fig. 45: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial por genotipos y por sexos en 2012

Fig. 46: Árbol filogenético del gen VP7

Fig. 47: Árbol filogenético del gen VP4

Fig. 48: Árbol filogenético del gen VP6

Fig. 49: Árbol filogenético del gen VP1

Fig. 50: Árbol filogenético del gen VP2

Fig. 51: Árbol filogenético del gen VP3

Fig. 52: Árbol filogenético del gen NSP1

Fig. 53: Árbol filogenético del gen NSP2

Fig. 54: Árbol filogenético del gen NSP3

Fig. 55: Árbol filogenético del gen NSP4

Fig. 56: Árbol filogenético del gen NSP5

TABLAS

Tabla 1: Características de los géneros de la familia *Reoviridae*

Tabla 2: Genoma del rotavirus (cepa bovina RF G6P6[1]) y proteínas codificadas

Tabla 3: Especies de rotavirus

Tabla 4: Valores umbrales de identidad que definen genotipos para los 11 segmentos genómicos de rotavirus

Tabla 5: Principales características de las infecciones por rotavirus en humanos

Tabla 6: Desarrollo de vacunas contra el rotavirus

Tabla 7: Número de niños menores de 5 años censados en el área I de salud del sistema sanitario asistencial de la Región de Murcia, desde 2010 hasta 2013

Tabla 8: Sistema de puntuación de la severidad de las gastroenteritis por rotavirus de Vesikari adaptada

Tabla 9: Clasificación de las gastroenteritis por rotavirus en función de la puntuación obtenida a partir de los parámetros de puntuación de Vesikari

Tabla 10: Master mix para la RT-PCR en un paso. Se detalla la cantidad en volumen de cada componente para cada tubo de reacción

Tabla 11: Primers utilizados para la amplificación de fragmentos consenso de los genes que codifican las proteínas VP7 y VP4 del rotavirus A

Tabla 12: Resumen de las condiciones para la transcripción inversa y la amplificación por PCR en un paso

Tabla 13: Primers utilizados para la amplificación de productos específicos de genotipo de los segmentos VP7 y VP4 del genoma del rotavirus A

Tabla 14: Master mix de la segunda PCR para la amplificación de productos específicos de genotipo G

Tabla 15: Master mix de la segunda PCR para la amplificación de productos específicos de genotipo P

Tabla 16: Tamaño en pares de bases de los amplicones generados en la segunda PCR específica de genotipo

Tabla 17: Modelos de sustitución y tasas entre sitios elegidos para la construcción de árboles filogenéticos de los distintos segmentos del genoma de las cepas P369 y P370 de rotavirus

Tabla 18: Número total de muestras tomadas, número de muestras positivas a rotavirus A y proporción de muestras positivas, desde 2010 hasta 2013

Tabla 19: Población de niños menores de 5 años en el área I de salud, muestras positivas a rotavirus A y tasa de incidencia de gastroenteritis por rotavirus A por cada 100 niños menores de 5 años en el área I de salud

Tabla 20: Número de muestras positivas a rotavirus A según grupo de edad, desde 2010 hasta 2013

Tabla 21: Número de casos según sexo, desde 2010 hasta 2013

Tabla 22: Número y proporción de muestras positivas según el origen de la infección (adquisición comunitaria, nosocomial o sin información del origen de la infección) en 2012

Tabla 23: Número y proporción de casos según la procedencia de las muestras en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial en 2012

Tabla 24: Número y proporción de casos según el diagnóstico principal de hospitalización en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial en 2012

Tabla 25: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o nosocomial por edades en 2012

Tabla 26: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o nosocomial por sexos en 2012

Tabla 27: Genotipos encontrados en los casos de adquisición comunitaria en 2012 y número de muestras identificadas en cada genotipo

Tabla 28: Número de muestras por genotipo identificado y grupo de edad en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012

Tabla 29: Número de muestras por genotipo identificado y sexo en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012

Tabla 30: Número de muestras por genotipo identificado y procedencia en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012

Tabla 31: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 que presentaron o no presentaron un determinado síntoma

Tabla 32: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de diarrea

Tabla 33: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de vómitos

Tabla 34: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de vómitos

Tabla 35: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de signos de deshidratación

Tabla 36: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de síntomas catarrales

Tabla 37: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de hiporexia

Tabla 38: Número de muestras procedentes de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 que fueron dados de alta al domicilio desde urgencias o hospitalizados, por genotipos

Tabla 39: Número de muestras procedentes de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 que fueron hospitalizados de 1-4 días o más de 4 días, por genotipos

Tabla 40: Modelos de regresión logística para el análisis de la severidad de las gastroenteritis por rotavirus A adquiridas en la comunidad

Tabla 41: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria con severidad severa, o moderada y leve, en el primer trimestre, segundo trimestre o segundo semestre de 2012

Tabla 42: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 con severidad severa, o moderada y leve, en función de la edad de los pacientes

Tabla 43: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 con severidad severa, o moderada y leve, en función del sexo de los pacientes

Tabla 44: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 con severidad severa, o moderada y leve, en función de la procedencia de las muestras

Tabla 45: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 con severidad severa, o moderada y leve, en función del genotipo identificado en las muestras

Tabla 46: Genotipos encontrados en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial durante 2012, y número de muestras identificadas en cada genotipo. GOP0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo

Tabla 47: Test de comparación de las proporciones de los distintos genotipos identificados en las muestras procedentes de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o nosocomial en 2012

Tabla 48: Número de muestras por genotipo identificado y grupo de edad en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial en 2012

Tabla 49: Número de muestras por genotipo identificado y sexo en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial en 2012

Tabla 50: Genotipos identificados según el diagnóstico motivo de ingreso de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial identificados en 2012

Tabla 51: Genotipos identificados según la procedencia de las muestras, en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial identificados en 2012

Tabla 52: Número de vacunas contra el rotavirus aplicadas en la Región de Murcia según marca comercial aplicada, y cobertura vacunal, desde 2010 hasta 2013

Tabla 53: Número de niños que recibieron al menos una dosis de vacuna anti-rotavirus, y que enfermaron por el rotavirus A entre 2010 y 2013

Tabla 54: Número de niños que recibieron al menos una dosis de vacuna anti-rotavirus, y que enfermaron por el rotavirus A entre 2010 y 2013, por grupos de edad

Tabla 55: Número de casos vacunados con alguna de las dos vacunas autorizadas, tanto de forma completa como con dosis incompletas

Tabla 56: Número de niños que recibieron al menos una dosis de vacuna anti-rotavirus, y que enfermaron por el rotavirus A entre 2010 y 2013, por genotipos identificados

Tabla 57: Constelaciones genotípicas de las cepas P369 y P370, y otras cepas de referencia

Tabla 58: Diferencias en nucleótidos y en aminoácidos codificados entre la cepa P369 y la cepa P370

Tabla 59: Diferencias en los aminoácidos que componen la proteína VP4 entre las cepas P369 y P370, y la cepa WI79-4 de Rotateq

I - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS DE ESTA TESIS

1. Antecedentes e identificación del problema.

Los rotavirus se identificaron por primera vez en 1973 en Australia en heces de niños con gastroenteritis (Bishop et al. 1973). Hoy en día sabemos que se trata de una infección vírica de carácter universal que afecta a todos los seres humanos en sus primeros años de vida. Aunque sólo un pequeño porcentaje de los niños infectados desarrollan síntomas lo suficientemente graves para requerir atención médica, cuando lo hacen implican cuadro de gastroenteritis aguda con deshidratación, que si no se trata con terapia de reconstitución hídrica puede acabar en la muerte del paciente. De esta manera sabemos que cada año se producen en el mundo cientos de miles de muertes de niños por gastroenteritis graves por rotavirus que ocurren principalmente en los países en vías de desarrollo, donde es menos probable que se apliquen las técnicas terapéuticas adecuadas.

En los países desarrollados como el nuestro, las gastroenteritis severas por rotavirus causan una carga en el sistema sanitario por hospitalizaciones y atenciones intensivas en los servicios de urgencias.

Desde 2000 existen en el mercado dos vacunas que confieren protección contra las gastroenteritis severas por rotavirus, y en los países donde se han incluido en el calendario vacunal han disminuido drásticamente los ingresos hospitalarios por esta causa, disminuyendo la carga económica que conllevan.

Los rotavirus infectan, además de a los seres humanos jóvenes a numerosas, si no a todas, las especies de mamíferos y aves en sus fases juveniles.

Existen virus dentro de la misma familia *Reoviridae*, que infectan a especies de seres vivos de los principales grupos de eucariotas, desde los protistas, pasando por los hongos y las plantas, hasta los animales, vertebrados e invertebrados.

2. Motivación y fundamentos del estudio.

En la Región de Murcia no existe ningún estudio que describa la epidemiología y las características de los rotavirus circulantes.

Se desconoce qué factores propios del agente infeccioso están presentes en nuestro medio, como por ejemplo qué genotipos circulan por la Región o su estacionalidad.

También desconocemos qué factores propios del hospedador tienen influencia en nuestro medio, así como su impacto en el sistema sanitario regional.

3. Objetivo principal y objetivos específicos.

El objetivo principal del presente estudio es determinar la carga de morbilidad y la epidemiología del rotavirus en el área I de salud de la Región de Murcia, cuyo hospital de referencia es el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

Los objetivos específicos son:

1. Estimar la incidencia de gastroenteritis aguda por rotavirus A en niños menores de 5 años atendidos en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.
2. Describir las características clínico-epidemiológicas de las gastroenteritis comunitarias y nosocomiales por rotavirus.
3. Caracterizar molecularmente los genotipos G (VP7) y P (VP4) de las cepas de rotavirus.
4. Detectar fallos vacunales y caracterizar cepas relacionadas con esos fallos.

4. Diseño del estudio.

Para el estudio de incidencia de gastroenteritis por rotavirus A se han estudiado todos los pacientes que fueron así diagnosticados y confirmados microbiológicamente en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, del 1 de enero de 2010 al 31 de diciembre de 2013.

Para el estudio de las características clínico-epidemiológicas y de genotipos se estudiaron todos los casos de gastroenteritis por rotavirus A que se detectaron desde el 1 de enero hasta el 31 de diciembre de 2012.

El estudio de gastroenteritis por rotavirus A en niños vacunados se llevó a cabo también durante los cuatro años 2010-2013. Se procedió a la caracterización de dos cepas de rotavirus A que habían infectado a dos niños previamente vacunados de forma correcta, y que sin embargo se habían contagiado por el virus en el hospital

desarrollando síntomas de gastroenteritis. En estas cepas se secuenció el genoma completo mediante técnicas de secuenciación masiva en el Institute of Infection and Global Health de la Universidad de Liverpool, en Reino Unido.

II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Breve reseña histórica

La diarrea es la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años en todo el mundo, estando sólo por detrás de la neumonía. En 2013 causó la muerte de 578.000 niños, principalmente en países en vías de desarrollo (Walker et al. 2013). En cambio, si hablamos de enfermedad en general, la diarrea es la principal causa de morbilidad en ese grupo de edad, estimándose en 1.700 millones el número de episodios de diarrea infantil en el mundo cada año (Liu et al. 2015). Pero estas cifras son las cifras de mortalidad y morbilidad por diarrea infantil más bajas registradas jamás. Respecto a la mortalidad en niños menores de 5 años, se produjo una disminución del 54% entre los años 2000 y 2013.

El mayor número de diarreas ocurre entre los 6 y los 11 meses de edad, y la mayoría de las muertes ocurre antes de los dos años, siendo África y Asia los continentes donde se da más del 90% de esta mortalidad (Leung et al. 2016). Respecto al agente etiológico causante de las diarreas infecciosas, es muy difícil encontrar la causalidad de uno en concreto debido a la presencia de numerosos agentes patógenos en las heces de los niños. Por ejemplo, en niños asiáticos relativamente sanos pueden encontrarse una media de 4,3 patógenos, cuando en los niños de EEUU se encuentra una media de 0,5 (Taniuchi et al. 2013). En niños africanos y asiáticos menores de dos años, el agente infeccioso más comúnmente identificado en diarreas moderadas y severas es el rotavirus, pasando a segundo lugar y siendo sobrepasado por bacterias del género *Shigella* a partir de los 2 hasta los 5 años (Kotloff et al. 2013). Curiosamente, el rotavirus pasa de ser la primera causa de diarrea infantil en los países donde no existe la vacunación rutinaria contra rotavirus, a ser la quinta causa en países donde esta vacuna está dentro del calendario vacunal (Platts-Mills et al. 2015).

En España hubo 3,6 fallecimientos de niños menores de 5 años por diarrea por cada 1.000 nacimientos en 2013 (Wang et al. 2014).

Hasta 1973, año en que se descubrió el rotavirus, no se lograba identificar el agente causal de las diarreas agudas en niños pequeños en un 80% de los casos (Bishop R. 2009). En el S. XVIII en Irlanda morían durante los dos primeros años de vida el 80% de los niños que eran admitidos en orfanatos por “cholera infantum”.

En 1900 en Nueva York se estimó una tasa de mortalidad del 5,6% entre los niños de 6 meses a un año y medio de edad, y durante esos primeros años del S. XX hasta el 20% de los niños que nacían en Victoria, Australia, morían antes de cumplir un año, principalmente de enfermedades diarreicas.

Incluso tan recientemente como el año 1943, el 50% de los niños ingresados en el West Middlesex Hospital de Londres por diarrea severa murieron sin la identificación de un patógeno entérico (Gairdner 1945).

Debido al lento reconocimiento de la necesidad del reemplazo electrolítico y de fluidos en las gastroenteritis severas, en 1947 todavía moría el 57% de las admisiones por gastroenteritis en niños menores de 15 meses en Reino Unido (Bishop R. 2009).

Las primeras alusiones a la posibilidad de un origen vírico en afecciones intestinales se deben a Zahorsky en 1929, en referencia probablemente al cuadro gastrointestinal producido por el norovirus (Zahorsky 1929).

En 1963 Adams y colaboradores identificaron por primera vez partículas víricas de 75 μm de diámetro en el citoplasma de las células epiteliales intestinales de ratones jóvenes con diarrea epizootica, denominándose *Epizootic diarrhea of infant mice virus* (EDIMV) (Adams & Kraft 1963). En 1967 se identificó otro virus semejante como causante de diarrea en monos, el *Simian virus SA11* (Malherbe & Strickland-Cholmley 1967), y en 1969 en terneras jóvenes el *Neonatal calf diarrhea virus* (NCDV) (Mebus et al. 1969).

En 1972 Kapikian y colaboradores publicaron el hallazgo de la relación de partículas de 27 nm de diámetro encontradas en las heces de seres humanos con gastroenteritis agudas no bacterianas en adultos (Kapikian et al. 1972). Posteriormente se conocería que los calicivirus, y especialmente los norovirus, son la principal causa de gastroenteritis infecciosa no bacteriana en adultos.

En mayo de 1973, Ruth Bishop y colaboradores identificaron abundantes partículas de un nuevo virus de 70 nm de diámetro en las heces y en el citoplasma de células epiteliales de las vellosidades intestinales duodenales de niños ingresados con gastroenteritis (Fig. 1), en el Royal Children's Hospital de Melbourne, Australia (Bishop

et al. 1973). El virus fue identificado como semejante al reovirus u orbivirus, con un gran parecido con los virus EDIMV y NCDV de ratones y terneras.

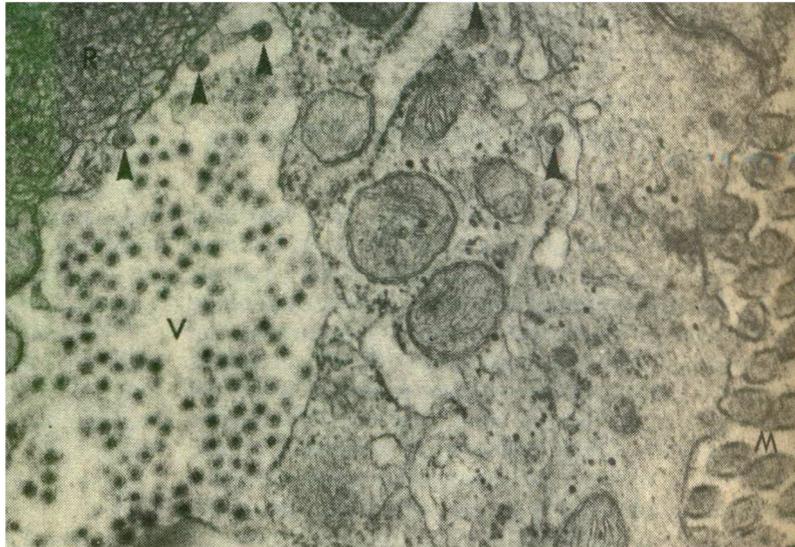


Figura 1: Primera micrografía electrónica de rotavirus humanos dentro de una célula epitelial intestinal, procedente de una biopsia a un niño con gastroenteritis. V: partículas víricas en el retículo endoplásmico; R: inclusión reticular; M: superficie apical de la célula con sus microvellosidades. Señaladas con flechas, partículas envueltas (Bishop et al. 1973).

Al principio llamados *Reovirus-like virus*, *Orbivirus-like virus*, *Duovirus* o *Infantile gastroenteritis virus*, finalmente su estructura parecida a una rueda les dio el nombre de *Rotavirus* (Bishop R. 2009).

La importancia de los rotavirus como causa de diarrea aguda severa en niños pequeños se estableció mediante un estudio de identificación de patógenos en niños con edades menores o iguales a 5 años en el Royal Children's Hospital de Melbourne. Se encontraron rotavirus en las heces del 52% de los niños ingresados por gastroenteritis entre 1974 y 1975, siendo la causa del 73% de los ingresos durante el invierno (Davidson et al. 1975). Una importante consecuencia de este estudio fue la retirada de los antibióticos de la lista de productos farmacéuticos beneficiosos para la gastroenteritis infantil.

Numerosos estudios posteriores han confirmado al rotavirus como la causa más frecuente de diarrea aguda severa con deshidratación en niños pequeños en todo el

mundo (Parashar et al. 2003), y además son responsables de gastroenteritis en una gran variedad de mamíferos y aves jóvenes (Martella et al. 2010).

Las estimaciones sugieren que prácticamente todos los niños en el mundo habrán sido infectados por el rotavirus a la edad de cinco años. Durante la infección algunos de esos niños sufrirán gastroenteritis severas que requerirán atención médica debido a grandes pérdidas de fluidos (Parashar et al. 2006).

2. Filogenia del rotavirus.

Los rotavirus constituyen un amplio grupo de virus pertenecientes a 9 especies descritas como rotavirus A-I, dentro del género *Rotavirus*. El género *Rotavirus* a su vez es uno de los 15 géneros que pertenecen a la familia *Reoviridae* (ICTV 2017). La familia *Reoviridae* se ha subdividido en dos subfamilias, en base a la presencia o ausencia de torretas que sobresalen de la capa interna del virión. El género *Rotavirus* pertenece a la subfamilia *Sedoreovirinae*, por carecer de estas torretas en la partícula interior (Figs. 2 y 3).



Figura 2: Géneros y especies de virus pertenecientes a la familia *Reoviridae*.

La familia *Reoviridae* contiene virus con genomas segmentados de ARN de doble cadena, en número de 9 a 12 segmentos, y que codifican de 9 a 14 proteínas.

Los viriones en esta familia carecen de envuelta lipídica, tienen cápsidas con una, dos o tres capas de proteínas, presentan simetría icosaédrica y tienen un tamaño de entre 60-85 nm

Dentro de la familia *Reoviridae* se han reconocido 90 especies, e incluyen virus que infectan células de una gran variedad de organismos muy alejados filogenéticamente, incluyendo células de hongos, clorofitas unicelulares, plantas superiores y animales vertebrados e invertebrados (Tabla 1).

Tabla 1: Características de los géneros de la familia *Reoviridae* (ICTV 2017).

Género	Nº de especies	Nº de segmentos de ARN	Nº de capas proteicas	Hospedador
Subfamilia <i>Sedoreovirinae</i>				
<i>Cardoreovirus</i>	1	12	3	Cangrejos
<i>Mimoreovirus</i>	1	11	3	<i>Micromonas</i>
<i>Orbivirus</i>	22	10	3	Vertebrados y artrópodos
<i>Phytoreovirus</i>	3	12	2	Plantas superiores
<i>Rotavirus</i>	9	11	3	Vertebrados
<i>Seadornavirus</i>	3	12	3	Vertebrados y artrópodos
Subfamilia <i>Spinareovirinae</i>				
<i>Aquareovirus</i>	7	11	2	Vertebrados e invertebrados acuáticos
<i>Coltivirus</i>	2	12	3	Vertebrados y artrópodos
<i>Cypovirus</i>	16	10	1	Insectos
<i>Dinovernavirus</i>	1	9	1	Mosquitos
<i>Fijivirus</i>	9	10	2	Plantas superiores e insectos
<i>Idnoreovirus</i>	5	11	2	Insectos
<i>Mycoreovirus</i>	3	11-12	2	Hongos
<i>Orthoreovirus</i>	6	10	2	Vertebrados

<i>Oryzavirus</i>	2	10	2	Plantas superiores e insectos
-------------------	---	----	---	-------------------------------

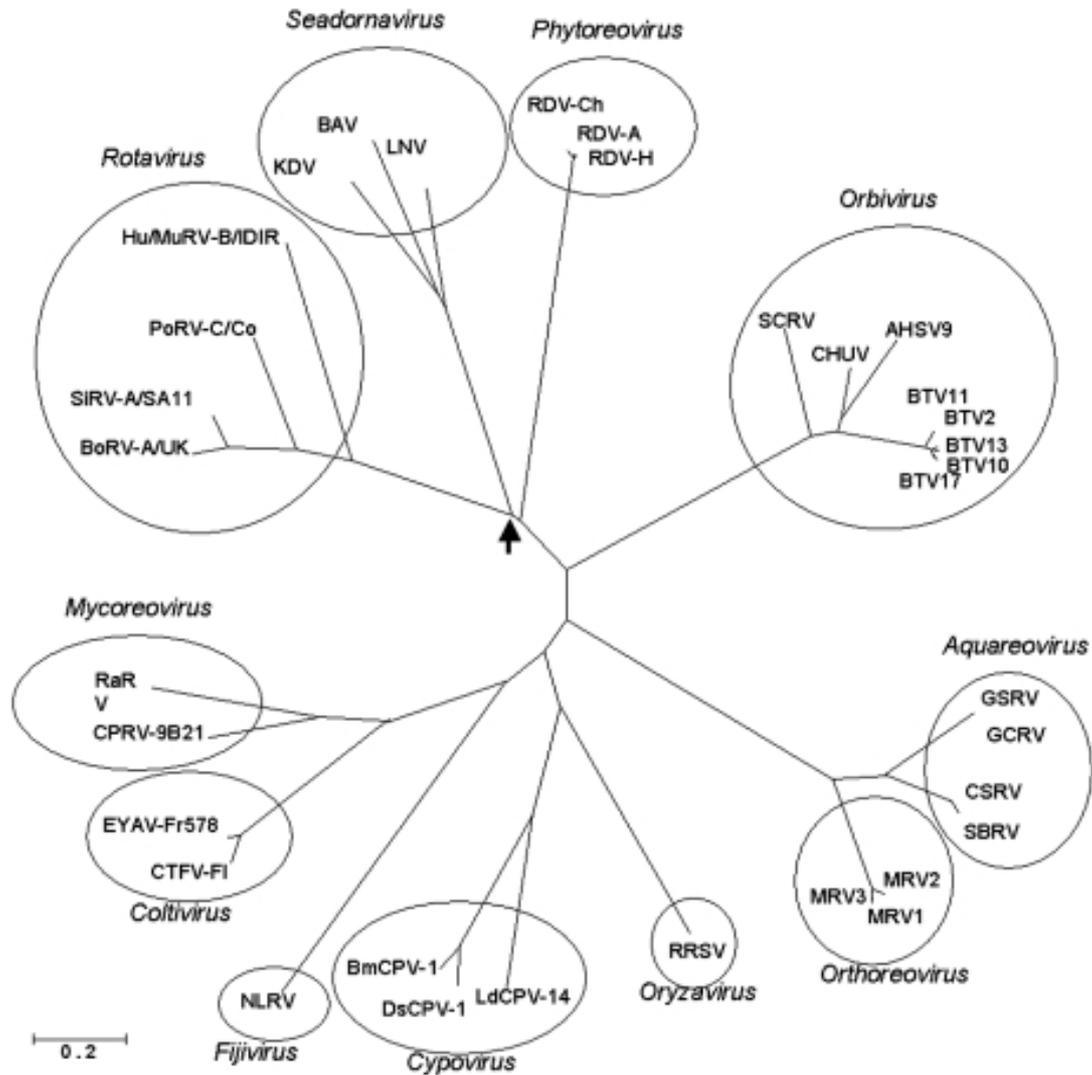


Figura 3: Comparación filogenética de las secuencias proteicas de las polimerasas víricas de la familia Reoviridae (Attoui et al. 2005). KDV, Kadapiro virus; BAV, Banna virus; LNV, Liao Ning virus; RDV, Rice dwarf virus; SCRV, St. Croix River virus; AHSV, African horse sickness virus; CHUV, Chuzan virus; BTV, Blue tongue virus; GSRV, Golden shiner reovirus; GCRV, Grass carp reovirus; CSRV, Chum salmon reovirus; SBRV, Striped bass reovirus; MRV, Mammalian orthoreovirus; RRSV, Rice ragged stunt virus; BmCPV, Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus; DsCPV, Dendrolimus spectabilis cytoplasmic polyhedrosis virus; LdCPV, Lymantria dispar cytoplasmic polyhedrosis virus; NLRV, Nilaparvata luguens reovirus; CTFV, Colorado tick fever virus; EYAV, Eyach virus; CPRV, Cryphonectria parasitica reovirus; RaRV, Rotavirus A; BoRV, Bovine rotavirus; SiRV, Simian rotavirus; PoRV, Porcine rotavirus; Hu/MuRV, Human/Murine rotavirus.

3. Estructura del virión

El género *Rotavirus* corresponde a virus con un tamaño de unos 80 nm de diámetro, que puede llegar a los 100 nm si se cuentan las espículas. Los viriones maduros tienen simetría icosaédrica y carecen de envuelta lipídica, por lo que son resistentes a los disolventes para lípidos.

Las cápsides de los rotavirus están formadas por tres capas concéntricas de proteínas, y en su interior albergan los ácidos nucleicos y las enzimas necesarias para la síntesis de ARN mensajero a partir del genoma vírico.

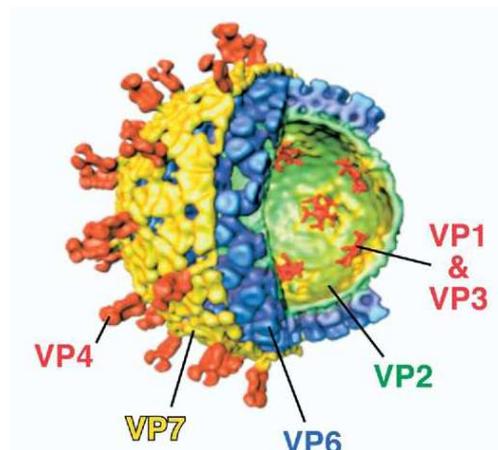


Figura 4: Corte de la estructura del virión del rotavirus determinada por reconstrucción de imagen tras criomicroscopía electrónica (Greenberg & Estes 2009).

La estructura del virión ha sido resuelta con una resolución casi atómica gracias a las técnicas de cristalografía de rayos X y a la reconstrucción de partículas únicas mediante imágenes de microscopía crioelectrónica (Settembre et al. 2011)(McClain et al. 2010)(Chen et al. 2009)(Zhang et al. 2008).

La capa más interna, o core, es la que envuelve los ácidos nucleicos y está compuesta por 120 copias de la proteína VP2. Esta proteína se organiza en grupos de cinco dímeros (decámeros) alrededor de cada uno de los 12 vértices del icosaedro, con un número de triangulación de 1. El extremo amino-terminal de VP2 es flexible y se aloja en el interior de la partícula vírica a través del eje de simetría pentavalente del vértice icosaédrico, y se cree que en cada decámero interacciona directamente con un complejo de

polimerasa vírica, compuesto por una molécula de la propia polimerasa VP1, y una molécula de VP3, que es la proteína que inserta la caperuza 5' en los ARN mensajeros. Alrededor de esta primera capa de VP2 se sitúan otras dos capas proteicas, ambas con número de triangulación 13 de simetría icosaédrica.

La capa intermedia es una capa gruesa, en comparación con las otras dos capas, y está formada por 260 trímeros de la proteína VP6. La unión de VP6 a la frágil partícula central le otorga a ésta una gran estabilidad, además de servir como fase adaptadora para el anclaje de las proteínas de la capa más externa, que son cruciales para la adhesión y entrada en las células hospedadoras.

De este modo se colocan 260 trímeros de VP7 directamente sobre la capa de VP6 formando una capa continua con perforaciones en el centro de cada uno de los 12 pentones de los vértices icosaédricos, y formando 5 canales peripentonaes alrededor de cada pentón. Los trímeros de VP7 dependen de los iones de Ca^{2+} para su estabilidad uniéndose dos de ellos a cada subunidad, de forma que se requieren 6 cationes para estabilizar cada trímero. Unas extensiones en forma de brazo en los extremos amino terminales de las proteínas VP7 ejercen interacciones con las proteínas VP6 de la capa proteica inferior, además de entablar contacto con los otros trímeros de VP7. Esta característica otorga a esta capa mayor integridad y permite la interacción cooperativa de los trímeros adyacentes.

A través de la capa de VP7 sobresalen 60 espículas triméricas de VP4, que emergen desde los canales peripentonaes de la capa de VP6 subyacente.

VP4 y VP7 tienen roles decisivos en la infectividad, y los anticuerpos generados contra estas proteínas neutralizan efectivamente a los rotavirus.

El mapeo de mutaciones de escape a anticuerpos ha llevado a la identificación de varios epítomos discretos en cada proteína de la capa externa del virión (Fig. 5).

Respecto a la proteína VP7 se han identificado 6 epítomos (A-F), que en la práctica constituyen dos áreas únicas que son diana de los anticuerpos neutralizantes (Aoki et al. 2010). Los epítomos 7-1 residen en las tres esquinas de cada trímero y comprende residuos de dos subunidades de VP7 adyacentes, la 7-1a y 7-1b. Los anticuerpos que se unen al epítomo 7-1 neutralizan el virus principalmente estabilizando la cápsida y

previniendo el desmantelamiento de la capa VP7. De hecho, el epítipo 7-1 incluye varios aminoácidos que están próximos a uno de los sitios de unión del Ca^{2+} , que mantienen la conformación trimérica de VP7. El epítipo 7-2 está en la región flexible en el centro de cada subunidad VP7, aunque hay más incertidumbre sobre el mecanismo de neutralización por los anticuerpos que alcanzan este epítipo (Trask et al. 2012).

Con respecto a la proteína VP4, una vez ingerido el virión por el animal hospedador ésta sufre una escisión proteolítica por proteasas semejantes a la tripsina, dando lugar a los fragmentos VP5* y VP8* que permanecen unidos no covalentemente. VP8* tiene cuatro epítipos definidos estructuralmente (Dormitzer et al. 2002)(Kovacs-Nolan et al. 2003). La mayoría de anticuerpos neutralizantes que se dirigen a VP8* bloquean el anclaje del virus. VP5* es una proteína para la penetración de la membrana y tiene cinco epítipos definidos (Dormitzer et al. 2004).

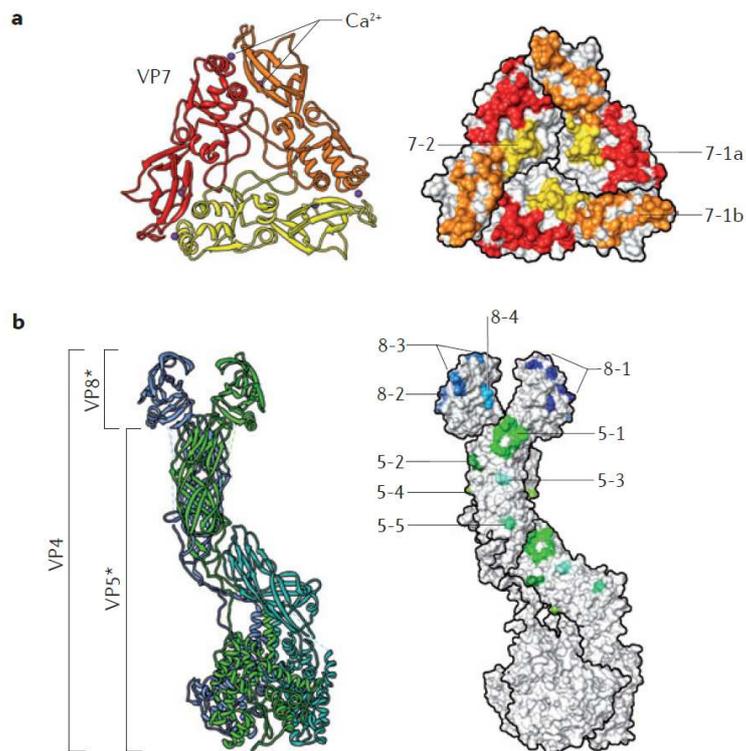


Figura 5: Epítipos de las proteínas VP7 (a) y VP4 (b) del rotavirus (Trask et al. 2012).

4. Genoma

El genoma de los rotavirus está compuesto por 11 segmentos de ARN de doble cadena de diferentes tamaños. El tamaño de los segmentos varía desde los 666 hasta los 3.302 pares de bases, con un genoma total de unos 18.500 pares de bases (Estes & Kapikian 2007).

Cada uno de los segmentos de ARN del genoma del rotavirus codifica sólo una proteína, excepto el segmento 11 de la mayor parte de rotavirus A, que codifica dos proteínas diferentes. Seis de estas proteínas son proteínas estructurales que forman parte del virión (viral proteins, VP1-4,6,7), mientras que las otras seis proteínas son no estructurales, sólo se encuentran en las células infectadas, y no forman parte de la partícula vírica madura (non-structural proteins, NSP1-6) (Tabla 2).

Tabla 2: Genoma del rotavirus (cepa bovina RF G6P6[1]) y proteínas codificadas (Desselberger 2014).

Segmento de ARN	Tamaño (pares de bases)	Proteína codificada	Tamaño (KDa)	Localización en el virión	Moléculas por virión	Función principal
1	3.302	VP1	125	Core	12	ARN polimerasa dependiente de ARN
2	2.687	VP2	94	Core	120	Constituyente de la capa proteica interna
3	2.592	VP3	88	Core	12	Guanililtransferasa; metiltransferasa
4	2.362	VP4	86	Capa externa	180	Antígeno neutralizante de tipo P
5	1.581	NSP1	58	No estructural	-	Antagonista de interferón
6	1.356	VP6	44	Capa intermedia	780	Constituyente de la capa proteica intermedia
7	1.062	VP7	37	Capa externa	780	Antígeno neutralizante de tipo G
8	1.059	NSP2	36	No estructural	-	NTPasa

9	1.074	NSP3	34	No estructural	-	Inhibe la traducción de proteínas celulares
10	751	NSP4	20	No estructural	-	Enterotoxina
11	666	NSP5	21	No estructural	-	Proteína fosfo- y O-glicosilada.
11	-	NSP6	12	No estructural	-	Interacción con NSP5

Debido al gran número de virus excretados en las heces de los niños con gastroenteritis, la cantidad de ARN genómico de rotavirus es tan grande en algunas muestras que puede visualizarse a simple vista sin necesidad de amplificación, utilizando los colorantes para ácidos nucleicos habituales como bromuro de etidio o nitrato de plata (Fig. 6). Los ácidos nucleicos extraídos se separan con electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en 11 segmentos genómicos según su tamaño (Greenberg & Estes 2009).

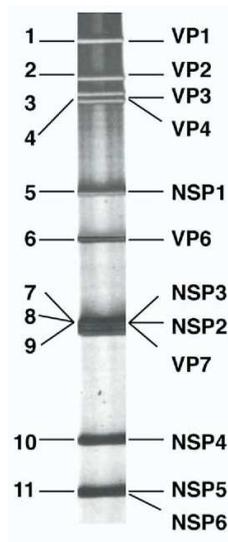


Figura 6: Electroforesis en gel de poliacrilamida de ARN de rotavirus, y proteínas codificadas por cada segmento (Greenberg & Estes 2009).

Las proteínas codificadas en el genoma del rotavirus son las siguientes (Attoui et al. 2012):

VP1: ARN polimerasa dependiente de ARN. Se trata de la proteína más grande codificada por el genoma del rotavirus. Posee cuatro túneles, una ARN de cadena sencilla, forma complejo con VP3 y es responsable tanto de la transcripción como de la replicación del genoma vírico.

VP2: Constituyente de la capa proteica interna. Una ARN tanto de doble como de cadena sencilla, y es necesaria para la actividad polimerasa de VP1. Se trata de una proteína muy conservada.

VP3: Guanililtransferasa, metiltransferasa, 2',5'-fosfodiesterasa. Una ARN de cadena sencilla y forma complejo con VP1.

VP4: Antígeno neutralizante de tipo P. Forma homotrimeros en la capa proteica exterior, y participa en la adhesión a la célula. Su infectividad es potenciada por escisión proteolítica por proteasas intestinales. Se considera un factor de virulencia y también participa en la fusión con la membrana celular.

VP6: Constituyente de la capa proteica intermedia. Forma homotrimeros y es determinante de la especie de rotavirus. Tiene una función de defensa frente a los mecanismos de defensa antivíricos intracelulares y es necesaria para la transcripción.

VP7: Antígeno neutralizante de tipo G. Es el constituyente principal de la capa proteica externa. Forma homotrimeros y es glicosilada. El complejo de cationes de Ca^{2+} cambia sus propiedades estructurales.

NSP1: Antagonista de interferón. Tiene actividad ubiquitín-ligasa E3 produciendo la degradación de los factores reguladores del interferón (IRF3, IRF5 y IRF7) y se une al ARN. Se trata de la proteína más variable dentro de una misma especie de rotavirus, pudiendo cambiar el tamaño total del segmento que la codifica y el marco abierto de lectura. Se cree que influye en la especificidad de hospedador.

NSP2: Se trata de una proteína multifuncional que exhibe actividad nucleósido trifosfatasa (NTPasa), ARN trifosfatasa (RTPase) y actividades desestabilizadores de hélice. Esta proteína es crítica para la formación del viroplasma con su proteína colaboradora NSP5, y para la replicación y el empaquetamiento vírico a través de sus interacciones con ARN, VP1 y VP2. Las cepas que expresan NSP2 mutantes sensibles a la temperatura pierden su capacidad sintetizar ARN de doble cadena y producen partículas

víricas vacías a temperaturas no permisivas. Se dispone en octámeros (Viskovska et al. 2014).

NSP3: Forma dímeros que se unen al extremo 3' de los ARN mensajeros víricos, al eIF4G y a Hsp90, desplazando PABP, de forma que inhibe la traducción de proteínas celulares mientras permite la traducción de los de origen vírico.

NSP4: Enterotoxina cuando es secretada actuando como viroporina, se trata de una glicoproteína transmembrana del retículo endoplasmático rugoso. Allí actúa como receptor intracelular para las partículas de doble capa. Interacciona con los viroplasma y con la vía autofágica. Modula el Ca^{2+} intracelular y la replicación del ARN. Se considera un factor de virulencia.

NSP5: Aunque el papel exacto de esta proteína está sin resolver se especula que esta proteína está implicada en la replicación y en el empaquetamiento del genoma vírico. La localización de esta proteína en los viroplasma y su actividad se correlacionan con su estado de fosforilación, que a su vez depende su interacción con NSP2. Se dispone en dímeros y está fosfo- y O-glicosilada. Une ARN y tiene actividad quinasa (Viskovska et al. 2014).

NSP6: Interacciona con NSP5. Localizada en el viroplasma. Esta proteína existe en la mayoría de cepas de rotavirus A, y se sintetiza a partir de un marco abierto de lectura alternativo en el segmento 11 del genoma del virus (Gonzalez et al. 1998).

5. Ciclo replicativo

Las células diana de los rotavirus son los enterocitos maduros del intestino delgado. El ciclo replicativo del rotavirus se da en su totalidad en el citosol de la célula, y el genoma del virión no sale en ningún momento de la partícula vírica de forma que nunca queda expuesto a los mecanismos de defensa antivíricos intracelulares (Fig. 7).

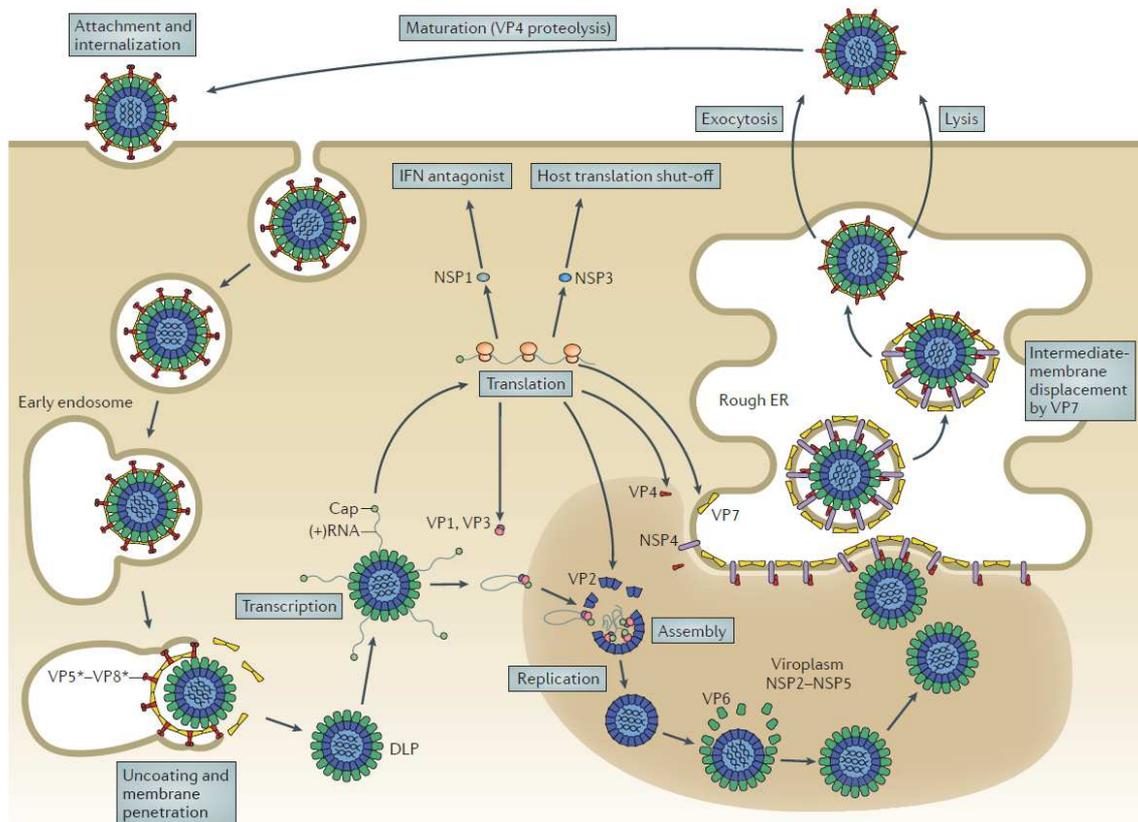


Figura 7: Ciclo replicativo del rotavirus (Trask et al. 2012).

Tras ser ingerido, el virión llega al intestino delgado donde las proteasas intestinales actúan sobre la proteína VP4 de la capa externa del virión, escindiéndola en dos fragmentos, VP5* y VP8*. El virión primero se ancla a los receptores de la superficie de las células diana a través del fragmento VP8*. En muchas cepas este receptor son las moléculas de ácido siálico, aunque no en todas (Ciarlet et al. 2002)(Fiore et al. 1991). Por medio de un proceso de endocitosis no mediado por clatrina ni caveolina el virión llega al endosoma temprano. Allí, probablemente debido a bajos niveles de Ca^{2+} , se produce el desensamblaje de la capa proteica más externa del virión, eliminándose las proteínas VP7, VP8* y VP5*, y permitiendo esta última la salida de la partícula vírica de doble capa hacia el citosol (Trask et al. 2012).

Una vez en el citosol la partícula de doble capa activa el complejo polimerasa de su núcleo (VP1 más VP3), actuando como una máquina que transcribe el genoma en ARN mensajeros que van siendo liberados en el citosol, tomando como molde las cadenas de sentido negativo de cada segmento genómico. A los ARNs de sentido positivo recién

transcritos VP3 le añade una caperuza en 5' formando un aducto con GTP y S-adenosilmetionina.

Los ARNs de sentido positivo sirven tanto como ARN mensajeros para la síntesis de proteínas víricas por los ribosomas celulares, como también de moldes para la síntesis de ARN de sentido negativo durante la replicación vírica.

La acumulación de proteínas víricas no estructurales en la célula, especialmente NSP2 y NSP5, hacen que se formen grandes inclusiones en la célula llamadas viroplasmos, que van almacenando los componentes necesarios para la replicación y el ensamblaje de las partículas subvirales. El empaquetamiento del genoma es iniciado cuando una molécula de VP1 se une al extremo 3' de un ARN monocatenario de sentido positivo. Actualmente se cree que la interacción de los 11 ARN monocatenarios de sentido positivo da lugar a la formación de un complejo de agrupación, y que la condensación de la primera capa proteica de VP2 alrededor de este complejo de agrupación lleva a la síntesis de las cadenas complementarias de ARN por VP1. A continuación se añade una capa de VP6, dando lugar a partículas de doble capa proteica.

El proceso de ensamblaje de la última capa de proteína para dar partículas víricas de tres capas no se conoce con todo detalle, aunque el modelo actual propone que la partícula de doble capa en el citoplasma interacciona con la proteína vírica NSP4, que es una proteína transmembrana embebida en la membrana plasmática del retículo endoplasmático. Esta proteína NSP4 también atrapa a la proteína estructural VP4 en la cara citosólica del retículo endoplasmático y, a través de un mecanismo indefinido, el complejo partícula subvírica-NSP4-VP4 entra en el retículo endoplasmático. En este momento se forma de forma transitoria una partícula vírica con una envuelta lipídica. La eliminación de esta membrana del retículo endoplasmático que hay sobre la partícula y de NSP4, permite que las proteínas VP7 que están en el interior del retículo endoplasmático se ensamblen encima, formando las partículas de tres capas. Los rotavirus explotan los mecanismos de señalización relacionados con la concentración de Ca^{2+} intracelular para controlar la replicación, la morfogénesis y la patogénesis. De esta manera, la infección con rotavirus conlleva un incremento de al menos 3 veces la

concentración de Ca^{2+} intracelular, y hasta 10 veces la entrada de Ca^{2+} a las células (Brunet et al. 2000)(Ruiz et al. 2000).

El Ca^{2+} tiene un papel importante en los procesos de ensamblaje y desensamblaje del virión. También mantiene la integridad de la capa proteica más externa. La proteína VP7 es una proteína que une Ca^{2+} y la quelación de este catión es una manera de activar la polimerasa de ARN vírica. La proteína NSP5 también une Ca^{2+} y la formación del viroplasma también requiere de este catión. La morfogénesis del virus también depende de niveles adecuados de Ca^{2+} , ya que sin este catión la morfogénesis vírica se para en la fase de partícula de doble capa proteica, ya que VP7 es excluida de los complejos heteroproteicos con NSP4 y VP4 y las partículas víricas de doble capa no llegan a entrar dentro del retículo endoplasmático. NSP4 es la única proteína del rotavirus capaz de movilizar el Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático en la célula, quizás actuando como un canal de Ca^{2+} o regulando otro tipo de canal, o al insertarse en su membrana o por la actividad de sus dominios desestabilizantes de membrana.

Las partículas víricas de tres capas permanecen dentro del retículo endoplasmático hasta que finalmente son liberadas por un mecanismo de transporte no clásico en células polarizadas como son los enterocitos, o por lisis celular (Estes & Greenberg 2013)(Trask et al. 2012).

6. Clasificación y nomenclatura de rotavirus

Los virus pertenecientes al género *Rotavirus* se han clasificado en varias especies, también llamados “grupos”, en función de las propiedades antigénicas de la proteína VP6, así como en los patrones de migración de los segmentos de ARN de doble cadena en electroforesis en gel de poliacrilamida. En los últimos tiempos el desarrollo de las técnicas moleculares está reemplazando a las técnicas inmunológicas, y en la actualidad se utiliza un sistema de clasificación de las especies de rotavirus basado en la comparación de las secuencias de la proteína VP6. Se ha propuesto un umbral de identidad del 53% de aminoácidos, por debajo del cual dos cepas de rotavirus se consideran de diferente especie (Matthijssens et al. 2012).

En general, la capacidad de reagrupar segmentos entre distintas cepas de rotavirus sólo se da entre cepas pertenecientes a una misma especie (Attoui et al. 2012).

Hasta ahora se han descrito 9 especies, que se denominan con letras del abecedario consecutivas, desde el Rotavirus A, hasta el Rotavirus I (Tabla 3), y se ha propuesto una nueva especie, el rotavirus J, recién identificado en murciélagos (Bányai et al. 2017).

Tabla 3: Especies de rotavirus (ICTV 2017)

Especie	Hospedador	Descripción
Rotavirus A	Seres humanos, otros mamíferos, aves	(Matthijnssens et al. 2011)
Rotavirus B	Seres humanos y mamíferos	(Matthijnssens et al. 2011)
Rotavirus C	Seres humanos y mamíferos	(Matthijnssens et al. 2011)
Rotavirus D	Aves	(Trojnar et al. 2010)
Rotavirus E	Cerdos	(Pedley et al. 1986)
Rotavirus F	Aves	(Mascarenhas et al. 2016)(Kindler et al. 2013)
Rotavirus G	Aves	(Mascarenhas et al. 2016)(Kindler et al. 2013)
Rotavirus H	Cerdos, seres humanos	(Marthaler et al. 2014)(Yang et al. 2004)
Rotavirus I	Gatos, perros	(Phan et al. 2017)(Mihalov-Kovács et al. 2015)

Desde el punto de vista epidemiológico, la especie de rotavirus con mayor importancia para el ser humano es el rotavirus A, ya que el 90% de las gastroenteritis por rotavirus en los seres humanos se debe a virus pertenecientes a esta especie, y por tanto son los virus de esta especie los que más esfuerzos han reunido para su clasificación.

La clasificación de los rotavirus A se ha realizado de cuatro formas distintas: en base a las propiedades antigénicas de las proteínas VP6 (subgrupos), VP7 (serotipos G) y VP4 (serotipos P); en base a los patrones de migración de los segmentos genómicos de ARN en electroforesis en gel de poliacrilamida (electroferotipos largo, corto, súper corto o atípico); conforme a patrones de hibridación de genomas completos de ARN (genogrupos); o analizando las secuencias de nucleótidos de los segmentos genómicos (genotipos) (Estes & Greenberg 2013)(Matthijnssens et al. 2009).

Históricamente, VP6 fue la primera proteína vírica utilizada para la clasificación de los rotavirus. Tanto VP6 como VP2 son proteínas estructurales altamente inmunogénicas y tras la infección los anticuerpos contra ellas son fácilmente detectables. VP6 tiene distintos epítomos que permiten diferenciar diferentes especificidades de subgrupo (SG I, SG II, SG I + II, o SG no-I, no-II) utilizando dos anticuerpos monoclonales (Ciarlet & Estes 2002). Más recientemente, mediante caracterización molecular, solo se distinguieron dos grupos, llamados genogrupos, dentro de los rotavirus A: genogrupo I (subgrupo I), y genogrupo II (subgrupos II, I + II y no-I, no-II) (Iturriza-Gómara et al. 2002). En 1985 se propuso un esquema de clasificación para los rotavirus para permitir la existencia de múltiples “grupos” y para la existencia de “serotipos” que cruzaban las especies (Graham & Estes 1985), y más tarde en 1989 se estableció un sistema de clasificación binario inspirado en el utilizado en la clasificación de los virus de la gripe, derivado de las reactividades inmunológicas y de las estructuras de los genes de las dos proteínas de la capa externa del virión, VP7 y VP4, que de forma independiente producen anticuerpos neutralizantes (Ciarlet & Estes 2002). De esta forma las cepas de rotavirus se clasificaron en serotipos VP7 ó G (por glicoproteína) y serotipos VP4 ó P (por proteasa-sensible) (Estes & Kapikian 2007). La clasificación de los rotavirus en serotipos VP7 ó VP4 se realiza con ensayos de neutralización utilizando suero hiperinmune a virus prototipos y/o a virus mono-reagrupados desarrollados en laboratorio. Ya que la caracterización antigénica consume una gran cantidad de tiempo y requiere colecciones de virus y reactivos inmunológicos adecuados que no están disponibles en todos los laboratorios, y gracias a la creciente disponibilidad de las técnicas moleculares y la secuenciación, la clasificación antigénica ha ido siendo reemplazada por un sistema de clasificación basado en genotipos VP7 y VP4. Esta clasificación se realiza con análisis de secuencias de nucleótidos y se basa en las identidades entre secuencias del mismo tipo de segmento genómico (Matthijnssens et al. 2008).

En la actualidad se han identificado 28 genotipos G y 39 genotipos P en el mundo (Mijatovic-Rustempasic et al. 2016).

Las designaciones de los serotipos G coinciden en gran medida con las de los genotipos, pero en contraste se ha utilizado un sistema de clasificación dual para la clasificación

antigénica y genética de VP4 (Estes & Kapikian 2007). Si se conoce el serotipo P se denota con un número arábigo (a veces seguido de una letra en mayúscula), y el genotipo P se denota inmediatamente después entre corchetes. De forma general, el tipo G1P1A[8], es decir, con genotipo/serotipo G1, y serotipo P1A y genotipo P[8], es el más prevalente en las poblaciones humanas (Matthijnsens et al. 2008).

En 2008 se propuso un sistema de clasificación de las cepas de rotavirus genotipando todos los segmentos en base a unos umbrales de identidad, por debajo de los cuales, las cepas comparadas pertenecen a distintos genotipos (Matthijnsens et al. 2008). A cada segmento se le asignó una letra relacionada con el tipo de proteína que codifica en inglés, y que se acompaña de un número que determina el genotipo para ese segmento (ver tabla 4). Un ejemplo es la cepa Wa, aislada en Estados Unidos en 1974, cuya constelación de genotipos es: G1P[8]I1R1C1M1A1N1T1E1H1.

Tabla 4: Valores umbrales de identidad que definen genotipos para los 11 segmentos genómicos de rotavirus (Matthijnsens et al. 2008).

Producto génico	Valores umbrales de identidad	de	Nombre de genotipos	Símbolo de genotipo
VP7	80%		<u>G</u> lycosylated	Gx
VP4	80%		<u>P</u> rotease-sensitive	P[x]
VP6	85%		<u>I</u> ntermediate shell	Ix
VP1	83%		<u>R</u> NA-dependent polymerase	RNA Rx
VP2	84%		<u>C</u> ore protein	Cx
VP3	81%		<u>M</u> ethyl transferase	Mx
NSP1	79%		Interferon <u>A</u> ntagonist	Ax
NSP2	85%		<u>N</u> TPase	Nx
NSP3	85%		<u>T</u> ranslation enhancer	Tx
NSP4	85%		<u>E</u> nterotoxin	Ex
NSP5	91%		<u>p</u> Hosphoprotein	Hx

En 2011, el Rotavirus Classification Working Group, formado por científicos del área para mantener, evaluar y desarrollar el sistema de clasificación de genotipos de los rotavirus, propuso un sistema de nomenclatura para identificar las cepas de rotavirus estudiadas

(Matthijnssens et al. 2011). Mediante el sistema propuesto se condensa una gran cantidad de información sobre la cepa en una sola línea.

Las cepas se denominan cumplimentando 6 campos:

Especie de rotavirus / especie animal de origen / país de identificación / nombre común / año de identificación / tipos G y P

Siguiendo este sistema de nomenclatura la cepa Wa, aislada en Estados Unidos en 1974 se denominó RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P1A[8], mientras que la cepa DS-1 aislada en el mismo país en 1976 se denominó RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P1B[4].

En 2012 se publicó el hallazgo de que en realidad sólo determinadas constelaciones de genotipos, excluyendo a los tipos G y P que son más variables, infectan con frecuencia al ser humano (Matthijnssens & Van Ranst 2012). Las dos principales constelaciones son aquellas en las que se encuadran las cepas tipo Wa, con genotipos I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, y las cepas tipo DS-1, con genotipos I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2.

7. Evolución de rotavirus

La evolución de los rotavirus está dirigida principalmente por tres procesos moleculares: mutaciones puntuales que dan lugar a variaciones en la secuencia genética de su genoma (Ramig 1997), reordenamientos (rearrangements) y reagrupamientos (reassortments) del genoma (Palombo 2002).

Mutaciones puntuales: La replicación del genoma del rotavirus se produce a través de una polimerasa dependiente de ARN, y la principal fuente de diversidad genética en los rotavirus son las mutaciones debidas a la propia naturaleza tendente a cometer errores de esta enzima. Se ha calculado una tasa de mutación de menos de 5×10^{-5} mutaciones por nucleótido por ronda de replicación, similar a la que presenta el virus de la gripe (Ramig 1997). Una cepa de un virus de ARN, que tiene una tendencia natural a sufrir mutaciones, no constituye una población clonal exacta de un virus tipo, sino que es más bien una distribución de mutantes que compiten en un paisaje de aptitud. La presión selectiva que ejerce un hospedador puede hacer que un mutante gane ventaja evolutiva sobre los demás y acabe predominando en la población. Se ha descrito suficientemente

la contribución de estas mutaciones para generar variantes genéticas de cepas de rotavirus recolectadas en distintas localizaciones geográficas en el mundo.

Reordenamientos genéticos: Aunque no hay evidencia directa de recombinación homóloga durante la replicación del rotavirus, los saltos de la polimerasa durante la síntesis de las cadenas positiva o negativa pueden dar lugar a recombinaciones intramoleculares que den lugar a segmentos reordenados, que usualmente implica segmentos parcialmente duplicados. Estos raros eventos han sido detectados en varios animales y en niños inmunocomprometidos e inmunocompetentes, y se considera que ocurren durante infecciones persistentes. Aunque se han descrito diferentes reordenamientos genéticos en virus humanos y animales, este mecanismo solo jugaría un papel marginal, en caso de que juegue alguno, en la generación de una variación significativa en virus salvajes.

Reagrupamientos: La naturaleza segmentada del genoma del rotavirus proporciona un mecanismo especial para la generación de diversidad genética a través de reagrupamientos de segmentos genómicos de distintas cepas. Esto ocurre cuando más de una cepa distinta infecta a una misma célula, y segmentos genómicos de las distintas cepas acaban empaquetados en la misma partícula vírica. Los reagrupamientos son un mecanismo evolutivo único en virus con genomas segmentados, que puede dar lugar a la transmisión de segmentos entre distintas especies, siendo un mecanismo conocido en la generación de diversidad antigénica y en la evolución de los virus de la gripe. No es raro que la circulación simultánea de distintas cepas humanas puede dar fenómenos de reagrupamientos, contribuyendo enormemente a la diversidad genética de los rotavirus (Iturriza-gómara et al. 2001).

Las enteritis asociadas a rotavirus en animales tienen también una gran importancia en ganadería, especialmente en terneras pequeñas (Saif et al. 1994), en lechones (Kapikian & Chanock 1996), en potros (Conner & Darlington 1980) y en aves jóvenes (Dhama et al. 2015). Desde los primeros estudios sobre las infecciones por rotavirus se han descrito casos esporádicos o incluso brotes de rotavirus A atípicos de origen animal en humanos (Martella et al. 2010). La transmisión de rotavirus entre especies diferentes, aunque ocurre de forma esporádica, se da de forma natural en la naturaleza (Yodmeeklin et al.

2017)(Palombo 2002). Hay numerosos ejemplos de descripciones de cepas de rotavirus aisladas en humanos y animales que comparten características genéticas y fenotípicas con virus de especies heterólogas, y se ha comprobado que las reagrupaciones entre cepas humanas y animales no son eventos tan aislados (Bezerra et al. 2016)(Mijatovic-Rustempasic et al. 2016).

Otros factores que aceleran la diversificación y el cambio en las cepas de rotavirus circulantes son la globalización de los viajeros, que hace que cepas lejanas puedan extenderse en nuevas localizaciones con facilidad.

Todos estos factores que influyen en la evolución y en la diversificación de los rotavirus, hacen que se observan fluctuaciones temporales y espaciales en la distribución de genotipos de rotavirus humanos, en los estudios de vigilancia de forma continua.

Se cree que el cambio de genotipos circulantes de una temporada a la siguiente es debido a la deriva genética generada por las mutaciones puntuales, y a la reagrupación de segmentos génicos entre cepas distintas que infectan una misma célula.

Las vacunas, que sólo contienen algunas de las cepas humanas más prevalentes, podrían permitir que emergieran otras cepas con distintos genotipos G y P, aunque detectar este hecho es complicado, ya que se dan fluctuaciones cíclicas de manera natural (Matthijnsens et al. 2009).

8. Detección y caracterización de rotavirus

Microscopía electrónica: El descubrimiento de los rotavirus se realizó mediante preparaciones de heces y de tejido epitelial intestinal de niños enfermos con gastroenteritis, observados al microscopio electrónico (Fig. 9). Esta técnica es altamente específica para la detección de rotavirus, ya que la forma y el tamaño de los viriones es fácilmente diferenciable de otros virus, y es tan sensible como algunas técnicas de enzimoanálisis. Se estima que se necesitan 10^6 partículas por gramo de heces para poder ser observadas. Pero este tipo de ensayo no se realiza de forma rutinaria en la detección de este virus porque requiere la utilización de una determinada cantidad de recursos, tanto de personal entrenado, como de costosa instrumentación, además

de no poder distinguir entre rotavirus de diferentes grupos. La gran ventaja de esta técnica es que permite encontrar cualquier virus (Buesa Gómez et al. 2001).

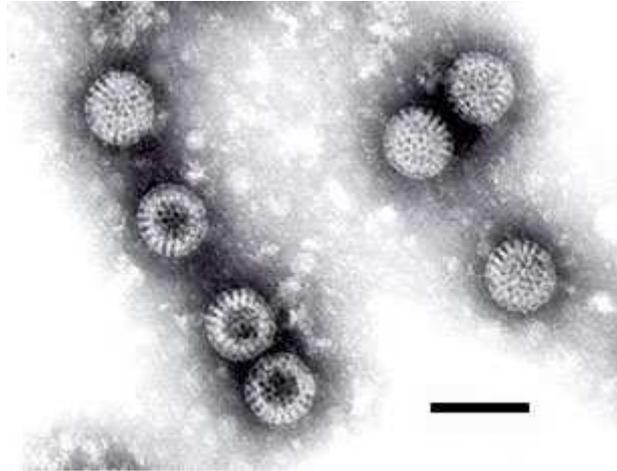


Figura 8: Microfotografía electrónica de rotavirus. La barra mide 100 nm (<https://es.wikipedia.org/wiki/Rotavirus>).

Detección de antígenos:

Los métodos más comunes de detección de rotavirus, por su facilidad de ejecución y su bajo coste, son los basados en la detección de proteínas antigénicas en la superficie de las partículas víricas en muestras de heces. Se han utilizado varias técnicas, como el enzimo-inmunoanálisis (EIA), utilizado en estudios de vigilancia a gran escala, y que usa anticuerpos específicos para capturar antígenos en placas de plástico con pocillos. El antígeno es detectado con una reacción colorimétrica usando un segundo anticuerpo específico contra rotavirus acoplado a una enzima detectora. Se trata de un método muy sensible y específico, y adaptable a un alto volumen de muestras analizadas utilizando placas de 96 pocillos. Los resultados de densidad óptica pueden además ser registrados de forma automática con un lector de placas, permitiendo el análisis de los resultados directamente en el ordenador. Un método alternativo es la aglutinación de látex, utilizando partículas de látex cubiertas con anticuerpos anti-rotavirus, pero el método con un menor coste-beneficio son los tests rápidos inmuno-cromatográficos. Estos kits se pueden utilizar cuando el volumen de muestras a analizar no es excesivo, se realizan en poco tiempo y tienen una sensibilidad y especificidad aceptables. Además, suelen

incluir la posibilidad de detectar en el mismo ensayo adenovirus intestinales. El test rápido se basa en una conjugación previa de los rotavirus de la muestra con anticuerpos anti-rotavirus unidos a esferas de poliestireno de un determinado color en suspensión, y esta suspensión se hace correr por una membrana. En una zona concreta de esta membrana se han inmovilizado anticuerpos anti-rotavirus formando una línea gruesa. Al migrar la suspensión a través de la membrana los rotavirus unidos a las esferas de color quedan atrapados en la línea por los anticuerpos inmovilizados observándose una línea coloreada en la ventana del soporte (Wilhelmi et al. 2001)(World Health Organization 2009a).



Figura 9: Test rápido inmuno-cromatográfico VIKIA® Rota-Adeno.

Serotipado con anticuerpos monoclonales:

En la primera mitad de los años 1980 se aislaron anticuerpos monoclonales contra el antígeno de serotipo VP7 (G) de los cuatro rotavirus más comunes (G1-4), que se mostraron capaces de unirse a partículas víricas intactas de una manera específica. El desarrollo posterior de métodos de EIA con esos anticuerpos monoclonales permitió el serotipado directo de los rotavirus en las muestras fecales. También se han aislado anticuerpos monoclonales contra el antígeno de serotipo VP4 (P) que clasifican a las distintas cepas de rotavirus en distintos serotipos (Taniguchi et al. 1987).

Electroferogramas:

Debido a la gran cantidad de rotavirus excretados en las heces de los niños infectados con gastroenteritis, los segmentos de ARN pueden visualizarse directamente tras su extracción de las partículas víricas, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, y tras ser teñidos con bromuro de etidio o nitrato de plata. Con la electroforesis pueden distinguirse las distintas especies de rotavirus en función del patrón de separación de

los segmentos. En algunos casos, la detección de los ácidos nucleicos con nitrato de plata presenta una sensibilidad semejante a los enzimo-inmunoanálisis. Sin embargo, estas técnicas requieren un trabajo intensivo y un tiempo considerable por lo que no suelen utilizarse en estudios de vigilancia.

Se han desarrollado una serie de métodos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa convencionales (RT-PCR) o en tiempo real (qRT-PCR), utilizando primers específicos para varios genes diferentes de rotavirus, en especial para VP6.

Además de para la detección de rotavirus en muestras de heces, el estudio de los electroferotipos puede utilizarse en la caracterización de las cepas de rotavirus, ya que cada cepa presenta una distribución de bandas, también llamado electroferotipo, característica. Las distintas especies de rotavirus presentan electroferotipos determinados, y dentro del rotavirus A, existen patrones de electroferotipos largos (cepas tipo Wa), y electroferotipos cortos (cepas tipo DS-1) (World Health Organization 2009a).



Figura 10: Gel PAGE mostrando los diferentes patrones de migración de segmentos de ARN de los rotavirus A, B y C (World Health Organization 2009a)

Análisis de hibridación (Palombo 2002)(Nakagomi & Nakagomi 1993)(Gerna et al. 1992)(Pongsuwanna et al. 1996)(Palombo et al. 2000):

Se utilizan sondas del genoma completo, que se obtienen gracias a la capacidad de las partículas víricas con una sola capa proteica de sintetizar ARN *in vitro*. Si lo hacen en presencia de [³²P] ATP o [³²P] GTP, los ARNs transcritos llevan incorporada la etiqueta radioactiva, y se obtienen sondas de los 11 ARN del genoma del rotavirus. Las sondas pueden entonces mezclarse con ARN genómico purificado de un virus diferente, hibridadas en líquido y analizadas por PAGE seguida de autorradiografía. De esta manera se identifican los segmentos de ARN relacionados. Una desventaja de este método es que los híbridos pueden migrar con distinta velocidad de los ARN puros, y por tanto puede resultar difícil identificarlos de forma exacta. Para definir con más precisión el gen o los genes a analizar, también se usa un método en el que la sonda del genoma completo del rotavirus está etiquetada con sustratos quimioluminiscentes. En este método el ARN a estudiar es separado por PAGE, transferido a un filtro de membrana, desnaturalizado y utilizado en hibridación de tipo Northern. Los ensayos de hibridación ARN-ARN definieron tres grupos de rotavirus, basados en la incapacidad de sus genomas para hibridar de forma cruzada, y que se llamaron genogrupos. Los primeros genogrupos identificados fueron Wa-like, DS-1-like y AU-1-like (Nakagomi et al. 1989).

Genotipado:

El genotipado puede realizarse mediante amplificación de productos de PCR específicos de genotipo para su análisis sobre un gel de agarosa, o para secuenciación y análisis de las secuencias. Si el objetivo es visualizar amplicones específicos de tipo en un gel se deben realizar dos fases: una primera fase de transcripción inversa y amplificación de un fragmento común a todos los genotipos, y una segunda fase en la que se utilizan primers específicos de genotipo y que dan lugar a los productos de amplificación específicos. La primera fase se hace en tres pasos: 1) desnaturalización del ARN de doble cadena, 2) transcripción inversa del ARN de doble cadena, y 3) amplificación del ADN

copias. La segunda fase consiste en una segunda amplificación con una PCR convencional utilizando primers específicos de varios genotipos posibles en la muestra juntos.

Secuenciación de genomas completos (Whole genome sequencing):

En los últimos tiempos las técnicas de secuenciación masiva han permitido obtener las secuencias de los genomas completos de muchas cepas de rotavirus. Con estas técnicas pueden estudiarse las características de cada cepa de una manera mucho más exacta.

9. Patogénesis

Los rotavirus infectan principalmente los enterocitos maduros de los extremos de las vellosidades intestinales de los animales, donde pueden producir vacuolización y pérdida del epitelio, seguido de hiperplasia de las criptas (Greenberg & Estes 2009).

La gastroenteritis por rotavirus va acompañada por una viremia sistémica, aunque generalmente con unos títulos mucho menores que en heces. Se desconoce sin embargo si esta viremia implica replicación de los rotavirus en otro tipo de células fuera del circuito intestinal, aunque se han encontrado virus en órganos tales como hígado y corazón. Las infecciones repetidas se dan en presencia de anticuerpos IgG, que impedirían la replicación del virus extraintestinalmente, aunque no en la mucosa intestinal. La cantidad de virus en sangre es mayor en niños de entre 6 y 23 meses. Este hecho puede deberse a la protección otorgada por anticuerpos maternos antes de los 6 meses de edad, y en anticuerpos desarrollados tras infecciones naturales a partir de los 2 años. Por otro lado, no se ha encontrado asociación entre la presencia de ARN del virus en la sangre y la gravedad de la clínica (Ray et al. 2006)(Blutt & Conner 2007)(Blutt et al. 2007).

En cambio, en hospedadores inmunocomprometidos los rotavirus pueden replicarse en el hígado, en el sistema biliar y en el páncreas, y pueden asociarse con atresia biliar y pancreatitis (Desselberger 2014).

Los factores del mecanismo productor de enfermedad son: malabsorción seguida de destrucción del epitelio, isquemia de las vellosidades, la acción de NSP4 como enterotoxina vírica, y la activación del sistema nervioso entérico. El análisis microscópico de las lesiones revela atrofia de las vellosidades intestinales con algunas fusiones de

vellosidades, e hiperplasia epitelial en las criptas. La necrosis de los enterocitos apicales es seguida de metaplasia escamosa y cuboidal mientras las lesiones se resuelven. Respecto de los vómitos, la infección de las células enterocromafines del intestino estimula la producción de serotonina que activa nervios vagales aferentes y estimula las estructuras cerebrales que controlan el vómito (Desselberger 2014).

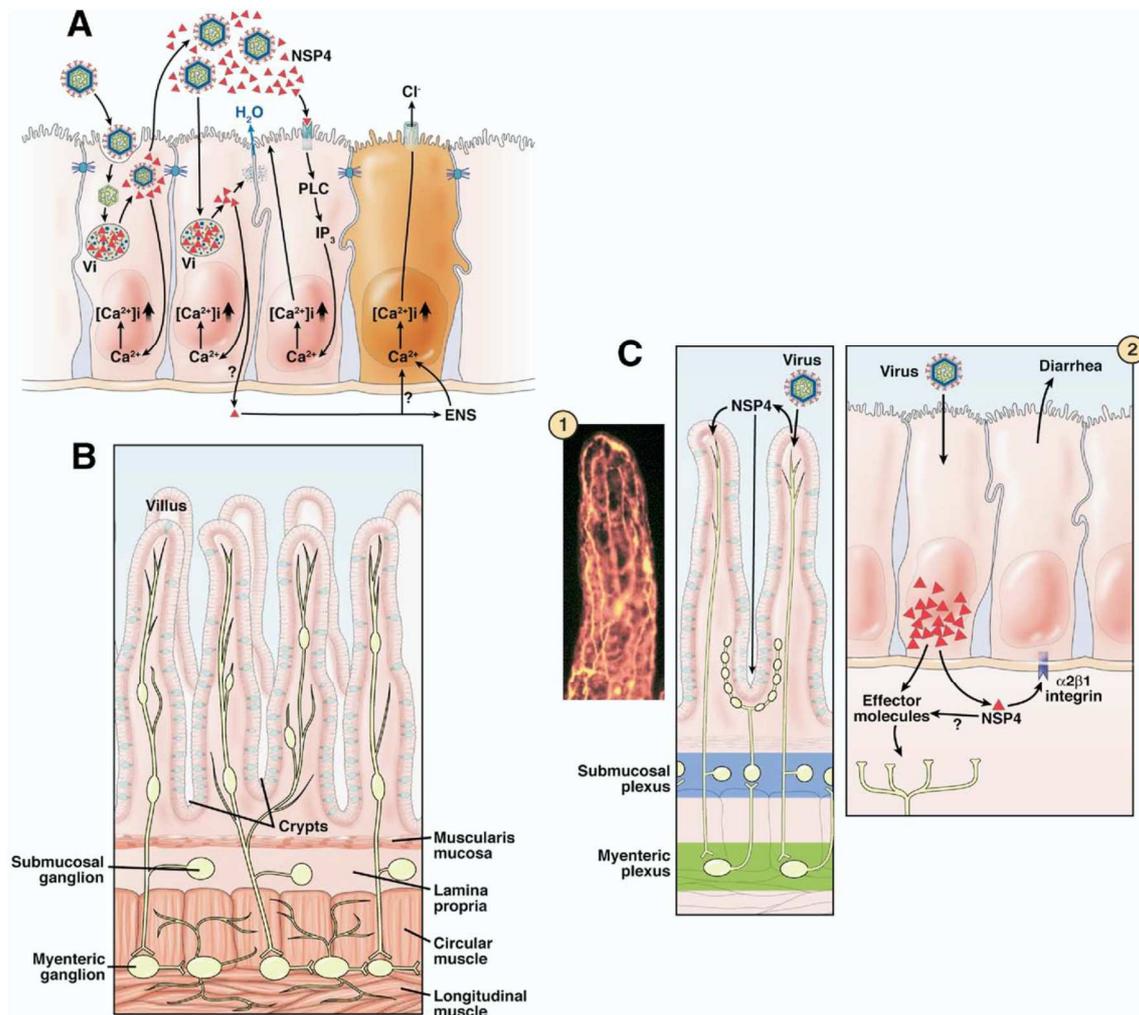


Figura 11: Mecanismo mediante los cuales los rotavirus causan diarrea (Greenberg & Estes 2009). A) Los eventos que suceden tras la infección de los enterocitos se muestran en orden de izquierda a derecha, aunque no todos los eventos se dan en todas las células. La infección de la célula inicial por un virus en el lumen da lugar a la entrada, eliminación de la capa exterior, transcripción, traducción de proteínas víricas, formación de viroplasm (Vi) y liberación apical de virus y proteínas víricas (los triángulos rojos son moléculas de NSP4) mediante una vía de secreción no clásica. NSP4 intracelular también induce la

liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, produciendo un aumento del Ca^{2+} intracelular. NSP4 liberado en el lumen debilita las uniones tight junctions permitiendo un flujo paracelular de agua y electrolitos (flecha azul). NSP4 liberado en el lumen puede unirse a un receptor específico y desencadenar una cascada de señales a través de la fosfolipasa C (PLC) y el inositol trifosfato (IP_3) que resulta en la liberación de Ca^{2+} y en el aumento del Ca^{2+} intracelular. La expresión de NSP4 también aumenta el Ca^{2+} intracelular a través de un mecanismo independiente de PLC. El incremento en Ca^{2+} intracelular también desorganiza el citoesqueleto. NSP4 puede actuar directamente sobre una célula de cripta, o NSP4 puede estimular el sistema nervioso entérico (ENS) que señala un aumento de Ca^{2+} intracelular, que a su vez induce la secreción de Cl^- . B) Arquitectura normal del intestino delgado, sin mostrar el sistema circulatorio. Se muestra el ENS y sus ganglios en los distintos niveles de la submucosa. C) Arco reflejo en el ENS que puede recibir señales del epitelio de las vellosidades y activar el epitelio de la cripta. En el inserto 1 puede verse la rica inervación en amarillo de una vellosidad intestinal de un ratón adulto. El inserto 2 muestra que los enterocitos infectados de la vellosidad pueden estimular el ENS mediante la liberación basolateral de NSP4 u otra molécula efectora. La integrina $\alpha 2\beta 1$ puede unirse al NSP4 y desarrollar diarrea en el ratón recién nacido.

Los mecanismos y la duración de la protección contra la infección por rotavirus no están completamente dilucidados, aunque se sospecha que la protección clínica implica una respuesta de anticuerpos desde la mucosa intestinal y sistémicos, así como inmunidad celular (M. Franco et al. 2006). Las evidencias apuntan a que los anticuerpos intestinales IgA producidos en el yeyuno son los mecanismos más importantes para la protección a largo plazo frente al rotavirus, y que la respuesta inmune depende, al menos parcialmente, de epítomos neutralizantes sobre las proteínas VP7 y VP4 de la cápsida (Ward 2009).

Tras la primera infección la respuesta de anticuerpos se dirige preferentemente contra el serotipo específico vírico, a través de una respuesta homotípica, mientras que se desarrolla una respuesta heterotípica más amplia a partir de la siguiente infección (M. A. Franco et al. 2006).

Algunos estudios asocian determinados genotipos con cuadros de gastroenteritis más severos, mientras que otros estudios encuentran resultados contradictorios o no encuentran asociación (Bahl et al. 2005).

10. Clínica del rotavirus.

Síntomas:

Las gastroenteritis por rotavirus pueden desencadenar un amplio espectro de síntomas en los niños pequeños, desde diarreas leves y fugaces, hasta gastroenteritis severas con fiebre concomitante. Las infecciones primarias incluyen con más frecuencia síntomas de gastroenteritis, mientras que las reinfecciones suelen pasar más inadvertidas, sin síntomas o con síntomas leves, y muy raramente dan lugar a hospitalizaciones (Velázquez 2009). Síntomas como los vómitos, diarrea o fiebre son los que se asocian con mayor frecuencia a deshidrataciones severas en algunos niños que requieren hospitalización (Uhnnoo et al. 1986).

La mayoría de las enfermedades por rotavirus son leves a moderadas, aunque en las edades desde el nacimiento hasta los tres años suelen observarse gastroenteritis severas que requieren hospitalización. Esta edad, por otro lado, es la edad en la que los niños son más sensibles a la deshidratación, y es la edad también en la que suelen darse las infecciones primarias (Van Damme et al. 2007)(Wildi-Runge et al. 2009).

El periodo de incubación de la enfermedad por rotavirus oscila entre los 1 y 2 días, y los síntomas suelen durar entre 3 y 8 días, aunque pueden llegar a permanecer dos o tres semanas en niños inicialmente sanos.

Complicaciones:

En algunos niños, las náuseas y los vómitos pueden hacer que sea imposible una adecuada rehidratación oral domiciliaria, lo que puede ocasionar una pérdida severa de fluidos con o sin el acompañamiento de descompensaciones electrolíticas. Hay que considerar que la deshidratación hipo-, iso- o hipertónica puede requerir tratamientos prolongados de rehidratación. Pueden producirse también convulsiones debidas a la fiebre o a los desequilibrios electrolíticos, encefalitis o meningitis, shock y posible muerte. A largo plazo algunos niños desarrollan diarrea crónica y, en localidades más desfavorecidas malnutrición.

En niños previamente sanos y bien nutridos que reciben rehidratación antes de desarrollar un shock, no quedan secuelas residuales tras una infección por rotavirus. Sin embargo, es primordial una asistencia sanitaria adecuada para evitar complicaciones.

Infecciones en niños inmunocomprometidos:

En general la infección por rotavirus no causa síntomas clínicos severos en pacientes moderadamente inmunocomprometidos, aunque sí se ha observado una excreción prolongada de virus (Oishi et al. 1991).

En cambio, en niños con inmunodeficiencias severas como inmunodeficiencia severa congénita, trasplante de órganos sólidos o de médula ósea, se pueden dar enfermedades por rotavirus severas, prolongadas e incluso fatales (Fischer 2008).

11. Epidemiología de la infección por rotavirus

La epidemiología de cada una de las especies de rotavirus es distinta. Los rotavirus A son los más prevalentes en la especie humana, aunque los rotavirus B, C y H también causan enfermedad en el ser humano (Martella et al. 2010). Las partículas víricas de los rotavirus son muy resistentes en el medio ambiente, lo que facilita la transmisión oral-fecal. Se han descrito brotes de origen alimentario muy raramente, por productos contaminados en origen, o por manipuladores infectados (Iturriza-Gomara & O'Brien 2016).

Tabla 5: Principales características de las infecciones por rotavirus en humanos (Martella et al. 2010).

Especie	RVA	RVB	RVC	RVH
Edad de infección	<5 años	Principalmente adultos	Todas las edades	Principalmente adultos
Seroprevalencia	Casi 100% a los 5 años	?	50-60% a los 60 años	?
Ocurrencia típica	Casos esporádicos (brotes en adultos)	Brotes (últimamente también en esporádicos)	Brotes y casos esporádicos	¿Brotes?
Geografía	Mundial	Este y sur de Asia	Mundial	Este y sur de Asia
Estacionalidad	Sí	?	?	?
Modo de transmisión típico	Fecal-oral ¿Aérea?	Agua	Fecal-oral ¿Alimentos?	?
Hospedador animal	Varios mamíferos y aves	Varios mamíferos	Varios mamíferos	Cerdos
Evidencia de transmisión zoonótica	Sí	No	Sí	Sí

Rotavirus A:

Se considera que todos los niños en el mundo habrán sido infectados por un rotavirus A a la edad de cinco años.

Las enfermedades diarreicas atribuidas a rotavirus A constituyen una gran proporción de la carga de enfermedad y muerte en niños menores de 5 años, especialmente en países en vías de desarrollo (Platts-Mills et al. 2015)(Tate et al. 2012). El número de muertes infantiles por rotavirus se ha reducido a la mitad, desde las 528.000 muertes en el año 2000 hasta las 215.000 en 2013 (Iturriza-Gómara & Cunliff 2017). Aunque el número de muertes ha disminuido, la distribución de esta mortalidad infantil sigue concentrándose en África y en Asia (Fig. 12).

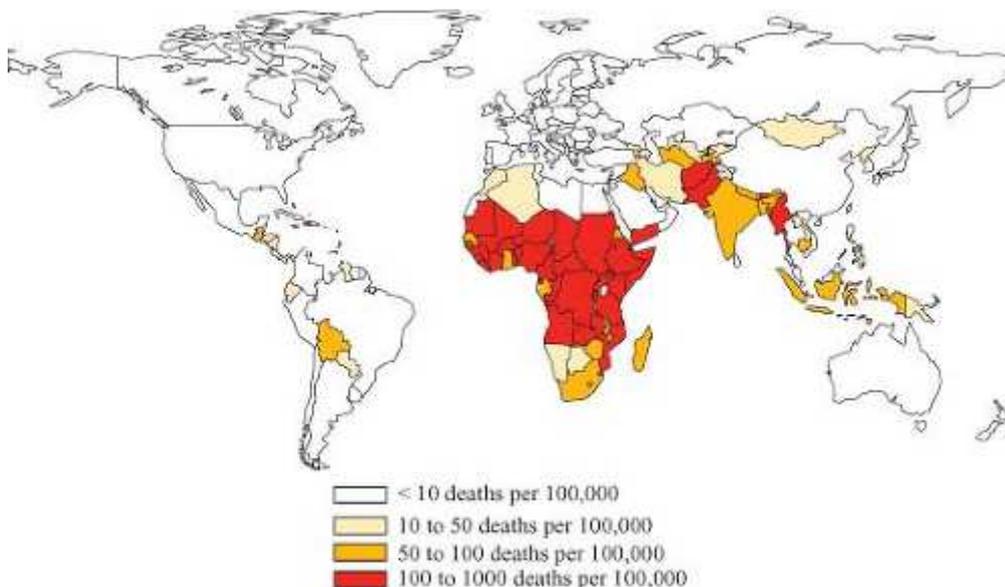


Figura 12: Distribución mundial de la mortalidad infantil producida por rotavirus (Tate et al. 2012).

Más del 80% de las muertes infantiles por rotavirus se producen en países en vías de desarrollo, donde las pobres condiciones higiénicas y sanitarias, la malnutrición y la alta prevalencia de coinfecciones que afectan de forma seria al sistema inmune, tienen un efecto negativo en la evolución de la enfermedad (Parashar et al. 2006).

A pesar de tener una mortalidad muy baja en países desarrollados, las infecciones por rotavirus conllevan una morbilidad significativa, con un gran impacto en los costes médicos totales (Gleizes et al. 2006).

La mayor carga de enfermedad se presenta en los niños de entre 0 y 3 años de edad, tal y como se puede observar en la figura 13, siendo la mayor prevalencia entre los niños de 6 y 23 meses (Gleizes et al. 2006).

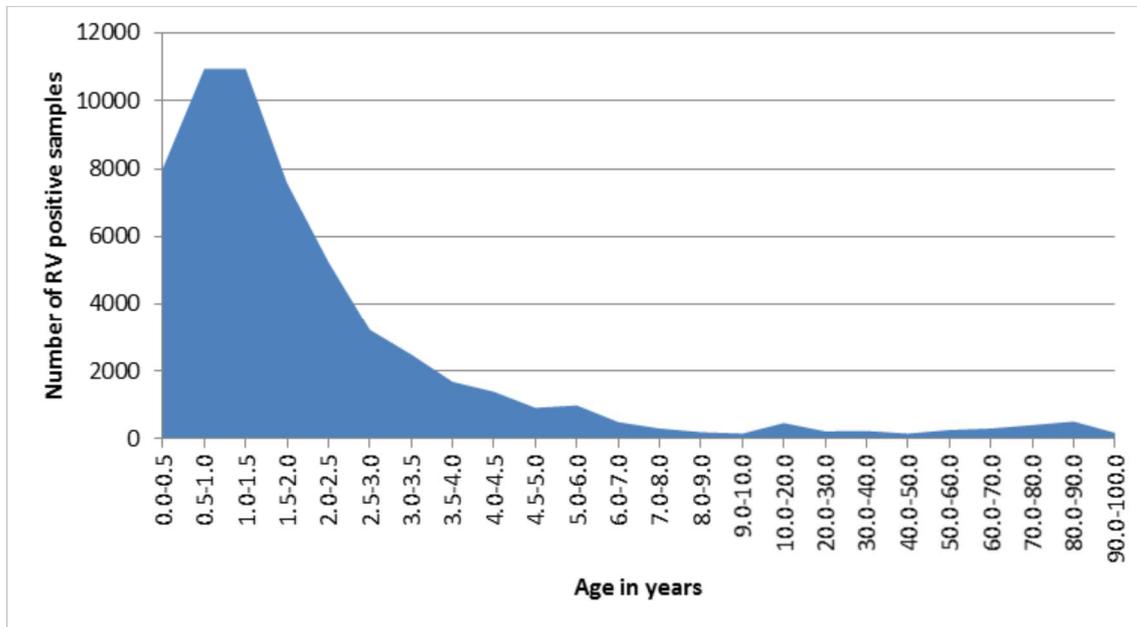


Figura 13: Número de muestras positivas a rotavirus por grupos de edad, analizadas por laboratorios de referencia de rotavirus de 16 países de la UE/EEA de 2006 a 2013, y notificadas a EuroRotaNet (EuroRotaNet n.d.).

Los brotes de gastroenteritis por rotavirus A, que son los más prevalentes en el ser humano, no presentan estacionalidad en los países tropicales, pero en los países templados presentan una estacionalidad muy marcada, presentándose con mayor frecuencia en invierno y primavera (Koopmans & Brown 1999).

Durante cada temporada, cepas con diferentes genotipos circulan entre la población simultáneamente, con distintas proporciones. Así, en un estudio sistemático de revisión de publicaciones sobre genotipado de poblaciones de rotavirus desde 1996 hasta 2007, se encontró que los genotipos G1, G2, G3, G4 y G9 constituyen un 88% de todas las cepas circulantes en los seres humanos en todo el mundo. Sin embargo, se observan grandes diferencias atendiendo a la localidad estudiada, así como a lo largo del tiempo. Las cepas encontradas en un localidad varían de una temporada a otra. Así, las cepas G1 disminuyeron desde el año 2000, mientras que las cepas G3 reemergieron, y las cepas G9 y G12 emergieron en el mismo período. En cambio, si se considera el peso de las

cepas que predominan en los países con una importante mortalidad por rotavirus, las cepas G1 y G9, que son más prevalentes en países desarrollados, pierden importancia en relación a las cepas G8, que predominan en países en vías de desarrollo como muchos países de África (Bányai et al. 2012).

Aunque los rotavirus infectan preferentemente una determinada especie de animal para la cual se definen como homólogos, pueden llegar a ser heterólogos e infectar a otras especies. Estudios en el conejo y en el ratón han demostrado que por lo general sólo los virus homólogos se replican de manera eficiente y se transmiten horizontalmente (Ciarlet et al. 2000)(Feng et al. 1994). Pero por otro lado, también se ha observado que bajo condiciones experimentales cepas heterólogas de rotavirus han podido infectar e incluso causar diarrea en modelos animales (Kapikian et al. 2001). Además, los análisis de hibridación ARN-ARN y los estudios de secuenciación del genoma completo de cepas salvajes humanas y animales han mostrado varios ejemplos de transmisión entre especies en condiciones naturales (Tsugawa & Hoshino 2008)(Matthijnssens et al. 2006).

Con gran frecuencia se dan infecciones nosocomiales en hospitales. La mayor carga de las infecciones nosocomiales por distintos patógenos ocurre en la población adulta, donde las infecciones no víricas representan la gran mayoría (85-95%) de todas las infecciones. El tracto urinario asociado en un 80% de veces con la presencia de un catéter, el tracto respiratorio, y los sitios de intervención quirúrgica son los lugares predominantes de infección, mientras que las infecciones gastrointestinales son menos comunes (Lizioli et al. 2003). Los agentes aislados con más frecuencia son bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.) y Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp), mientras que los hongos (*Candida* spp y *Aspergillus* spp.) tiene también un papel significativo en algunas localizaciones (Trick et al. 2002).

En cambio, entre la población infantil son las infecciones de los tractos gastrointestinal y respiratorio (alto y bajo) las dos localizaciones de infección nosocomial más frecuentes, constituyendo hasta un 65-90% de todas las infecciones pediátricas adquiridas en el hospital, y siendo las primeras las más prevalentes (Urrea et al. 2003). Por otro lado, las infecciones víricas nosocomiales se dan principalmente en la población

infantil, constituyendo hasta un 91-94% de todas las causas de diarrea pediátrica nosocomial, y siendo el rotavirus el mayor agente causal, en un 31-87% de los casos, aunque no hay que despreciar el dato de que el papel de otros virus como norovirus, astrovirus y adenovirus ha sido infraestimado hasta hace relativamente poco tiempo como consecuencia de unas técnicas más limitadas en cuanto a sensibilidad y dificultad de manejo. Por ejemplo, los norovirus se han identificado en el 17-46% de las causas de diarrea nosocomial en los estudios en los que se han buscado estos virus. Las infecciones nosocomiales por rotavirus están principalmente asociadas con niños de entre 0 y 5 meses de edad, que es una edad más temprana que a la que suelen darse las infecciones de transmisión comunitaria (Gleizes et al. 2006)(Pacini et al. 1987)(Noone & Banatvala 1983)(McIver et al. 2001).

Los niños que acuden a los servicios de urgencia o son hospitalizados con enfermedad por rotavirus tienen el potencial de convertirse en fuente de infecciones nosocomiales (Dennehy & Peter 1985), y factores como la disponibilidad de agua en la habitación del niño, o la cercanía del mostrador de enfermería o de la sala de juegos pueden jugar un determinado papel en la frecuencia de estas infecciones (Le Roux et al. 2004).

Las infecciones nosocomiales asintomáticas son más frecuentes en neonatos y en niños menores de 3 meses, constituyendo entre un 18 y un 39% de todos los casos, considerándose como posibles causas cepas específicas adaptadas a su circulación en determinados ambientes (cepas de guardería) o a la presencia transitoria de anticuerpos maternos (Gianino et al. 2002)(Ringenberg et al. 1989).

En algunos estudios se ha encontrado que hasta un 7% de los niños ingresados en la unidad de lactantes sin síntomas de gastroenteritis excretan rotavirus en sus heces, lo que puede constituir una fuente considerable de contagio para el resto de niños no infectados (Román Riechmann et al. 2004).

El principal mecanismo de transmisión nosocomial del rotavirus es por contacto, a través de la vía oral-fecal directa o indirecta. Por su estructura física el rotavirus es bastante resistente en el medio ambiente, su dosis infectiva es muy baja, y los viriones son excretados en grandes cantidades en las heces de los niños infectados, lo que hace que el rotavirus sea altamente contagioso. Otras vías de transmisión descritas son mediante

el vómito, y se ha sugerido la transmisión aérea respirando pequeñas gotas infectadas, aunque sigue siendo motivo de controversia. Esta transmisión aérea en cambio explicaría la incapacidad de probar la transmisión oral-fecal en algunos brotes de gastroenteritis por rotavirus (Gleizes et al. 2006)(Parashar et al. 1998)(Zheng et al. 1991).

Los principales vehículos de transmisión son los trabajadores asistenciales, la mayoría de ellos no infectados. Se han encontrado rotavirus en las manos del 76-78% de los trabajadores asistenciales que cuidan niños con gastroenteritis por rotavirus adquirida en la comunidad, y también en el 20% de los trabajadores asistenciales que no atienden a niños (Cone et al. 1988)(Barnes et al. 2003).

Se ha demostrado una prolongada excreción de rotavirus en las heces de más de 10 días en niños inmunocompetentes tras gastroenteritis severas (Richardson et al. 1998).

Rotavirus B:

En 1980 se produjo una gran epidemia de gastroenteritis por rotavirus B vehiculizada por agua con más de un millón de personas afectadas, principalmente adultos (Hung et al. 1984), mientras que se han identificado casos esporádicos con posterioridad que parecen ser de cepas diferentes, lo que sugiere que distintas cepas de rotavirus B circulan o pueden infectar al ser humano (Ahmed et al. 2004)(Kelkar & Zade 2004).

Rotavirus C:

Se consideran endémicos en muchas partes del mundo, y causan menos del 5% de las hospitalizaciones infantiles por gastroenteritis (Bányai et al. 2006). Sin embargo, los rotavirus C también causan brotes asociados con la consumición de alimentos o agua contaminados. La limitada variabilidad genética de los rotavirus C en los humanos contrasta con la diversidad observada en cerdos, y no está claro si esa pequeña variabilidad es por una reciente adquisición desde una cepa porcina, o si se debe a restricciones genéticas contra la diversificación (Martella et al. 2007). De todas formas, está claro que las barreras entre especies son a veces traspasadas por los rotavirus tal y

como se observó en una cepa porcina encontrada en un niño brasileño (Gabbay et al. 2008).

Rotavirus H:

Aún no se ha identificado el origen de la cepa ADRV-N identificada en un brote de diarrea en China y de un caso esporádico en Bangladesh (Alam et al. 2007).

12. Tratamiento y prevención

Al igual que ocurre con otros virus desnudos como son los rinovirus, los rotavirus pueden mantenerse infecciosos durante varias horas en las manos o en superficies inanimadas. De esta manera, una gran variedad de superficies animadas (manos principalmente) e inanimadas (plástico, cristal o acero, por poner algunos ejemplos) en los servicios asistenciales pueden actuar como donantes y receptores de rotavirus (Ansari et al. 1988).

Se sabe que pueden excretarse hasta 10^{11} partículas víricas por gramo de heces (Flewett & Woode 1978) y se ha demostrado que al menos 1 de cada 4×10^4 de esas partículas es infecciosa para cultivos celulares (Graham et al. 1987)(Ward et al. 1986).

También se sabe que la dosis mínima infectiva es de 1 unidad infectiva para cultivo celular (Ward et al. 1984).

En un estudio se comprobó que los niños se chupan los dedos y ponen juguetes y otros objetos en sus bocas con una frecuencia media de una vez cada 2 ó 3 minutos (Black et al. 1981).

Una vez identificado un caso, éste debe ser inmediatamente aislado. En época epidémica, la aparición de vómitos proyectados o diarrea debe ser suficiente para un diagnóstico presuntivo, mientras llegan los resultados de laboratorio. Las medidas de prevención entéricas y la atención en una limpieza ambiental profunda de superficies con hipoclorito o biocidas virucidas autorizados para virus desnudos, son esenciales para la contención. Las ropas de cama y toallas y otros materiales textiles que puedan estar contaminados deben rápidamente gestionados, y productos perecederos expuestos como alimentos o toallitas deben ser eliminados (Caul 1994).

Una clave para la contención es la “inmovilización” del paciente sintomático para evitar la posibilidad de diseminación adicional. Los antieméticos intramusculares rápidamente frenan los vómitos, disminuyen la deshidratación y actúan como sedantes, reduciendo la movilidad del paciente. El personal de enfermería tendrá un riesgo especial de contagio.

Al ser tan frecuentes los brotes nosocomiales por rotavirus se debe instaurar una política de descontaminación ambiental continua.

La medida más fácil de aplicar es eliminar la dispersión del virus a otras áreas. Se debe imponer una restricción total a todo movimiento del personal de un área afectada a otra, especialmente a habitaciones comunales como salas de juegos. En caso de que esta medida no se imponga inmediatamente el virus se diseminará rápidamente. El movimiento del paciente debe ser también restringido a no ser que sea clínicamente imperativo. Debido a un alto índice de infecciones en el personal que trabaja en un área afectada, un trabajador con síntomas debería quedar confinado en esa zona, y si los síntomas aparecen trabajando en otra zona, debería quedarse en casa hasta su recuperación completa.

Estas medidas estrictas pueden evitar brotes que causen el cierre de algunas zonas del hospital.

Aunque prometedora en un principio, no existe evidencia que apoye el uso de la terapia oral con gammaglobulinas anti-rotavirus en niños nacidos con bajo peso para la prevención de la infección precoz (Barnes et al. 1982)(Pammi & Haque 2011).

13. Vacunas

La gran carga de enfermedad que supone la infección por rotavirus en el mundo en seguida hizo que la OMS apoyara iniciativas para el desarrollo de vacunas contra la enfermedad. Los primeros estudios longitudinales mostraron que una vacuna oral viva administrada a niños durante los primeros meses de vida podía ser efectiva. El primer estudio se basó en la selección y vigilancia longitudinal de bebés ingresados en el Royal Women’s Hospital de Melbourne, donde una cepa inusual de rotavirus era endémica. Los niños seleccionados fueron vigilados clínica y serológicamente durante sus 3

primeros años de vida, comprobándose que los niños infectados siendo neonatos no quedaban protegidos de reinfecciones futuras, aunque sí quedaban protegidos de síntomas de diarrea severa durante las reinfecciones (Bishop et al. 1983). Estudios intensivos sobre rotavirus humanos y animales adaptados a cultivos celulares proporcionaron las bases para el diseño de vacunas. Así, desde 1983 se han ensayado varias vacunas candidatas. En la tabla 6 se detallan las vacunas contra el rotavirus que han existido hasta la fecha en el mundo. Las estrategias adoptadas han sido principalmente dos: las vacunas de primera generación, que utilizaba cepas de rotavirus animales naturalmente poco virulentas en el ser humano; y las de segunda generación, que o bien utilizan una cepa humana representativa de un serotipo común, y atenuada mediante múltiples pases “in vitro”, o bien están basadas en cepas reagrupadas humanas y animales, donde en una cepa animal se cambia algún segmento génico de VP7 o VP4 por uno de origen humano (Jiang et al. 2010).

Tabla 6: Desarrollo de vacunas contra el rotavirus (Bishop R. 2009).

Año	Nombre de la vacuna	Cepas incluidas	Laboratorio comercializador	País desarrollador
1983	RIT 4237	Cepa única bovina G6P6	No se comercializó	Estados Unidos
1986	RRV-MMU	Cepa única de monos G3	No se comercializó	Estados Unidos
1991	TRRV (Rotashield®)	Cepas reagrupadas humanas y de monos G1, G2, G3, G4, p3	Wyeth-Lederle	Estados Unidos
1999	Rotarix®	Cepa única humana G1P[8]	Glaxo-Smithkline	Reino Unido
2000	RotaTeq®	Cepas reagrupadas humanas y bovinas G1, G2, G3, G4, P[8]	Merck	Estados Unidos
2000	Lanzhou lamb rotavirus vaccine	Cepas reagrupadas humanas y de cordero G10P[12], G1, G2, G3, G4	Lanzhou Biologicals	China
2012	Rotavin-M1	Cepa única humana G1P[8]	POLYVAC	Vietnam

2014	Rotavac®	Cepa única naturalmente reagrupada humana y bovina G9P[11]	Bharat Biotech	India
2017	ROTASIIL®	Cepas humanas y G1, G2, G3, G4 y G9	reagrupadas y bovinas (aún no comercializada)	Serum Institute of India Pvt Ltd India

Las vacunas con una sola cepa animal (RIT, RRV) mostraron una protección limitada contra la diversidad de serotipos humanos, por lo que se adoptó la estrategia de cepas reagrupadas animales y humanas. Las cepas únicas humanas son capaces de otorgar protección contra diversos serotipos humanos tal y como han demostrado algunos estudios longitudinales (Patel & Parashar 2009)(Gorrell & Bishop 1999)(Velázquez et al. 1996). La vacuna tetravalente TRRV demostró ser muy efectiva, y fue aprobada para su comercialización siendo ampliamente usada en Estados Unidos. Esta vacuna fue sin embargo retirada del mercado tras la farmacovigilancia post-comercialización, al asociarse con un riesgo aumentado de invaginaciones intestinales (MMWR 1999)(Delage 2000).

Hoy en día, las dos vacunas autorizadas para su comercialización en el mundo son Rotarix®, que contiene una sola cepa humana G1P[8], y Rotateq®, que contiene cinco cepas reagrupadas bovino-humanas, y que incluye los genotipos G1, G2, G3, G4 y P1[8]. Alrededor del 90% de los genotipos que circulan por el mundo pertenecen a alguno de los que están incluidos en estas vacunas y además, ambas parecen presentar una amplia capacidad de protección cruzada contra genotipos no incluidos en la formulación de las mismas. Por esta razón no parece necesario que las vacunas tengan que incluir todos los genotipos existentes para ser altamente efectivas. Sin embargo, hasta que se disponga de datos concluyentes que demuestren que las vacunas protegen contra una amplia variedad de cepas, y teniendo en consideración que aquéllas pueden ejercer algún tipo de presión selectiva sobre éstas, es importante disponer de una imagen de los tipos circulantes antes de la introducción de las vacunas, para detectar cambios una vez introducidas (Bányai et al. 2012).

En amplios estudios con placebo ambas vacunas han mostrado una eficacia del 90% en reducir los ingresos hospitalarios y las visitas a los servicios de urgencias, debidas a gastroenteritis agudas por rotavirus y una eficacia del 70% contra gastroenteritis por rotavirus de cualquier severidad (Ruiz-Palacios et al. 2006)(Vesikari et al. 2006). Las vacunas también se han asociado con una disminución en gastroenteritis por otras causas, y en protección indirecta de hermanos mayores no vacunados (Cortese et al. 2015).

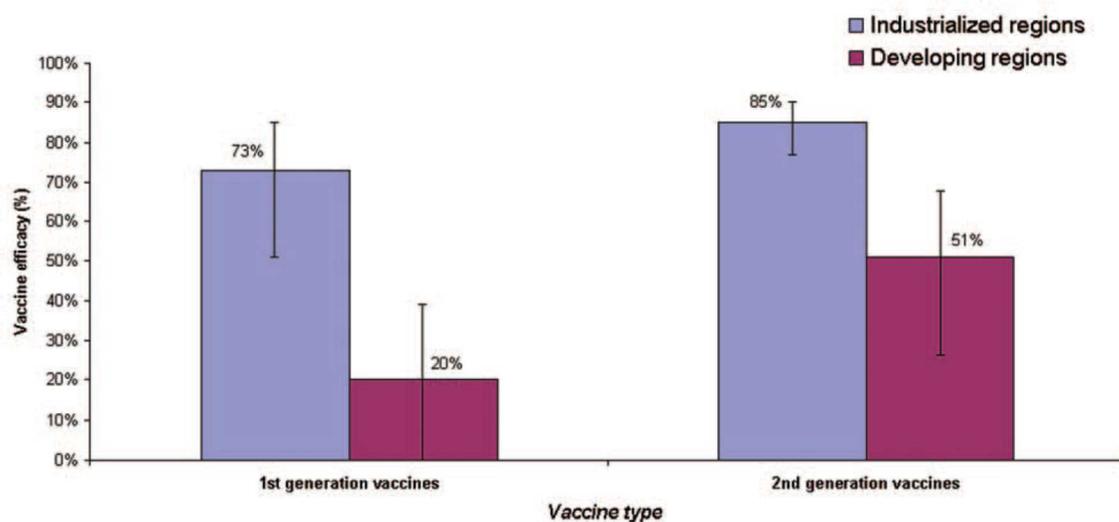


Figura 14: Estimaciones acumuladas de eficacia frente a la enfermedad severa por rotavirus según el nivel de desarrollo del país, para las vacunas de primera y segunda generación (Jiang et al. 2010)

La inmunogenicidad y la efectividad de las vacunas actualmente disponibles es menor en los países en desarrollo (Fig. 14) que la observada en los estudios hechos en Norteamérica, Europa o Suramérica (Soares-Weiser et al. 2012). Los estudios realizados en África subsahariana y en Asia muestran una efectividad del 40-50%, muy por debajo de la observada en las otras localizaciones (Asmah et al. 2001)(Zaman et al. 2010)(Madhi et al. 2016). Actualmente se está estudiando a qué se debe esta diferente eficacia según la localización geográfica a través del Estudio de Aplicación de las Vacunas del Rotavirus y de la Polio Oral en países en desarrollo. En este estudio de cohortes de nacimientos en varias localizaciones se barajan varias hipótesis que pueden afectar a esta

inmunogenicidad disminuida, como es la presencia de otras enteropatías, la malnutrición, o efectos de distinta microbiota intestinal (Kirkpatrick et al. 2015).

Las vacunas contra el rotavirus han ido incluyéndose en los calendarios vacunales oficiales de muchos países desde su aparición en el mercado en 2006. Desde entonces, 88 países tanto del mundo desarrollado como de países en vías de desarrollo administran alguna de las dos vacunas aprobadas en sus niños. Otros 26 países tienen planeada su introducción antes del año 2020. En el 71% de los países donde la vacuna contra el rotavirus está incluida en el calendario vacunal la vacuna aplicada es la vacuna monovalente Rotarix[®], mientras que la vacuna pentavalente Rotateq[®] se aplica en el 19% de los mismos. En un 8% de los países ambas vacunas se aplican y están disponibles para su uso desde las instituciones sanitarias. En Europa varios países vacunan rutinariamente contra el rotavirus, como Reino Unido, Alemania, Bélgica, Austria y otros (International Vaccine Access Center 2017).

En España se autorizó la comercialización de Rotarix el 8 de marzo de 2006, y la de Rotateq el 12 de julio del mismo año, pero la vacuna contra el rotavirus no está incluida en el calendario vacunal oficial, y no está prevista su inclusión antes de 2020, aunque la Asociación Española de Pediatría la recomienda como vacuna no financiada por el Sistema Nacional de Salud (Moreno-Pérez et al. 2017).

La OMS ha declarado que las vacunas contra el rotavirus son una medida importante en la reducción de las diarreas severas y la mortalidad asociadas a este virus, y el consiguiente impacto en los recursos sanitarios (World Health Organization 2009b), y ha recomendado su introducción en los calendarios vacunales de todos los países (World Health Organization 2013).

Las invaginaciones intestinales (“intussusception” en inglés) son la causa más común de obstrucción intestinal en niños (Heller & Hernanz-Schulman 1999), y se asocian con hipertrofia de las placas de Peyer y con linfadenopatía mesentérica (Fig. 15). Las invaginaciones intestinales son idiopáticas en la gran mayoría de los casos, aunque aproximadamente un 50% de los niños excretan virus con las heces, principalmente adenovirus, enterovirus y citomegalovirus (Murphy et al. 2001). Aunque se asoció una mayor probabilidad de sufrir una invaginación intestinal tras la administración de

Rotashield®, lo que provocó su retirada del mercado, no ha ocurrido lo mismo con las dos vacunas actualmente recomendadas por la OMS, Rotarix® y Rotateq®, en las que no se ha demostrado asociación con esta patología.

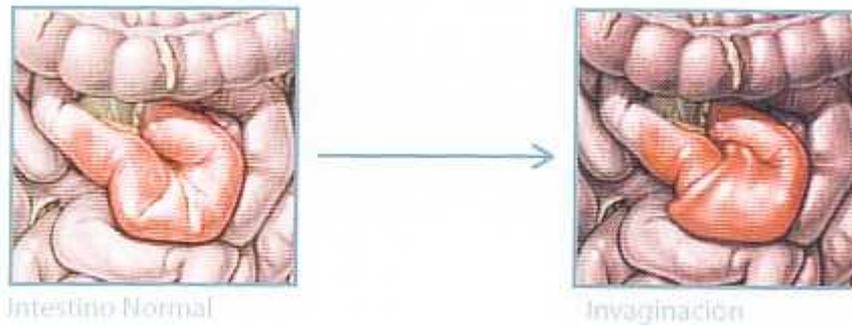


Figura 15: Descripción de un intestino delgado sano (izquierda) y uno con una invaginación intestinal (derecha).

Un campo de estudio es por qué las vacunas causan enfermedad a algunos niños. Las vacunas están compuestas por cepas de rotavirus que constituyen cuasiespecies, con un determinado porcentaje de viriones con variaciones genéticas puntuales. ¿Es posible que alguno de los viriones pueda causar enfermedad?

Se han detectado cambios en la frecuencia de genotipos detectados en un país tras la introducción de la vacuna, como por ejemplo el aumento de la proporción de genotipos G2P4, o G9P8 (Adlhoch et al. 2013)(Tanaka et al. 2017).

Se ha descrito un mayor fallo vacunal en niños exclusivamente alimentados con leche materna (Adlhoch et al. 2013), apoyando la hipótesis de que los anticuerpos anti-rotavirus en la leche materna puede neutralizar las partículas infecciosas de la vacuna, si el niño es amamantado poco antes o poco después de administrarla (Moon et al. 2010).

Un problema de las vacunas comercializadas en la actualidad es que necesitan mantenerse bajo la cadena del frío para asegurar su efectividad, y la OMS ha resaltado los factores necesarios para mantener estas condiciones (World Health Organization 2006). Rotarix® y Rotateq® tienen que conservarse y distribuirse a una temperatura de entre 2 y 8 °C (GSK 2017)(Merck 2017), mientras que ROTAVAC® y Rotavin necesitan unas temperaturas de conservación y distribución de al menos -20°C. La primera vacuna

que se comercializó en el mundo, Rotashield®, indicaba que era estable por debajo de 25°C durante al menos 24 meses, pero esta vacuna ya no se comercializa (CDC 1999). Otra vacuna comercializada desde el año 2000 en China, la vacuna de rotavirus de cordero de Lanzhou, carece de información pública sobre estabilidad y conservación. Para superar este inconveniente especialmente negativo en los países en vías de desarrollo donde la mortalidad por rotavirus es más alta, y donde es más difícil mantener la cadena del frío, el Serum Institute of India Pvt Ltd está desarrollando una vacuna termoestable.

Esta nueva vacuna actualmente en desarrollo, llamada ROTASIL®, contiene cinco cepas reagrupadas humanas y bovinas, con los genotipos G1, G2, G3, G4 y G9 (Naik et al. 2017).

14. Microbioma y viroma

El microbioma intestinal humano tiene un papel en el control de varias funciones metabólicas y fisiológicas como el uso de nutrientes, la síntesis de vitaminas, así como el diseño, desarrollo y maduración del intestino y del sistema inmunológico (LeBlanc et al. 2013)(Hooper et al. 2012)(Nicholson et al. 2012)(Atarashi & Honda 2011). La fracción vírica de este microbioma es llamada viroma humano (Wylie et al. 2012). Los estudios con animales gnotobióticos, es decir, que se crían en condiciones de esterilidad ambiental desde su concepción y que no poseen microbiota, están ayudando a dilucidar los mecanismos mediante los cuales esta microbiota moldea el sistema inmune y sus respuestas (Slack et al. 2009). Se sospecha que la microbiota intestinal puede influir en la respuesta inmune a las vacunas. En este sentido se ha descrito recientemente el papel de la microbiota en la efectividad vacuna contra la gripe (Oh et al. 2014) y también se ha encontrado una correlación entre la composición del microbioma y la efectividad de la vacuna contra el rotavirus (Harris et al. 2017). Se ha descrito por otro lado que la microbiota intestinal influye en la replicación vírica intestinal en ratones (Kuss et al. 2011). Las vacunas orales vivas atenuadas necesitan replicarse en el tracto intestinal y por tanto la microbiota intestinal puede, directa o indirectamente, influir en la replicación de la cepa vacunal, afectando así a la respuesta inmune (Iturriza-Gómara & Cunliff 2017). Por otro lado, también se ha propuesto que los anticuerpos transferidos

a los niños por la leche materna pueden ser otra de las causas que expliquen esa baja efectividad de las vacunas contra el rotavirus en los países en desarrollo con una alta exposición al virus. Para dilucidar el impacto de la microbiota infantil y de los anticuerpos maternos en la inmunogenicidad de las vacunas contra el rotavirus se ha puesto en marcha un proyecto que espera publicar sus resultados en 2018 (Sindhu et al. 2017). Pero hay otro aspecto a considerar, y es que no solo la microbiota puede afectar a la efectividad de la vacuna, sino que hay que tener en cuenta que la propia vacuna puede ser parte del viroma humano, y puede tener una función útil para el hospedador (Virgin et al. 2009). Un reciente estudio ha encontrado asociación entre factores genéticos del hospedador, la microbiota intestinal y la susceptibilidad a determinadas infecciones víricas en el ser humano (Rodríguez-Díaz et al. 2017). Estudios en pollos han puesto de manifiesto que existe una gran diversidad de virus intestinales de ARN circulando en animales sanos, tanto jóvenes como adultos, y que esta circulación más que una excepción es la norma (Shah et al. 2016). También se ha encontrado que los rotavirus se encuentran con considerable frecuencia en los nódulos linfáticos mesentéricos de terneras y vacas adultas sanas, incluso en ausencia de virus en el epitelio intestinal (Mitake et al. 2015).

III- MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Para el presente estudio se utilizaron 4.694 muestras clínicas pertenecientes a 3.922 pacientes, que fueron remitidas al Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca durante un período de cuatro años, desde el 1 de enero de 2010 hasta el 31 de diciembre de 2013. Este centro es el hospital de referencia del Área I de salud de la Región de Murcia, y cubre a una población de más de 250.000 personas residentes en los municipios de Alcantarilla, Alhama de Murcia, Librilla, Mula y 10 de las 23 zonas básicas de salud que constituyen el municipio más poblado de la región, el municipio de Murcia. Este hospital, el más importante de la Comunidad Autónoma, también es centro de referencia para varias patologías a nivel regional, y atiende a población de cualquier procedencia en el servicio de urgencias. La población de niños menores de 5 años en el área I de salud en los distintos años de estudio fue la descrita en la tabla 7.

Tabla 7: Número de niños menores de 5 años censados en el área I de salud del sistema sanitario asistencial de la Región de Murcia, desde 2010 hasta 2013. Fuente: Dirección General de Planificación, Ordenación Sanitaria y Farmacéutica, e Investigación de la Región de Murcia.

Área I de salud	2010	2011	2012	2013
Niños <5 años	16.414	16.463	15.927	15.382

Este estudio se realizó dentro de un contexto asistencial, dado que no existe un programa de vigilancia de la carga de la gastroenteritis por rotavirus en niños en nuestra comunidad. Cuando fue posible por motivos fisiológicos, se tomó una muestra de heces a los pacientes diagnosticados con gastroenteritis en el hospital o en atención primaria en el área de salud, que se envió al Laboratorio de Microbiología para identificación de rotavirus.

Toma de muestras

Las muestras consistieron en al menos 1-2 mL ó 1-2 g de heces en duquesitas estériles de 125 mL de capacidad. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a menos de 4°C

un máximo de 72 horas hasta su análisis. Todas las muestras se sometieron a un ensayo de detección de antígeno de rotavirus A y adenovirus mediante inmuno-cromatografía con el test rápido VIKIA® Rota-Adeno. Todas las muestras positivas a antígeno de rotavirus A recogidas en 2012, así como aquellas procedentes de pacientes recogidas de 2010 a 2013 que habían recibido al menos una dosis de vacunas contra el rotavirus con anterioridad, se prepararon en suspensión al 10% en agua y se congelaron a -60°C para someterlas a un ensayo de genotipado posterior.

Análisis estadístico

Se comenzó haciendo un análisis descriptivo univariante para cada una de las variables a través de representaciones gráficas y tablas de frecuencia. Para el estudio de asociación entre ellas se realizó un análisis bivariado a través de tablas de contingencia y la prueba χ^2 . En aquellos casos donde no se cumplieron los supuestos para realizar esta prueba únicamente se mostraron análisis descriptivos. Para el estudio de asociación entre la severidad de las gastroenteritis por rotavirus y el mes de ocurrencia, el sexo y la edad del paciente, la procedencia de la muestra y el genotipo del virus se utilizó un análisis multivariante mediante modelos de regresión logística. Se consideraron 3 modelos: el modelo 1 incluyó mes, sexo y edad; el modelo 2 incluyó al modelo 1 más la procedencia; y el modelo 3 incluyó el modelo 2 más el genotipo. La bondad de ajuste se midió a través del test de χ^2 . La significación estadística se estableció en 0.05. El análisis estadístico se realizó con los programas SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago IL) y Stata versión 14 (StataCorp, College Station TX) para Windows.

1. Incidencia de gastroenteritis por rotavirus entre 2010-2013

1.1. Recogida de información sobre fecha de recogida de la muestra, edad y sexo del paciente

Cada una de las muestras fue recogida anotando junto a su código de identificación la fecha de recogida de la misma, así como la edad y el sexo del paciente.

1.2. Detección de antígeno de rotavirus A en heces mediante el test rápido VIKIA® Rota-Adeno (Biomérieux, Francia)

1.2.1. Fundamento

Se trata de una prueba cualitativa basada en la asociación de anticuerpos monoclonales específicos anti-rotavirus, aunque el kit también contiene anticuerpos anti-adenovirus para la detección de estos otros virus. Esta prueba se basa en un sistema de reacciones inmunológicas realizadas sobre una membrana por migración (formato inmunocromatografía o flujo lateral). Primero se hace reaccionar la muestra con anticuerpos monoclonales anti-VP6 de rotavirus A unidos a microesferas azules. Si la muestra contiene estos antígenos se forman complejos con los anticuerpos unidos a las microesferas. A continuación, se deposita el medio de reacción en la membrana de inmunocromatografía, que también tiene fijados anticuerpos anti-VP6 de rotavirus A formando una banda transversal. Al migrar a lo largo de la membrana, los rotavirus que tienen unidos los anticuerpos con microesferas azules se conjugan con los anticuerpos fijados en la banda, observándose una banda de color azul.

1.2.2. Realización del ensayo

Tras dejar que la muestra se atempere a temperatura ambiente (15-30°C) se recogen 50 mg de heces con la varilla contenida en el kit si éstas son sólidas. En caso de heces líquidas se precisan 2 gotas o 50 µL. Las heces así recogidas se transfieren a un tubo que contiene un tampón de dilución con los anticuerpos anti-VP6 de rotavirus A unidos a las microesferas. Se homogeniza agitando energicamente, y se invierte el frasco para depositar 2 gotas (unos 80 µL) de la muestra diluida en el pocillo del soporte con la membrana. El resultado deberá leerse después de 10 minutos.

1.2.3. Controles de calidad

La prueba incluye un sistema de control interno de migración representado por la línea coloreada que aparece en la zona de control (C). Esta línea confirma que la prueba ha sido realizada de forma correcta y con un volumen de muestra suficiente. Si la línea de control no aparece, la prueba no es válida. La intensidad de las líneas en la zona de prueba R o A puede variar según las concentraciones de rotavirus y/o adenovirus presentes en la muestra, pero esta determinación cualitativa en ningún caso puede indicar la cantidad de virus presentes. En otros test similares, como bioNexia® Rota-

Adeno (Biomerieux, Francia) se ha encontrado un porcentaje de concordancia de positivos con respecto a RT-PCR del 89,9%, y de negativos del 97,3%.

1.2.4. Interpretación de resultados

La prueba se considera positiva para rotavirus A cuando aparecen dos líneas distintas, una en la zona de control (C), y una línea azul en la zona de prueba R. Si además de la línea en C se presenta una línea rosa en la zona de prueba A, independientemente de que también esté presente la línea azul en R, la prueba será positiva para adenovirus. La prueba será negativa para rotavirus cuando aparezca la línea en C pero no azul en R.

2. Características clínico-epidemiológicas de las gastroenteritis por rotavirus durante 2012

2.1. Recogida de información clínico-epidemiológica de los casos de gastroenteritis positivos a antígeno de rotavirus A

Se estudiaron las historias clínicas de los 220 pacientes diagnosticados de gastroenteritis en 2012, con test rápido VIKIA® Rota-Adeno positivo a rotavirus.

2.1.1. Origen de la infección

Los casos se clasificaron en función de si el origen de la infección fue en la comunidad o en el hospital. Para esta clasificación se averiguó en la historia clínica si el paciente había llegado ya enfermo de gastroenteritis al hospital, considerándose entonces una infección de adquisición comunitaria. Si por el contrario el paciente había ingresado en el hospital por otra causa distinta de gastroenteritis y comenzó a desarrollar síntomas a partir de las 48 horas de su ingreso, o hasta las 72 horas del alta, la infección se consideró de adquisición nosocomial (Gervasi et al. 2016).

2.1.2. Procedencia de las muestras en los casos comunitarios

Se tomaron los datos de procedencia de las muestras de los casos. La mayoría de las muestras procedían del servicio de urgencias pediátricas del hospital, mientras que otras procedencias incluyeron los servicios de atención primaria cuyo hospital de referencia era el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, los servicios de consultas externas

pediátricas, el hospital de adultos y otras muestras con origen desconocido donde no se especificaba su procedencia.

2.1.3. *Tiempo en desarrollar una gastroenteritis por rotavirus de adquisición nosocomial*

Una vez clasificados los casos como comunitarios o nosocomiales, se determinaron en estos últimos los días que tardaron los niños en desarrollar síntomas de gastroenteritis desde su ingreso en el hospital por una patología distinta a gastroenteritis por rotavirus, o desde su alta.

2.1.4. *Duración de la hospitalización y número de ingresos en urgencias*

En los casos comunitarios que requirieron hospitalización por la gastroenteritis se determinó el número de días que duró la hospitalización. En todos los casos comunitarios se registró también el número de asistencias al servicio de urgencias que realizó cada paciente.

2.1.5. *Procedencia de los casos nosocomiales*

Se registró el origen de cada muestra procedente de cada uno de los casos nosocomiales, incluyendo el box y la cama donde los niños permanecieron ingresados. En el hospital pediátrico, la zona de neonatología ingresa los bebés recién nacidos hasta los 28 días de edad, en la zona de lactantes se ingresan los niños hasta los dos años de edad, en la zona de escolares a los niños desde los dos hasta los once años. Existe una zona para oncología pediátrica, habitaciones de aislados infantiles, y una unidad de cuidados intensivos pediátrica, todos para niños de hasta once años de edad.

2.1.6. *Motivo de la hospitalización en los casos nosocomiales*

Se registró el diagnóstico principal que causó el ingreso hospitalario en los casos nosocomiales.

2.1.7. *Sintomatología de los casos comunitarios*

Se recogieron los datos referidos a los síntomas que presentaron los casos comunitarios en los que se genotiparon las cepas de rotavirus, como diarrea, vómitos, fiebre, deshidratación, síntomas catarrales, hiporexia, decaimiento y otros como exantema, otitis o convulsiones no explicados por otras enfermedades diagnosticadas.

Se consideró fiebre cuando se presentaron temperaturas corporales por encima de los 37,0°C (Lewis 2011).

Los síntomas de deshidratación se clasificaron como “hidratación adecuada” cuando el médico describió así el estado del paciente; “deshidratación leve” cuando el médico describió así el estado del paciente o describió labios o mucosas secas, o lengua pastosa; “deshidratación moderada” cuando el médico describió así el estado del paciente o cuando además de mucosas secas se describió la presencia de cercos perioculares; y “deshidratación grave” cuando el médico describió así el estado del paciente.

2.1.8. Severidad de las gastroenteritis en los casos comunitarios

La severidad de las gastroenteritis por rotavirus se evaluó siguiendo el sistema de clasificación de la severidad de Vesikari adaptado (Lewis 2011). Durante los estudios tempranos en el desarrollo de vacunas contra el rotavirus en los 1980s en seguida se puso de manifiesto que las vacunas no ofrecían la misma protección frente a todas las severidades de gastroenteritis por rotavirus y que las vacunas debían proteger frente a los cuadros clínicos más severos. De este modo, el objetivo de las vacunas debía ser proteger frente a aquellos casos que desembocan en hospitalizaciones o en la muerte del paciente. Así se definió la diarrea clínicamente significativa, llegándose a varios sistemas estandarizados de puntuación de la severidad clínica basados en los ensayos de eficacia de la vacuna (Lewis 2011).

El sistema de puntuación de la severidad clínica de Vesikari modificado incluye siete parámetros de puntuación (Tabla 8). Cinco de ellos se corresponden con la duración e intensidad de cada uno de los principales síntomas que causa la infección sintomática por rotavirus, es decir, la diarrea, los vómitos y la fiebre. Hay además dos parámetros adicionales que se corresponden con las visitas médicas subsiguientes y el tratamiento requerido. Cada uno de los siete parámetros se divide en tercios de acuerdo con una distribución de severidad equitativa, cada uno de los cuales se corresponde con 1, 2 ó 3 puntos respectivamente. Los puntos de cada parámetro se suman para dar una puntuación de severidad total que oscilará entre 0 y 20 (Tabla 9). Las puntuaciones por debajo de 7 se consideran de severidad leve, las que están entre 7 y 10 son de severidad moderada, y las que tienen 11 puntos o más se consideran severas (Guarino et al. 2014).

Tabla 8: Sistema de puntuación de la severidad de las gastroenteritis por rotavirus de Vesikari adaptada. Para cada uno de los siete parámetros se anota una puntuación de 0-3, sumándose todas finalmente hasata un máximo de 20 puntos. NA, no aplica esta puntuación para este parámetro (Guarino et al. 2014).

Puntos	0	1	2	3
Diarrea: duración (h)	0	1-96	97-120	>120
Diarrea: nº máximo deposiciones en 24h durante la enfermedad	0	1-3	4-5	>5
Vómitos: duración (h)	0	1-24	25-48	>48
Vómitos: nº máximo en 24h durante la enfermedad	0	1	2-4	>4
Fiebre (°C)	<37,1	37,1-38,4	38,5-38,9	>38,9
Atención médica	NA	NA	Atención primaria	Servicio de urgencias
Tratamiento	Ninguno	Rehidratación IV	Hospitalización	NA

Tabla 9: Clasificación de las gastroenteritis por rotavirus en función de la puntuación obtenida a partir de los parámetros de puntuación de Vesikari (Lewis 2011).

Categoría de severidad (máx. 20)		
Leve	Moderada	Severa
<7	7-10	>10

2.2. Estudio de genotipado de cepas de rotavirus

2.2.1. Fundamento

Los métodos moleculares de genotipado han ido sustituyendo progresivamente a los métodos de serotipado en la caracterización de rotavirus. Los métodos moleculares permiten determinar los tipos G y P de los rotavirus presentes en las muestras clínicas mediante la extracción del ARN vírico de las heces y su análisis con RT-PCR multiplex semi-anidadas (Fig. 16). Este análisis comienza con la transcripción inversa del ARN a ADN, y la amplificación de productos de ADN específicos de rotavirus A utilizando primers consenso para regiones de los genes que codifican las proteínas víricas VP7 (G-tipo) y VP4 (P-tipo). Los primers son seleccionados para que sean homólogos de cepas de distintos serotipos, de forma que un par de primers puede utilizarse para amplificar

la mayoría de cepas humanas. El ADN producido en el primer ciclo de amplificación es usado como molde en una segunda PCR en presencia de uno de los primers consenso originales (PCR semi-anidada) y una mezcla de primers (PCR multiplex) específicos de genotipo (Fig. 15). Estos primers específicos de genotipo poseen una polaridad opuesta al primer consenso y cada uno está diseñado para producir un producto de distinto tamaño. Los genotipos pueden ser así determinados basándose en el tamaño del producto tras análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

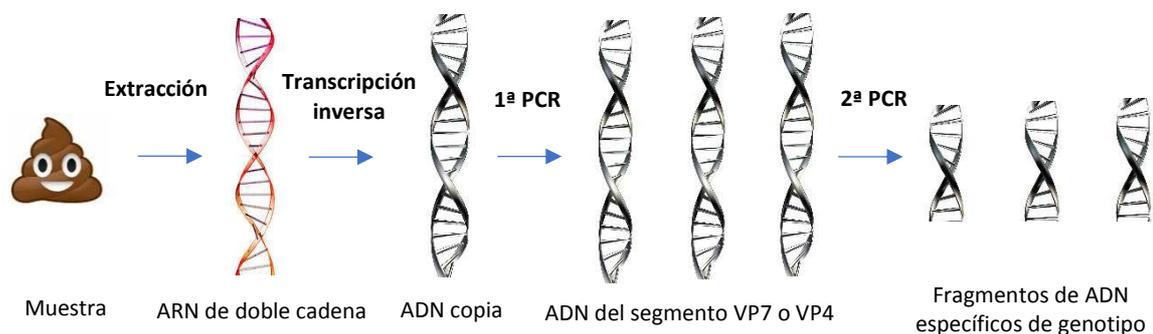
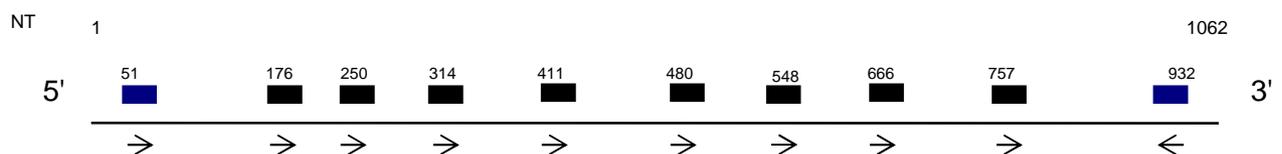


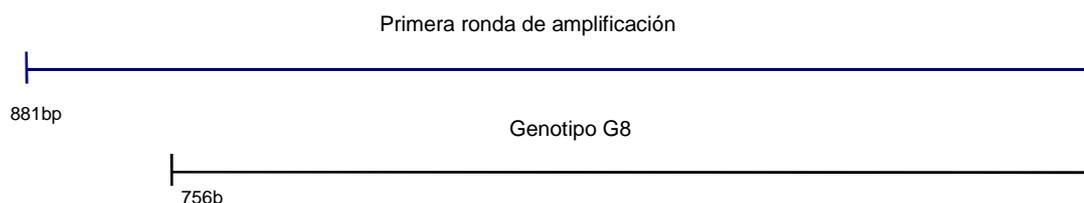
Figura 16: Esquema del proceso de genotipado mediante amplificación de productos de PCR específicos de genotipo.

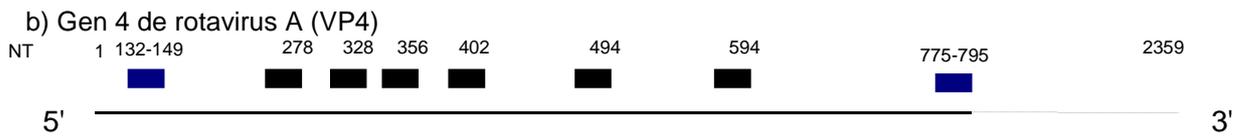
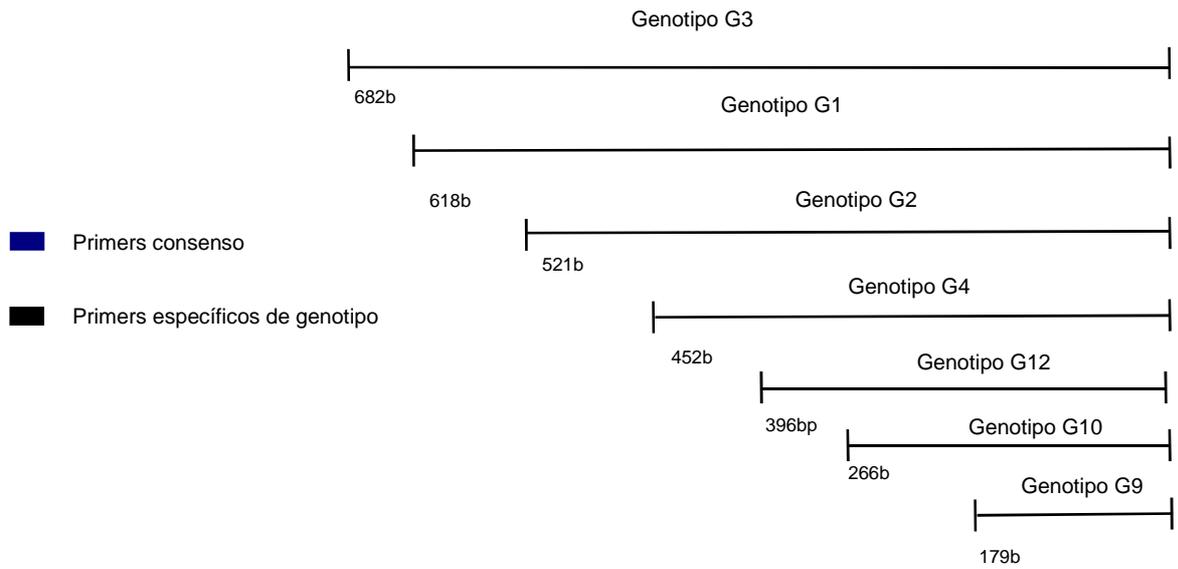
En la figura 17 puede verse el tamaño de los productos de la primera PCR para el gen de la proteína VP7 (a) y para el gen de la proteína VP4 (b) de 881 pb y 663 pb respectivamente. Debajo de estos productos de la primera ronda de PCR puede observarse el tamaño de los productos de la segunda PCR específicos de genotipo.

a) Gen 9 de rotavirus A (VP7)



Productos de amplificación:





Productos de amplificación:

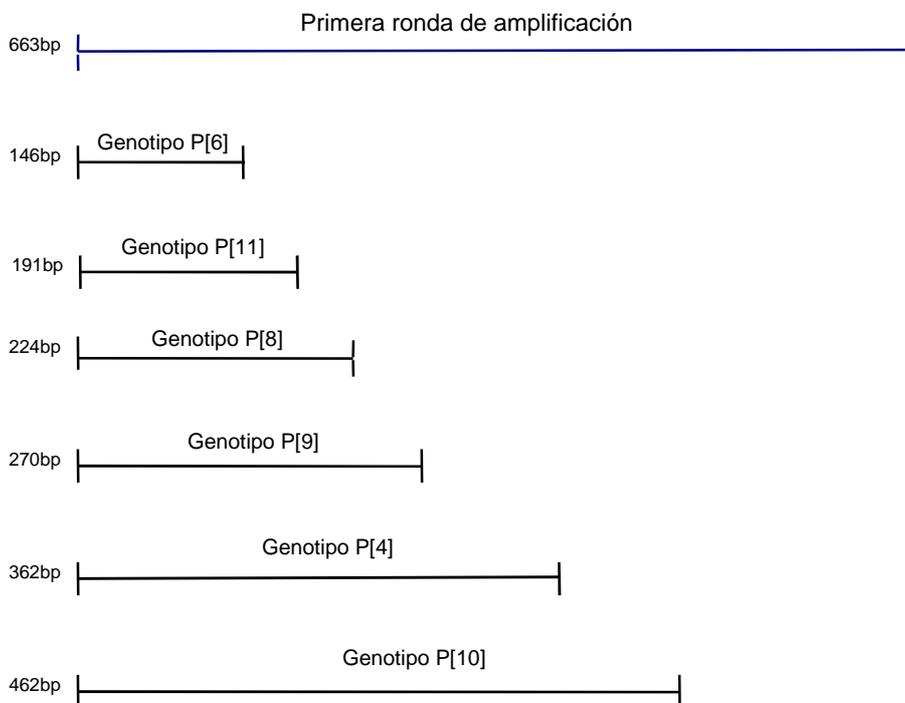


Figura 17: Esquema de las posiciones de los primers específicos para VP7 (a) y VP4 (b) y el tamaño de los amplicones específicos de genotipo.

2.2.2. Extracción y purificación del ARN de las muestras de heces

El análisis y purificación del ARN vírico a partir de las muestras fecales se realizó con el método de extracción con TRIzol® (ThermoFischer, Waltham, MA, USA) (World Health Organization 2009a).

El procedimiento consiste en:

- Agitar la suspensión de heces al 10%.
- Transferir 250 µL de la suspensión de heces a un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL y añadir 750 µL de TRIzol®. Agitar el tubo 30 segundos e incubar a temperatura ambiente 5 minutos.
- Añadir 200 µL de cloroformo a cada muestra y agitar 30 segundos. Incubar los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos. Volver a agitar y a dejar reposar los tubos 5 minutos dos veces más.
- Centrifugar los tubos a 13.000 rpm a 4°C durante 15 minutos para separar las fases.
- Transferir cuidadosamente la fase acuosa clara superior a un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL (aproximadamente entre 400-450 µL). Debe evitarse transferir también la interfase blanca así como la fase rosa orgánica.
- Añadir 500 µL de isopropanol enfriado en hielo y agitar volteando el tubo varias veces. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Centrifugar a 13.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Descartar el sobrenadante inmediatamente y con cuidado.
- Añadir 1 mL de etanol al 75% a -20°C a cada tubo.
- Centrifugar a 13.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante inmediatamente y con cuidado.
- Secar el pellet a 37°C durante 45 minutos en estufa.
- Resuspender el pellet en 40 µL de agua y congelar a -20°C hasta su utilización en la siguiente etapa del análisis.

2.2.3. Reacción de transcripción inversa para síntesis de ADN copia y amplificación de la secuencia consenso VP7 ó VP4

La transcripción inversa del ARN a ADN copia y la amplificación de la secuencia consenso de VP7 ó VP4 se realizan secuencialmente en el mismo tubo de reacción mediante el kit OneStep RT-PCR (QIAGEN®, Hilden, Alemania). Todos los componentes necesarios para realizar las dos reacciones se añaden durante la preparación de los tubos al principio, y no hay necesidad de añadir componentes adicionales una vez que las reacciones han empezado (Tabla 10).

Tabla 10: Master mix para la RT-PCR en un paso. Se detalla la cantidad en volumen de cada componente para cada tubo de reacción.

Componente	Volumen por reacción	Concentración final
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5x	5 µL	1x; 2,5 mM Mg ²⁺
dNTP mix (10 mM cada uno)	1 µL	400 µM de cada dNTP
Primer VP7-F ó VP4-F (10 µM)	1,5 µL	0,6 µM aprox.
Primer VP7-R ó VP4-R (10 µM)	1,5 µL	0,6 µM aprox.
Agua libre de RNasas	6 µL	-
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 µL	
5x Q-Solution	5 µL	1x
Disolución de ARN problema	4 µL	1 pg - 2 µg / reacción
Volumen de reacción total	25 µL	

En la primera fase de transcripción inversa actúan las enzimas Omniscript® y Sensiscript®, que son dos transcriptasas inversas que convertirán en ADN copia las secuencias específicas consenso para VP7 ó para VP4 a 50°C durante media hora, utilizando los primers especificados en la tabla 11, suministrados por Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EEUU).

Tabla 11: Primers utilizados para la amplificación de fragmentos consenso de los genes que codifican las proteínas VP7 y VP4 del rotavirus A (World Health Organization 2009a).

Primer	Secuencia (5' - 3')	Longitud	Posición
VP7-F	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	23	51-71
VP7-R	AACTTGCCACCATTTTTTCC	20	914-932
VP4-F	TATGCTCCAGTNAATTGG	18	132-149
VP4-R	ATTGCATTCTTTCCATAATG	21	775-795

Tras esta fase inicial y una vez obtenido el ADN copia de las secuencias de interés se inactivan las transcriptasas inversas del medio de reacción y se activa a la polimerasa de ADN HotStarTaq® calentando a 95°C durante 15 minutos. Una vez activada la polimerasa se llevan a cabo 35 ciclos de PCR, cada ciclo de los cuales consiste en los siguientes pasos: 1) calentamiento del ADN a amplificar para separar las dos cadenas (desnaturalización), 2) unión de los dos primers que son complementarios a la región a amplificar (hibridación), 3) elongación de los primers por la polimerasa utilizando como molde la cadena de ADN a copiar. En la tabla 12 se detallan las condiciones de reacción necesarias para la transcripción inversa y la amplificación por PCR de las secuencias consenso para VP7 y para VP4. Al final de esta fase se obtiene un amplicón de 881 pares de bases para el segmento VP7 y de 663 pares de bases para el segmento VP4.

Tabla 12: Resumen de las condiciones para la transcripción inversa y la amplificación por PCR en un paso.

Paso	Tiempo	Temperatura
Transcripción inversa	30 min	50°C
Activación inicial de la PCR	15 min	95°C
PCR: desnaturalización	1 min	94°C
PCR: hibridación	1 min	52°C
PCR: extensión	1 min	72°C
Número de ciclos de PCR	x35	
Extensión final	10 min	72°C

2.2.4. Segunda PCR para la amplificación de productos específicos de genotipo

La segunda amplificación para obtener productos de PCR específicos de genotipo se realizó siguiendo el protocolo del Manual de la Organización Mundial de la Salud para la detección y caracterización de rotavirus, para el tipado mediante PCR multiplex (World Health Organization 2009a). Las secuencias de los primers utilizados para las segundas PCRs se detallan en la tabla 13, que fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EEUU).

Tabla 13: Primers utilizados para la amplificación de productos específicos de genotipo de los segmentos VP7 y VP4 del genoma del rotavirus A (www.eurorota.net). “Y” es C ó T, “W” es A ó T, “R” es A ó G.

Primer	Nombre	Secuencia (5'- 3')	Longitud	Posición
Primer G1	aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	22	314-335
Primer G2	aCT-2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	25	411-435
Primer G3	G3	ACGAACTCAACACGAGAGG	19	250-269
Primer G4	aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	19	480-498
Primer G8	G8	TTRTCGCACCATTTGTGAAAT	21	176-198
Primer G9	G9	CTTGATGTGACTAYAAATAC	20	757-776
Primer G10	G10	ATGTCAGACTACARATACTGG	21	666-687
Primer G12	G12	GGTTATGTAATCCGATGGACG	21	548-567
Primer P[4]	2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	21	474-494
Primer P[6]	3T-1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	20	259-278
Primer P[8]	1T-1D	TCTACTGGRTTRACNTGC	18	339-356
Primer P[9]	4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	18	385-402
Primer P[10]	5T-1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	18	575-594
Primer P[11]	P[11]	GTAACATCCAGAATGTG	18	305-323

Para preparar la master mix para esta segunda PCR se siguieron las proporciones especificadas en la tabla 14 para la amplificación de productos específicos de genotipo G, utilizando primers para la identificación de los genotipos G1, G2, G3, G4, G8, G9, G10 y G12.

Tabla 14: Master mix de la segunda PCR para la amplificación de productos específicos de genotipo G. Se detalla la cantidad en volumen de cada componente para cada tubo de reacción.

Componente	Volumen por reacción	Concentración final
10x reaction buffer (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza)	2,5 µL	1x
MgCl ₂ Solution (50 mM) (Biotools, Madrid, España)	0,5 µL	1 mM Mg ²⁺
dNTPs (10 mM, 2,5 mM cada uno) (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido)	2 µL	200 µM de cada dNTP
Taq polimerasa (5 U/µL) (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza)	0,1 µL	0,02 U/µL
Primer VP7-R (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer G1 (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer G2 (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM

Primer G3 (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer G4 (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer G8 (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer G9 (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer G10 (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer G12 (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Agua libre de RNAsas	14,65 µL	
ADN problema producto de la primera PCR	0,75 µL	
Volumen de reacción total	25 µL	

Las proporciones de los distintos componentes que componen la master mix para la segunda PCR para la amplificación de productos específicos de genotipo P se detallan en la tabla 15. Se utilizaron primers para la identificación de los genotipos P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] y P[11].

Tabla 15: Master mix de la segunda PCR para la amplificación de productos específicos de genotipo P. Se detalla la cantidad en volumen de cada componente para cada tubo de reacción.

Componente	Volumen por reacción	Concentración final
10x reaction buffer (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza)	2,5 µL	1x
MgCl ₂ Solution (50 mM) (Biotools, Madrid, España)	0,5 µL	1 mM Mg ²⁺
dNTPs (10 mM, 2,5 mM cada uno) (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido)	2 µL	200 µM de cada dNTP
Taq polimerasa (5 U/µL) (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza)	0,1 µL	0,02 U/µL
Primer VP4-F (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer P[4] (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer P[6] (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer P[8] (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer P[9] (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer P[10] (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer P[11] (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Agua libre de RNAsas	15,65 µL	

ADN problema producto de la primera PCR	0,75 μ L
Volumen de reacción total	25 L

2.2.5. Visualización de los amplicones

Los productos de amplificación por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5x. Para la preparación de los geles se siguió el siguiente protocolo:

- Adicionar 3 g de agarosa a 200 mL de tampón TBE 0,5x (Thermo Fischer, Waltham, MA, EEUU).
- Disolver en el microondas.
- Añadir 20 μ L de SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Thermo Fischer, Waltham, MA, EEUU).
- Dejar enfriar 20 minutos a temperatura ambiente.

Para cada muestra mezclar 2 μ L de tampón de carga 10x y 10 μ L de agua, y mezclar con 10 μ L de producto de la PCR.

Cargar en el gel las muestras así preparadas y un marcador de tamaños moleculares de ADN de 100 pares de bases.

Correr el gel a 120 V, durante 150 minutos.

Los geles se observan en el transiluminador con luz ultravioleta.

2.2.6. Controles de calidad

Se realizaron lotes de hasta 18 muestras que se extrajeron y sometieron a todo el proceso de genotipado. En cada lote de muestras se incluyó un blanco en el que se sustituyó una muestra de heces por agua, y que constituyó un control negativo para detectar posibles contaminaciones. Este blanco se sometió a las mismas operaciones que el resto de muestras hasta la visualización final en el gel de agarosa.

2.2.7. Interpretación de resultados

Se estimó el tamaño molecular aproximado de los amplicones que constituyen las bandas observadas en el gel de agarosa comparando la distancia recorrida por las

mismas y la distancia recorrida por las bandas que componen el marcador de tamaños moleculares. Se detalla en la tabla 16 el tamaño de los distintos amplicones.

Tabla 16: Tamaño en pares de bases de los amplicones generados en la segunda PCR específica de genotipo.

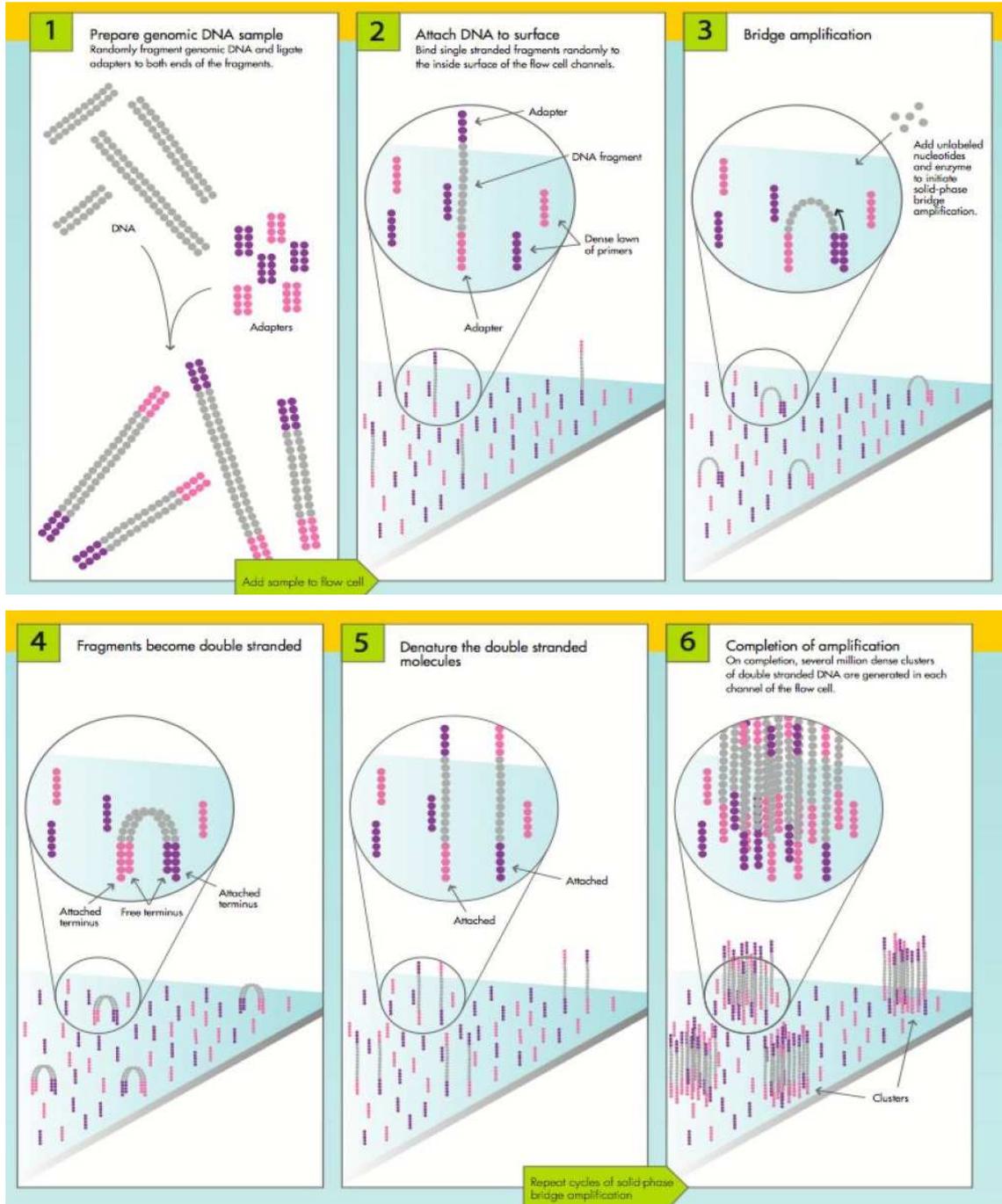
Producto de amplificación 2ª PCR	Tamaño molecular del ADN (pares de bases)
Genotipos G:	
G8	756
G3	682
G1	618
G2	521
G4	452
G12	396
G10	266
G9	179
Genotipos P:	
P[10]	462
P[4]	362
P[9]	270
P[8]	224
P[11]	191
P[6]	146

3. Estudio de gastroenteritis por rotavirus en niños vacunados

Se recogió la información relativa a la vacunación contra el rotavirus de todos los casos de niños que desarrollaron gastroenteritis por rotavirus A desde el 1 de enero de 2010 hasta el 31 de diciembre de 2013, a través de la aplicación corporativa PROSAN de la Consejería de Salud de la Región de Murcia. Se registró la marca comercial de la vacuna y el número de dosis aplicadas. Se registró la fecha de manifestación de la gastroenteritis por rotavirus, la edad y el sexo del paciente. Todas las muestras procedentes de estos casos se sometieron a un análisis de genotipado de rotavirus A.

Para la caracterización de la cepa que infectó en el hospital a dos niños previamente vacunados se procedió a la secuenciación del genoma completo de las cepas P369 y P370 procedentes de ambos niños, mediante técnicas de secuenciación masiva en el Institute of Infection and Global Health, de la Universidad de Liverpool en Reino Unido. Esta secuenciación masiva se llevó a cabo utilizando la plataforma Illumina HiSeq 2500 del Centre for Genomic Research de esa Universidad.

Puede observarse un esquema del proceso de secuenciación masiva utilizado en el presente estudio en la figura 18. El proceso comienza 1) con la extracción y purificación del ARN de doble cadena, y su fragmentación en moléculas del tamaño adecuado para disponer de todo el material genético en forma de biblioteca genómica. También se deben añadir adaptadores de dos tipos en los extremos a cada fragmento. 2-6) Una vez preparada la biblioteca genómica a partir de la muestra, se deben generar grupos de agregados de ADN clónico sobre la superficie de los canales de células de flujo. 7-9) Finalmente se lleva a cabo la secuenciación propiamente dicha de cada uno de los grupos de agregados, mediante la secuenciación por síntesis. Este proceso se desarrolla a través de sucesivos ciclos de adición de nucleótidos marcados con distintos fluoróforos, que van añadiéndose de forma complementaria a la secuencia del ADN del agregado. Tras cada adición se excita con un láser, obteniéndose sobre la célula de flujo puntos de distinto color según la base nitrogenada que se ha incorporado en cada ciclo. El resultado final es un conjunto de secuencias cortas, de cada uno de los fragmentos de ADN en que se cortó el genoma del rotavirus. A continuación, son los programas informáticos los encargados de mapear las lecturas, alineando las secuencias cortas obtenidas con una secuencia de referencia, para dar una secuencia consenso del genoma completo del rotavirus.



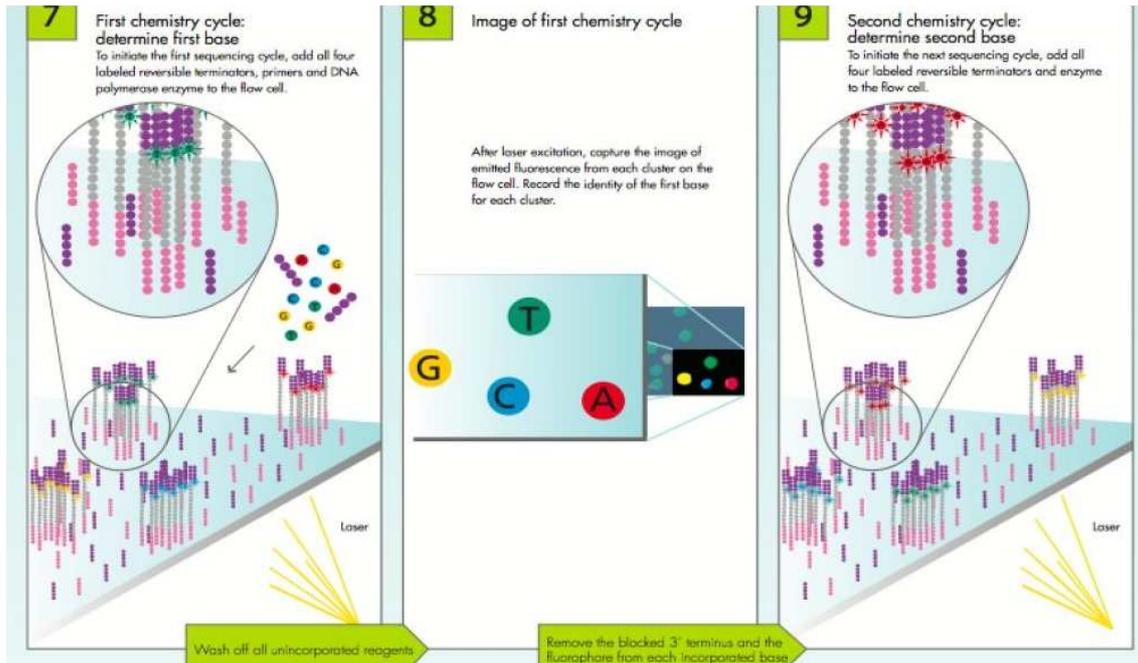


Figura 18: Esquema del proceso de secuenciación masiva con Illumina HiSeq 2500.

3.1. Preparación de bibliotecas genómicas para secuenciación masiva

El primer paso para poder secuenciar un genoma completo de rotavirus es preparar una biblioteca genómica del mismo, en la que a cada fragmento de ADN que la componen se hayan añadido los adaptadores necesarios para la secuenciación posterior. Para la preparación de estas bibliotecas genómicas a partir del genoma de ARN de doble cadena del rotavirus se utilizó el ScriptSeq[®] v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicentre[®], Madison, WI, EEUU). El procedimiento de preparación de las bibliotecas se detalla en la figura 19. En primer lugar, el ARN es fragmentado y después sometido a transcripción inversa utilizando primers de secuencia aleatoria, que contienen secuencias-etiqueta en el extremo 5'. A continuación, se usan oligonucleótidos de etiquetado terminal para etiquetar el extremo 3' del ADN copia. El ADN copia etiquetado en ambos extremos se amplifica por PCR de ciclo limitado utilizando primers complementarios a las secuencias-etiqueta, que además añaden una secuencia-adaptadora para la generación de los agregados de ADN posteriores.

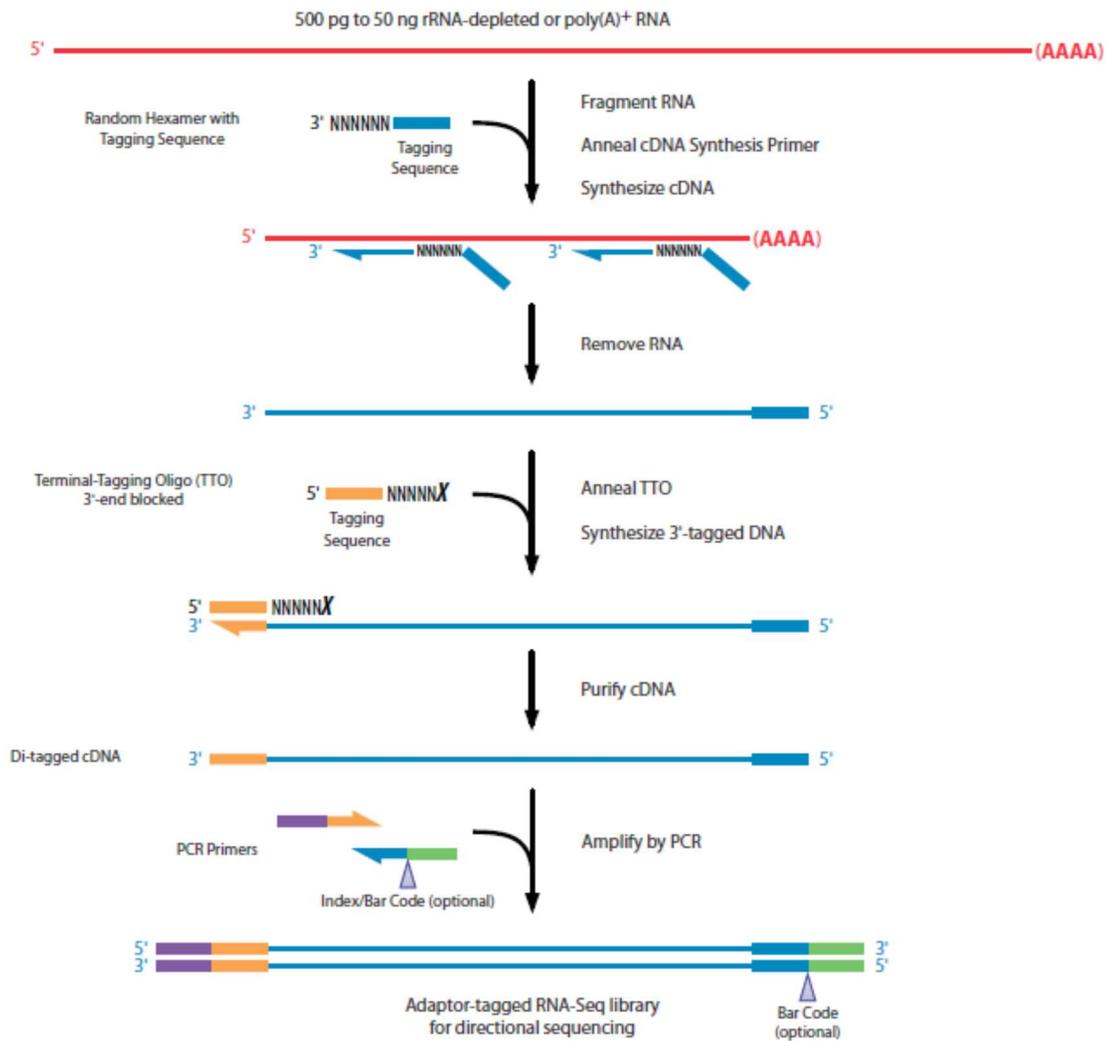


Figura 19: Esquema del proceso de preparación de bibliotecas genómicas a partir de ARN con ScriptSeq[®] v2 RNA-Seq Library Preparation Kit.

3.1.1. Extracción del ARN de doble cadena de las muestras de heces

- Añadir 200 µL de solución PBS a tubos de 2 mL rotulados.
- Tomar aproximadamente 100 mg de muestra de heces y añadir al tubo con PBS. Si la muestra de heces es líquida tomar 300 µL.
- Mezclar durante 5 segundos.
- Añadir 1 mL de TRI[®] Reagent, mezclar y dejar reposar los tubos 5 minutos.
- Añadir 270 µL de cloroformo, mezclar y dejar reposar los tubos 3 minutos.
- Centrifugar a 13.000 revoluciones por minuto durante 20 minutos a 4°C.

- Añadir 1 mL de isopropanol enfriado en hielo a tubos nuevos 2 minutos antes de que termine la centrifugación de los tubos.
- Eliminar el sobrenadante y añadir a los nuevos tubos con el isopropanol, mezclar por inversión 8-10 veces y dejar los tubos reposar 5 minutos.
- Centrifugar los tubos a 13.000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante, golpear los tubos invertidos en papel de filtro y dejar secar 10 minutos.
- Añadir 95 µL de Qiagen Elution Buffer (EB) del MinElute Gel Extraction kit. Dejar reposar los tubos 10 minutos mientras se mezcla de vez en cuando.
- Mezclar 5 µL de los ácidos nucleicos extraídos con tampón de carga y correr una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio a 90v, junto con un marcador de tamaños moleculares de 1kb.

3.1.2. *Eliminación del ARN de cadena sencilla y de impurezas de proteínas*

- Añadir 30 µL de LiCl₂ 8 M a cada tubo.
- Mezclar y dejar reposar los tubos 20 minutos.
- Preparar un baño de agua a 4°C, colocar las muestras e incubar durante 16 horas.

3.1.3. *Eliminación de impurezas de ADN*

- Centrifugar los tubos a 16,100x g a 4°C durante 30 minutos.
- Retirar el sobrenadante a nuevos tubos.
- Preparar una master mix calculando 13 µL de DNasa I y 13 µL de tampón 10x DNasa I por muestra, y añadir 26 µL de ella a cada muestra.
- Mezclar bien e incubar los tubos a temperatura ambiente 15 minutos.
- Añadir 13 µL de Stop Solution y mezclar con la pipeta.
- Calentar a 70°C 10 minutos en un bloque calentador.
- Incubar en hielo durante 2 minutos y proceder con la purificación.

3.1.4. *Purificación del ARN de doble cadena usando el kit Qiagen MinElute Gel Extraction Kit*

- Sacudir los tubos y añadir 330 µL de tampón QG a cada uno.
- Mezclar bien con pipeta, sacudir los tubos y transferir todo el contenido a columnas de centrifugación MinElute.

- Centrifugar los tubos a 13.000 rpm a 4°C durante 1 minuto.
- Eliminar el filtrado.
- Añadir 750 µL de tampón PE a cada columna.
- Centrifugar a 13.000 rpm a 4°C 1 minuto.
- Eliminar el filtrado y centrifugar de nuevo.
- Colocar las columnas en tubos nuevos de 1,5 mL.
- Añadir 35 µL de tampón EB en el centro de la membrana.
- Incubar los tubos 1 minuto y después centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto.
- Eliminar las columnas.
- Comprobar la integridad del ARN de doble cadena corriendo 2 µL a 90 V en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, e incluyendo un marcador de tamaños moleculares de 1 kb.

3.1.5. Cuantificación del ARN de doble cadena con Qubit, utilizando el kit de alta sensibilidad (HS kit)

- Etiquetar un tubo Qubit por muestra y dos tubos Qubit adicionales para los estándares (STD1 y STD2).
- Preparar la solución de trabajo diluyendo el reactivo Qubit HS RNA 1:200 en tampón Qubit RNA, preparando 200 µL para cada muestra y para cada estándar.
- Pipetear 190 µL de esta solución de trabajo a cada tubo para los estándares.
- Añadir 10 µL de cada estándar al tubo correspondiente y mezclar.
- Pipetear 198 µL de solución de trabajo a cada tubo de muestra.
- Añadir 2 µL de cada muestra al tubo correspondiente y mezclar.
- Incubar los tubos a temperatura ambiente 2 minutos.
- Seguir las instrucciones de la pantalla de Qubit para determinar la concentración de ARN de doble cadena en cada muestra.

3.1.6. Fragmentación del ARN purificado e hibridación del primer para síntesis de ADN copia

- Se deben utilizar entre 500 pg a 50 ng de ARN por reacción por lo que si el ARN está altamente concentrado se debe diluir con agua para conseguir una concentración de 50 ng por reacción.

- Añadir 9,5 μ L de ARN a un tubo de PCR de 0,2 mL y desnaturalizar a 95°C durante 5 minutos.
- Preparar la mezcla de fragmentación utilizando 1 μ L de solución de fragmentación y 2 μ L de primer de síntesis de ADN copia por muestra.
- Añadir 3 μ L de esta mezcla de fragmentación al ARN desnaturalizado.
- Incubar los tubos a 85°C durante 5 minutos.
- Parar la fragmentación poniendo los tubos en hielo.

3.1.7. *Síntesis de ADN copia*

- Preparar la Master Mix de Síntesis de ADN Copia mezclando para cada reacción: 3 μ L de cDNA Synthesis PreMix, 0,5 μ L DTT 100 mM y 0,5 μ L de StarScript AMV Reverse Transcriptase.
- Mezclar pipeteando la Master Mix de Síntesis de ADN Copia y añadir 4 μ L a cada uno de los tubos que están en hielo.
- Mezclar e incubar a 25°C durante 5 minutos, seguido de 20 minutos a 42°C.
- Enfriar las reacciones a 37°C.
- Ir quitando una a una las reacciones del termociclador a 37°C, añadir 1 μ L de Finishing Solution, mezclar con pipeta y devolver el tubo al termociclador.
- Incubar las reacciones a 37°C durante 10 minutos.
- Incubar cada reacción a 95°C durante 3 minutos. A continuación enfriar las reacciones a 25°C.

3.1.8. *Síntesis de ADN copia etiquetado en 3'*

- Preparar la Master Mix de Etiquetado Terminal mezclando para cada reacción: 7,5 μ L de ScriptSeq v2 Terminal-Tagging Premix y 0,5 μ L de ADN polimerasa.
- Ir retirando uno a uno los tubos del termociclador a 25°C y añadir 8 μ L de Master Mix de Etiquetado Terminal y devolver los tubos al termociclador.
- Incubar cada reacción a 25°C durante 15 minutos.
- Incubar cada reacción a 95°C durante 3 minutos y a continuación enfriar a 4°C.

3.1.9. Purificación del ADN copia etiquetado en ambos extremos utilizando Qiagen MinElute PCR Purification Kit

- Seguir las instrucciones del fabricante. Eluir el ADN copia utilizando 25 μ L de tampón EB.

3.1.10. Amplificar las bibliotecas de ADN copia etiquetado en ambos extremos mediante PCR

- Preparar la Master Mix para la PCR mezclando: 22,5 μ L de ADN copia purificado etiquetado en ambos extremos, 1 μ L de primer PCR Forward, 1 μ L de primer PCR Reverse, 25 μ L de FailSafe PCR PreMix E y 0,5 μ L de FailSafe PCR Enzyme. El volumen final de reacción será 50 μ L.
- Desarrollar la PCR en el termociclador con una primera fase a 95°C durante 1 minuto, seguida de entre 15 y 22 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 3 minutos a 68°C. Tras acabar los ciclos se incubaba a 68°C durante 7 minutos.

3.1.11. Purificación de la biblioteca RNA-Seq utilizando el sistema AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU),

- Atemperar las bolas AMPure XP a temperatura ambiente.
- Transferir los 50 μ L de reacción a tubos de 1,5 mL.
- Añadir 50 μ L de bolas a cada muestra y mezclar bien.
- Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Colocar las muestras en el soporte magnético a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos hasta que el líquido aparece claro.
- Eliminar y descartar el sobrenadante de cada tubo utilizando la pipeta sin tocar las bolas.
- Sin retirar los tubos del soporte añadir 200 μ L de etanol al 80% a cada tubo.
- Incubar las muestras a temperatura ambiente durante al menos 30 segundos y entonces eliminar todo el sobrenadante.
- Repetir los dos pasos anteriores una vez más hasta un total de dos lavados con etanol al 80%.
- Dejar que las muestras se sequen al aire en su soporte magnético durante 15 minutos.

- Añadir 20 µL de agua a cada tubo y retirar los tubos del soporte.
- Resuspender las bolas e incubar las muestras a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Colocar las muestras de nuevo en el soporte magnético durante al menos 5 minutos hasta que el líquido se observe claro.
- Transferir el sobrenadante claro que contiene las bibliotecas a un tubo nuevo.

3.1.12. Cuantificación del producto de la PCR purificado utilizando Qubit-dsDNA BR kit

- Etiquetar un tubo Qubit por cada muestra y dos más para los estándares (STD1 y STD2).
- Preparar la solución de trabajo diluyendo el reactivo Qubit BR dsDNA 1:200 en tampón Qubit BR dsDNA. Preparar 200 µL por muestra y por cada estándar.
- Pipetear 190 µL de la solución de trabajo en cada tubo de estándar.
- Añadir 10 µL de cada estándar en su tubo y mezclar.
- Pipetear 198 µL de la solución de trabajo a cada tubo de muestra.
- Añadir 2 µL de cada muestra a su correspondiente tubo y mezclar.
- Incubar los tubos a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Seguir las instrucciones de la pantalla de Qubit para determinar la concentración de ADN en cada muestra.

3.1.13. Evaluación de la distribución de tamaños de los ADN copia utilizando el 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU)

En la figura 20 pueden verse tres ejemplos de perfiles de tamaños de bibliotecas obtenidas con ScriptSeq® v2 RNA-Seq Library Preparation Kit utilizando la cantidad indicada de ARN poli(A) de hígado humano. Se realizaron 15 ciclos de PCR para las bibliotecas de 500 pg (A) y 5 ng (B). La opción C muestra el perfil de una biblioteca que ha sido sobre-amplificada con demasiados ciclos de PCR. Si hay más de un 60% del material que está entre los 200 y los 1.000 pares de bases la biblioteca puede ser secuenciada.

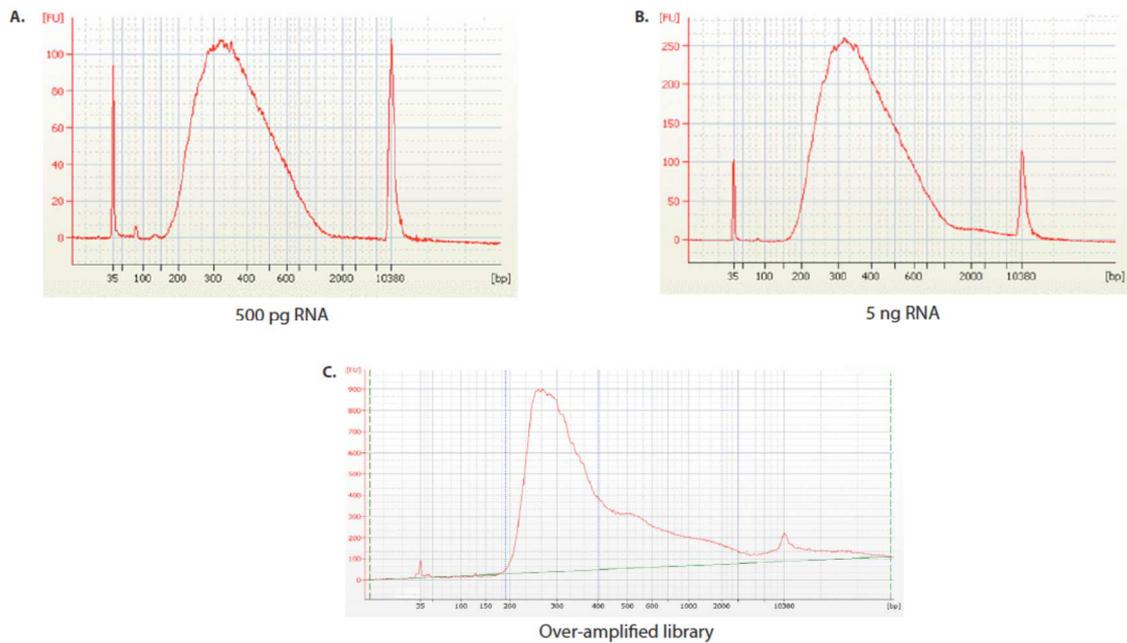


Figura 20: Perfiles representativos de las bibliotecas ScriptSeq[®] v2 RNA-Seq.

3.1.14. Controles de calidad

Se incluyó un control positivo a partir de una muestra fuertemente positiva a rotavirus para comprobar que todas las etapas han funcionado correctamente. También se incluyó un control negativo que en este caso fue agua para detectar contaminaciones.

3.2. Secuenciación masiva

Una vez obtenidas las bibliotecas genómicas se secuenciaron mediante secuenciación por síntesis en un equipo Illumina HiSeq 2500 en el Centre for Genomic Research de la Universidad de Liverpool.

3.3. Análisis y ensamblado de las lecturas

Las secuencias apareadas (2 x 125 pares de bases) fueron ensambladas utilizando el software Geneious R8, mapeando utilizando el genoma de la cepa de rotavirus Wa como referencia, para obtener las secuencias consenso del genoma de ambas cepas, P369 y P370.

3.4. Genotipado

Para asignar los genotipos a cada uno de los 11 segmentos del genoma de cada cepa se utilizó la herramienta de genotipado automático RotaC (<http://rotac.regatools.be>).

3.5. Identidad nucleotídica y aminoacídica y análisis filogenético

Se calculó la identidad nucleotídica y aminoacídica entre las cepas P369 y P370, y se realizó el análisis filogenético de las mismas con MEGA 7 (Kumar et al. 2016). Se elaboraron árboles filogenéticos para cada segmento del genoma del rotavirus mediante el método Maximun Likelihood con 100 réplicas de bootstrap, incluyendo secuencias disponibles en GenBank con el mismo genotipo. El modelo de sustitución para cada árbol se eligió mediante ModelTest de MEGA 7. En la tabla 17 se detallan los modelos utilizados en el presente estudio.

Tabla 17: Modelos de sustitución y tasas entre sitios elegidos para la construcción de árboles filogenéticos de los distintos segmentos del genoma de las cepas P369 y P370 de rotavirus.

Segmento genómico	Modelo de sustitución	Tasas entre sitios
VP7	Tamura 3-parameter	Gamma distributed
VP4	Tamura 3-parameter	Gamma distributed
VP6	Tamura 3-parameter	Gamma distributed and has Invariant sites
VP1	General Time Reversible	Gamma distributed and has Invariant sites
VP2	Tamura-Nei	Gamma distributed and has Invariant sites
VP3	General Time Reversible	Gamma distributed and has Invariant sites
NSP1	Tamura 3-parameter	Gamma distributed
NSP2	Tamura 3-parameter	Gamma distributed
NSP3	Tamura 3-parameter	Gamma distributed and has Invariant sites
NSP4	Tamura 3-parameter	Gamma distributed
NSP5	Tamura 3-parameter	Gamma distributed

3.6. Estudio de las diferencias aminoacídicas en los epítomos de la proteína VP4 de las cepas P369 y P370, con la proteína VP4 de la cepa WI79-4 de Rotateq®

Se estudiaron las regiones inmunogénicas de la proteína VP4 de las cepas P369 y P370 de rotavirus, comparándolas con las mismas regiones en la cepa incluida en la vacuna Rotateq® WI79-4, que tiene genotipo P[8] al igual que P369 y P370, utilizando el programa MEGA 7.

IV. RESULTADOS

1. Incidencia de gastroenteritis por rotavirus entre 2010-2013

Se procesaron 4.694 muestras pertenecientes a 3.922 pacientes diagnosticados de gastroenteritis en el HUVA o en los servicios de atención primaria del área I de salud, para la detección de rotavirus A durante un período de 4 años (2010-2013). Un total de 997 muestras (21,2%) fueron positivas a la detección de rotavirus A, mientras que 3.697 muestras (78,8%) resultaron negativas. Por años, se recibieron en el laboratorio un mínimo de 1.046 muestras en 2010, y un máximo de 1.306 en 2011, con una media interanual de 1.174 muestras al año, y una desviación estándar de 117 muestras. La proporción de muestras positivas con respecto al total de muestras tomadas fue disminuyendo año tras año desde un 26,8% en 2010, hasta un 13,6% en 2013, disminuyendo por lo tanto un 49,3% en cuatro años (Fig. 21, Tabla 18). Esta disminución en la proporción de muestras positivas no se explicó por un aumento en la intensidad de muestreo con los años.



Figura 21: Relación entre el número total de muestras tomadas y la proporción de muestras positivas a rotavirus A, entre 2010 y 2013.

Tabla 18: Número total de muestras tomadas, número de muestras positivas a rotavirus A y proporción de muestras positivas, desde 2010 hasta 2013.

Año	2010	2011	2012	2013
Nº total de muestras tomadas	1.046	1.306	1.111	1.231
Nº de muestras positivas	280	329	220	168
% muestras positivas	26,8	25,2	19,8	13,6

Las tasas de incidencia anuales de gastroenteritis por rotavirus en niños menores de 5 años en la población atendida por el HUVA oscilaron entre 1,03/100 niños en 2013, y 1,88/100 niños en 2011 (Tabla 19), resultando diferentes estadísticamente (p -valor = 0.0000).

Tabla 19: Población de niños menores de 5 años en el área I de salud, muestras positivas a rotavirus A y tasa de incidencia de gastroenteritis por rotavirus A por cada 100 niños menores de 5 años en el área I de salud.

	2010	2011	2012	2013
Niños <5 años	16.414	16.463	15.927	15.382
Positivos rotavirus	257	310	212	158
Incidencia/100	1,57	1,88	1,33	1,03

1.1. Estacionalidad de las gastroenteritis por rotavirus

Las curvas epidémicas de las gastroenteritis por rotavirus tuvieron un pico de incidencia al final del invierno o principio de la primavera (Fig. 22). A lo largo de los cuatro años de estudio los picos de incidencia ocurrieron en el mes de marzo para los años 2010 y 2012, adelantándose a febrero en 2011 y retrasándose a abril en 2013. Durante el año 2010 además se observaron otros picos de incidencia secundarios en mayo y en septiembre. El número de casos detectados fue mínimo en los meses de septiembre (2011), octubre (2010 y 2012) y noviembre (2013), a partir de los cuales el número de casos comenzó a aumentar de nuevo.

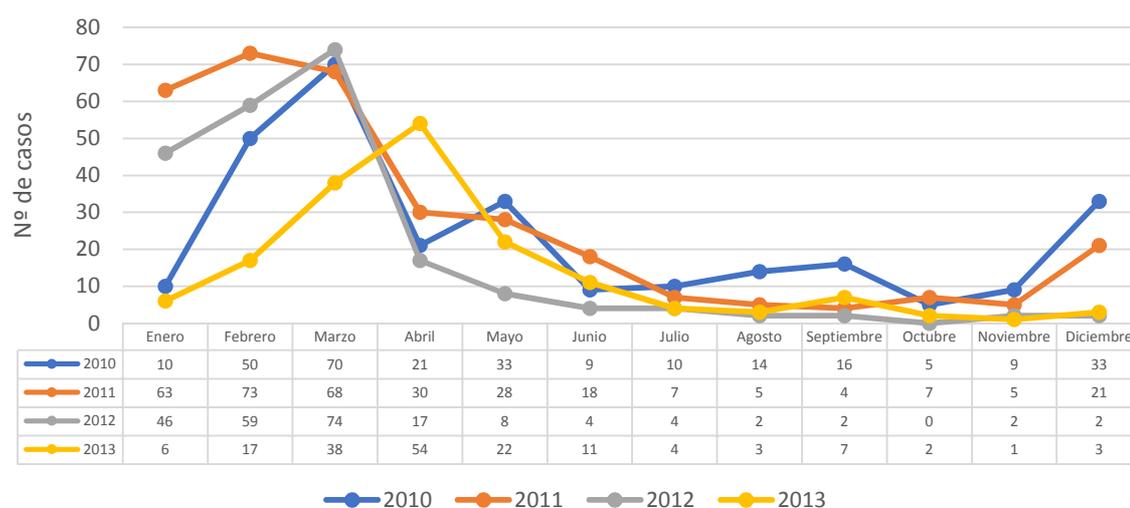


Figura 22: Número de muestras positivas a rotavirus A por meses, desde 2010 hasta 2013.

1.2. Incidencia según edad

En la tabla 20 se detalla el número de muestras positivas a rotavirus A por grupos de edad en los distintos años del estudio.

Tabla 20: Número de muestras positivas a rotavirus A según grupo de edad, desde 2010 hasta 2013.

Edad (meses)	2010	2011	2012	2013	Total	Porcentaje del total
0-5	81	110	54	32	277	28,2%
6-23	148	173	117	99	537	54,7%
24-59	28	27	41	28	124	12,6%
60 ó más	13	14	8	8	43	4,4%
Total	270	324	220	167	981	100%

La distribución de la edad en los casos positivos fue significativamente diferente en los distintos años (p -valor = 0,0023). Más del 50% de todas las muestras positivas a rotavirus A pertenecieron a niños con un rango de edad de entre 6 y 23 meses de edad en los cuatro años del estudio (Fig. 23). El siguiente grupo de edad con una mayor contribución al número de casos positivos fue el de los niños menores de 6 meses, que osciló entre un 19,2% en 2013 y un 34,0% en 2011. Entre un 8,3% en 2011 y un 18,6% en 2012 de las muestras pertenecieron a niños de entre 24 y 59 meses. Por último, entre un 3,6% de las muestras en 2012 y un 4,8% de las muestras en 2010 y 2013 procedieron de pacientes a partir de los 5 años de edad. La proporción de casos entre niños de 6 a 23 meses de

edad fue máxima (59,3%) en 2013, siendo en este año mínima (19,2%) la afectación de los menores de 6 meses. Por el contrario, la afectación de los niños de 6 a 23 meses fue mínima (53,2%) en 2012, año en el que la afectación de niños entre 24 y 59 meses de edad fue máxima (18,6%). La mayor afectación (34,0%) de los niños menores de 6 meses se produjo en 2011, año en que se produjo la mínima (8,3%) afectación de los niños de 24 a 59 meses de edad. El paciente más joven con gastroenteritis por rotavirus A fue una niña de 17 días de edad, mientras que el paciente de mayor edad fue una mujer de 78 años. De manera global, en los cuatro años de estudio el 28,2% de las muestras procedió de niños menores de 6 meses, el 54,7% de niños de entre 6 meses y menores de 2 años, el 12,6% de niños de entre 2 y menores de 5 años, y el 4,4% de pacientes (niños o adultos) mayores de 5 años. En total, el 82,9% de las muestras procedió de niños menores de 2 años.

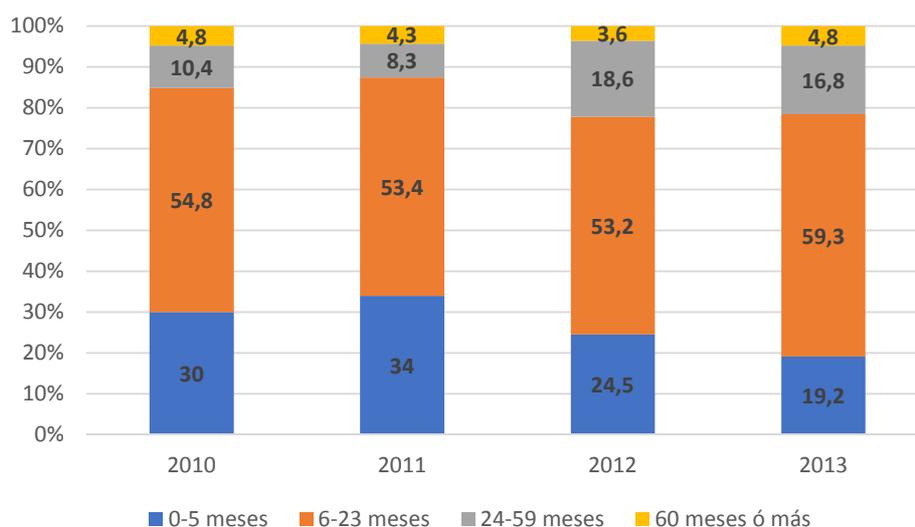


Figura 23: Proporción de muestras positivas a rotavirus A por edades, desde 2010 hasta 2013.

1.3. Incidencia según sexo

En la tabla 21 se detalla el número de muestras positivas a rotavirus A por sexos en los distintos años del estudio.

Tabla 21: Número de casos según sexo, desde 2010 hasta 2013.

Sexo	2010	2011	2012	2013
Hombre	164	169	112	100
Mujer	115	157	108	64

Total	279	326	220	164
--------------	-----	-----	-----	-----

La distribución de la variable sexo no varió entre los sucesivos años de forma significativa (p -valor = 0,0793), siendo la proporción de positivos ligeramente mayor entre los hombres que entre las mujeres en los cuatro años (Fig. 24).

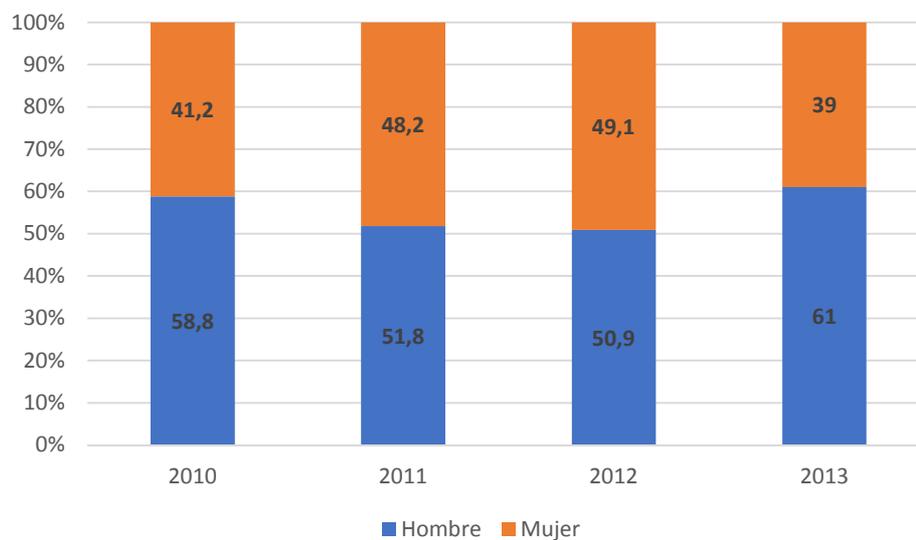


Figura 24: Proporción de muestras positivas a rotavirus A por sexos, desde 2010 hasta 2013.

2. Características clínico-epidemiológicas de las gastroenteritis por rotavirus durante 2012

2.1. Estudio de la influencia del origen de la infección en la estacionalidad, la edad y el sexo de los casos

De las 1.111 muestras recibidas en 2012, 220 (19,8%) fueron positivas a rotavirus mientras que 891 (80,2%) fueron negativas. 170 (77,3%) de las muestras positivas procedieron de infecciones de adquisición comunitaria, mientras que 47 (21,4%) de ellas pertenecieron a infecciones nosocomiales. En 3 casos (1,4%) no pudieron obtenerse los datos clínicos (Tabla 22).

Tabla 22: Número y proporción de muestras positivas según el origen de la infección (adquisición comunitaria, nosocomial o sin información del origen de la infección) en 2012.

Test rotavirus	Tipo de infección	Nº muestras	% del total	% de las positivas
Negativo		891	80,2	
Positivo	Desconocido	3	0,3	1,4
	Comunitaria	170	15,3	77,3
	Nosocomial	47	4,2	21,4
Total		1111	100,0	100,0

La población censada en 2012 en el área I de salud fue de 15.927 niños menores de cinco años, y el número de casos de gastroenteritis por rotavirus A adquirido en la comunidad detectado en este grupo de edad fue de 164 casos. La tasa de incidencia resultó por tanto en 1,03 casos/100 niños menores de cinco años en ese año.

Los niños que contrajeron una gastroenteritis por rotavirus A nosocomial tardaron una media de 8,4 días desde su ingreso en el hospital infantil en comenzar los síntomas, con una desviación estándar de 7,6 días. El periodo mínimo en desarrollar los síntomas fue de 2 días, mientras que el periodo máximo fue de 34 días en un bebé de un mes de edad (Fig. 25).

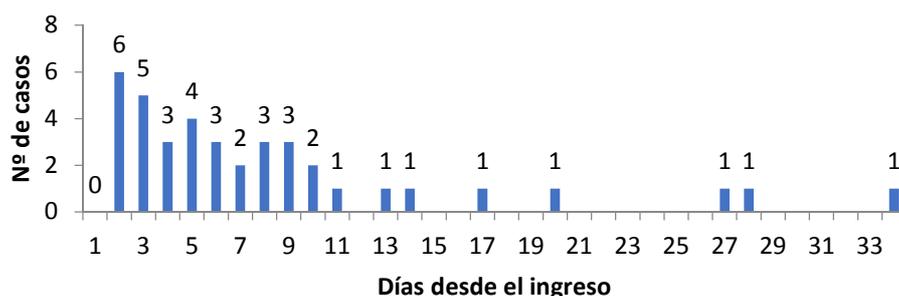


Figura 25: Histograma de frecuencias del número de días que tardaron en desarrollar síntomas los niños que enfermaron de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial durante 2012, desde la fecha de su ingreso en el hospital.

En la tabla 23 se detalla el número y la proporción de casos de adquisición nosocomial por procedencia de las muestras. La mayoría de los casos procedieron de la zona de

lactantes, dentro del Servicio de Pediatría, con 26 casos (55,3%), seguidos por la zona de escolares en el mismo Servicio con 7 casos (14,9%), oncología infantil con 5 casos (10,6%), unidades de aislados con 4 casos (8,5%) y neonatología con 3 casos (6,4%). Sólo se identificó un caso (2,1%) de infección nosocomial en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátrica.

Tabla 23: Número y proporción de casos según la procedencia de las muestras en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial en 2012.

Origen	Casos	Proporción %
Aislados	4	8,5
Escolares	7	14,9
Lactantes	26	55,3
Neonatología	3	6,4
Oncología infantil	5	10,6
UCI pediátrica	1	2,1
Desconocido	1	2,1
Total	47	100,0

Respecto a la causa de la hospitalización en las gastroenteritis por rotavirus A adquiridas nosocomialmente, en la tabla 24 se detalla el número de casos por diagnóstico principal de hospitalización. El principal grupo de pacientes afectado fue el de ingresados por afecciones respiratorias con 20 (42,5%) casos, seguido por 4 (8,5%) casos de pacientes con cáncer y 3 (6,4%) casos de pacientes epilépticos. El resto de casos estaba ingresado por una gran variedad de diagnósticos.

Tabla 24: Número y proporción de casos según el diagnóstico principal de hospitalización en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial en 2012.

Diagnóstico	Casos	%
Afección respiratoria	20	42,5
Neoplasia	4	8,5
Epilepsia	3	6,4
Pielonefritis por E. coli	2	4,3
Adenoflemón	2	4,3
Nacimiento patológico	2	4,3
Encefalopatía secuelar a episodios hipóxicos previos	1	2,1

Sepsis-meningitis	1	2,1
Síndrome febril	1	2,1
Macrocefalia	1	2,1
Retraso psicomotor	1	2,1
Reflujo gastroesofágico	1	2,1
Enfermedad de Niemann-Pick	1	2,1
Trastorno paroxístico no epiléptico	1	2,1
Colitis eosinofílica	1	2,1
Gastroenteritis rotavirus negativa	1	2,1
Anemia ferropénica	1	2,1
Cefalea	1	2,1
Microcardiopatía dilatada con insuficiencia mitral	1	2,1
Desconocido	1	2,1
Total	47	99,7

2.1.1. Estacionalidad según origen de la infección

Las curvas epidémicas anuales de los casos de gastroenteritis por rotavirus de adquisición comunitaria y de los casos de adquisición nosocomial tuvieron una forma similar, con máximos de incidencia a finales del invierno, aunque con distinta amplitud (Fig. 26). La curva de los casos comunitarios tuvo su máxima incidencia en marzo con 61 casos, mientras que la curva epidémica de casos nosocomiales tuvo una meseta en la que las máximas incidencias ocurrieron en febrero y marzo con 13 casos en cada mes. En general la incidencia de casos de adquisición comunitaria superó a la incidencia de casos nosocomiales, aunque hubo un mes, el mes de abril, en el que la incidencia de estos superó a la incidencia de aquellos. En este mes se detectaron 10 casos nosocomiales y sólo 7 comunitarios. No se detectaron casos nosocomiales desde julio hasta noviembre, concentrándose el 91,5% de los casos en los primeros cuatro meses del año.

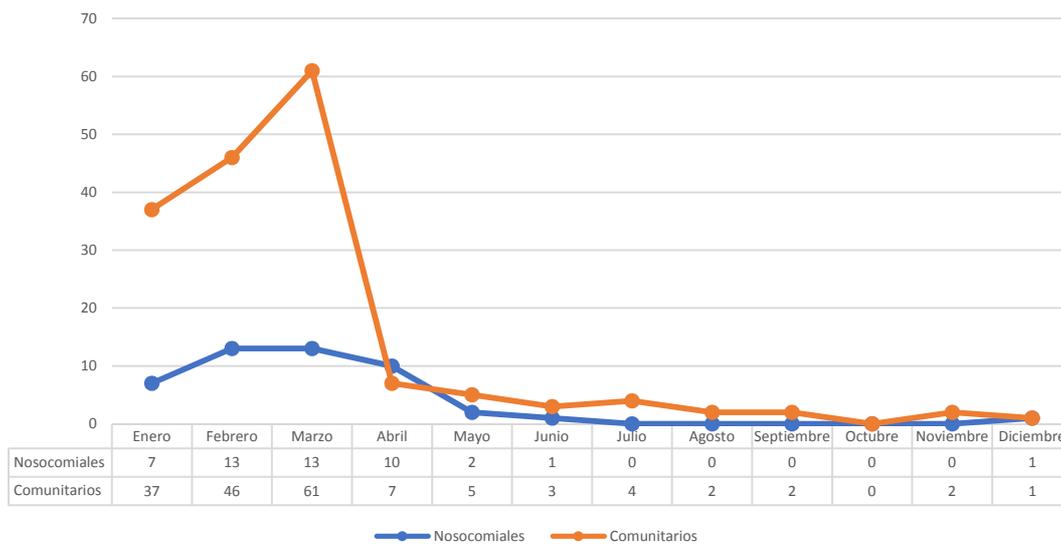


Figura 26: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A durante 2012, tanto de adquisición comunitaria como de adquisición nosocomial.

2.1.2. Incidencia según edad y origen de la infección

En la tabla 25 se detalla el número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o de adquisición nosocomial por grupos de edad.

Tabla 25: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o nosocomial por edades en 2012.

Edad (meses)	Casos comunitarios	Casos nosocomiales
0-5	35	19
6-23	99	17
24-59	30	9
60 ó más	6	2
Total	170	47

Se encontraron diferencias significativas en la distribución de la variable edad según el tipo de infección, comunitaria o nosocomial (p -valor = 0,0258). El principal grupo de edad afectado por las gastroenteritis por rotavirus A adquiridas en la comunidad fue el de 6 a 23 meses, representando el 58,2% de los casos (Fig. 27). En cambio, en los casos nosocomiales el principal grupo de edad afectado fue el de menores de 6 meses, con un 40,4% de los casos. En los casos nosocomiales se observó una mayor dispersión de los

casos entre los distintos grupos de edad, de forma que el grupo de entre 6 y 23 meses perdió la predominancia a costa del resto de grupos de edad que crecieron en proporción.

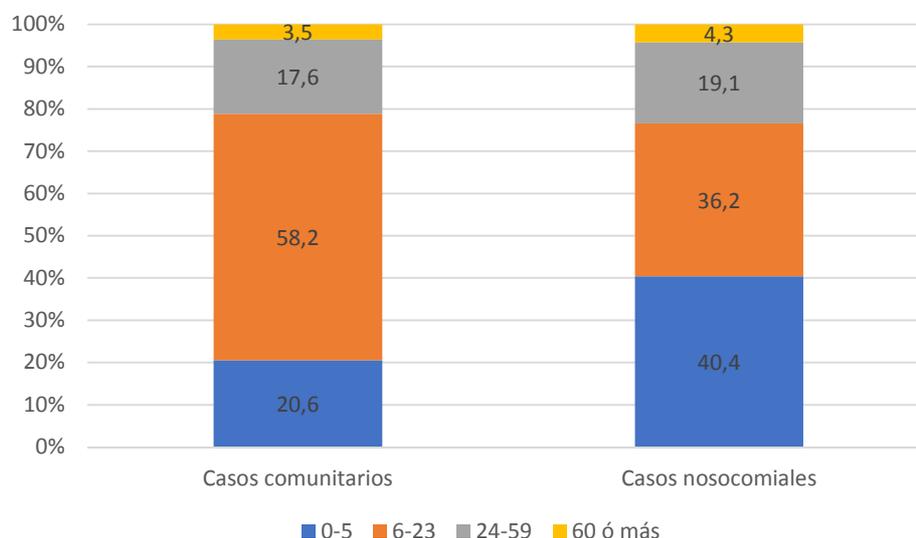


Figura 27: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o nosocomial por edades (en meses) en 2012.

2.1.3. Incidencia según sexo y origen de la infección

En la tabla 26 se observa el número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o de adquisición nosocomial por sexos.

Tabla 26: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o nosocomial por sexos en 2012.

Sexo	Casos comunitarios	Casos nosocomiales
Hombre	79	32
Mujer	91	15
Total	170	47

Se encontraron diferencias significativas en la distribución de la variable sexo según el tipo de infección, comunitaria o nosocomial (p-valor = 0,0008). En los casos de adquisición comunitaria la proporción de casos fue ligeramente mayor entre las mujeres

que entre los hombres, mientras que en las infecciones nosocomiales la proporción de casos fue mucho mayor entre los hombres, con un 68,1% de los casos.

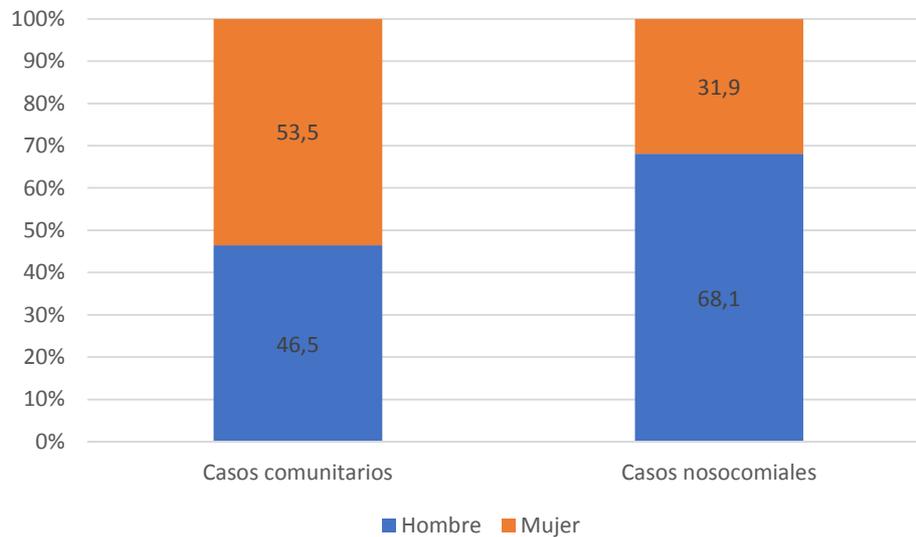


Figura 28: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o nosocomial por sexos en 2012.

2.2. Estudio de genotipos en casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012

2.2.1. Prevalencia de los distintos genotipos

En la tabla 27 se detalla el número de muestras que se sometieron al análisis de genotipado y los genotipos encontrados. Se analizaron 138 (81,2%) de las 170 muestras procedentes de casos con gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria.

Tabla 27: Genotipos encontrados en los casos de adquisición comunitaria en 2012 y número de muestras identificadas en cada genotipo. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. G1P0 representa una muestra en la que no se consiguió identificar el genotipo P.

Genotipo	Nº de muestras
G0P0	21
G1P[8]	42
G2P[4]	28
G4P[8]	37
G9P[8]	2

G12P[8]	5
G1P0	1
G9P[4]	1
G1G4P[8]	1
Total analizadas	138
No analizadas	32
Total casos	170

En la figura 29 puede observarse una fotografía de un gel de agarosa, en el que se han desarrollado mediante electroforesis los productos de amplificación por PCR, específicos de genotipo de las muestras 102 a 119. Se observan cuatro muestras en las que no se identificó ningún genotipo (104, 106, 115 y 119), cinco muestras que presentaron genotipo G1P[8] (109, 111, 112, 116 y 118), cuatro muestras que presentaron genotipo G4P[8] (110, 113, 114 y 117) y cinco muestras que presentaron genotipo G2P4 (102, 103, 105, 107 y 108). Se observa también con el control negativo que no se produjo contaminación cruzada.

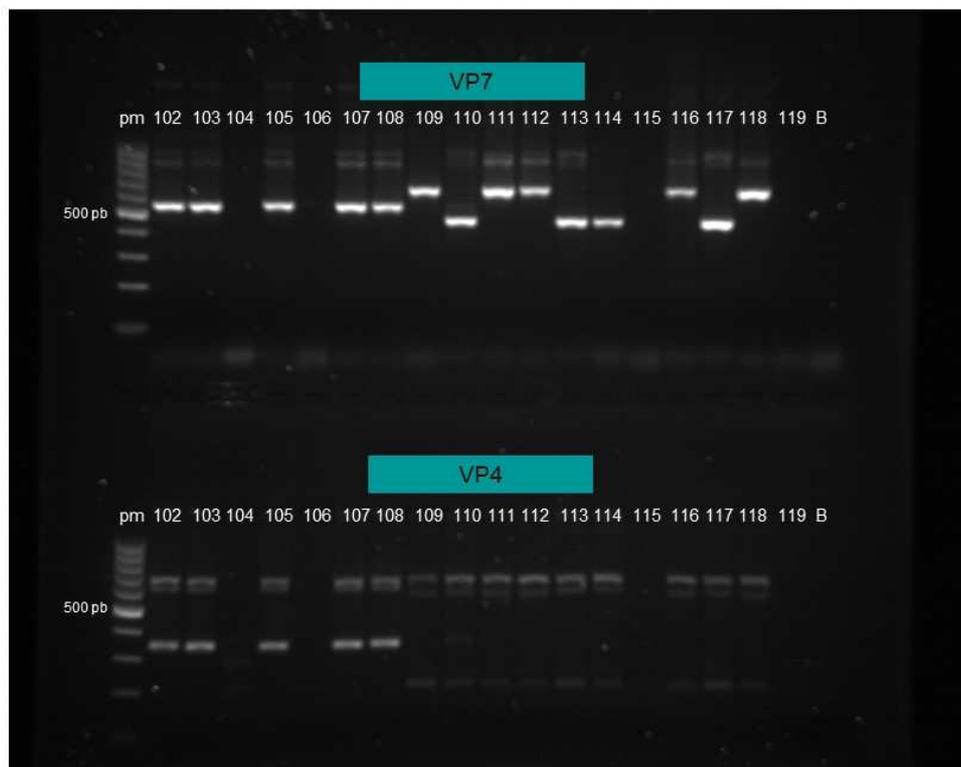


Figura 29: Fotografía de un gel de agarosa tras electroforesis a 120V durante 90 minutos, de las muestras 102-119 de 2012. Se utilizó SYBR® Safe DNA gel stain (ThermoFisher Scientific) para visualizar el ADN bajo excitación ultravioleta. En la parte superior (VP7) las bandas de 452 pb, 521 pb, y 618 pb pertenecen a los genotipos G4, G2 y G1 respectivamente. En la parte inferior (VP4) las bandas a 224 pb y a 362 pb pertenecen a los genotipos P[8] y P[4] respectivamente. B se corresponde a un control negativo en el que la muestra de heces ha sido sustituida por agua pura de grado molecular (Invitrogen).

Los genotipos más prevalentes durante 2012 en los casos comunitarios fueron los genotipos tipo Wa (G1P[8], G4P[8], G9P[8] y G12P[8]) que se encontraron en un 62,3% de todas las muestras analizadas (Fig. 30). El genotipo más frecuente fue el G1P[8] con un 30,4% de las muestras, seguido de cerca por el G4P[8] con un 26,8%. Los genotipos tipo DS-1 fueron los siguientes más prevalentes, con el genotipo G2P[4] encontrándose en un 20,3% de las muestras. Los genotipos G9P[8] y G12P[8] se encontraron tan solo en 7 muestras. En una de las muestras se identificó el genotipo G, pero no se consiguió identificar el genotipo P; en otra muestra se encontró una asociación infrecuente de genotipos G y P (G9P[4]); y otra muestra se encontraron dos genotipos G y uno P, indicando una infección múltiple con dos cepas (G1G4P[8]). En 21 muestras analizadas (15,2%) no se consiguió identificar ningún genotipo.

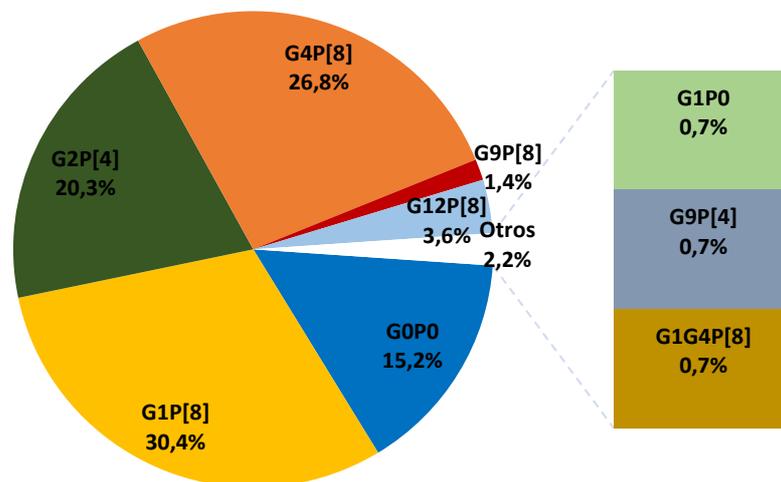


Figura 30: Proporción de los distintos genotipos encontrados en las muestras analizadas en 2012. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. G1P0 representa una muestra en la que no se consiguió identificar el genotipo P.

2.2.2. Estacionalidad de genotipos

En la figura 31 se detalla el número de muestras con un genotipo determinado que se encontraron cada mes a lo largo de 2012. Todos los genotipos presentaron su máxima incidencia entre enero y marzo. El genotipo G1P[8] se encontró principalmente de enero a marzo, con sólo dos casos fuera de este periodo, uno en abril y uno en septiembre. Por otro lado, el genotipo G2P[4] sólo se encontró en los primeros cuatro meses del año., mientras que el genotipo G4P[8] fue el genotipo que mayor expansión tuvo a lo largo del año ya que, aunque su pico de incidencia ocurrió en febrero y marzo, produjo casos aislados en todas las estaciones, no presentando casos tan solo en julio, en septiembre, en octubre y en diciembre. Los cinco casos con genotipo G12P[8] ocurrieron en el primer trimestre del año, mientras que los dos casos con G9P[8] ocurrieron aisladamente, uno en enero y otro en abril. La frecuencia de casos con genotipo no identificable se distribuyó más o menos homogéneamente a lo largo del año, siguiendo la tendencia general de mayor incidencia en el primer trimestre del año.

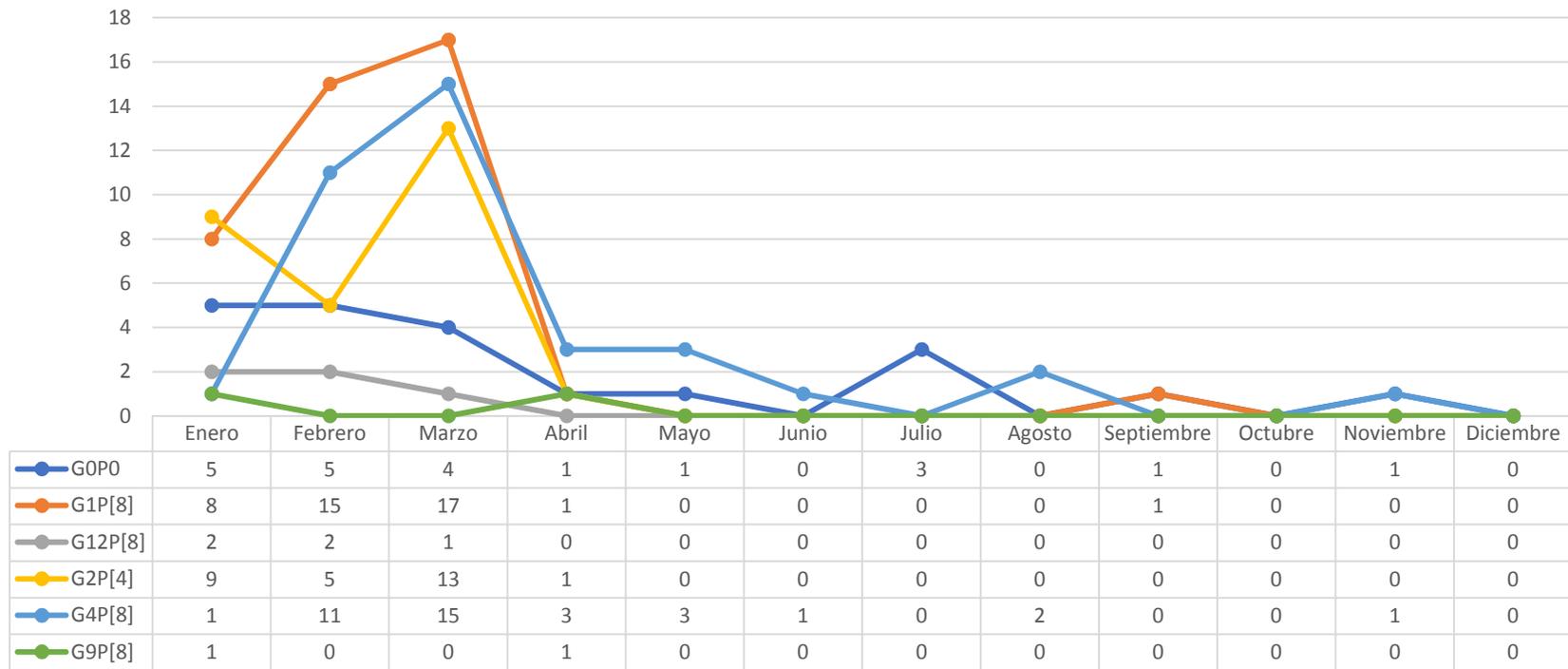


Figura 31: Distribución temporal de los distintos genotipos identificados en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria a lo largo de 2012. GOP0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo.

2.2.3. Relación del genotipo con la edad

En la tabla 28 se detalla la distribución de muestras por genotipos y grupos de edad. Se encontraron diferencias significativas en la distribución de genotipos en los distintos grupos de edad (p -valor = 0,041). Estas diferencias se siguieron manteniendo cuando eliminamos del análisis la categoría “resto de genotipos”, cuyas frecuencias fueron todas menores de 5 (p -valor = 0,024).

Tabla 28: Número de muestras por genotipo identificado y grupo de edad en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], cinco G12P[8], un G9P[4], un G1G4P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Genotipo	Edad (meses)				Total
	0-5	6-11	12-23	24 ó más	
G0P0	5	2	5	9	21
G1P[8]	8	10	19	5	42
G2P[4]	4	7	11	6	28
G4P[8]	11	14	7	5	37
Resto de genotipos	2	4	1	3	10
Total	30	37	43	28	138

La distribución de genotipos fue muy similar en los grupos de edad de menores de 6 meses y de 6 a 11 meses. En estos niños menores de 1 año el genotipo más prevalente fue el G4P[8] (36,7%), seguido del G1P[8] (26,7%) y del G2P[4] (13,3%). En cambio, en los niños con edad entre 12 y 23 meses el genotipo más prevalente fue el G1P[8] (44,2%), seguido del G2P[4] (25,6%) y del G4P[8] (16,3%). En los pacientes a partir de los dos años de edad las proporciones de los diferentes genotipos fueron más parecidas, siendo el genotipo G2P[4] el más prevalente (21,4%), seguido de G1P[4] y G4P[8] en igual proporción (17,9%). Del “resto de genotipos”, en niños menores de 6 meses se identificó una muestra con una constelación de genotipos inusual G9P[4], así como una muestra con genotipo G12P[8]. En el grupo de edad de 6 a 11 meses se identificaron las dos muestras con genotipo G9[8] identificado en 2012, una muestra con genotipo G12P[8] y una muestra con genotipo G1 en la que no se pudo identificar el genotipo P. En el grupo de edad de 12 a 23 meses sólo se encontró una muestra con genotipo G12P[8], y en el grupo de edad a partir de 2 años hubo dos muestras con genotipo G12P[8] y una

muestra con una infección múltiple G1G4P[8]. Las muestras en las que no se pudo identificar ningún genotipo fueron más frecuentes en niños mayores de 2 años (32,1%) y en menores de 6 meses (16,7%), y menos frecuentes en el rango de edad entre 6 y 23 meses (5,4-11,6%) (Fig. 32).

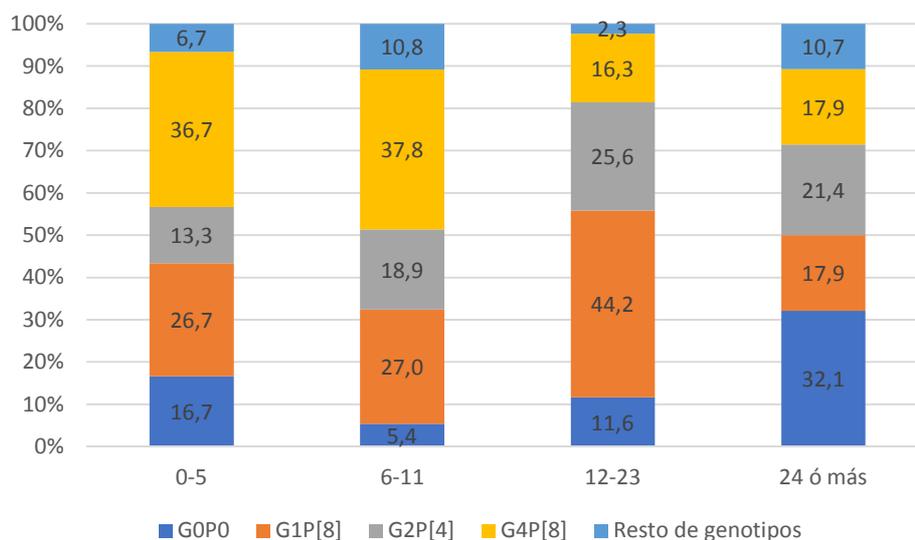


Figura 32: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria por genotipos y por edades (en meses) en 2012. GOP0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], cinco G12P[8], un G9P[4], un G1G4P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

2.2.4. Relación del genotipo con los sexos

En la tabla 29 se detalla la distribución de muestras por genotipos y sexos. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de genotipos en los distintos sexos (p-valor = 0.244).

Tabla 29: Número de muestras por genotipo identificado y sexo en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012. GOP0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], cinco G12P[8], un G9P[4], un G1G4P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Genotipo	Sexo		Total
	Hombre	Mujer	
GOP0	5	16	21

G1P[8]	21	21	42
G2P[4]	13	15	28
G4P[8]	20	17	37
Resto de genotipos	5	5	10
Total	64	74	138

Tanto en hombres como en mujeres el genotipo más prevalente fue el G1P[8] (32,8-28,4%), seguido del G4P[8] (31,3-23,0%) y del G2P[4] (20,3%). En mujeres se encontraron más muestras en las que no se pudo identificar el genotipo (21,6%) que en hombres (7,8%). Del “resto de genotipos”, las dos muestras con genotipo G9P[8] procedieron de mujeres, así como tres muestras con genotipo G12P[8]. Las dos restantes muestras en las que se identificó el genotipo G12P[8] procedieron de hombres, así como la muestra con el genotipo inusual G9P[4], la muestra con genotipo G1 en la que no se pudo identificar el genotipo P, y la muestra con infección múltiple con genotipos G1G4P[8] (Fig. 33).

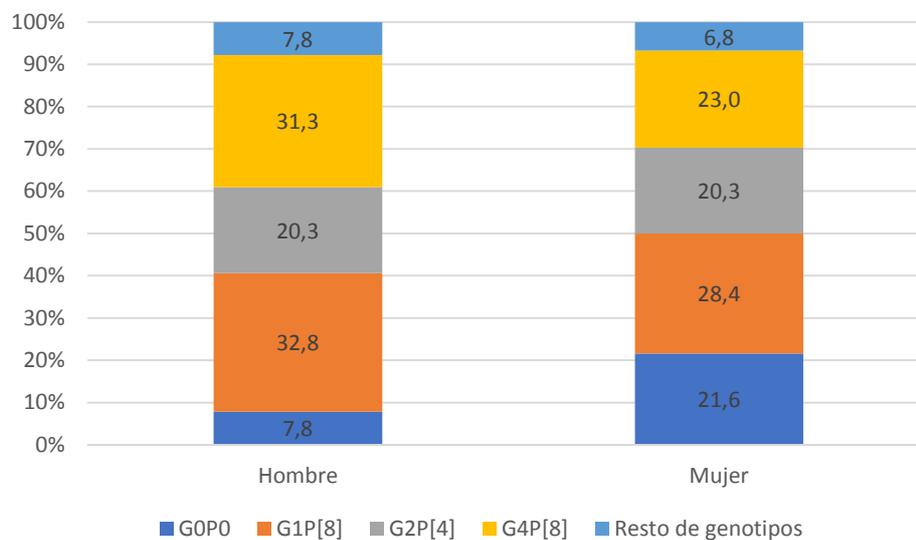


Figura 33: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria por genotipos y por sexos en 2012. GOP0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], cinco G12P[8], un G9P[4], un G1G4P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

2.2.5. Relación del genotipo con la procedencia

En la tabla 30 se detalla la distribución de muestras por genotipos y procedencia de las mismas. Se encontraron diferencias significativas en la distribución de genotipos, según si las muestras procedieron del servicio de urgencias pediátricas o del grupo de resto de procedencias (p -valor = 0,033).

Tabla 30: Número de muestras por genotipo identificado y procedencia en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], cinco G12P[8], un G9P[4], un G1G4P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P. El “resto de procedencias” incluyó 12 muestras procedentes de atención primaria (27,9%), 26 procedentes de consultas externas pediátricas (60,5%), 2 muestras procedentes del hospital de adultos (4,7%) y 3 muestras con origen desconocido (7,0%).

Genotipo	Procedencia		
	Resto de procedencias	Urgencias pediátricas	Total
G0P0	11	10	21
G1P[8]	9	33	42
G2P[4]	8	20	28
G4P[8]	6	31	37
Resto de genotipos	4	6	10
Total	38	100	138

La distribución de genotipos en las muestras procedentes de urgencias pediátricas mostraron un patrón más acorde con las proporciones generales encontradas en 2012, con una preponderancia de los genotipos G1P[8] (33,0%) y G4P[8] (31,0%), seguidos por el genotipo G2P[4] (20,0%). Procedentes de urgencias infantiles fueron las dos muestras con genotipo G9P[8] identificadas en 2012, la muestra con el genotipo inusual G9P[4], la muestra con genotipo G1 en la que no se pudo identificar el genotipo P, y dos muestras con genotipo G12P[8]. En el grupo del “resto de procedencias” la distribución de genotipos fue más heterogénea, predominando las muestras en las que no se pudo identificar ningún genotipo (28,9%), y disminuyendo la proporción del genotipo G4P[8] (15,8%). 3 muestras con genotipo G12P[8] tuvieron este tipo de procedencia, además de la muestra con infección múltiple y genotipos G1G4P[8] (Fig. 34).

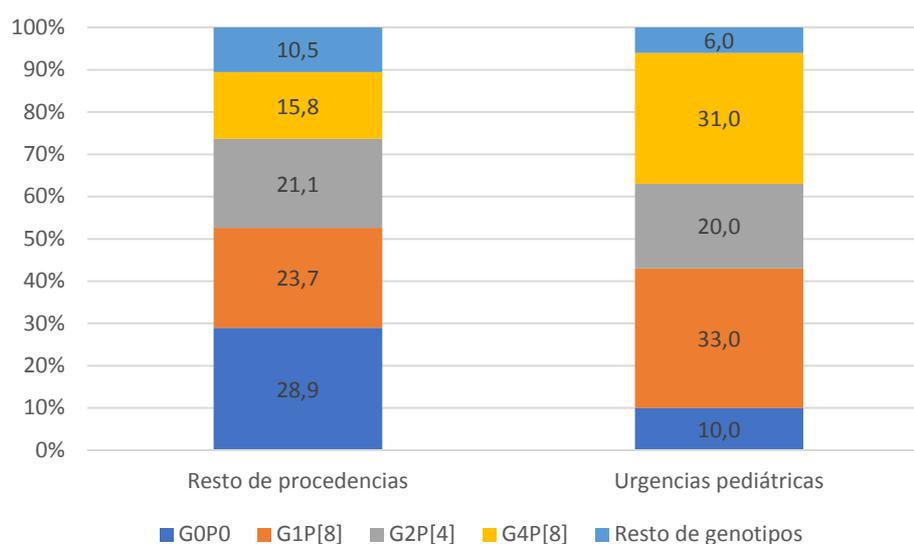


Figura 34: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria por genotipos y por procedencia en 2012. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], cinco G12P[8], un G9P[4], un G1G4P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

2.2.6. Relación del genotipo con la sintomatología de los casos

Se obtuvieron los datos de sintomatología de 107 (77,5%) de los 138 casos en los que se genotiparon las muestras. En estos casos no se identificó otro agente infeccioso u otra patología que pudiese explicar los síntomas, aparte del rotavirus. En la tabla 31 se detalla el número de casos que presentaron un determinado síntoma.

Tabla 31: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 que presentaron o no presentaron un determinado síntoma.

Síntoma	Presente	Ausente	Total
Diarrea	106	1	107
Vómitos	99	8	107
Fiebre	76	31	107
Decaimiento	12	95	107
Deshidratación	39	68	107
Hiporexia	24	83	107
Síntomas catarrales	29	78	107
Exantema	2	105	107
Otitis	2	105	107
Convulsiones	1	106	107

La mayoría de los casos presentaron diarrea (99,1%), vómitos (92,5%) y fiebre (71,0%) en algún momento durante la enfermedad, presentando más de un tercio de los casos algún signo de deshidratación (36,4%). Algo más de uno de cada cuatro casos (27,1%) presentó síntomas catarrales sin haber sido identificado ningún patógeno respiratorio, y también cerca de uno de cada cuatro casos presentó hiporexia (22,4%). Tan solo un 11,2% de los casos presentó decaimiento. Otros síntomas identificados en el estudio con baja frecuencia fueron exantema (1,9%), otitis (1,9%) y convulsiones (0,9%) no filiadas con otra patología aparente (Fig. 35).

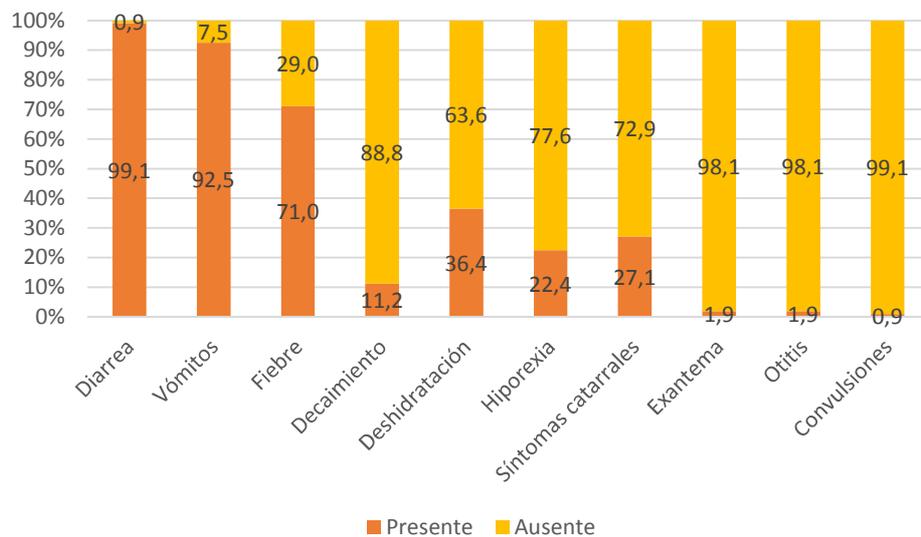


Figura 35: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 que presentaron o no presentaron un determinado síntoma.

Relación del genotipo con la diarrea:

En la tabla 32 se detalla el número de casos que presentó o no presentó diarrea y los distintos genotipos que tuvieron las muestras. Todos los casos presentaron diarrea (99,1%) excepto uno, que se correspondió con una muestra en la que no se pudo identificar ningún genotipo.

Tabla 32: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de diarrea. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], tres G12P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Genotipo	Sin diarrea	Con diarrea	Total
G0P0	1	11	12
G1P[8]	0	31	31
G2P[4]	0	25	25
G4P[8]	0	33	33
Resto de genotipos	0	6	6
Total	1	106	107

Relación del genotipo con la presencia de vómitos:

En la tabla 33 se detalla el número de casos que presentó o no presentó vómitos y los distintos genotipos que tuvieron las muestras. Se encontró relación estadísticamente significativa en la distribución del síntoma vómitos entre genotipos (p -valor = 0.009).

Tabla 33: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de vómitos. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], tres G12P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Genotipo	Sin vómitos	Con vómitos	Total
G0P0	4	8	12
G1P[8]	2	29	31
G2P[4]	1	24	25
G4P[8]	1	32	33
Resto de genotipos	0	6	6
Total	8	99	107

La mitad (50,0%) de los casos que no presentaron vómitos correspondió a muestras en las que no se pudo identificar ningún genotipo (Fig. 36). El resto de casos sin vómitos pertenecieron a muestras con los genotipos más prevalentes. Todos los casos con genotipos poco frecuentes (G9P[8], G12P[8], G1P0) presentaron vómitos.

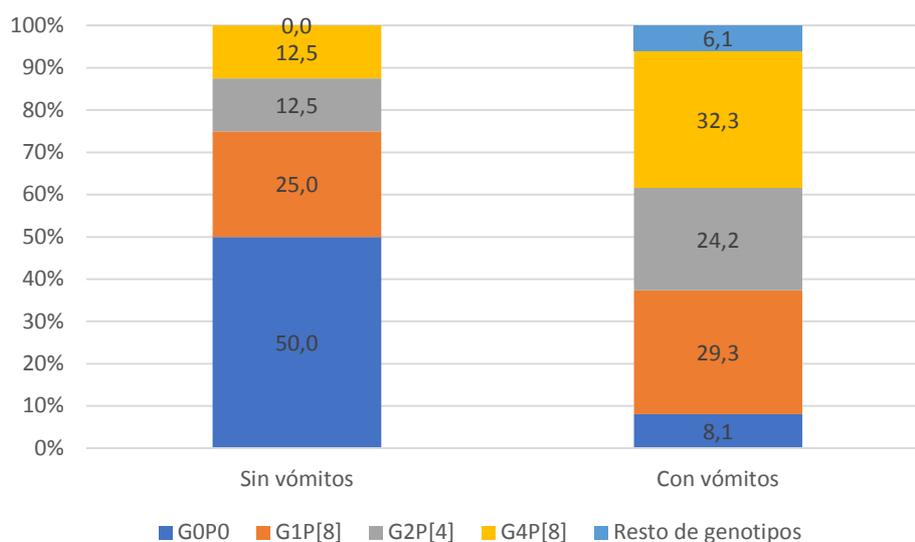


Figura 36: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria por genotipos con presencia o ausencia de vómitos en 2012. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], tres G12P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Relación del genotipo con la presencia de fiebre:

En la tabla 34 se detalla el número de casos que presentó o que no presentó fiebre y los distintos genotipos que tuvieron las muestras. No se encontró relación estadísticamente significativa en la distribución del síntoma fiebre entre genotipos (p -valor = 0.102).

Tabla 34: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de vómitos. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], tres G12P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Genotipo	Sin fiebre	Con fiebre	Total
G0P0	2	10	12
G1P[8]	12	19	31
G2P[4]	6	19	25
G4P[8]	7	26	33
Resto de genotipos	4	2	6
Total	31	76	107

Relación del genotipo con la presencia de signos de deshidratación:

En la tabla 35 se detalla el número de casos que presentó o que no presentó signos de deshidratación y los distintos genotipos que tuvieron las muestras. No se encontró relación estadísticamente significativa en la distribución del síntoma signos de deshidratación entre genotipos (p -valor = 0.411).

Tabla 35: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de signos de deshidratación. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], tres G12P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Genotipo	Sin deshidratación	Con deshidratación	Total
G0P0	7	5	12
G1P[8]	23	8	31
G2P[4]	15	10	25
G4P[8]	18	15	33
Resto de genotipos	5	1	6
Total	68	39	107

Relación del genotipo con la presencia de síntomas catarrales:

En la tabla 36 se detalla el número de casos que presentó o que no presentó síntomas catarrales y los distintos genotipos que tuvieron las muestras. No se encontró relación estadísticamente significativa en la distribución de la presencia o no de síntomas catarrales entre genotipos (p -valor = 0.090), aunque al eliminar del análisis la categoría “resto de genotipos”, cuyas frecuencias fueron menores a 5, esa relación sí resultó significativa (p -valor = 0,046).

Tabla 36: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de síntomas catarrales. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], tres G12P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Genotipo	Sin síntomas catarrales	Con síntomas catarrales	Total
G0P0	5	7	12
G1P[8]	26	5	31
G2P[4]	19	6	25
G4P[8]	24	9	33

Resto de genotipos	4	2	6
Total	78	29	107

Una mayor proporción de casos que presentaron síntomas catarrales se correspondió con muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo, un 24,1% frente al 6,4% de los casos sin estos síntomas.

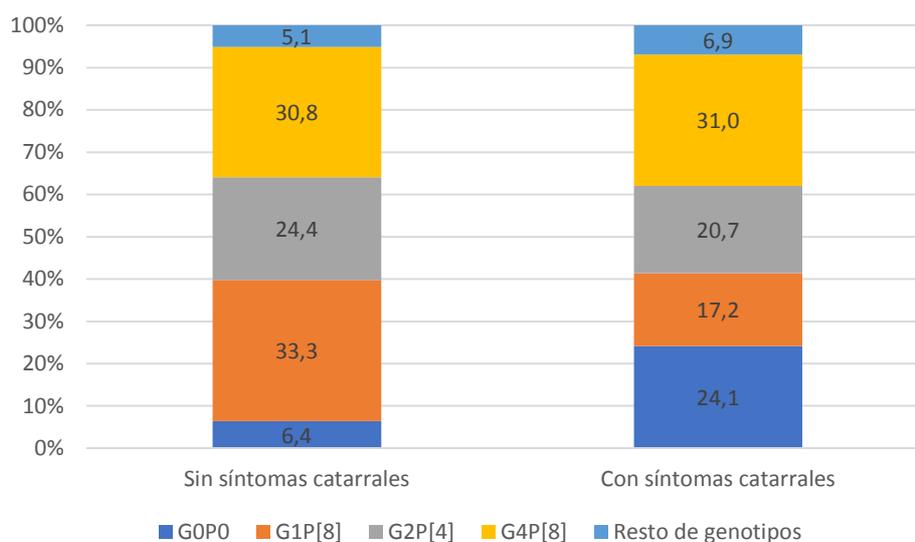


Figura 37: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria por genotipos con presencia o ausencia de síntomas catarrales en 2012. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], tres G12P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Relación del genotipo con la presencia de hiporexia:

En la tabla 37 se detalla el número de casos que presentó o no presentó hiporexia y los distintos genotipos que tuvieron las muestras. No se encontró relación estadísticamente significativa en la distribución del síntoma hiporexia entre genotipos (p-valor = 0.201), ni siquiera eliminando del análisis la categoría “resto de genotipos”, que presentó frecuencias menores de 5 (p-valor = 0.129).

Tabla 37: Número de muestras por genotipo identificado en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012, con presencia o ausencia de hiporexia. G0P0 representa las muestras

en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], tres G12P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Genotipo	Sin hiporexia	Con hiporexia	Total
G0P0	12	0	12
G1P[8]	21	10	31
G2P[4]	19	6	25
G4P[8]	27	6	33
Resto de genotipos	4	2	6
Total	83	24	107

Relación del genotipo con la presencia de otros síntomas:

Para el resto de síntomas para los que las frecuencias de aparición fueron menores de 5, es decir, para los síntomas de decaimiento, exantema, otitis y convulsiones, no pudo establecerse la significancia estadística de la relación entre genotipo y ocurrencia del síntoma. Con respecto al síntoma de decaimiento, los 12 casos en los que se presentó este síntoma pertenecieron a cinco muestras con genotipo G4P[8], cuatro muestras con genotipo G2P[4], dos muestras con genotipo G1P[8] y una muestra con genotipo G9P[8]. Este síntoma no se encontró en ninguno de los casos en los que no se pudo identificar ningún genotipo. Sólo presentaron exantema dos casos, ambos con genotipo G1P8. Respecto a la otitis, los dos únicos casos que presentaron este síntoma tenían genotipo G4P8. Por último, sólo un caso presentó convulsiones, y perteneció a una muestra en la que no se identificó ningún genotipo.

2.2.7. Relación de los genotipos con la hospitalización de los casos

Se obtuvo el dato de hospitalización de 137 (80,6%) de los 170 casos comunitarios detectados. 58 casos (42,3%) fueron hospitalizados como consecuencia de la gastroenteritis, mientras que 79 (57,8%) fueron dados de alta a su domicilio desde urgencias. Suponiendo que esta proporción de hospitalizaciones es extrapolable a los 170 casos comunitarios el número total de hospitalizaciones en 2012 fue de 72 casos. Este dato, teniendo en cuenta que el número total de niños menores de 5 años en el área I de salud fue de 15.927, representó que alrededor de 452 niños por cada 100.000 menores de 5 años requiriesen hospitalización debido al rotavirus.

Teniendo en cuenta que no todas las muestras se analizaron para averiguar su genotipo, fueron finalmente 108 casos (63,5%) los que se sometieron al análisis estadístico. En la tabla 38 se detalla el número de casos de cada genotipo que fue dado de alta desde urgencia o hospitalizado. No se observó relación estadísticamente significativa entre la circunstancia de ser hospitalizado y el genotipo (p-valor = 0.193).

Tabla 38: Número de muestras procedentes de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 que fueron dados de alta al domicilio desde urgencias o hospitalizados, por genotipos. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó dos G9P[8], tres G12P[8] y un G1P0 en el que no se consiguió identificar el genotipo P.

Genotipo	Alta	Hospitalización	Total
G0P0	6	7	13
G1P[8]	23	8	31
G2P[4]	13	12	25
G4P[8]	18	15	33
Resto de genotipos	2	4	6
Total	62	46	108

La duración media de la hospitalización fue de 3,9 días, con una desviación estándar de 2,6 días. La estancia mínima fue un día, mientras que la estancia máxima fue de 16 días (Fig. 38).

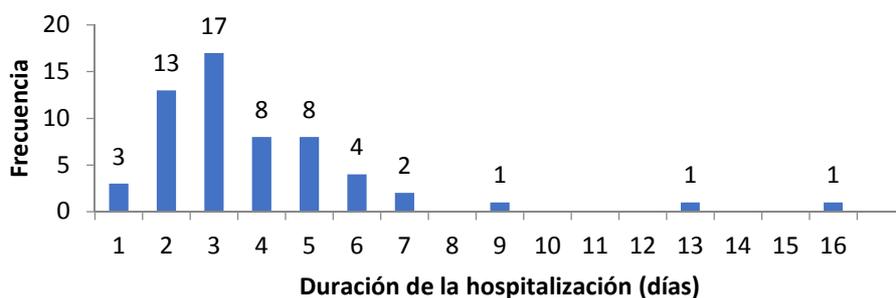


Figura 38: Histograma de frecuencias de la duración en días de la hospitalización de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012.

En la tabla 39 se detalla el número de casos que fueron hospitalizados de 1-4 días o más de 4 días en cada genotipo. Aunque las frecuencias fueron pequeñas para cada genotipo, no se encontró relación estadísticamente significativa entre la duración de la hospitalización y el genotipo (p -valor = 0.387). En el caso que estuvo hospitalizado 16 días no se pudo identificar ningún genotipo, mientras que en el caso que lo estuvo 13 días el genotipo identificado fue un G12P[8]. Los tres casos con genotipo G12P[8] estuvieron más de 4 días hospitalizados.

Tabla 39: Número de muestras procedentes de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 que fueron hospitalizados de 1-4 días o más de 4 días, por genotipos. GOP0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó un G9P[8] y tres G12P[8].

Genotipo	Duración hospitalización		Total
	1-4 días	más de 4 días	
GOP0	5	2	7
G1P[8]	6	2	8
G2P[4]	9	3	12
G4P[8]	11	4	15
Resto de genotipos	1	3	4
Total	32	14	46

Por otro lado, 50 (36,5%) de los 137 casos tuvieron que ser admitidos en urgencias pediátricas en más de una ocasión por la gastroenteritis (Fig. 39). Cada paciente tuvo una media de 1,5 ingresos en urgencias pediátricas, o en urgencias de adultos, con una desviación estándar de 0,8 ingresos. 6 pacientes acudieron hasta 4 veces por el mismo motivo a urgencias, teniendo finalmente que ser hospitalizados 3 de ellos.

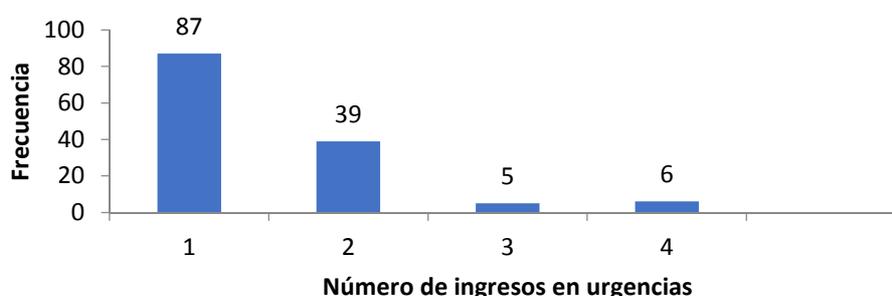


Figura 39: Histograma de frecuencias del número de ingresos en urgencias de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012.

2.2.8. Severidad de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria, su estacionalidad y su relación con la edad, el sexo, la procedencia de la muestra y el genotipo

Se obtuvieron los datos necesarios para calcular la severidad de las gastroenteritis en 136 (80,0%) de los 170 casos identificados. La mayoría (78,7%) de casos de gastroenteritis por rotavirus A diagnosticados en el Hospital se clasificaron como gastroenteritis severas, con un total de 107 casos. 27 (19,9%) casos más resultaron en gastroenteritis moderadas, mientras que sólo 2 (1,5%) casos fueron gastroenteritis leves (Fig. 40). En total, el 98,6% de todos los casos fueron gastroenteritis moderadas o severas.

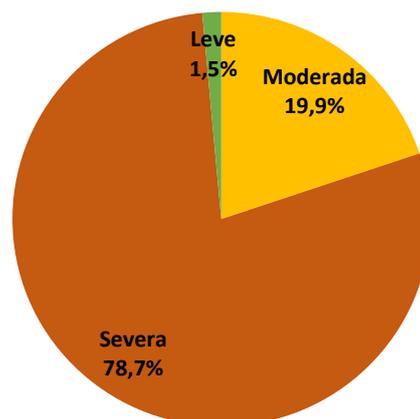


Figura 40: Proporción de las distintas severidades encontradas en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012.

Análisis de la severidad:

Para estudiar la asociación de la severidad con el resto de variables se utilizó la regresión logística tomando severidad como variable dependiente. Para el análisis se juntaron los casos con severidad moderada y leve, y se quitaron los 6 casos con genotipos menos frecuentes (“resto de genotipos”) en el modelo donde intervenía la variable genotipo. Se estimaron las Odds ratio de afectación severa, crudas y ajustadas. Para los ajustes se consideraron 3 modelos. El modelo 1 incluyó fecha de ocurrencia del caso, sexo y edad.

El modelo 2 incluyó al modelo 1 más la procedencia de las muestras. El modelo 3 incluyó al modelo 2 más el genotipo identificado en las muestras. Los modelos no mostraron falta de ajuste, y el modelo que mejor predijo fue el número 2, con un área bajo la curva AUC = 0,7625 (Tabla 40). Conforme a este modelo, la severidad se vio afectada por la fecha en la que ocurrieron los casos y por la edad de los mismos. En cambio, no pareció verse afectada por el sexo de los casos, ni por la procedencia, ni por el genotipo identificado en las muestras.

Gastroenteritis aguda por rotavirus en la población infantil atendida en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca

	Modelo 1 (n=136)			Modelo 2 (n=136)			Modelo 3 (n=101)					
Fecha	OR no ajustado	IC 95%		OR ajustado	IC 95%		OR ajustado	IC 95%		OR ajustado	IC 95%	
Primer trimestre	16,52	1,76	154,91	16,61	1,42	194,33	15,61	1,36	178,69	9,36	0,74	118,01
Segundo trimestre	22,00	1,54	314,29	28,01	1,51	520,37	25,67	1,39	474,56	9,86	0,45	214,12
Segundo semestre	1			1			1			1		
Sexo												
Hombre	1			1			1			1		
Mujer	0,60	0,26	1,39	0,74	0,28	1,94	0,77	0,29	2,03	0,79	0,27	2,30
Edad (meses)												
0-5	1			1			1			1		
6-11	6,80	2,06	22,48	7,52	1,99	28,36	9,09	2,26	36,49	5,09	1,14	22,70
12-23	10,00	2,82	35,50	8,96	2,46	32,60	10,26	2,73	38,59	8,95	2,13	37,59
24 ó más	3,17	0,97	10,30	3,31	0,95	11,51	4,23	1,11	16,10	3,37	0,70	16,24
Procedencia												
Resto de procedencias	1						1			1		
Urgencias pediátricas	1,28	0,42	3,87				2,13	0,59	7,69	2,16	0,54	8,57
Genotipo												
G0P0	1									1		
G1P[8]	2,45	0,59	10,17							1,24	0,23	6,78
G2P[4]	2,26	0,52	9,83							1,26	0,23	6,74
G4P[8]	2,65	0,64	10,97							2,19	0,39	12,21
AUC				0,7583			0,7625			0,7426		

Tabla 40: Modelos de regresión logística para el análisis de la severidad de las gastroenteritis por rotavirus A adquiridas en la comunidad. A la derecha se listan las variables fecha, sexo, edad, procedencia y genotipo de las muestras. Debajo de cada modelo se indican las odds ratio ajustadas y los índices de confianza del 95%.

Estacionalidad de la severidad:

En la tabla 41, y en la figura 41 se detallan el número y la proporción de casos respectivamente, que se encontraron de gastroenteritis severas, o moderadas y leves, en el primer trimestre, en el segundo trimestre o en el segundo semestre de 2012.

Tabla 41: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria con severidad severa, o moderada y leve, en el primer trimestre, segundo trimestre o segundo semestre de 2012.

Severidad	Primer trimestre	Segundo trimestre	Segundo semestre	Total
Moderada o leve	23	2	4	29
Severa	95	11	1	107
Total	118	13	5	136

El menor riesgo de severidad alta en las gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria fue durante el segundo semestre de 2012. El riesgo de que la severidad fuese alta resultó ser 25 veces mayor durante el segundo trimestre del año, mientras que fue 15 veces mayor en el primer trimestre.

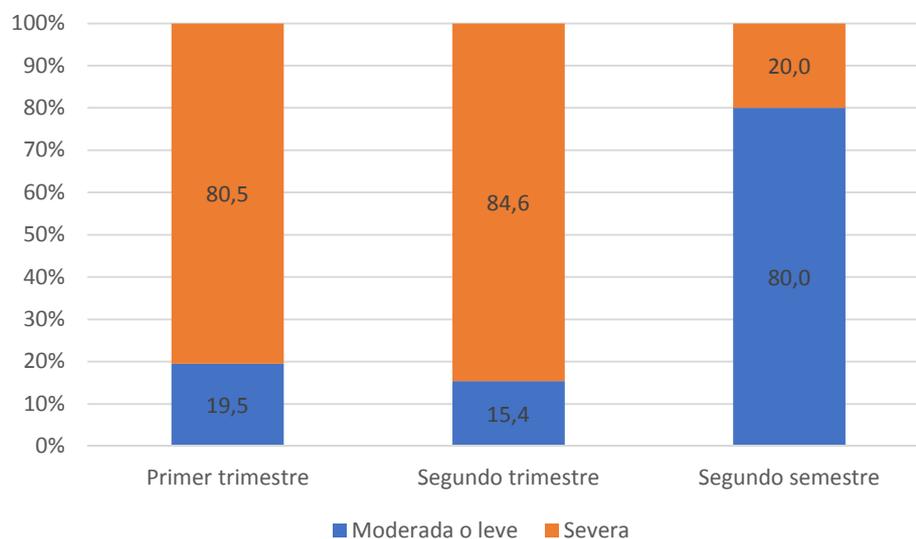


Figura 41: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria con severidad moderada y leve, o severa en el primer trimestre, segundo trimestre, o segundo semestre de 2012.

Relación de la severidad con la edad:

En la tabla 42 y en la figura 42 se detallan el número y la proporción de casos respectivamente, que se encontraron de gastroenteritis severas, o moderadas y leves, en función de la edad de los pacientes.

Tabla 42: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 con severidad severa, o moderada y leve, en función de la edad de los pacientes.

Severidad	Edad en meses				Total
	0-5	6-11	12-23	24 ó más	
Moderada o leve	14	5	4	6	29
Severa	14	34	40	19	107
Total	28	39	44	25	136

Las gastroenteritis menos severas se identificaron en los niños menores de 6 meses, mientras que los niños de entre 6 meses y dos años de edad presentaron el mayor riesgo de que esas gastroenteritis fuesen severas (riesgo 9-10 veces mayor). Ese mayor riesgo (riesgo 4 veces mayor que respecto a los niños menores de 6 meses) también se observó en pacientes mayores de 2 años, aunque sólo se mantuvo significativo cuando se ajustó por procedencia, y dejó de ser significativo al ajustar por genotipo, probablemente debido a que había menos muestra y a que el genotipo no pareció asociarse con la severidad.

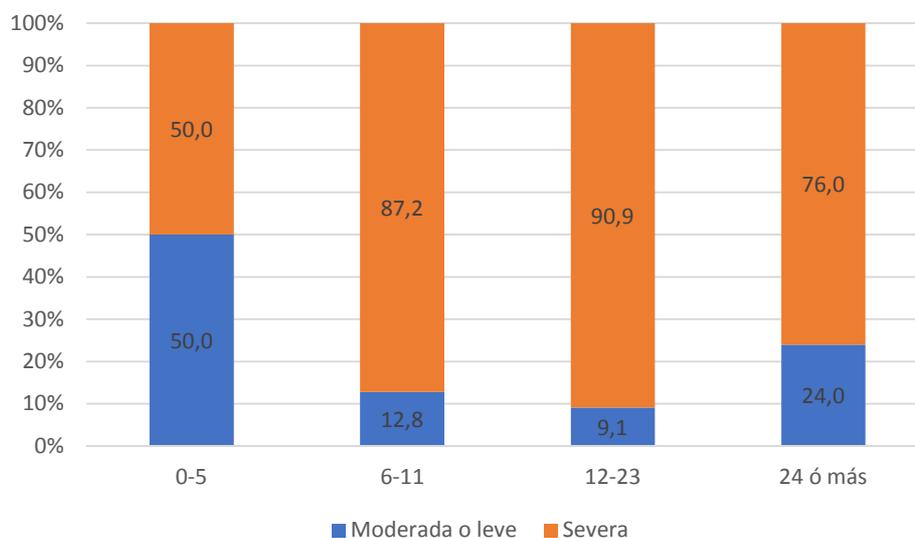


Figura 42: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 con severidad severa, o moderada y leve, en función de la edad de los pacientes.

Relación de la severidad con los sexos:

En la tabla 43 se detalla el número de casos de gastroenteritis severas, o moderadas y leves, en función del sexo de los pacientes. No se observó un riesgo relativo mayor de desarrollar gastroenteritis severas en un sexo que en otro.

Tabla 43: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 con severidad severa, o moderada y leve, en función del sexo de los pacientes.

Severidad	Hombre	Mujer	Total
Moderada o leve	11	18	29
Severa	54	53	107
Total	65	71	136

Relación de la severidad con la procedencia de las muestras:

En la tabla 44 se detalla el número de casos de gastroenteritis severas, o moderadas y leves, en función de la procedencia de las muestras. No se observó un riesgo relativo mayor de desarrollar gastroenteritis severas en función de la procedencia de las muestras.

Tabla 44: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 con severidad severa, o moderada y leve, en función de la procedencia de las muestras. El “resto de procedencias” incluyó 4 muestras procedentes de atención primaria (18,2%), 16 procedentes de consultas externas pediátricas (72,7%), 1 muestra procedentes del hospital de adultos (4,5%) y 1 muestra con origen desconocido (4,5%).

Severidad	Resto de procedencias	Urgencias pediátricas	Total
Moderada o leve	5	24	29
Severa	15	92	107
Total	20	116	136

Relación de la severidad con el genotipo:

En la tabla 45 se detalla el número de gastroenteritis severas, o moderadas y leves, en función del genotipo identificado en las muestras. No se observó un riesgo relativo mayor de desarrollar gastroenteritis severas en función del genotipo de las muestras.

Tabla 45: Número de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria en 2012 con severidad severa, o moderada y leve, en función del genotipo identificado en las muestras. El “resto de genotipos” incluyó 2 muestras con genotipo G9P[8], 3 muestras con genotipo G12P[8] y una muestra con infección múltiple y genotipos G1G2G4P[4]P[8].

Severidad	Genotipo					Total
	GOPO	G1P[8]	G2P[4]	G4P[8]	Resto de genotipos	
Moderada o leve	5	7	6	7	0	25
Severa	7	24	19	26	6	82
Total	12	31	25	33	6	107

2.3. Estudio de genotipos en casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial

2.3.1. Prevalencia de los distintos genotipos

En la tabla 46 se detalla el número de muestras encontradas con un genotipo determinado en los casos nosocomiales durante 2012. Se analizaron 43 (91,5%) muestras de los 47 casos identificados.

Tabla 46: Genotipos encontrados en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial durante 2012, y número de muestras identificadas en cada genotipo. GOPO representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo.

Genotipos	Casos
GOPO	7
G1P[8]	9
G2P[4]	8
G4P[8]	11
G12P[8]	3
G1P[4]	1
G4P[4]	1
G1G2P[8]	1

G1G2P[4]	1
G1G2G4P[4]P[8]	1
Total analizadas	43
No analizadas	4
Total casos	47

Los genotipos más prevalentes durante 2012 en los casos nosocomiales fueron, al igual que en los casos comunitarios, los genotipos tipo Wa (G4P[8], G1P[8] y G12P[8]) que se encontraron en 23 muestras (55,8% de todas las muestras analizadas) (Fig. 43). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en los casos comunitarios, el genotipo más frecuente fue el G4P[8] con 11 (25,6%) casos en lugar del G1P[8]. En segundo lugar se encontró el genotipo G1P[8] con 9 (20,9%) casos. Los genotipos tipo DS-1 fueron los siguientes más prevalentes, con el genotipo G2P[4] encontrándose en 8 (18,6%) muestras. El genotipo G12P[8] se encontró en 3 (7,0%) muestras. Se encontraron dos muestras (4,7%) con constelaciones atípicas, una con un genotipo G1P[4], y otra con genotipo G4P[4]. Se encontraron 3 muestras (7,0%) con infecciones múltiples, dos con combinaciones inusuales (G1G2P[8] y G1G2P[4]), y una con los genotipos G1G2G4P[4]P[8]. En 7 muestras analizadas (16,3%) no se consiguió identificar ningún genotipo.

Tras el análisis estadístico se puso de manifiesto que las diferencias en proporciones de la mayoría de genotipos identificados entre los casos comunitarios y los casos nosocomiales no fueron estadísticamente significativas (Tabla 47), excepto el grupo de “resto de genotipos” (p -valor = 0,030)). Este grupo incluyó en los casos nosocomiales 6 genotipos distintos, mientras que en los casos comunitarios incluyó 5 genotipos, representando el 18,6% de las muestras en los primeros y el 7,25% en los segundos, o lo que es lo mismo, la proporción de muestras con “resto de genotipos” en los casos nosocomiales resultó 2,6 veces mayor que en los casos comunitarios.

Tabla 47: Test de comparación de las proporciones de los distintos genotipos identificados en las muestras procedentes de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición comunitaria o nosocomial en 2012. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría

de “resto de genotipos” incluye una muestra G1P[4], una muestra G4P[4], una muestra con los genotipos G1G2P[8], una muestra con los genotipos G1G2P[8] y otra muestra con los genotipos G1G2G4P[4]P[8].

Genotipos	Casos comunitarios		Casos nosocomiales		Test de comparación de proporciones (%)
	Casos	%	Casos	%	p
G0P0	21	15.2	7	16.3	0.867
G1P8	42	30.4	9	20.9	0.226
G2P4	28	20.3	8	18.6	0.809
G4P8	37	26.8	11	25.6	0.873
Resto de genotipos	10	7.25	8	18.6	0.030

2.3.2. Evolución de genotipos a lo largo del año

En la figura 43 se detalla el número de muestras con un genotipo determinado que se encontraron cada mes en los casos nosocomiales a lo largo de 2012. Todos los genotipos presentaron su máxima incidencia entre febrero y marzo. El genotipo G4P[8] presentó una tendencia ascendente constante desde febrero hasta abril, cuando alcanzó los 7 casos, para desaparecer a partir del siguiente mes. El genotipo G1P[8] produjo tres casos en febrero y otros tres en marzo, para ir desapareciendo hasta mayo, a partir del cual no se detectan más casos. El genotipo G2P[4] se identificó en 3 casos en enero y en 5 casos en febrero, para desaparecer el resto del año. El resto de genotipos se identificaron en febrero (una muestra G1P[4]), en marzo (una muestra G4P[4], una muestra G1G2P[4] y una muestra G1G2P[8]), y en abril (una muestra G1G2G4P[4]P[8]). Los casos con genotipo G12P[8] ocurrieron en el primer trimestre del año, un caso en enero y dos en marzo.

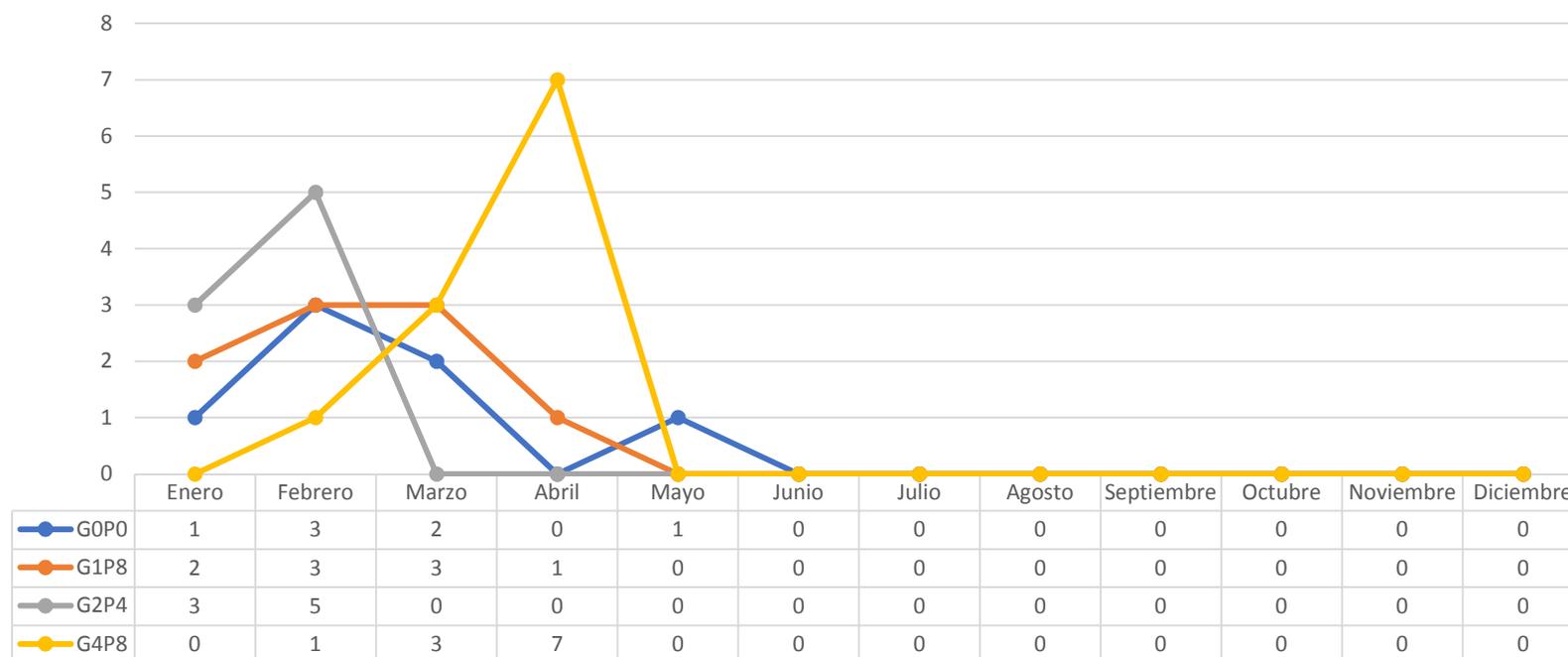


Figura 43: Distribución temporal de los distintos genotipos identificados en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial a lo largo de 2012. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo.

2.3.3. Relación de los genotipos con la edad

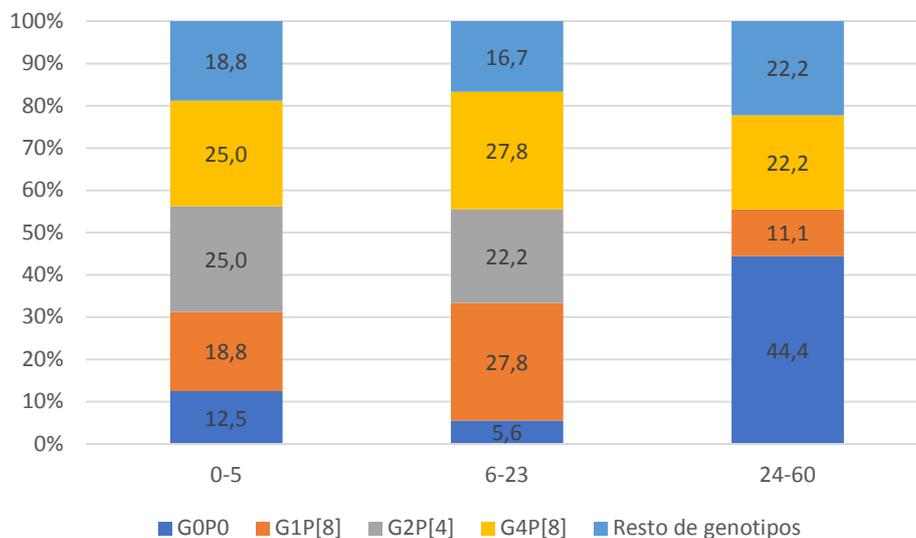
En la tabla 48 y en la figura 44 se detalla la distribución de muestras por genotipos y grupos de edad. Se obtuvo el dato de edad de los 43 (91,5%) casos en los que las muestras se sometieron al análisis de genotipado.

La distribución de genotipos con la edad fue similar, excepto por una mayor proporción de muestras en las que no se pudo identificar ningún genotipo en los mayores de 2 años. En este grupo tampoco se identificó ningún caso con genotipo G2P[4].

Tabla 48: Número de muestras por genotipo identificado y grupo de edad en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial en 2012. GOP0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó tres G12P[8], un G1P[4], un G4P[4], un G1G2P[4], un G1G2P[8] y un G1G2G4P[4]P[8].

Genotipo	Edad (meses)			Total
	0-5	6-23	24-60	
GOP0	2	1	4	7
G1P[8]	3	5	1	9
G2P[4]	4	4	0	8
G4P[8]	4	5	2	11
Resto de genotipos	3	3	2	8
Total	16	18	9	43

Figura 44: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial por genotipos y por edades (en meses) en 2012. GOP0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó tres G12P[8], un G1P[4], un G4P[4], un G1G2P[4], un G1G2P[8] y un G1G2G4P[4]P[8].



2.3.4. Relación de los genotipos con el sexo

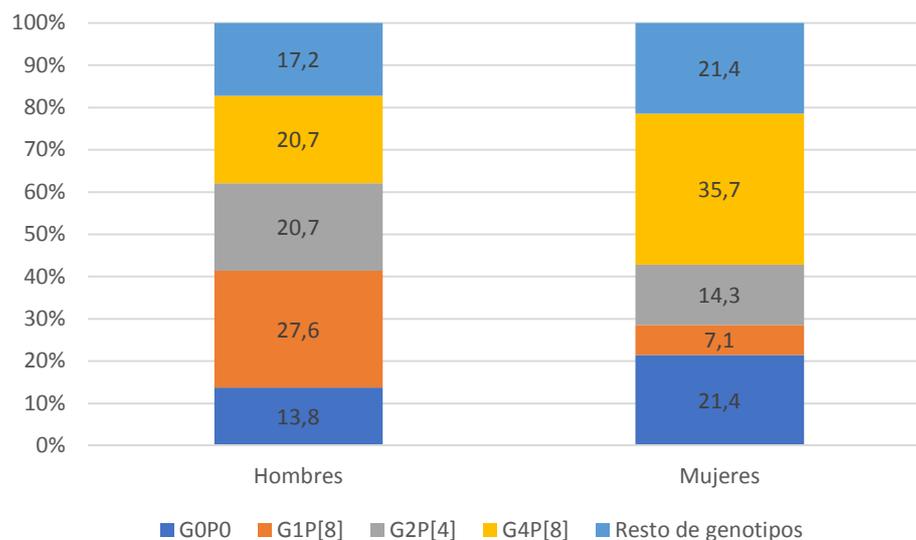
En la tabla 49 y en la figura 45 se detalla la distribución de muestras por genotipos y por sexos. Se obtuvo el dato de sexo de los 43 (91,5%) casos en los que las muestras se sometieron al análisis de genotipado.

No se observaron grandes diferencias en la distribución de genotipos entre los sexos.

Tabla 49: Número de muestras por genotipo identificado y sexo en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial en 2012. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó tres G12P[8], un G1P[4], un G4P[4], un G1G2P[4], un G1G2P[8] y un G1G2G4P[4]P[8].

Genotipo	Hombres	Mujeres	Total
G0P0	4	3	7
G1P[8]	8	1	9
G2P[4]	6	2	8
G4P[8]	6	5	11
Resto de genotipos	5	3	8
Total	29	14	43

Figura 45: Proporción de casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial por genotipos y por sexos en 2012. G0P0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo. La categoría “resto de genotipos” incluyó tres G12P[8], un G1P[4], un G4P[4], un G1G2P[4], un G1G2P[8] y un G1G2G4P[4]P[8].



2.3.5. Relación de los genotipos con el diagnóstico motivo del ingreso

En la tabla 50 se detalla la distribución de muestras por genotipos y por diagnóstico motivo del ingreso. En uno de los casos nosocomiales genotipados no se pudo averiguar el diagnóstico motivo del ingreso, por lo que se obtuvo el dato de 42 (89,4%) casos. Entre los ingresados por afecciones respiratorias el mayor número de casos presentaron genotipo G4P[8] (8 casos), seguidos por el genotipo G1P[8] (5 casos) y el G2P[4] (4 casos). En los pacientes diagnosticados de neoplasias 2 casos (50%) se correspondieron con muestras en las que no se pudo identificar ningún genotipo, mientras que en los pacientes ingresados por epilepsia los dos casos identificados presentaron genotipos poco frecuentes (uno G12P[8] y uno G1G2P[4]). Los genotipos identificados en el resto de casos resultaron heterogéneos.

Tabla 50: Genotipos identificados según el diagnóstico motivo de ingreso de los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial identificados en 2012. Se indica el número de casos identificados en cada tipo de diagnóstico, y entre paréntesis el porcentaje con respecto al total de los casos con ese diagnóstico. GOP0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo.

Diagnóstico al ingreso	Genotipos identificados				
Afección respiratoria	8 (40%) G4P[8]	5 (25%) G1P[8]	4 (20%) G2P[4]	2 (10%) GOP0	1 (5%) G4P[4]
Neoplasia	2 (50%) GOP0	1 (25%) G4P[8]	1 (25%) G1P[4]		
Epilepsia	1 (50%) G12P[8]	1 (50%) G1G2P[4]			
Pielonefritis por E. coli	1 (50%) G1P[8]	1 (50%) G1G2G4P[4]P[8]			
Adenoflemón	1 (50%) G1P[8]	1 (50%) G12P[8]			
Nacimiento patológico	1 G2P[4]				
Encefalopatía secuelar a episodios hipóxicos previos	1 G2P[4]				
Sepsis-meningitis	1 G12P[8]				
Síndrome febril	1 GOP0				
Macrocefalia	1 G2P[4]				
Retraso psicomotor	1 GOP0				
Reflujo gastroesofágico	1 GOP0				
Enfermedad de Niemann-Pick	1 G1P[8]				
Trastorno paroxístico no epiléptico	1 G1G2P[8]				
Colitis eosinofílica	1 GOP0				
Gastroenteritis rotavirus negativa	1 G1P[8]				

Anemia ferropénica	1 G4P[8]
---------------------------	----------

2.3.6. Relación de los genotipos con la procedencia de las muestras

En la tabla 51 se detalla la distribución de muestras por genotipos y por procedencia de las mismas. En uno de los casos nosocomiales genotipados no se pudo averiguar la procedencia de la muestra por lo que se obtuvo el dato de 42 (89,4%) casos nosocomiales. Aunque la mayoría de los casos nosocomiales con muestras genotipadas procedieron del área de lactantes en el hospital pediátrico (61,9%), sólo 1 muestra del grupo de las que no se consiguió identificar el genotipo procedió de esta zona (14,3%). La mayoría de muestras procedentes de esta área fueron 8 casos (30,8%) con G4P[8], 7 casos con G2P[4] (26,9%) y 6 casos con G1P[8] (23,1%). También se encontró en esta zona un caso con genotipo G12P[8], y 3 casos con infecciones múltiples (G1G2P[4], G1G2P[8] y G1G2G4P[4]P[8]). En la zona de escolares en cambio, se encontraron 3 muestras (60,0%) en las que no se pudo identificar el genotipo, y sólo otras dos muestras sí tuvieron un genotipo identificado (G1P[8] y G12P[8]). También en oncología pediátrica fueron las muestras sin genotipo identificado más frecuentes, encontrándose 2 muestras (40,0%), además de otras 2 muestras G4P[8] y una muestra G1P[8]. En la unidad de aislados dos de los tres casos identificados resultaron G1P[8], siendo el tercero G12P[8]. En neonatología un caso resultó G2P[4], mientras que en el otro no se pudo identificar el genotipo. El único caso identificado en la UCI pediátrica tuvo genotipo G4P[4].

Tabla 51: Genotipos identificados según la procedencia de las muestras, en los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial identificados en 2012. Se indica el número de casos identificados en cada tipo de procedencia, y entre paréntesis el porcentaje con respecto al total de los casos con esa procedencia. GOP0 representa las muestras en las que no se consiguió identificar ningún genotipo.

Procedencia	Genotipos identificados							
Lactantes	8 (30,8%) G4P[8]	7 (26,9%) G2P[4]	6 (23,1%) G1P[8]	1 (3,8%) GOP0	1 (3,8%) G12P[8]	1 (3,8%) G1G2P[4]	1 (3,8%) G1G2P[8]	1 (3,8%) G1G2G4P[4]P[8]
Escolares	3 (60%) GOP0	1 (20%) G1P[8]	1 (20%) G12P[8]					

Oncología pediátrica	2 (40%) G0P0	2 (40%) G4P[8]	1 (20%) G1P[4]
Aislados	2 (66,7%) G1P[8]	1 (33,3%) G12P[8]	
Neo-natología	1 (50%) G0P0	1 (50%) G2P[4]	
UCI pediátrica	1 (100%) G4P[4]		

3. Estudio de gastroenteritis por rotavirus en niños vacunados

La vacunación contra el rotavirus en España no está incluida dentro de los programas oficiales de vacunación rutinaria, y son por tanto vacunas que sólo algunos padres deciden aplicar a sus hijos costeándola ellos mismos. Así, en los cuatro años de estudio desde el 2010 hasta el 2013 la cobertura vacunal de las vacunas contra el rotavirus en la población infantil de la Región de Murcia fue aumentando año tras año, desde el 3,92% de 2010, hasta el 20,84% que se alcanzó en 2013 (Tabla 52). La proporción de vacunas aplicadas de la marca Rotarix® fue disminuyendo desde el 36,3% del total en 2010 hasta el 18,1% en 2012, para remontar de nuevo en 2013 con el 19,2% del total de vacunas contra el rotavirus.

Tabla 52: Número de vacunas contra el rotavirus aplicadas en la Región de Murcia según marca comercial aplicada, y cobertura vacunal, desde 2010 hasta 2013. Entre paréntesis el porcentaje de vacunas aplicadas de una determinada marca respecto del total de vacunas aplicadas.

	2010	2011	2012	2013
Rotarix	291 (36,3%)	665 (24,7%)	596 (18,1%)	727 (19,2%)
Rotateq	511 (63,7%)	2.024 (75,3%)	2.702 (81,9%)	3.068 (80,8%)
Total	802	2.689	3.298	3.795
Nacimientos	20.477	19.665	18.827	18.210
Cobertura vacunal	3,92%	13,67%	17,52%	20,84%

3.1. Características clínico-epidemiológicas de los casos de gastroenteritis por rotavirus A en niños previamente vacunados, desde 2010 a 2013

Se identificaron 28 casos de niños que habiendo recibido al menos una dosis de vacuna anti-rotavirus, enfermaron con una gastroenteritis por rotavirus A, en el periodo 2010-2013. De todos estos casos sólo 18 (64,3%) recibieron vacunaciones completas con una adecuada pauta de administración: 5 (27,8% de todos los vacunados de forma correcta) niños fueron vacunados con las dos dosis de Rotarix[®], mientras que 13 (72,2% de todos los vacunados de forma correcta) recibieron las tres dosis de Rotateq[®]. En la tabla 53 se detalla el número de niños que recibieron al menos una dosis de vacuna anti-rotavirus y enfermaron por el rotavirus A, en cada año desde 2010 hasta 2013.

Tabla 53: Número de niños que recibieron al menos una dosis de vacuna anti-rotavirus, y que enfermaron por el rotavirus A entre 2010 y 2013.

Año	2010	2011	2012	2013	Total
Rotarix [®]	1	1	3	0	5
Rotateq [®]	3	3	6	1	13
Vacunación incompleta	4	1	3	2	10
Total	8	5	12	3	28

Respecto a la edad en que se dieron los casos, en la tabla 54 se detalla el número de casos por grupo de edad. Entre los que recibieron una vacunación completa por Rotarix[®] 3 (60,0%) casos se encontraron en el grupo de edad de 6 a 23 meses, mientras que 2 (40,0%) casos ocurrieron en niños de 2 a 5 años. Entre los vacunados con Rotateq[®] 6 (46,2%) casos ocurrieron en niños de entre 6 y 23 meses, 5 (38,5%) casos se encontraron en niños de 2 a 5 años, y también se encontraron 2 (15,4%) casos en menores de 6 meses.

Tabla 54: Número de niños que recibieron al menos una dosis de vacuna anti-rotavirus, y que enfermaron por el rotavirus A entre 2010 y 2013, por grupos de edad.

Edad	0-5	6-23	24-60	Total
Rotarix	0	3	2	5
Rotateq	2	6	5	13
Vacunación incompleta	3	2	5	10

Total	5	11	12	28
--------------	---	----	----	----

Respecto al sexo de los casos, en la tabla 55 se detalla el número de casos vacunados con alguna de las dos vacunas autorizadas, tanto de forma completa como con dosis incompletas. Del total de casos, 14 (50%) ocurrieron en hombres y 14 (50%) en mujeres.

Tabla 55: Número de casos vacunados con alguna de las dos vacunas autorizadas, tanto de forma completa como con dosis incompletas.

Edad	Hombre	Mujer	Total
Rotarix	4	1	5
Rotateq	6	7	13
Vacunación incompleta	4	6	10
Total	14	14	28

Respecto a los genotipos identificados en las muestras de los casos de niños vacunados, en la tabla 56 se detalla el número de casos de cada genotipo identificado de cada grupo de vacuna aplicada. Es de resaltar que en un 44,4% de todos los casos correctamente vacunados con alguna de las dos vacunas autorizadas, o en un 46,4% de todos los casos (incluyendo los vacunados de forma incompleta) no se logró identificar ningún genotipo. En los casos vacunados de forma correcta con Rotarix® o Rotateq® el genotipo más frecuentemente identificado fue el G1P[8], con 2 (40,0%) y 3 (23,1%) casos respectivamente. Sólo se consiguió identificar el genotipo de un tercer caso vacunado con Rotarix® siendo un G4P[8]. Del resto de casos vacunados con Rotateq® dos (15,4%) pertenecieron al genotipo G9P[8], uno (7,7%) al genotipo G2P[4] y uno (7,7%) al genotipo G4P[8]. En los casos que recibieron cursos incompletos de vacunación los más frecuentes fueron en los que no se logró identificar ningún genotipo (5 casos, 50%), constituyendo el resto de casos dos (20,0%) con genotipo G1P[8], dos (20,0%) con genotipo G4P[8] y uno (10,0%) con genotipo G3P[8], siendo este último caso el único con genotipo G3 identificado en este trabajo y perteneciente a 2013.

Tabla 56: Número de niños que recibieron al menos una dosis de vacuna anti-rotavirus, y que enfermaron por el rotavirus A entre 2010 y 2013, por genotipos identificados.

Genotipos	G0P0	G1P[8]	G2P[4]	G3P[8]	G4P[8]	G9P[8]	Total
-----------	------	--------	--------	--------	--------	--------	-------

Rotarix®	2 (40,0%)	2 (40,0%)	0	0	1 (20,0%)	0	5 (17,9%)
Rotateq®	6 (46,2%)	3 (23,1%)	1 (7,7%)	0	1 (7,7%)	2 (15,4%)	13 (46,4%)
Vacunación incompleta	5 (50,0%)	2 (20,0%)	0	1 (10,0%)	2 (20,0%)	0	10 (35,7%)
Total	13 (46,4%)	7 (25,0%)	1 (3,6%)	1 (3,6%)	4 (14,3%)	2 (7,1%)	28 (100,0%)

3.2. Caracterización de una cepa que infectó en el hospital a dos niños previamente vacunados

3.2.1. Antecedentes

El día 11 de noviembre de 2010 una niña de 20 meses de edad fue ingresada en el área de lactantes del Hospital Pediátrico por un ataque de asma, asignándole la cama 2 del box 5. A los cinco días de su admisión comenzó a tener deposiciones diarreicas por lo que una muestra de heces se sometió a un test rápido para detección de antígeno de rotavirus A, que resultó positivo, asignándole a esta cepa el nombre P369 (RVA/Human-wt/ESP/P369/2010/G9P[8]). El día 19 de noviembre, a los 8 días de su ingreso la paciente fue dada de alta al domicilio, dada su mejoría. El 21 de noviembre un niño de 16 meses de edad fue ingresado por una inflamación en el ojo, y se le asignó la misma cama número 2 del box 5 del área de lactantes. A los seis días tras su ingreso el niño comenzó a presentar deposiciones diarreicas y vómitos. Se le realizó el test rápido para detección de antígeno de rotavirus A resultando positivo, asignando a la cepa el nombre P370 (RVA/Human-wt/ESP/P370/2010/G9P[8]). Tras ocho días ingresado, el niño fue dado de alta por su mejoría. Se dio la circunstancia de que ambos niños habían recibido las tres dosis de Rotateq® 16 y 10 meses antes de caer enfermos por el rotavirus en el hospital.

3.2.2. Constelación de genotipos

Se determinaron las secuencias nucleotídicas de los 11 segmentos genómicos de las cepas P369 y P370. Las constelaciones genotípicas completas de las cepas P369 y P370 fueron de tipo Wa e idénticas entre ellas, siendo asignadas como genotipos G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, para los fragmentos VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 respectivamente. En la tabla 57 se muestra la comparación de las constelaciones genotípicas completas de las cepas P369 y P370, con otras cepas

G9P[8] y no G9P[8] de referencia. La constelación genotípica completa de las cepas P369 y P370 fue idéntica a la de otras cepas humanas.

Tabla 57: Constelaciones genotípicas de las cepas P369 y P370, y otras cepas de referencia. El color verde indica constelaciones genotípicas tipo Wa, mientras que el color naranja indica constelación genotípica tipo DS-1.

Cepas	Genotipos										
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P[8]	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/P370/2010/G9P[8]	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/ESP/P369/2010/G9P[8]	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/USA/2008747307/2008/G9P[8]	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/MA20306/2011/G9P[8]	G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P[4]	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2

3.2.3. Identidad de secuencias entre las cepas P369 y P370

Las cepas P369 y P370 mostraron una alta identidad en las secuencias nucleotídicas de sus genomas, con un 100,0% de identidad en todos los segmentos excepto en el segmento VP7, en el que la identidad fue de un 99,8%. Respecto a la identidad aminoacídica en las proteínas codificadas por el genoma de ambas cepas sólo la proteína VP7 resultó diferente en un aminoácido, siendo el residuo 221 asparragina en la cepa P369 y serina en la P370. Las diferencias encontradas en el genoma de ambas cepas se detallan en la tabla 58.

Tabla 58: Diferencias en nucleótidos y en aminoácidos codificados entre la cepa P369 y la cepa P370. La primera letra indica el nucleótido o el aminoácido en esa posición en el genoma de la cepa P369, mientras que la última letra indica el nucleótido o el aminoácido en la cepa P370.

Segmento génico	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico
VP7	A710G	N221S
VP7	T729C	~
VP4	T2223C	~
VP1	C3058T	~

3.2.4. Análisis filogenético del gen VP7

En la figura 46 se muestra un árbol filogenético del segmento VP7 de las cepas P369 y P370, junto con representantes de distintos linajes dentro del genotipo G9, y un grupo externo perteneciente al genotipo G1 (cepa Wa) que se ha usado para radicar el árbol. Las cepas P369 y P370 compartieron el ancestro común más reciente para este gen. Las secuencias del gen VP7 de las cepas P369 y P370 resultaron similares a las secuencias del mismo gen en otras cepas humanas identificadas en España en años anteriores, como la cepa 622_VLC_2007, que circuló en Valencia en el año 2007 (96,9% y 97,2% de identidad respectivamente). Resultaron por otro lado con una identidad aún mayor para este gen con la cepa 2008747307, identificada en una muestra de 2008 en Estados Unidos, con un 99,3% y 99,5% de identidad respectivamente. Las secuencias se agruparon claramente en el linaje III del genotipo G3, aunque no se pudo discernir de forma definitiva una subclasificación dentro de los sublinajes IIIc o IIIId.

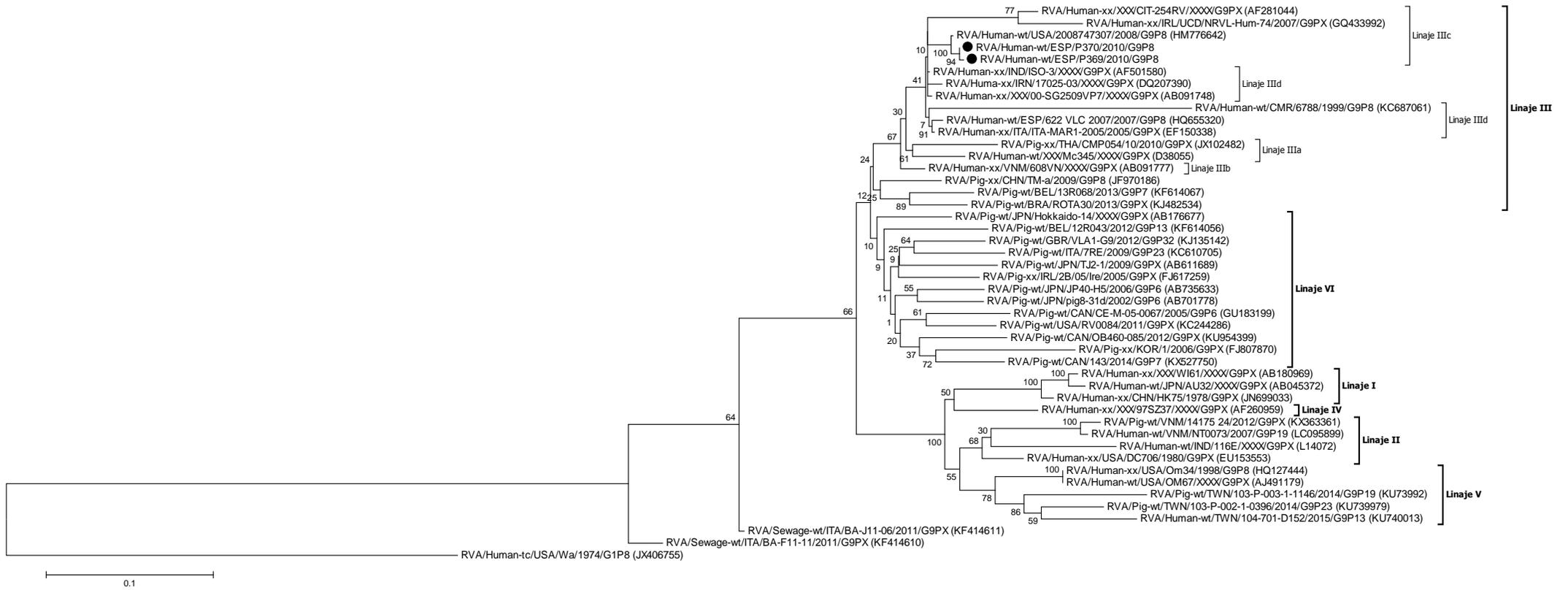


Figura 46: Árbol filogenético del gen VP7.

3.2.5. Análisis filogenético del gen VP4

En la figura 47 se muestra un árbol filogenético del segmento VP4 de las cepas P369 y P370, junto con cepas con una identidad mínima del 81% que pertenecen al genotipo P[8], además de un grupo externo perteneciente al genotipo P[4] (cepa DS-1) que se ha usado para radicar el árbol. Las cepas P369 y P370 compartieron el ancestro común más reciente para este gen. Las secuencias del gen VP4 de las cepas P369 y P370 resultaron similares a las secuencias del mismo gen en la cepa 2008747307, con un 99,7% de identidad con ambas. Las secuencias se agruparon en un cluster claramente diferenciado del cluster en el que se incluye la cepa de referencia P[8] Wa, y del cluster en el que se encuentra la cepa WI79-4, que es la cepa que porta el genotipo P[8] en la vacuna Rotateq®. Tanto la cepa P369 como la cepa P370 mostraron una identidad del 90,0% y del 92,5% con la cepa Wa y con la cepa WI79-4 respectivamente. En el mismo cluster que las cepas P369 y P370 se agruparon otras cepas humanas con genotipos G1, G4, G9 y G3 identificadas en los cinco continentes.

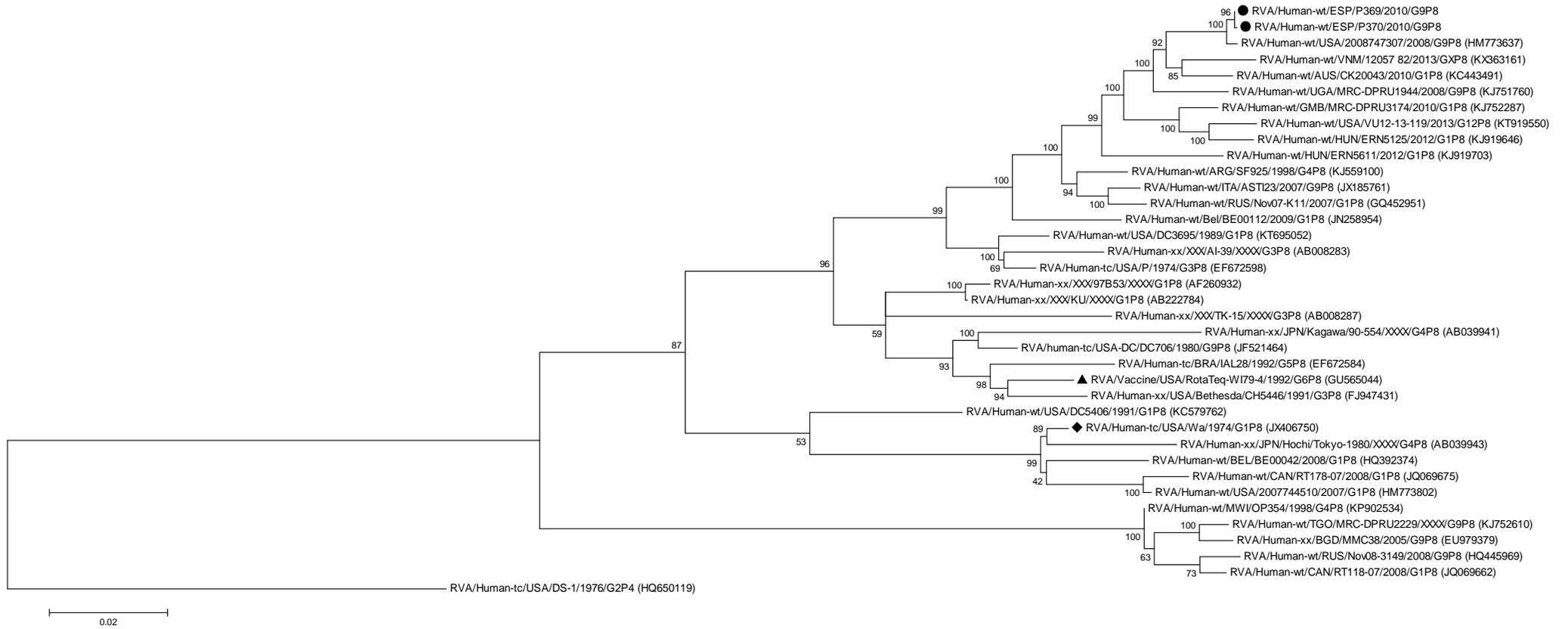


Figura 47: Árbol filogenético del gen VP4.

3.2.6. Análisis filogenético del gen VP6

En la figura 48 se muestra un árbol filogenético del segmento VP6 de las cepas P369 y P370, junto con cepas con una identidad mínima de un 86% que pertenecen al genotipo I1, además de un grupo externo perteneciente al genotipo I2 (cepa DS-1) que se ha usado para radicar el árbol. Las cepas P369 y P370 resultaron idénticas para este gen, y la secuencia del mismo resultó muy similar a la secuencia del gen VP6 en la cepa 2008747307, con un 99,7% de identidad. Las secuencias se agruparon en un cluster claramente diferenciado del cluster en el que se incluye la cepa de referencia I1 Wa, con la que mostraron una identidad nucleotídica del 90,4%. En el mismo cluster que las cepas P369 y P370 se agruparon otras cepas humanas con genotipos G1, G3, G4, G9 y G12 identificadas también en los cinco continentes.

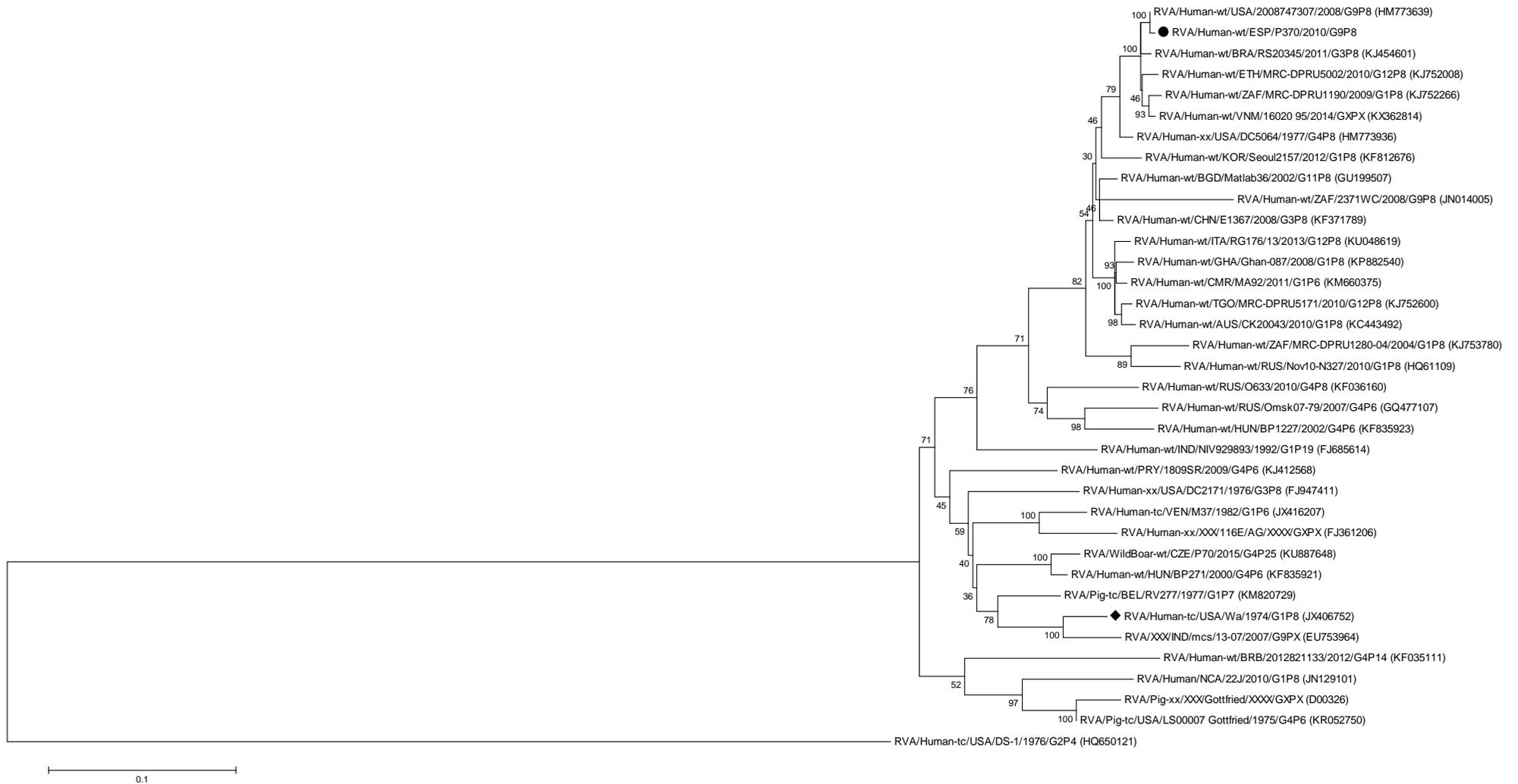


Figura 48: Árbol filogenético del gen VP6.

3.2.7. Análisis filogenético del gen VP1

En la figura 49 se muestra un árbol filogenético del segmento VP1 de las cepas P369 y P370, junto con cepas con una identidad mínima de un 84% que pertenecen al genotipo R1, además de un grupo externo perteneciente al genotipo R2 (cepa DS-1) utilizado para radicar el árbol. Las cepas P369 y P370 resultaron prácticamente idénticas para este gen (100,0%), y la secuencia del mismo resultó muy similar a la secuencia del gen VP1 en la cepa 2008747307, con un 99,6% de identidad. Las secuencias se agruparon en un cluster claramente diferenciado del cluster en el que se incluye la cepa de referencia R1 Wa, con la que mostraron una identidad nucleotídica del 95,0% para la cepa P369 y del 95,1% para la cepa P370. En el mismo cluster que las cepas P369 y P370 se agruparon otras cepas humanas con genotipos G1P[8], G9P[8], G11P[8] y G12P[8] identificadas también en los cinco continentes.

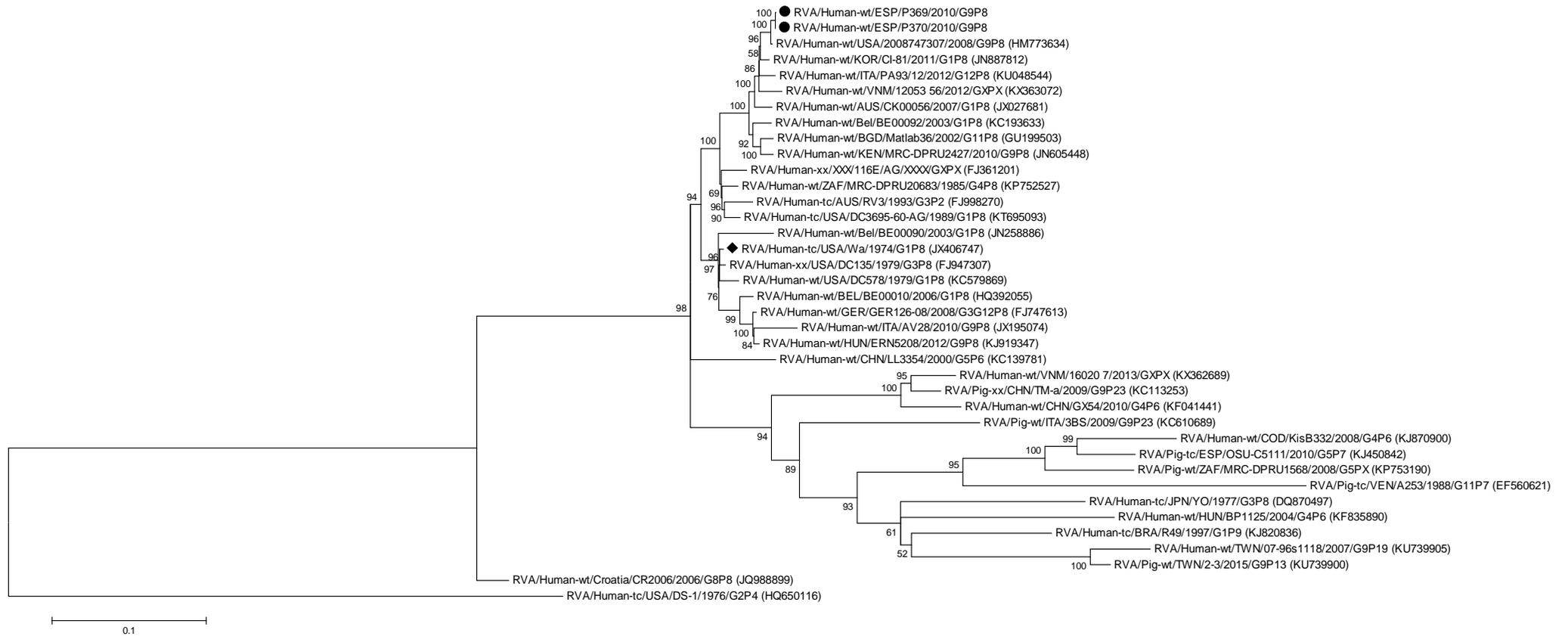


Figura 49: Árbol filogenético del gen VP1.

3.2.8. Análisis filogenético del gen VP2

En la figura 50 se muestra un árbol filogenético del segmento VP2 de las cepas P369 y P370, junto con cepas con una identidad mínima de un 85% que pertenecen al genotipo C1, además de un grupo externo perteneciente al genotipo C2 (cepa DS-1) que se ha usado para radicar el árbol. Las cepas P369 y P370 resultaron idénticas para este gen, y la secuencia del mismo resultó muy similar a la secuencia del gen VP2 en la cepa 2008747307, con un 99,8% de identidad. Las secuencias se agruparon en un cluster claramente diferenciado del cluster en el que se incluye la cepa de referencia C1 Wa, con la que mostraron una identidad nucleotídica del 93,4%. Las cepas P369, P370 y 2008747307 presentaron una inserción de secuencia a partir del nucleótido 126 que no presentaron el resto de cepas con el genotipo C1. Esta inserción consistió en la secuencia AATAAT, codificante para dos residuos de asparragina (N43 y N44), que se localizó dentro de una región de baja complejidad situada en el extremo amino-terminal de la proteína VP2, que está compuesta por 900 residuos. Otras cepas con genotipo C1 también presentaron esta región de baja complejidad genética, pero con una menor longitud. Al igual que lo que ocurre con los segmentos anteriores estudiados, las secuencias del gen VP2 de las cepas P369 y P370 se agruparon con otras cepas humanas con genotipos G1P[8], G3P[8], G9[8] y G12P[8] identificadas los cinco continentes.

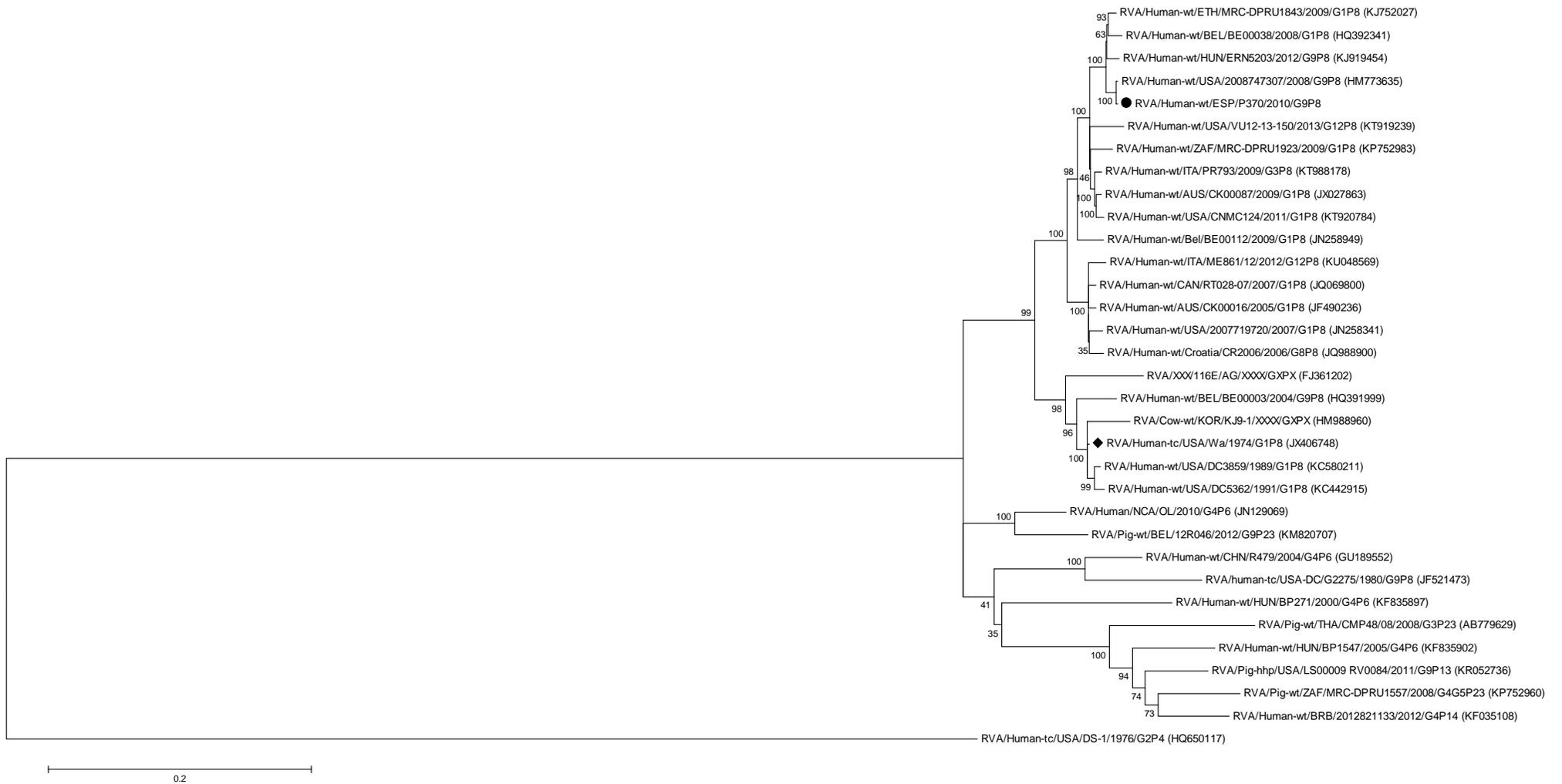


Figura 50: Árbol filogenético del gen VP2.

3.2.9. Análisis filogenético del gen VP3

En la figura 51 se muestra un árbol filogenético del segmento VP3 de las cepas P369 y P370, junto con cepas con una identidad mínima de un 82% que pertenecen al genotipo M1, además de un grupo externo perteneciente al genotipo M2 (cepa DS-1) que se ha usado para radicar el árbol. Las cepas P369 y P370 resultaron idénticas para este gen, y la secuencia del mismo resultó muy similar a la secuencia del gen VP3 en la cepa 2008747307, con un 99,5% de identidad. Las secuencias se agruparon en un cluster claramente diferenciado del cluster en el que se incluye la cepa de referencia M1 Wa, con la que mostraron una identidad nucleotídica del 92,4%. En el mismo cluster que las cepas P369 y P370 se agruparon otras cepas humanas con genotipos G1P[8], G9[8] y G12P[8] de Europa, América, Asia y Australia, y una cepa G2P[6] africana.

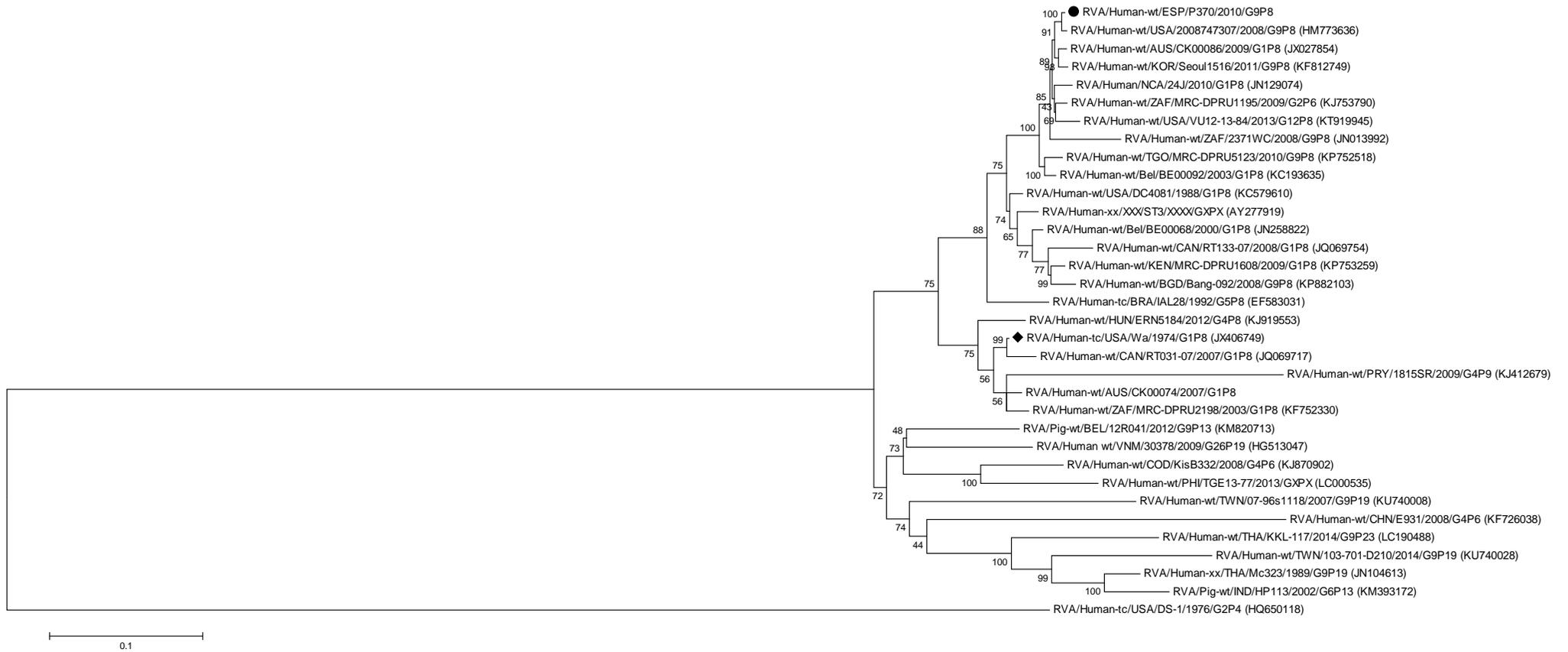


Figura 51: Árbol filogenético del gen VP3.

3.2.10. Análisis filogenético del gen NSP1

En la figura 52 se muestra un árbol filogenético del segmento NSP1 de las cepas P369 y P370, junto con cepas con una identidad mínima de un 80% que pertenecen al genotipo A1, además de un grupo externo perteneciente al genotipo A2 (cepa DS-1) que se ha usado para radicar el árbol. Las cepas P369 y P370 resultaron idénticas para este gen, y la secuencia del mismo resultó muy similar a la secuencia del gen NSP1 en la cepa 2008747307, con un 99,5% de identidad. Las secuencias se agruparon en un cluster claramente diferenciado del cluster en el que se incluye la cepa de referencia A1 Wa, con la que mostraron una identidad nucleotídica del 84,6%. En el mismo cluster que las cepas P369 y P370 se agruparon otras cepas humanas con genotipos G1P[8], G3P[8], G9[8] y G12P[8] de los cinco continentes, y una cepa G12P[11] de la India.

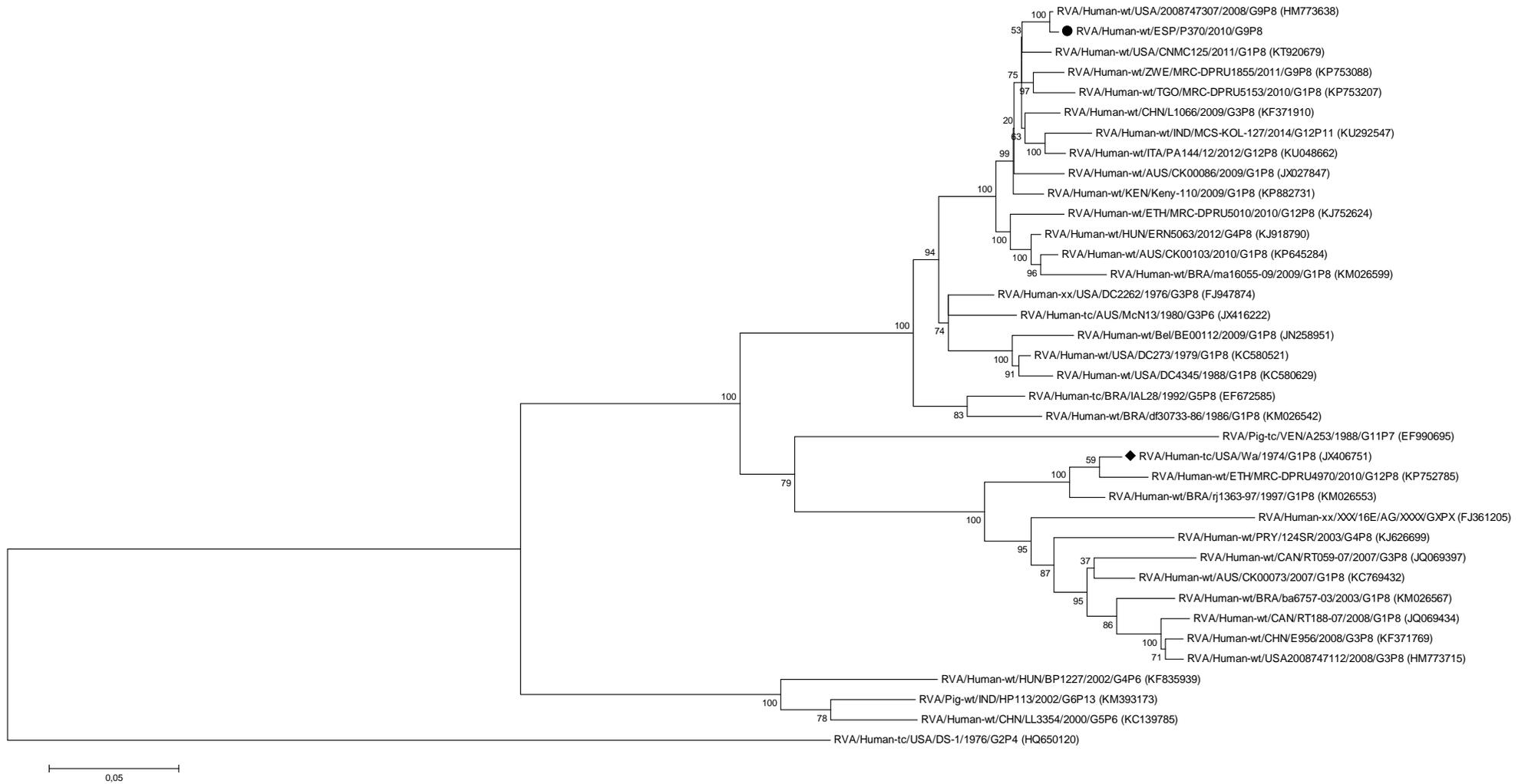


Figura 52: Árbol filogenético del gen NSP1.

3.2.11. Análisis filogenético del gen NSP2

En la figura 53 se muestra un árbol filogenético del segmento NSP2 de las cepas P369 y P370, junto con cepas con una identidad mínima de un 86% que pertenecen al genotipo N1, además de un grupo externo perteneciente al genotipo N2 (cepa DS-1) que se ha usado para radicar el árbol. Las cepas P369 y P370 resultaron idénticas para este gen, y la secuencia del mismo resultó muy similar a la secuencia del gen NSP2 en la cepa 2008747307, con un 99,7% de identidad. Las secuencias se agruparon en un cluster claramente diferenciado del cluster en el que se incluye la cepa de referencia N1 Wa, con la que mostraron una identidad nucleotídica del 92,3%. En el mismo cluster que las cepas P369 y P370 se agruparon otras cepas humanas con genotipos variados de América, Asia, Australia y África: G1P[8], G1P[6], G3P[8], G9[8], G11P[25] y G12P[8].

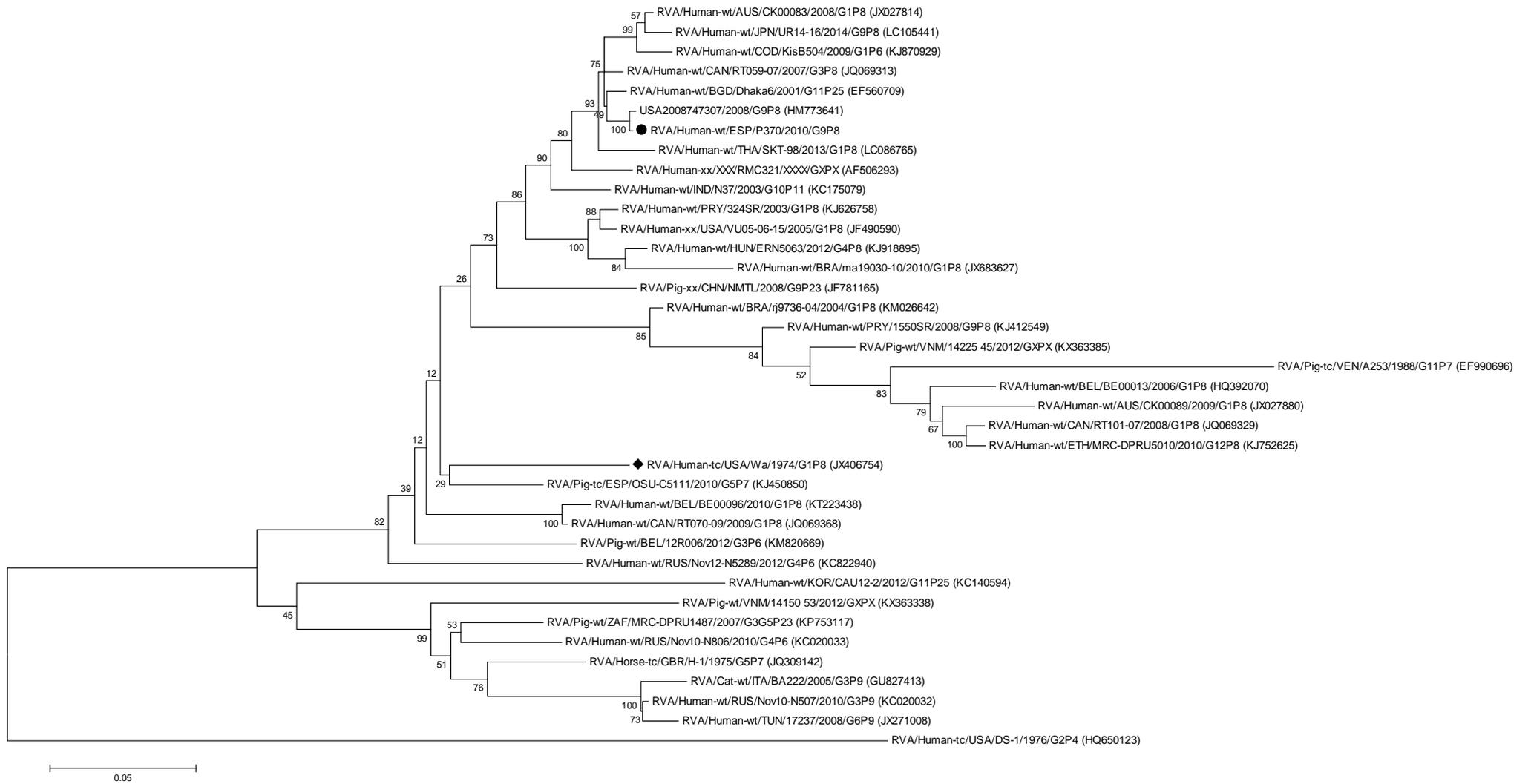


Figura 53: Árbol filogenético del gen NSP2.

3.2.12. Análisis filogenético del gen NSP3

En la figura 54 se muestra un árbol filogenético del segmento NSP3 de las cepas P369 y P370, junto con cepas con una identidad mínima de un 86% que pertenecen al genotipo T1, además de un grupo externo perteneciente al genotipo T2 (cepa DS-1) que se ha usado para radicar el árbol. Las cepas P369 y P370 resultaron idénticas para este gen, y la secuencia del mismo resultó muy similar a la secuencia del gen NSP3 en la cepa 2008747307, con un 99,9% de identidad. Las secuencias se agruparon en un cluster claramente diferenciado del cluster en el que se incluye la cepa de referencia T1 Wa, con la que mostraron una identidad nucleotídica del 95,1%. En el mismo cluster que las cepas P369 y P370 se agruparon otras cepas humanas con genotipos G1P[8], G9[8], G12P[8] , G1P[6] y G12P[6] de África, Asia y América.

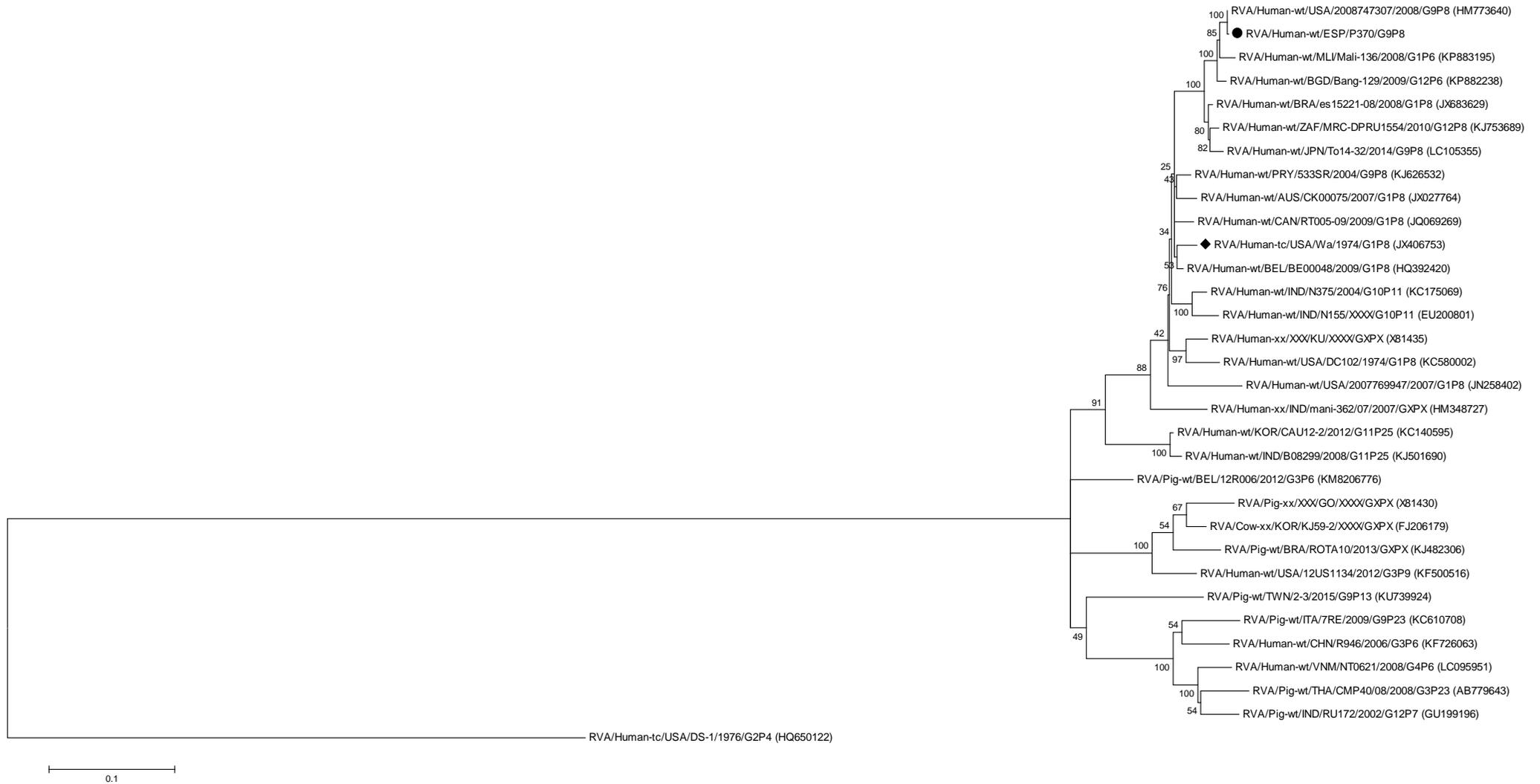


Figura 54: Árbol filogenético del gen NSP3.

3.2.13. Análisis filogenético del gen NSP4

En la figura 55 se muestra un árbol filogenético del segmento NSP4 de las cepas P369 y P370, junto con cepas con una identidad mínima de un 86% que pertenecen al genotipo E1, además de un grupo externo perteneciente al genotipo E2 (cepa DS-1) que se ha usado para radicar el árbol. Las cepas P369, P370 y 2008747307 resultaron idénticas para este gen, y mostraron una identidad de entre un 96,2% y un 98,5% con otras cepas identificadas en España en los años 2007 y 2008 (cepas 617_VLC_2007 y 766_VLC_2008). A diferencia de lo que se observó en el resto de segmentos genómicos de las cepas estudiadas, las secuencias correspondientes al gen NSP4 se agruparon en el mismo cluster en el que se incluye la cepa de referencia E1 Wa, con la que mostraron una identidad nucleotídica del 96,6%. En el mismo cluster que las cepas P369 y P370 se agruparon otras cepas humanas con genotipos G1P[8], G4P[8] y G9[8] de Australia, Europa, África y Asia.

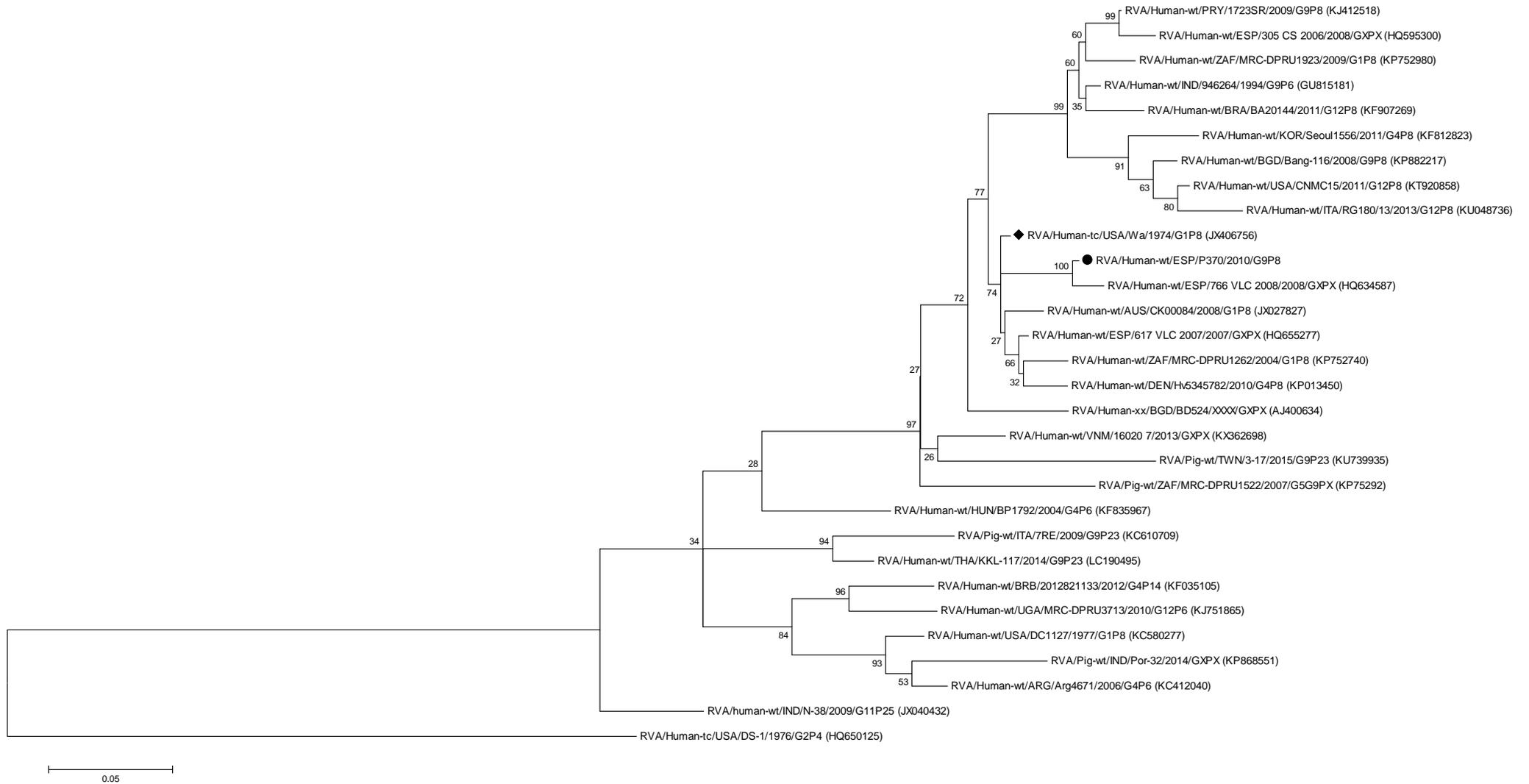


Figura 55: Árbol filogenético del gen NSP4.

3.2.14. Análisis filogenético del gen NSP5

En la figura 56 se muestra un árbol filogenético del segmento NSP5 de las cepas P369 y P370, junto con cepas con una identidad mínima de un 92% que pertenecen al genotipo H1, además de un grupo externo perteneciente al genotipo H2 (cepa DS-1) que se ha usado para radicar el árbol. Las cepas P369 y P370 resultaron idénticas para este gen, y la secuencia del mismo resultó muy similar a la secuencia del gen NSP5 en la cepa 2008747307, con un 99,7% de identidad. Las secuencias se agruparon en un cluster claramente diferenciado del cluster en el que se incluye la cepa de referencia H1 Wa, con la que mostraron una identidad nucleotídica del 93,2%. En el mismo cluster que las cepas P369 y P370 se agruparon otras cepas humanas con genotipos G1P[8], G3P[8] y G9[8] de los cinco continentes.

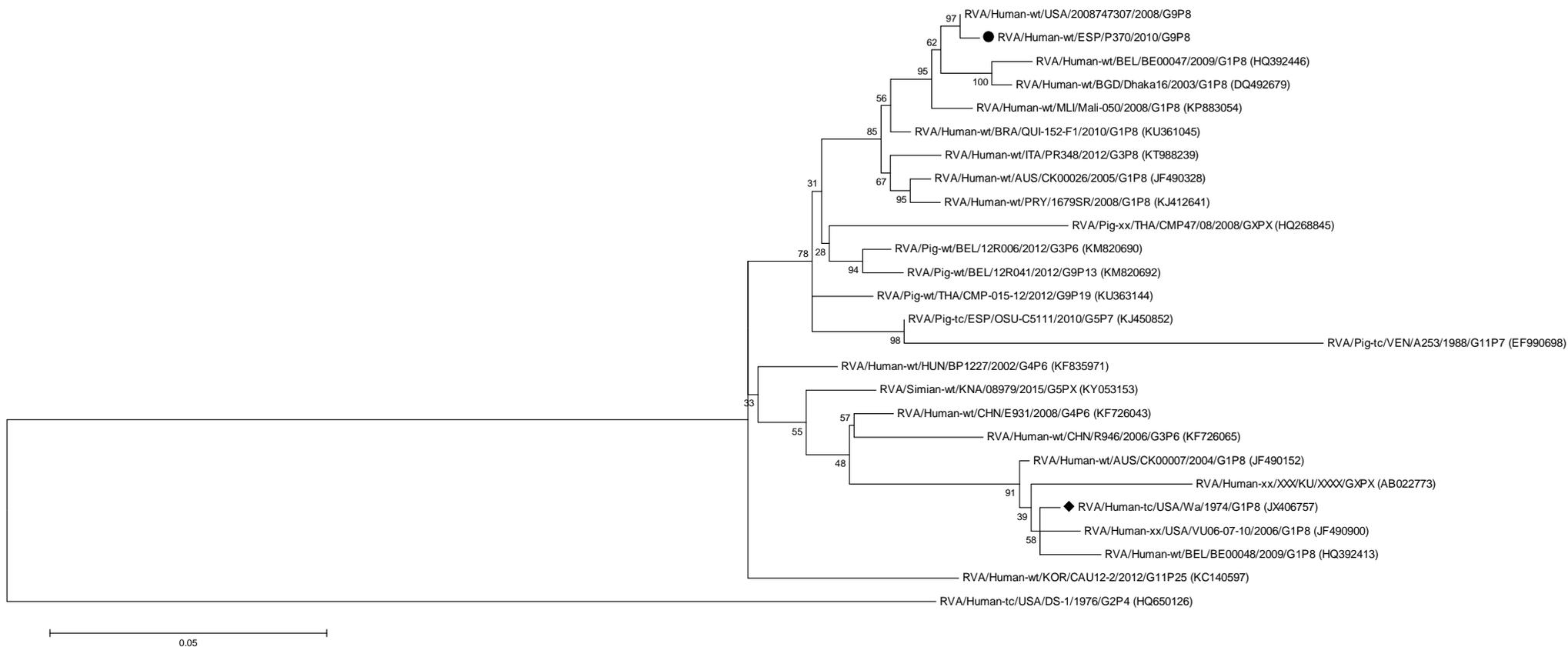


Figura 56: Árbol filogenético del gen NSP5.

3.2.15. Diferencias en la proteína VP4 de las cepas P369 y P370 con Rotateq®

La identidad aminoacídica entre las cepas P369 y P370 y la cepa WI79-4 de Rotateq® fue del 95,0%. En la tabla 59 se identifican las diferencias en aminoácidos en los principales epítomos identificados en la proteína VP4 de la cepa Rhesus rotavirus (RRV). Se observa que sólo en los epítomos 8-1 y 5-1 de la proteína VP4 se observan residuos distintos a los de la cepa WI79-4 de Rotateq®. En concreto, en el epítomo 8-1 la serina ubicada en la posición 145 en la cepa WI79-4 es sustituida por una glicina en las cepas P369 y P370. Por otro lado, en el epítomo 5-1 la arginina y histidina posicionadas en 383 y 385 respectivamente en la cepa WI79-4, han sido sustituidas por una serina y un aspartato respectivamente en las cepas P369 y P370.

Tabla 59: Diferencias en los aminoácidos que componen la proteína VP4 entre las cepas P369 y P370, y la cepa WI79-4 de Rotateq® (GU565044) y RRV (AF295303). En la primera columna se indica el epítomo al que pertenece el aminoácido (McDonald et al. 2009). En la segunda, el tipo y la posición del aminoácido en la proteína VP4 de la cepa RRV. En la tercera columna el tipo y la posición del aminoácido homólogo en la proteína VP4 de la cepa WI79-4 según el alineamiento aminoacídico, y en la cuarta columna el tipo y la posición del aminoácido homólogo en la proteína VP4 de las cepas P369 y P370. Se señalan con un asterisco los residuos en la proteína VP4 de las cepas P369 y P370 que resultan diferentes en los epítomos de la misma proteína en la cepa WI79-4 de Rotateq®.

Epítomo	RRV	WI79-4	P369/P370
8-1	T146*	S145*	G145*
8-1	G150	N149	N149
8-1	Y188	S187	S187
8-1	S190	N189	N189
8-1	Y194	L193	L193
8-2	N183	R182	R182
8-3	S114	P114	P114
8-3	T116	D116	D116
8-3	A133	D133	D133
8-3	Q135	D135	D135
8-3	T136	-	-
8-4	T87	N87	N87
8-4	A88	T88	T88
8-4	A89	N89	N89

5-1	D384*	R383*	S383*
5-1	S386*	H385*	D385*
5-1	A388	S387	S387
5-1	Q393	A392	A392
5-1	T398	N397	N397
5-1	T440	L439	L439
5-3	K459	N458	N458
5-4	R429	S428	S428
5-5	T306	L305	L305

V- DISCUSIÓN

Aunque se estima que todos los niños serán infectados por el rotavirus antes de cumplir los cinco años de edad, sólo una pequeña proporción de los infectados desarrollarán síntomas de gastroenteritis que motiven la asistencia a servicios médicos. Se ha estimado que en 2013 fallecieron unos 215.000 niños por gastroenteritis por rotavirus, de los que el 90% procedieron de África y Asia (Tate et al. 2016). En los países desarrollados, las gastroenteritis por rotavirus provocan costes económicos y sociales debidos a la atenciones médicas y hospitalizaciones, y sólo raramente causan muertes (Williams et al. 2009). Por todas estas razones, se han desarrollado vacunas seguras y altamente eficaces en disminuir las consecuencias más graves de la infección por rotavirus, que se han ido implantando progresivamente en los calendarios vacunales de un gran número de países en el mundo. La aplicación de estas vacunas de forma rutinaria ha disminuido la mortalidad y la morbilidad de las infecciones por rotavirus (Iturriza-Gómara & Cunliff 2017). España es uno de los países donde la vacuna contra el rotavirus no se ha implantado en el calendario vacunal, y la OMS recomienda en estos casos estudios para poder estimar los costes asociados a esta enfermedad, y la conveniencia o no de la implantación de vacunaciones rutinarias. En España no existe un programa de vigilancia de la enfermedad por rotavirus ni de las cepas que la causan, ni tampoco existe a nivel regional en la Comunidad Autónoma. El trabajo presentado en esta tesis es el primero realizado con objeto de mejorar el conocimiento de las características epidemiológicas y virológicas de las gastroenteritis por rotavirus en la Región de Murcia.

Incidencia de gastroenteritis por rotavirus entre 2010-2013

Un estudio multicéntrico, prospectivo y observacional realizado entre 2004 y 2005 en varios países europeos para el estudio de la incidencia de la gastroenteritis por rotavirus en niños menores de 5 años (Van Damme et al. 2007) observó que el porcentaje de casos de gastroenteritis positivas a rotavirus fue del 38% en España en esos años. En la población atendida por el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca entre 2010 y 2013 tan solo un 21,2% de las muestras tomadas en casos de gastroenteritis fueron positivas a estos virus. Este dato puede interpretarse como que sólo alrededor de una quinta parte de las gastroenteritis que llegan al hospital son causadas por estos virus en Murcia,

aunque la disparidad respecto del dato del estudio de 2007 quizás se deba en parte a que en éste sólo se contemplaron las muestras procedentes de niños menores de 5 años, y en esta tesis se han tenido en cuenta todas las muestras remitidas para identificación de antígeno de rotavirus, incluidas las procedentes de pacientes mayores de 5 años. En esta tesis también se ha comprobado que la proporción de muestras positivas fue disminuyendo gradualmente año tras año, alcanzando casi la mitad en 2013 respecto a 2010. Sin embargo, al estudiar estos datos teniendo en cuenta la población de niños menores de 5 años en cada año en el área I de salud, las tasas de incidencia de gastroenteritis por rotavirus no siguieron estrictamente la misma tendencia, ya que aunque en general fueron también disminuyendo desde los 1,57 casos por cada 100 menores de 5 años en 2010, hasta los 1,03 casos por cada 100 menores de 5 años en 2013, presentaron un pico de incidencia de 1,88 casos por cada 100 menores de 5 años en 2011. Estos datos indican una incidencia en Murcia considerablemente menor la encontrada en hospitales y servicios de urgencias en España en el estudio de 2007 (Van Damme et al. 2007), donde la tasa de incidencia acumulada anual por gastroenteritis por rotavirus se sitúa en 2,54 casos por cada 100 niños.

En relación a la estacionalidad de las gastroenteritis por estos virus, en los países desarrollados la curva epidémica de esta enfermedad está caracterizada por un pico de incidencia único en invierno, a diferencia de lo que ocurre en los países en vías de desarrollo en África y en Asia, donde se suceden más de un pico de incidencia (World Health Organization 2013). En los datos obtenidos en la presente tesis se observa que las curvas epidémicas de los cuatro años presentan un único pico de incidencia, excepto durante el año 2010, en el que se sucedieron varios picos secundarios. En el estudio publicado como resultado de los trabajos de la red de vigilancia EuroRotaNet (Hungerford et al. 2016), que los picos de incidencia en España son variables año tras año, habiéndose dado estos picos como muy pronto en enero en el año 2008, y como muy tarde en marzo en 2012 y en 2013. De los datos obtenidos en el presente estudio se desprende que en Murcia la máxima incidencia de estas gastroenteritis se da con cierto retraso con respecto al conjunto de España, ya que los máximos de incidencia ocurrieron como muy pronto en febrero (en 2011), y tan tarde como en abril (en 2013).

Los brotes de gastroenteritis por rotavirus suelen darse durante los meses más fríos de año y es posible que las características climatológicas de la Región de Murcia, donde el invierno llega más tarde en relación al resto de la península ibérica, causen este desfase de la curva epidemiológica.

En relación a la edad de los pacientes que desarrollaron una gastroenteritis por rotavirus, el mencionado trabajo publicado por EuroRotaNet estima para España que un 78% de las muestras procedieron de niños menores de 2 años entre 2007 y 2013, mientras que los casos de niños de entre 2 y menos de 5 años representaron el 18% del total. Además, sólo el 5% de las muestras procedió de pacientes (niños o adultos) a partir de 5 años de edad. En estudio presentado en esta tesis se han encontrado resultados similares a la distribución de la enfermedad por edades. El 82,9% de las muestras procedieron de niños menores de 2 años, tan solo ligeramente por encima del dato encontrado en el conjunto de España. El 12,6% procedió de niños de entre 2 y menores de 5 años, ligeramente por debajo del dato para el resto de España; y finalmente el 4,4% de los casos resultaron en pacientes a partir de 5 años de edad. En resumen, de los datos obtenidos en Murcia se puede deducir que la proporción de casos en niños menores de 2 años aquí es ligeramente mayor que en el resto de España, a costa de la proporción de casos en el resto de grupos de edad, especialmente por la menor proporción de niños de entre 2 y menores de 5 años en Murcia que acudieron al hospital con la enfermedad. Este dato podría significar que en Murcia los niños se infectan a una edad más temprana que en el conjunto de España, y a la edad de 2 años están más protegidos frente a la gastroenteritis por el virus.

En relación al sexo de los pacientes, en la bibliografía no se han encontrado datos que indiquen que alguno de los sexos enferma con más facilidad (Aristegui et al. 2016) y en la presente tesis los datos apuntan en la misma dirección, el sexo no parece influir en la probabilidad de enfermar por el rotavirus A.

Características clínico-epidemiológicas de las gastroenteritis por rotavirus durante 2012

En 2012 pudo realizarse un estudio epidemiológico más profundo accediendo a la información disponible sobre los casos de gastroenteritis por rotavirus para esta tesis. Estudiando las historias clínicas de los casos positivos a rotavirus A se ha concluido que el 21,4% de las muestras procedieron de casos que reunían las condiciones para clasificarse como casos de origen nosocomial, mientras que el 80,2% resultaron de adquisición comunitaria. Estos datos concuerdan con los publicados en otros trabajos (Gervasi et al. 2016) donde se habla de que alrededor de un 25% de todos los casos de rotavirus detectados en el hospital suelen ser de adquisición nosocomial.

En relación con los casos de adquisición comunitaria, la tasa de incidencia en 2012 se situó en 1,03 casos por cada 100 niños menores de cinco años. Respecto a los casos de gastroenteritis por rotavirus A de adquisición nosocomial, los niños tardaron una media de 8,4 días en enfermar desde su admisión por otras causas. La mayoría de los casos nosocomiales procedieron de la zona de lactantes, donde se ingresa a los niños hasta los dos años de edad. Además, se identificaron casos nosocomiales en otras zonas atendidas por el Servicio de Pediatría, como la zona de escolares, unidades de aislados y neonatología. Es especialmente notable el hecho de que se identificaran 5 infecciones adquiridas en el hospital entre niños ingresados por patologías oncológicas. Estos niños son especialmente sensibles a cualquier infección oportunista, sobre todo cuando son sometidos a quimioterapia. Cerca de la mitad de los casos de infección nosocomial por rotavirus estaban ingresados por afecciones respiratorias. Esto es consecuencia natural de la alta proporción de ingresos hospitalarios infantiles que están causados por este tipo de afecciones.

La estacionalidad de las gastroenteritis por rotavirus fue similar entre los casos comunitarios y los de adquisición nosocomial, con picos de incidencia en febrero y marzo. Este hecho refuerza la idea de que los brotes nosocomiales se alimentan de los casos comunitarios que van siendo introducidos en el hospital, bien de forma consciente siendo ingresados por la gravedad de la propia gastroenteritis, o bien de forma inesperada cuando los niños son ingresados por otra causa, no tienen síntomas típicos

de gastroenteritis, pero aún así liberan rotavirus en el medio. Por otro lado, la ausencia de casos nosocomiales desde julio hasta noviembre coincidiendo con una incidencia mínima de casos en la comunidad, da más fuerza a este argumento.

Por otra parte, los casos nosocomiales fueron más frecuentes en los niños más pequeños, los menores de 6 meses, mientras que en los casos comunitarios el principal grupo de edad afectado fue el de 6 meses hasta los 2 años. Esta diferencia de afectación en los distintos grupos de edad puede ser consecuencia de que los niños pequeños ingresados en el hospital suelen ser alimentados, con mayor frecuencia, con leches de fórmula. Se cree que en la comunidad los niños menores de 6 meses están protegidos frente a las infecciones graves por el rotavirus, gracias a los anticuerpos maternos que toman con la leche de la madre. Por eso el principal grupo de edad afectado por las gastroenteritis por rotavirus es el de entre 6 meses y menores de 2 años. En esta edad los niños quedan desprotegidos al serles retirada la leche materna, y entonces se encuentran con una primera infección que puede llegar a ser grave. En los casos comunitarios los niños mayores de 2 años ya se han enfrentado a su primera infección por rotavirus y están parcialmente protegidos por anticuerpos propios, de modo que las subsiguientes infecciones serán menos graves y su recuperación será más rápida.

En relación al sexo de los pacientes, se encontraron diferencias significativas en las proporciones de casos entre hombres y mujeres según si la infección se produjo en la comunidad o en el hospital. Mientras que en los casos comunitarios niños y niñas se infectaron por igual, en los casos nosocomiales se encontraron diferencias significativas entre sexos, con el doble de casos en niños respecto a las niñas. No se ha encontrado una explicación a estas diferencias en los casos nosocomiales.

Por el propio diseño del presente estudio no se han podido estudiar los casos de infecciones adquiridas durante las visitas al pediatra en atención primaria, ni las infecciones adquiridas en el servicio de urgencias, cuando ambas deben ser infecciones nosocomiales relativamente frecuentes.

Estudio de genotipos en casos de gastroenteritis por rotavirus de adquisición comunitaria en 2012

El genoma segmentado de los rotavirus facilita reagrupamientos genéticos cuando una célula epitelial es infectada con más de una cepa con distinto genotipo. Esta propiedad tiene el potencial para generar muchas combinaciones de las proteínas de superficie VP7 (genotipo G) y VP4 (genotipo P) siendo en teoría posibles más de 2^{11} combinaciones. Sin embargo, el número de combinaciones G y P más comúnmente identificadas es significativamente menor que el número teórico de posibles combinaciones, aunque aparecen nuevos rotavirus A reagrupados regularmente (European Centre for Disease Prevention and Control 2016). La monitorización de la emergencia de nuevos genotipos de rotavirus y del potencial para el reemplazo de genotipos y la deriva genética es una actividad esencial de la vigilancia de la enfermedad por estos virus. Esta tarea se ha convertido en aún más importante desde la introducción de las vacunas contra el rotavirus, ya que hay algunas evidencias de que en países como Australia, Brasil y Bélgica la vacunación masiva puede haber contribuido a cambios en los genotipos predominantes, aunque estos cambios pueden también ser el resultado de variaciones naturales (Hungerford et al. 2016). La red de vigilancia EuroRotaNet, establecida en 2007 y que incluye a 16 países, entre ellos España, ha estado monitorizando la diversidad genotípica de los rotavirus y las fluctuaciones de genotipos de año en año a lo largo de Europa durante 8 años. Conforme a los datos publicados por esta red, podemos ver cómo en España el genotipo predominante desde la temporada 2007/2008 hasta la temporada 2012/2013 ha sido el G1P[8], con un 46% de las cepas tipadas, seguido por el genotipo G12P[8] con un 13%, el G9P[8] con un 12%, y el G2P[4] con un 10%, identificándose el genotipo G4P[8] tan solo en un 3% de los casos. En contraste, en el estudio realizado en la presente tesis y teniendo en cuenta sólo los casos de adquisición comunitaria en 2012, se pone de manifiesto que aunque el genotipo más frecuente en Murcia también fue el G1P[8], éste se encontró con una menor proporción (un 30%), y seguido muy de cerca por el genotipo G4P[8] con un 27% de los casos. También el genotipo G2P[4] fue más prevalente que en el conjunto de España para todo el período, con un 20% de las cepas presentando este genotipo. Estas diferencias apuntan a una

mayor circulación del genotipo G4P[8] en Murcia durante 2012, en comparación con el conjunto de España, y serían convenientes estudios de genotipado de sucesivos años para comprobar si esta tendencia es constante año tras año o se trató de una dispersión puntual de este tipo de cepas en este año. En Murcia, por otro lado, las infecciones múltiples, las cepas no tipables y las infecciones por cepas reagrupadas de forma inusual, como aquellas con genotipo G9P[4], fueron bastante raras. Según la red de vigilancia EuroRotaNet, España se sitúa en un término medio entre Francia y Suecia con la mínima diversidad de genotipos identificados año tras año, y Bulgaria con la máxima diversidad (Hungerford et al. 2016). Las muestras en las que no se pudo identificar ningún genotipo alcanzaron una proporción considerable (un 15%) pudiendo ser por tratarse de cepas no genotipables, por la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras, o por falsos positivos del test rápido VIKIA® Rota-Adeno. Para resolver este problema y averiguar cuál es la razón de la negatividad en la prueba de genotipado de muestras que fueron positivas con el test rápido sería conveniente analizar las muestras mediante PCR en tiempo real, incluyendo un control interno en las muestras para detectar un mal funcionamiento de la PCR. Si como consecuencia de la adición del control interno se determina que la PCR funcionó correctamente, entonces la negatividad en la amplificación del ARN vírico implicaría que el test rápido dio un falso positivo. En cambio, si la PCR no funcionó correctamente, pueden adoptarse otras estrategias como la dilución adicional de la muestra para diluir también los posibles inhibidores.

Todos los genotipos presentaron su máxima incidencia en marzo, excepto el genotipo G9P[8] que solo se identificó en dos casos, uno en enero y otro en mayo, y el genotipo G12P[8], que se identificó exclusivamente en el primer trimestre del año, con dos casos en enero, dos en febrero y sólo un caso en marzo. Los principales genotipos siguieron la tendencia general de la estacionalidad de los casos de gastroenteritis por rotavirus A, con mayor incidencia en el primer trimestre del año disminuyendo drásticamente en abril, con la llegada de la primavera y los primeros calores. Pero los rotavirus se mantienen circulando con un perfil bajo fuera de la estación fría, con casos esporádicos que actúan de reservorio del virus, y que actuarán como semilla para el brote del año

próximo. En este sentido se identificaron casos esporádicos en agosto y en septiembre de los dos genotipos más frecuentes en la temporada previa, el G1P[8] y el G4P[8]. Por otro lado, se ha descrito que las cepas con genotipos raros y las infecciones múltiples son más probables fuera de la temporada de máxima incidencia en España (Hungerford et al. 2016), sin embargo en el presente estudio la infección múltiple, la cepa no tipable (G1P[0]) y la cepa reagrupada de forma inusual (G9P[4]) se identificaron en el primer trimestre del año 2012, coincidiendo con la máxima incidencia de gastroenteritis por rotavirus. Un tamaño muestral no demasiado grande puede estar limitando en todo caso la interpretación de los resultados en el presente estudio.

Respecto a la distribución de genotipos por grupos de edad se ha encontrado que la alta prevalencia del genotipo G4P[8] en Murcia se puede atribuir a infecciones en los niños más pequeños, menores de 1 año, donde supera significativamente en incidencia al genotipo G1P[8]. Ocurre lo contrario en los niños de entre 1 y 2 años, en los que el genotipo más prevalente es el G1P[8]. Una posible explicación de la alta incidencia del genotipo G4P[8] en los niños más pequeños es que 2012 hubiese sido el primer año de la circulación masiva de este genotipo en Murcia, de forma que las madres no habrían ofrecido la suficiente protección con su leche materna a los recién nacidos.

La alta incidencia de muestras en las que no se pudo identificar ningún genotipo entre los mayores de 2 años, y en los menores de 6 meses, es coherente con el hecho de que en estos dos grupos de edad son menos frecuentes las gastroenteritis por rotavirus, lo que indica que gran parte de estas muestras puedan haber sido falsos positivos del test rápido VIKIA® Rota-Adeno.

En concordancia con lo publicado en la literatura científica no se encontró en Murcia asociación entre genotipos determinados y el sexo de los pacientes.

En relación con la procedencia de las muestras, se ha encontrado una gran proporción de muestras en las que no se ha podido identificar ningún genotipo, procedentes de consultas externas pediátricas y atención primaria. Procedentes de estos servicios médicos externos se encontró una menor proporción de muestras con genotipo G4P[8] que en el servicio de urgencias pediátricas del hospital, lo que podría deberse a una mayor severidad de las gastroenteritis causadas por este genotipo.

Las gastroenteritis por rotavirus A se manifestaron con diarrea y vómitos en casi todos los casos, con fiebre en cerca de tres de cada cuatro casos, y con signos de deshidratación en uno de cada tres. Más del 27% de los casos presentaba síntomas catarrales sin la identificación de ningún patógeno respiratorio. Se ha especulado que quizás los rotavirus sean también causantes de este tipo de síntomas, aunque no se ha establecido claramente su asociación. Los síntomas catarrales pueden deberse a infecciones respiratorias coincidentes en el tiempo, ya que no se analiza la presencia de todos los posibles patógenos, ni se analizan estos en todos los niños. Otros síntomas secundarios encontrados con cierta frecuencia en el presente estudio han sido hiporexia y decaimiento, mientras que síntomas más raros como exantema, otitis y convulsiones tuvieron frecuencias menores a cinco casos. La diarrea fue el síntoma indicador para el médico de la presencia de gastroenteritis, y por tanto todos los casos identificados la presentaron, excepto uno en el que no se pudo identificar ningún genotipo y que pudo ser un falso positivo del test rápido VIKIA® Rota-Adeno. Respecto a los vómitos, se encontró asociación estadísticamente significativa entre la ausencia de vómitos en los casos en los que no se pudo identificar ningún genotipo. Este dato implica que cuando se presenta un caso de gastroenteritis sin vómitos hay mayor probabilidad de que el agente causal no sea el rotavirus A. En relación con los síntomas catarrales también se encontró asociación entre una mayor presencia de estos síntomas en los casos en los que no se identificó ningún genotipo. Este hecho podría indicar que una parte de los casos de gastroenteritis con síntomas catarrales son falsos positivos del test rápido VIKIA® Rota-Adeno. No se ha encontrado asociación entre los síntomas de fiebre, hiporexia y deshidratación con ningún genotipo determinado.

Una revisión bibliográfica ha identificado 46 estudios llevados a cabo en 18 Estados Miembros de la Unión Europea, estimando que alrededor de entre 300-600 niños por cada 100.000 menores de 5 años son hospitalizados anualmente debido a gastroenteritis por rotavirus en Europa (European Centre for Disease Prevention and Control 2016). En concordancia con estos datos, el presente trabajo ha identificado que en el área I de salud de la Región de Murcia 452 niños por cada 100.000 menores de 5 años fueron hospitalizados por el rotavirus en 2012. Esta cifra se sitúa en un valor medio

de la cifra estimada por ese estudio, lo que indica que el número de hospitalizaciones por estos virus en la Región de Murcia parece ser similar a lo que ocurre en el resto de países de nuestro entorno. El 42% de los casos requirieron hospitalización y no se encontró asociación entre la necesidad de hospitalización y el genotipo identificado. La duración media de la hospitalización por gastroenteritis por rotavirus A adquirido en la comunidad fue de 3,9 días, que es similar a la duración reportada por otros estudios realizados en España, en los que se ha estimado desde 3,2 hasta 6,3 días (Cilla et al. 2012)(García-Basteiro et al. 2011). Es de destacar que los tres casos que presentaron genotipo G12P[8] estuvieron hospitalizados más de 4 días, y uno incluso llegó a los 13 días de hospitalización. En algunos estudios se ha especulado sobre una mayor severidad asociada a las infecciones con este genotipo. Por otro lado, también es importante resaltar el hecho de que cada paciente identificado en este estudio tuvo que ser admitido en urgencias una media de 1,5 veces, y el 4% de los casos acudió a urgencias hasta en cuatro ocasiones teniendo que ser hospitalizados la mayoría de estos. Esta necesidad de ser atendido en urgencias más de una vez puede haberse debido a una infravaloración del estado del paciente, o bien a infecciones más insidiosas que prolongaron en el tiempo los síntomas. Es posible que una segunda asistencia del paciente al servicio de urgencias pueda servir al médico de indicador de una mayor severidad de la gastroenteritis, y le permita valorar la gravedad de la enfermedad con mayor facilidad.

Es de resaltar que durante el estudio realizado sobre los pacientes afectados por gastroenteritis por rotavirus A adquiridos en la comunidad no falleció ningún niño por esta causa y todos se recuperaron de manera satisfactoria. Conforme a estudios previos se estima una tasa de mortalidad por rotavirus menor a 0,1 por 100.000 niños menores de 5 años en países de nuestro entorno como es Reino Unido (European Centre for Disease Prevention and Control 2016).

La severidad de las gastroenteritis por rotavirus A fue mayor en el primer semestre del año, coincidiendo con la mayor incidencia de estas gastroenteritis. En el segundo semestre del año los casos identificados fueron considerablemente menos severos, quizás debido a que los casos que ocurren en esas fechas pertenecen con mayor

probabilidad a pacientes de mayor edad (Hungerford et al. 2016), y a que algunos de los casos identificados pueden ser falsos positivos del test rápido VIKIA® Rota-Adeno, y por tanto no estar causados por estos virus. Las gastroenteritis resultaron más severas en los niños de entre 6 meses y 2 años de edad, quizás debido a que los niños pequeños están parcialmente protegidos frente a gastroenteritis severas gracias a los anticuerpos que toman con la leche materna. Por otro lado, los niños mayores de 2 años suelen haber tenido algún contacto previo con el rotavirus A, y por tanto también tienen cierta protección por los anticuerpos generados durante esa infección. En el presente estudio no se encontró asociación de la severidad de las gastroenteritis con el genotipo de la cepa que infectó al paciente. En este sentido, en la literatura se encuentran datos contradictorios en los diferentes estudios, mientras que en algunos encuentran mayor severidad asociada a determinados genotipos, en otros no se encuentra ninguna asociación.

Estudio de genotipos en casos de gastroenteritis por rotavirus de adquisición nosocomial en 2012

En los casos de gastroenteritis por rotavirus A adquiridos en el hospital la distribución de los genotipos identificados fue similar en términos generales a la encontrada en los casos de adquisición comunitaria, siendo las cepas con genotipos tipo Wa los más frecuentes. Aunque en los casos nosocomiales uno de cada cuatro casos fue causado por una cepa de rotavirus con genotipo G4P[8], siendo el más prevalente en este grupo de enfermos, y seguido por el genotipo G1P[8], no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas proporciones. Las cepas con genotipo tipo DS-1, en concreto el genotipo G2P[4], tuvieron una prevalencia parecida a la que presentaron los enfermos por infección adquirida en la comunidad, ocurriendo lo mismo con las cepas pertenecientes a de casos en los que no se pudo identificar ningún genotipo. Por otro lado, se ha encontrado una mayor diversidad genotípica que la encontrada en los casos de adquisición comunitaria, a pesar del menor número de casos nosocomiales que comunitarios. En los casos nosocomiales se han encontrado más muestras con infecciones múltiples y combinaciones inusuales de genotipos G y P. La

mayor diversidad genotípica encontrada dentro del hospital sugiere que los rotavirus son introducidos en las instalaciones de forma constante desde el exterior, provocando pequeños brotes nosocomiales de cepas distintas, e infecciones múltiples. Esta explicación, junto con el hecho de una menor incidencia de casos nosocomiales fuera de la temporada de máxima incidencia de casos comunitarios, rechazaría la hipótesis de que existen cepas intrínsecamente intrahospitalarias que circulan de forma constante dentro del hospital. El hecho de darse infecciones múltiples con mayor frecuencia es importante desde el punto de vista de la aparición de nuevas cepas, ya que la coincidencia de dos o más virus distintos en una misma célula puede producir una progenie vírica reagrupada con propiedades biológicas inesperadas. El servicio de hospitalización pediátrica podría actuar como un crisol para la aparición de nuevas cepas de rotavirus que luego pueden escapar a la comunidad.

La máxima incidencia de los distintos genotipos fue diferente respecto a los casos comunitarios. La máxima incidencia de casos nosocomiales con cepas con genotipo G4P[8] ocurrió en el mes siguiente al de máxima incidencia en los casos comunitarios, para luego desaparecer. Este comportamiento de la curva epidémica de casos nosocomiales parece haber seguido la tendencia de los casos comunitarios, pero con cierto retardo. En cambio, los casos nosocomiales con genotipos G1P[8] y G2P[8] sí coincidieron en el tiempo con las máximas incidencias de los casos circulantes en la comunidad. No está claro si el hecho de que la distribución de los casos nosocomiales para cada genotipo siga curvas epidémicas con un solo pico de incidencia significa que los brotes nosocomiales se producen por una misma cepa de rotavirus que circula durante un tiempo dentro del hospital, o si esos brotes producidos por un mismo genotipo están compuestos por varias cepas que van siendo introducidas desde el exterior de forma constante durante la temporada.

Aunque no han podido sacarse conclusiones estadísticamente significativas del estudio de la relación de los genotipos identificados en los casos nosocomiales con variables como la edad o el sexo de los pacientes, debido al pequeño tamaño muestral, se puede resaltar el hecho de que la mayoría de muestras en las que no se pudo identificar ningún genotipo perteneció a niños mayores de 2 años, sugiriendo una mayor frecuencia de

falsos positivos del test rápido VIKIA® Rota-Adeno en este grupo. Tampoco se identificó ninguna cepa con genotipo G2P[4] en este grupo de edad.

El diagnóstico principal por el que estaban ingresados casi la mitad de niños que enfermaron por rotavirus en el hospital fueron afecciones respiratorias más o menos graves. De forma similar a lo ocurrido en los casos de adquisición comunitaria, los pacientes de cáncer son especialmente vulnerables a las infecciones oportunistas, y en el presente estudio se identificaron cuatro casos de niños que estaban ingresados en el hospital por una patología de este tipo. El hecho de que en dos de los casos no se pudiera identificar ningún genotipo, con la consiguiente posibilidad de que sean falsos positivos del test rápido, y de que en los otros dos casos las cepas fueran de genotipos distintos hace pensar que la introducción de los rotavirus en este área del hospital infantil es bastante esporádica y no se perpetúa. La zona de lactantes fue donde se dio la máxima incidencia de infecciones nosocomiales de rotavirus, y en ella se han identificado los tres casos nosocomiales de infecciones múltiples por varias cepas simultáneas encontrados en el presente estudio. Estos hechos, junto con la gran diversidad de genotipos encontrada refuerza la hipótesis de que los brotes nosocomiales se dan por la continua introducción de cepas desde la comunidad, que circulan temporalmente dentro del hospital para ser luego reemplazadas por otras nuevas que llegan (Gervasi et al. 2016). Sería necesario realizar estudios de caracterización de estas cepas de rotavirus que circulan sincronizadas en el tiempo, secuenciando su genoma completo para establecer su identidad, y filiar los brotes.

La introducción de las vacunaciones contra el rotavirus en el calendario vacunal oficial tendría un impacto especialmente beneficioso para evitar un primer contacto de los niños en las instalaciones sanitarias asistenciales cuando acuden a ellas por estar enfermos, y ser más vulnerables a las complicaciones. La vacunación rutinaria de todos los niños programaría este primer contacto del niño con el rotavirus a un momento adecuado de la vida del pequeño, cuando éste se encuentra sano y preparado para enfrentarse al virus.

Estudio de gastroenteritis por rotavirus en niños vacunados

Las vacunas contra el rotavirus son en la Región de Murcia vacunas que no están recogidas en el calendario vacunal oficial y no son subvencionadas por la Seguridad Social, por lo que son aplicadas de forma voluntaria a criterio de los padres que además deben costearla por sus propios medios. La cobertura vacunal en la Región ha ido aumentando año tras año desde el 2010 hasta el 2013, siendo de las dos vacunas disponibles en el mercado Rotateq[®] la que se aplica con más frecuencia, con entre un 64% y un 81% de todas ellas. Se han identificado sólo cinco casos de niños que fueron vacunados adecuadamente con Rotarix[®] y que aún así enfermaron de gastroenteritis positiva a antígeno de rotavirus A entre 2010 y 2013. En el caso de la vacuna Rotateq[®] se han identificado trece casos de niños que fueron adecuadamente vacunados con Rotateq[®] y enfermaron de gastroenteritis positiva a rotavirus A en esos cuatro años. Estas bajas frecuencias de posibles fallos vacunales resultan aún menores si tenemos en cuenta que en el 44% de los casos no se pudo identificar ningún genotipo en las muestras procedentes de los mismos, lo que sugiere que en estos casos pudo haberse dado un falso positivo del test rápido VIKIA[®] Rota-Adeno. En general, la baja incidencia de fallo vacunal no ha permitido un estudio estadístico de las características clínico-epidemiológicas de estos casos, por lo que sólo se han podido sacar conclusiones del estudio descriptivo de los mismos. Los genotipos de las cepas identificadas en los casos de sospecha de fallo vacunal resultaron ser los genotipos más prevalentes en la comunidad o en el hospital como el G1P[8] y el G4P[8] alguno de cuyos antígenos están incluidos en ambas vacunas. Curiosamente, el único caso detectado de infección por una cepa de rotavirus G2P[4] fue en un paciente que había sido vacunado con Rotateq[®], que sí incluye el genotipo G2 en una de las cepas que contiene. Los dos casos en los que se detectaron cepas G9P[8] habían recibido las tres dosis de la vacuna Rotateq[®] previamente, que no incluye el genotipo G9 en sus cepas pero sí el genotipo P[8], y estaban relacionados por haber compartido cama en el hospital y por haber contraído el virus estando hospitalizados por otra causa distinta del rotavirus. El interés de estas cepas motivó que se caracterizaran mediante la secuenciación y el análisis de sus genomas completos.

Caracterización de una cepa que infectó en el hospital a dos niños previamente vacunados

Se identificaron dos casos de posible fallo vacunal relacionados entre ellos. Se trataba de dos niños que habían sido vacunados correctamente con las tres dosis de Rotateq® alrededor de un año antes, y acabaron ingresando en el hospital pediátrico ocupando sucesivamente la misma cama, por un ataque de asma uno de ellos, y por una inflamación en el ojo el otro. Ambos niños desarrollaron una gastroenteritis a los 5 y 6 días respectivamente desde su ingreso, identificándose un rotavirus con genotipo G9P[8] en los dos casos. El hecho de haber desarrollado una gastroenteritis nosocomial por rotavirus a pesar de haber sido vacunados, ocurriendo en dos niños que no tenían vínculos familiares ni habiendo tenido contacto directo entre ellos, hizo pensar que una misma cepa había infectado primero a uno de los niños, y después a través de una vía de transmisión desconocida al otro. El tiempo que ocurrió entre el alta del primer niño y el ingreso del segundo niño en la misma cama fue de dos días. Se estableció la hipótesis de que el primer niño se contagió de este virus (cepa P369) estando ingresado desarrollando la enfermedad. Una vez curado y dado de alta, el segundo niño también se contagió (cepa P370) estando asignado a la misma cama y enfermando de gastroenteritis igualmente. Para caracterizar estas dos cepas y averiguar si eran la misma se secuenció el genoma completo de las dos cepas mediante técnicas de secuenciación masiva. La constelación de genotipos de ambas cepas fue típicamente Wa en todos sus segmentos genómicos e igual entre ellas. La identidad genética entre las cepas P369 y P370 mostró una identidad de secuencia nucleotídica del 100% en todos los segmentos excepto en el segmento que codifica la proteína VP7, en el que la identidad fue del 99,8%. Respecto a la identidad aminoacídica entre ambas cepas todas las proteínas codificadas fueron idénticas excepto la proteína VP7 de la capa externa del virión, que en la posición 221 es una asparragina en la cepa P369 y una serina en la cepa P370. En ambos casos el residuo es un aminoácido neutro polar. La alta identidad entre las dos cepas demostró que se trataba de la misma cepa que había infectado a los dos niños. Del análisis filogenético de los 11 segmentos genómicos se encontró una cepa humana aislada en Estados Unidos en 2008 con una alta identidad de secuencia genética

en todos sus segmentos, siendo casi idéntica a las cepas aisladas en el presente estudio. Esta cepa denominada 2008747307 presentó identidades de secuencia con las cepas identificadas en el presente estudio por encima del 99,3% en todos los segmentos del genoma, siendo el segmento NSP4 completamente idéntico. En el análisis filogenético se comprobó que estas cepas constituyen cepas típicamente humanas, cuyas cepas emparentadas han sido identificadas en los cinco continentes en repetidas ocasiones. No se trata por tanto de cepas zoonóticas, ni reagrupamientos originales con propiedades biológicas inesperadas, sino cepas adaptadas al ser humano que circulan de manera habitual por el globo. De las dos proteínas más inmunogénicas que poseen los rotavirus, VP7 y VP4, el genotipo P de las cepas que enfermaron a los dos niños vacunados fue el P[8], estando incluido este genotipo en la vacuna Rotateq[®]. Por este motivo se estudiaron las diferencias aminoacídicas en los epítomos inmno génicos neutralizantes de la proteína VP4 de las cepas P369 y P370, y de la proteína VP4 con genotipo P[8] presente en la cepa WI79-4 en la vacuna Rotateq[®]. Se encontraron dos sustituciones aminoacídicas en dos epítomos distintos en las proteínas VP4 de las cepas P369 y P370 y la de la cepa WI79-4. En el epítomo 5-1 la cepa WI79-4 presentó una arginina en la posición 383, mientras que las cepas P369 y P370 presentaron una serina. Este cambio significativo en un epítomo de un aminoácido básico por uno neutro polar puede estar afectando a la efectividad de los anticuerpos en la neutralización de las cepas P369 y P370. El otro cambio fue en el epítomo 8-1, que en la cepa WI79-4 presentaba una serina, y en las cepas P369 y P370 presentó una glicina. Esta sustitución también resulta notable, pasando de un aminoácido polar a uno sin grupo lateral y lipofílico. Serían necesarios estudios adicionales de neutralización con anticuerpos monoclonales para demostrar que esta cepa es capaz de escapar a los anticuerpos generados por el sistema inmunológico contra la cepa WI79-4 de Rotateq[®].

VI- CONCLUSIONES

1. El porcentaje de casos de gastroenteritis causados por rotavirus A en el período 2010-2013 fue de un 21,2%. El 82,9% de los casos de gastroenteritis por rotavirus A diagnosticados microbiológicamente se detectaron en pacientes menores de 2 años.
2. La tasa acumulada anual de incidencia de gastroenteritis por rotavirus A en este estudio osciló desde los 1,03 hasta los 1,88 casos por cada 100 menores de 5 años.
3. Los picos de incidencia de gastroenteritis por rotavirus A se produjeron entre febrero y abril en los cuatro años del estudio.
4. El 77,3% de los casos detectados fue de adquisición comunitaria, mientras que el 21,4% de los mismos fue de adquisición nosocomial.
5. El 58,2% de las infecciones comunitarias se dio en niños de entre 6 meses y 1 año de edad, y no hubo diferencias significativas entre los sexos. En las infecciones nosocomiales el 40,4% de los casos se dio en niños menores de 6 meses de edad, y el 68,1% se dio en niños de sexo masculino. El 55,3% de las infecciones nosocomiales se produjeron en el área de lactantes del hospital pediátrico.
6. El genotipo más prevalente en 2012 en los casos comunitarios fue el G1P[8] con un 30,4% y el G4P[8] con un 26,8% de todas las muestras, siendo este último especialmente prevalente en menores de un año, con un 36,7-37,8% de todos los casos en este grupo de edad. En los casos nosocomiales se encontró que el genotipo más frecuente fue el G4P[8] con un 25,6% de todas los casos, seguido del G1P[8] con un 20,9%.
7. Las gastroenteritis por rotavirus A comunitarias en 2012 fueron más severas en el primer semestre del año (OR ajustado entre 15,61 y 25,67), y en los niños de entre 6 meses y 2 años de edad (OR ajustado entre 9,09 y 10,26). No se encontró asociación entre severidad y genotipo de la cepa.

8. La proporción de infecciones múltiples e infecciones con combinaciones inusuales de genotipos G y P fue mayor en los casos nosocomiales que en los comunitarios.
9. Se detectaron dos casos de infección nosocomial en dos niños previamente vacunados con Rotateq[®], que habían compartido cama en el hospital con dos días de diferencia entre ellos. Mediante secuenciación del genoma completo de los rotavirus de las dos muestras y el posterior análisis filogenético se demostró que se trataba de la misma cepa. Esta cepa fue una cepa típicamente humana con constelación genotípica Wa, cuyas cepas más próximas habían sido identificadas en los cinco continentes.
10. La comparación de la proteína VP4 de la cepa transmitida entre los niños vacunados y la proteína VP4 de la cepa WI79-4 incluida en la vacuna Rotateq[®], ambas con el mismo genotipo P[8], mostró dos sustituciones aminoacídicas en los epítomos 5-1 y 8-1. Esto implica cambios significativos en la polaridad de los residuos en esas posiciones.

VII- BIBLIOGRAFÍA

- Adams, W.R. & Kraft, L.M., 1963. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, 141, pp.359–60.
- Adlhoch, C. et al., 2013. Rotavirus vaccine effectiveness and case-control study on risk factors for breakthrough infections in Germany, 2010-2011. *The Pediatric infectious disease journal*, 32(2), pp.e82-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334342>.
- Ahmed, M. et al., 2004. Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. *Journal of Medical Virology*, (72), pp.149–155.
- Alam, M. et al., 2007. Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Archives of Virology*, (152), pp.199–208.
- Ansari, S.A. et al., 1988. Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(8), pp.1513–1518.
- Aoki, S.T. et al., 2010. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science*, 324(5933), pp.1444–1447.
- Arístegui, J. et al., 2016. Multicenter prospective study on the burden of rotavirus gastroenteritis in children less than 3 years of age in Spain. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), p.549. Available at: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1890-7>.
- Asmah, R.H. et al., 2001. Rotavirus G and P genotypes in rural Ghana. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), pp.1981–1984.
- Atarashi, K. & Honda, K., 2011. Microbiota in autoimmunity and tolerance. *Current opinion in immunology*, (23), pp.761–768.
- Attoui, H. et al., 2005. Coltiviruses and seadornaviruses in North America, Europe, and Asia. *Emerg Infect Dis*, 11(11), pp.1673–1679. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16318717>.
- Attoui, H. et al., 2012. Family: Reoviridae. In A. King et al., eds. *Virus taxonomy: Ninth report of the ICTV*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp. 541–637.

- Bahl, R. et al., 2005. Incidence of severe rotavirus diarrhea in New Delhi, India, and G and P types of the infecting rotavirus strains. *The Journal of infectious diseases*, 192(Suppl 1), pp.S114–S119.
- Bányai, K. et al., 2017. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infection, Genetics and Evolution*, (48), pp.19–26.
- Bányai, K. et al., 2006. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *Journal of clinical virology*, (37), pp.317–322.
- Bányai, K. et al., 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(SUPPL. 1), pp.122–130.
- Barnes, G.L. et al., 1982. A randomized trial of oral gammaglobulin in low-birth-weight infants infected with rotavirus. *Lancet*, 1, pp.1371–3.
- Barnes, G.L. et al., 2003. Excretion of serotype G1 rotavirus strains by asymptomatic staff: a possible source of nosocomial infection. *Journal of Pediatrics*, 142, pp.722–5.
- Bezerra, D.A.M. et al., 2016. Analysis of a genotype G3P[9] rotavirus a strain that shows evidence of multiple reassortment events between animal and human rotaviruses. *Journal of medical virology*, (August 2016), pp.974–981.
- Bishop, R.F. et al., 1983. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *The New England Journal of Medicine*, 309(2), pp.72–6.
- Bishop, R.F. et al., 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet*, pp.1281–1283.
- Bishop R., 2009. Discovery of rotavirus: Implications for child health. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24 Suppl 3, pp.S81–S85.
- Black, R. et al., 1981. Handwashing to prevent diarrhea in day-care centers. *American Journal of Epidemiology*, 113(4), pp.445–51.
- Blutt, S.E. et al., 2007. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Medicine*, 4(4), pp.660–668.

- Blutt, S.E. & Conner, M.E., 2007. Rotavirus: to the gut and beyond! *Current Opinion in Gastroenterology*, 23(1), pp.39–43.
- Brunet, J. et al., 2000. Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: Role in microvillar actin alteration. *Journal of Virology*, 74(5), pp.2323–2332.
- Buesa Gómez, J., López-Andújar, P. & Rodríguez Díaz, J., 2001. Diagnóstico de las infecciones víricas gastrointestinales. *Sociedad Española de Microbiología Clínica*.
- Caul, E.O., 1994. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *The Lancet*, 343(8908), pp.1240–1242.
- CDC, 1999. Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization and Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report*, (48), pp.1–23.
- Chen, J.Z. et al., 2009. Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(26), pp.10644–8.
- Ciarlet, M. et al., 2002. Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *Journal of virology*, 76(8), pp.4087–4095.
- Ciarlet, M. & Estes, M., 2002. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. In G. Britton, ed. *Encyclopedia of environmental microbiology*. New York: John Wiley & Sons, pp. 2573–2773.
- Ciarlet, M., Estes, M. & Conner, M., 2000. Simian rhesus rotavirus is a unique heterologous (non-lapine) rotavirus strain capable of productive replication and horizontal transmission in rabbits. *Journal of general virology*, (81), pp.1237–1249.
- Cilla, G. et al., 2012. Rotavirus genotypes in children in the Basque Country (North of Spain): rapid and intense emergence of the G12P[8] genotype. *Epidemiology and infection*, (3), pp.1–7.
- Cone, R. et al., 1988. Nosocomial transmission of rotavirus infection. *The Pediatric infectious disease journal*, 7(2), pp.103–9.

- Conner, M. & Darlington, R., 1980. Rotavirus infection of foals. *American Journal of Veterinary Research*, (41), pp.1699–1703.
- Cortese, M.M. et al., 2015. Protection against gastroenteritis in US households with children who received rotavirus vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, 211(4), pp.558–562.
- Van Damme, P. et al., 2007. Multicenter prospective study of the burden of rotavirus acute gastroenteritis in Europe, 2004-2005: the REVEAL study. *The Journal of infectious diseases*, 195 Suppl(Suppl 1), pp.S4–S16.
- Davidson, G.P. et al., 1975. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet*, i, pp.292–5.
- Delage, G., 2000. Rotavirus vaccine withdrawal in the United States : The role of postmarketing surveillance. *Journal of Infectious Diseases*, The, 11(1), pp.14–16.
- Dennehy, P. & Peter, G., 1985. Risk factors associated with nosocomial rotavirus infection. *American Journal of Diseases of Children*, 139(9), pp.935–9.
- Desselberger, U., 2014. Rotaviruses. *Virus Research*, 190, pp.75–96.
- Dhama, K. et al., 2015. Avian rotavirus enteritis - an updates review. *The Veterinary Quarterly*, 35(3), pp.142–158.
- Dormitzer, P.R. et al., 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature*, 430(7003), pp.1053–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1780043&tool=pmc&rendertype=abstract><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15329727><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1780043>.
- Dormitzer, P.R. et al., 2002. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO Journal*, 21(5), pp.885–897.
- Estes, M. & Greenberg, H., 2013. Rotaviruses. In D. Knipe et al., eds. *Fields virology*. Philadelphia: Walters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1347–1401.
- Estes, M. & Kapikian, A., 2007. Rotaviruses. In D. Knipe et al., eds. *Fields virology*.

- Philadelphia: Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1917–1974.
- European Centre for Disease Prevention and Control, 2016. Expert opinion on rotavirus vaccination in infancy. , (June).
- EuroRotaNet, The Rotavirus Surveillance Network. Available at: www.eurorota.net.
- Feng, N. et al., 1994. Comparison of mucosal and systemic humoral and immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *Journal of virology*, (68), pp.7766–7773.
- Fiore, L., Greenberg, H.B. & Mackow, E.R., 1991. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology*, 181(2), pp.553–563.
- Fischer, S. a, 2008. Emerging viruses in transplantation: there is more to infection after transplant than CMV and EBV. *Transplantation*, 86(10), pp.1327–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033999>.
- Flewett, T. & Woode, G., 1978. The rotaviruses. *Archives of Virology*, 57(1), pp.1–23.
- Franco, M.A., Angel, J. & Greenberg, H.B., 2006. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*, 24(27), pp.18–31.
- Franco, M., Angel, J. & Greenberg, H., 2006. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*, 24(15), pp.2718–2731.
- Gabbay, Y. et al., 2008. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. *Journal of Medical Virology*, (80), pp.1666–1674.
- Gairdner, P., 1945. An analysis of 216 cases with special reference to institutional outbreaks. *Archives of disease in childhood*, (20), pp.22–31.
- Garcia-Basteiro, A. et al., 2011. Hospitalizations due to rotavirus gastroenteritis in Catalonia, Spain, 2003-2008. *BMC research notes*, (4), p.429.
- Gerna, G. et al., 1992. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1), pp.9–16.
- Gervasi, G. et al., 2016. Nosocomial rotavirus infection: An up to date evaluation of European studies. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 12(9), pp.2413–2418.
- Gianino, P. et al., 2002. Incidence of nosocomial rotavirus infections, symptomatic and asymptomatic, in breast-fed and non-breast-fed infants. *The Journal of Hospital*

Infection, 50(1), pp.13–7.

- Gleizes, O. et al., 2006. Nosocomial Rotavirus Infection in European Countries. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 25(Supplement), pp.S12–S21. Available at: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=AdvancedSearch&qid=16&SID=R1ygyaTXNrbgrGh6ZFU&page=1&doc=6.
- Gonzalez, R. et al., 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Archives of Virology*, (143), pp.981–996.
- Gorrell, R.J. & Bishop, R.F., 1999. Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children. *Journal of Medical Virology*, 57, pp.204–11.
- Graham, D., Dufour, G. & Estes, M., 1987. Minimal infective dose of rotavirus. *Archives of Virology*, 92(3–4), pp.261–71.
- Graham, D. & Estes, M., 1985. Proposed working serologic classification system for rotaviruses. *Annales de l'Institut Pasteur Virologie*, 136(1), pp.5–12.
- Greenberg, H.B. & Estes, M.K., 2009. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology*, 136(6), pp.1939–1951. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.076>.
- GSK, 2017. Ficha técnica de Rotarix disponible en la página web de GSK. Available at: https://www.gsksource.com/pharma/content/dam/GlaxoSmithKline/US/en/Prescribing_Information/Rotarix/pdf/ROTARIX-PI-PIL.PDF.
- Guarino, A. et al., 2014. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: update 2014. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 59(1), pp.132–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739189>.
- Harris, V.C. et al., 2017. Significant Correlation Between the Infant Gut Microbiome and Rotavirus Vaccine Response in Rural Ghana. *The Journal of infectious diseases*, 215(1), pp.34–41. Available at: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/infdis/jiw518%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27803175>.

//ucelinks.cdlib.org:8888/sfx_ucsf?sid=EMBASE&issn=14736527&id=doi:10.1097%2FQCO.0000000000000299&atitle=Foodborn.

- Jiang, V. et al., 2010. Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries. *Human vaccines*, 6(7), pp.532–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3322519&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Kapikian, A. & Chanock, R., 1996. Rotaviruses. In B. Fields, D. Knipe, & P. Howley, eds. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, pp. 1657–1708.
- Kapikian, A., Hoshino, Y. & Chanock, R., 2001. Rotaviruses. In D. Knipe et al., eds. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins, pp. 1787–1833.
- Kapikian, A.Z. et al., 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of virology*, 10(5), pp.1075–1081. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4117963>.
- Kelkar, S. & Zade, J., 2004. Group B rotaviruses similar to strain CAL-1 have been circulating in Western India since 1993. *Epidemiology and infection*, (132), pp.745–749.
- Kindler, E. et al., 2013. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infection, Genetics and Evolution*, 14(1), pp.58–67. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.11.015>.
- Kirkpatrick, B.D. et al., 2015. The “Performance of Rotavirus and Oral Polio Vaccines in Developing Countries” (PROVIDE) study: Description of methods of an interventional study designed to explore complex biologic problems. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(4), pp.744–751.
- Koopmans, T. & Brown, D., 1999. Seasonality and diversity of Group A rotaviruses in Europe. *Acta Paediatrica*, Suppl. 88, pp.14–19.
- Kotloff, K.L. et al., 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. *The Lancet*, 382(9888), pp.209–222.

- Kovacs-Nolan, J., Yoo, D. & Mine, Y., 2003. Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus. *The Biochemical journal*, 376(Pt 1), pp.269–275.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, (33), pp.1870–1874.
- Kuss, S. et al., 2011. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science*, 334(6053), pp.249–252.
- LeBlanc, J. et al., 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current opinion in biotechnology*, (2), pp.160–168.
- Leung, D.T., Chisti, M.J. & Pavia, A.T., 2016. Prevention and Control of Childhood Pneumonia and Diarrhea. *Pediatric Clinics of North America*, 63(1), pp.67–79.
- Lewis, K., 2011. Vesikari Clinical Severity Scoring System Manual. *Path*, (May), pp.1–50. Available at:
https://www.path.org/publications/files/VAD_vesikari_scoring_manual.pdf.
- Liu, L. et al., 2015. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet*, 385(9965), pp.430–440. Available at:
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61698-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61698-6).
- Lizioli, A. et al., 2003. Prevalence of nosocomial infections in Italy: results from the Lombardy survey in 2000. *The Journal of Hospital Infection*, 54(2), pp.141–8.
- Madhi, S.A. et al., 2016. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *Malawi Medical Journal*, 28(3), pp.108–114.
- Maes, P. et al., 2009. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiology*, (9), p.238.
- Malherbe, H. & Strickland-Cholmley, M., 1967. Simian virus SA11 and the related O agent. *Archiv fur die gesamte Virusforschung*, 22(1), pp.235–45.
- Martella, V. et al., 2007. Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses. *Virology*, (367), pp.358–366.
- Martella, V. et al., 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*,

- 140(3–4), pp.246–255.
- Marthaler, D. et al., 2014. Widespread rotavirus H in domesticated pigs, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), pp.1195–1198.
- Mascarenhas, J.D.P. et al., 2016. Detection of the VP6 gene of group F and G rotaviruses in broiler chicken fecal samples from the Amazon region of Brazil. *Archives of Virology*, 161(8), pp.2263–2268.
- Matthijnssens, J. et al., 2006. Full Genomic Analysis of Human Rotavirus Strain B4106 and Lapine Rotavirus Strain 30 / 96 Provides Evidence for Interspecies Transmission †. *Journal of virology*, 80(8), pp.3801–3810.
- Matthijnssens, J. et al., 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic segments. *Microbiology*, 153(8), pp.1621–1629.
- Matthijnssens, J. et al., 2009. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future microbiology*, 4(10), pp.1303–1316.
- Matthijnssens, J. et al., 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of Virology*, 156(8), pp.1397–1413.
- Matthijnssens, J. et al., 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of Virology*, 157(6), pp.1177–1182.
- Matthijnssens, J. & Van Ranst, M., 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current Opinion in Virology*, 2(4), pp.426–433. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2012.04.007>.
- McClain, B. et al., 2010. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, (397), pp.587–99.
- McDonald, S.M. et al., 2009. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: Balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathogens*, 5(10).
- McIver, C. et al., 2001. Diagnosis of enteric pathogens in children with gastroenteritis. *Pathology*, 33(3), pp.353–8.
- Mebus, C.A. et al., 1969. Calf diarrhea (Scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Univ. Nebraska Res. Bull.*, 233(1969), pp.1–16.
- Merck, 2017. Ficha técnica de Rotateq disponible en la página web de Merck. Available

- at: http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/r/rotateq/rotateq_pi.pdf.
- Mihalov-Kovács, E. et al., 2015. Candidate new Rotavirus species in sheltered Dogs, Hungary. *Emerging Infectious Diseases*, 21(4), pp.660–663.
- Mijatovic-Rustempasic, S. et al., 2016. Full genome characterization of the first G3P[24] rotavirus strain detected in humans provides evidence of interspecies reassortment and mutational saturation in the VP7 gene. *Journal of general virology*, 97(2), pp.389–402.
- Mitake, H. et al., 2015. Persistence of the rotavirus A genome in mesenteric lymph nodes of cattle raised on farms. *The journal of general virology*, 96(9), pp.2708–2013.
- MMWR, 1999. Intussusception Among Recipients of Rotavirus Vaccine—United States, 1998-1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, July 16(48), p.27. Available at: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.282.6.520>.
- Moon, S.-S. et al., 2010. Inhibitory effect of breast milk on infectivity of live oral rotavirus vaccines. *The Pediatric infectious disease journal*, 29(10), pp.919–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3704726&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Moreno-Pérez, D. et al., 2017. Calendario de vacunaciones de la Asociación Española de Pediatría (CAV-AEP): recomendaciones 2017. *Anales de Pediatría*, 86(2), p.98.e1-98.e9.
- Murphy, T. V. et al., 2001. Intussusception among Infants Given An Oral Rotavirus Vaccine. *The New England journal of medicine*, 344(20), p.1564. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200102223440804%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207352%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357164>.
- Naik, S.P. et al., 2017. Stability of heat stable, live attenuated Rotavirus vaccine (ROTASIIL®). *Vaccine*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X17304991>.
- Nakagomi, O. et al., 1989. Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA

- hybridization. *Molecular and cellular probes*, (3), pp.251–261.
- Nakagomi, O. & Nakagomi, T., 1993. Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. *Microbiology and immunology*, 37(5), pp.337–421.
- Nicholson, J. et al., 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), pp.1262–1267.
- Noone, C. & Banatvala, J., 1983. Hospital acquired rotaviral gastroenteritis in a general paediatric unit. *Journal of Hospital Infection*, 4, pp.297–9.
- Oh, J. et al., 2014. TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity*, 41(3), pp.478–792.
- Oishi, I. et al., 1991. Serial Observations of Chronic Rotavirus in an Immunodeficient Child Infection Hitokazu FUNAMOTO3 Abstract Chronic rotavirus infection of an infant with severe combined immuno- deficiency (SCID) was studied by virological examinations in association w. , 35(11), pp.953–961.
- Pacini, D.L. et al., 1987. Nosocomial rotaviral diarrhea: Pattern of spread on wards in a children's hospital. *Journal of Medical Virology*, 23, pp.359–66.
- Palombo, E.A., 2002. Genetic analysis of group A rotaviruses: Evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. *Virus Genes*, 24(1), pp.11–20.
- Palombo, E., Clark, R. & Bishop, R., 2000. Characterization of a “European-like” serotype G8 human rotavirus isolated in Australia. *Journal of medical virology*, 60, pp.56–62.
- Pammi, M. & Haque, K.N., 2011. Oral immunoglobulin for the prevention of rotavirus infection in low birth weight infants. *The Cochrane database of systematic reviews*, 9(11), p.CD003740.
- Parashar, U. et al., 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*, 9, pp.565–72.
- Parashar, U.D. et al., 1998. Hospitalizations associated with rotavirus diarrhea in the United States, 1993 through 1995: surveillance based on the new ICD-9-CM rotavirus-specific diagnostic code. *The Journal of infectious diseases*, 177(1), pp.13–17.

- Parashar, U.D. et al., 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), pp.304–306.
- Patel, M.M. & Parashar, U.D., 2009. Assessing the effectiveness and public health impact of rotavirus vaccines after introduction in immunization. *The Journal of infectious diseases*, 200(suppl.1), pp.S291-9.
- Pedley, S. et al., 1986. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. *Journal of general virology*, (67), pp.131–137.
- Phan, T.G. et al., 2017. Rotavirus I in feces of a cat with diarrhea. *Virus Genes*, (February), pp.4–7. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11262-017-1440-4>.
- Platts-Mills, J.A. et al., 2015. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: A multisite birth cohort study (MAL-ED). *The Lancet Global Health*, 3(9), pp.564–575.
- Pongsuwanna, Y. et al., 1996. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), pp.1050–1057.
- Ramig, R., 1997. Genetics of rotaviruses. *Annual review of microbiology*, 51, pp.225–255.
- Ray, P. et al., 2006. Quantitative Evaluation of Rotaviral Antigenemia in Children with Acute Rotaviral Diarrhea. , 194, pp.3–8.
- Richardson, S. et al., 1998. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *Lancet*, 351(9119), pp.1844–1848.
- Ringenberg, M. et al., 1989. Prospective study of nosocomial rotavirus infection in a paediatric hospital. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 25(3), pp.156–60.
- Rodríguez-Díaz, J. et al., 2017. Relevance of secretor status genotype and microbiota composition in susceptibility to rotavirus and norovirus infections in humans. *Scientific Reports*, 7(December 2016), p.45559. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep45559>.
- Román Riechmann, E. et al., 2004. Gastroenteritis aguda nosocomial e infección asintomática por rotavirus y astrovirus en niños hospitalizados. *Anales de*

Pediatría, 60(4), pp.337–43.

Le Roux, P. et al., 2004. Nosocomial viral infections in a pediatric service: example of rotaviral gastroenteritis and respiratory syncytial viral bronchiolitis. *Archives de Pédiatrie*, 11(8), pp.908–15.

Ruiz-Palacios, G. et al., 2006. Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine*, 354(1), pp.11–22.

Ruiz, M.C., Cohen, J. & Michelangeli, F., 2000. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium*, (28), pp.137–49.

Saif, L., Rosen, B. & Parwani, A., 1994. Animal rotaviruses. In A. Kapikian, ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. New York: Marcel Dekker Inc., pp. 279–367.

Settembre, E.C. et al., 2011. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *The EMBO Journal*, (30), pp.408–16.

Shah, J.D. et al., 2016. Development of the intestinal RNA virus community of healthy broiler chickens. *PLoS ONE*, 11(2), pp.1–13.

Sindhu, K.N.C. et al., 2017. Impact of maternal antibodies and infant gut microbiota on the immunogenicity of rotavirus vaccines in African, Indian and European infants: protocol for a prospective cohort study. *BMJ open*, 7(3), p.e016577. Available at: <http://bmjopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjopen-2017-016577><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28360258>.

Slack, E. et al., 2009. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science*, 325(5940), pp.617–620.

Soares-Weiser, K. et al., 2012. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *The Cochrane database of systematic reviews*, (2), p.CD008521.

Tanaka, T. et al., 2017. Changes in rotavirus genotypes before and after vaccine introduction: a multicenter, prospective observational study in three areas of Japan. *Japanese journal of infectious diseases*.

Taniguchi, K. et al., 1987. Direct serotyping of human rotavirus in stools using serotype 1-, 2-, 3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP7. *The Journal of infectious*

- diseases*, (155), pp.1159–1166.
- Taniuchi, M. et al., 2013. Etiology of diarrhea in bangladeshi infants in the first year of life analyzed using molecular methods. *Journal of Infectious Diseases*, 208(11), pp.1794–1802.
- Tate, J.E. et al., 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), pp.136–141. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70253-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70253-5).
- Tate, J.E. et al., 2016. Global, regional and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000-2013. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 62(suppl.2), pp.S96–S105.
- Trask, S.D., McDonald, S.M. & Patton, J.T., 2012. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), pp.165–177. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2673>.
- Trick, W. et al., 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 35(5), pp.627–30.
- Trojnar, E. et al., 2010. The genome segments of group D rotavirus possess group A-like conserved termini but encode group-specific proteins. *Journal of virology*, (84), pp.10254–10265.
- Tsugawa, T. & Hoshino, Y., 2008. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology*, (380), pp.344–353.
- Uhnou, I., Olding-Stenkvis, E. & Kreuger, a, 1986. Clinical features of acute gastroenteritis associated with rotavirus, enteric adenoviruses, and bacteria. *Archives of disease in childhood*, 61(8), pp.732–738.

- Urrea, M. et al., 2003. A prospective incidence study of nosocomial infections in a neonatal care unit. *American Journal of Infection Control*, 31(8), pp.505–7.
- Velázquez, F.R., 2009. Protective effects of natural rotavirus infection. *The Pediatric infectious disease journal*, 28(3 Suppl), pp.S54-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19252424>.
- Velázquez, F.R.. et al., 1996. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *The New England journal of medicine*, (335), pp.1022–8.
- Vesikari, T. et al., 2006. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *The New England journal of medicine*, 354(1), pp.23–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16394299>.
- Virgin, H.W., Wherry, E.J. & Ahmed, R., 2009. Redefining Chronic Viral Infection. *Cell*, 138(1), pp.30–50.
- Viskowska, M. et al., 2014. Probing the sites of interactions of rotaviral proteins involved in replication. *Journal of virology*, 88(21), pp.12866–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25165107>.
- Walker, C. et al., 2013. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *The Lancet*, 381(9875), pp.1405–1416.
- Wang, H. et al., 2014. Global, regional, and national levels of neonatal, infant, and under-5 mortality during 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 384(9947), pp.957–979.
- Ward, R. et al., 1986. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *The Journal of infectious diseases*, 154(5), pp.871–80.
- Ward, R., 2009. Mechanisms of protection against rotavirus infection and disease. *The pediatric infectious disease journal*, (28), pp.57–9.
- Ward, R.L., Knowlton, D.R. & Pierce, M.J., 1984. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 19(6), pp.748–753.
- Wildi-Runge, S. et al., 2009. A 4-year study on clinical characteristics of children hospitalized with rotavirus gastroenteritis. *European Journal of Pediatrics*, 168(11), pp.1343–1348.

- Wilhelmi, I. et al., 2001. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples compared with standard enzyme immunoassay and latex agglutination techniques. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(10), pp.741–743.
- Williams, C., Lobanov, A. & Pebody, R., 2009. Estimated mortality and hospital admission due to rotavirus infection in the WHO European Region. *Epidemiology and Infection*, 137(5), pp.607–616.
- World Health Organization, 2009a. *Manual of rotavirus detection and characterization methods.pdf*,
- World Health Organization, 2009b. Rotavirus Vaccination. Meeting of the immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009. *Weekly epidemiological record*, 84(23), pp.220–236. Available at: <http://www.who.int/wer/2009/wer8423.pdf?ua=1>.
- World Health Organization, 2006. Temperature sensitivity of vaccines. *Immunization Vaccines and Biologicals*. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69387/1/WHO_IVB_06.10_eng.pdf.
- World Health Organization, 2013. Weekly epidemiological report no. 5. *Weekly epidemiological record*, 88(5), pp.49–64.
- Wylie, K.M., Weinstock, G.M. & Storch, G.A., 2012. Emerging view of the human virome. *Translational Research*, 160(4), pp.283–290. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2012.03.006>.
- Yang, H. et al., 2004. Cloning and sequence analysis of dsRNA segment 5, 6, and 7 of a novel non-group A, B, C adult rotavirus. *Virus Research*, (106), pp.15–26.
- Yodmeeklin, A. et al., 2017. Analysis of complete genome sequences of G9P[19] rotavirus strains from human and piglet with diarrhea provides evidence for whole-genome interspecies transmission of nonreassorted porcine rotavirus. *Infection, Genetics and Evolution*, 47, pp.99–108. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.021>.
- Zahorsky, J., 1929. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, (45), pp.391–5.

- Zaman, K. et al., 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), pp.615–623.
Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60755-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60755-6).
- Zhang, X. et al., 2008. Near-atomic resolution using electro cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), pp.1867–72.
- Zheng, B. et al., 1991. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *Journal of Medical Virology*, 34(1), pp.29–37.