

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“Diversidad de Rotavirus A en niños con
gastroenteritis aguda en Lima, Perú”**

Tesis para obtener el Título Profesional de Licenciada
en Biología

María Giuliana Oyola Lozada

Lima, Perú

2015

Porque de Él, y por Él, y para Él, son todas las cosas.

A Él sea la gloria por los siglos. Amén

(Romanos 11:36)

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía y fortaleza en todo tiempo. Por haberme permitido alcanzar esta meta, que es parte del propósito que Él tiene para mi vida.

A mi familia por todo el apoyo y aliento brindado. Mario, Silvia y Nailú: son los motores de mi vida, siempre me esforzaré por darles lo mejor. Asimismo a mi tía Bertha, Pedro y Víctor, parte importante de mi vida y mi familia.

A José, quien con mucha paciencia me ha acompañado a lo largo de todo este camino y ha sabido brindarme su apoyo incondicional y preciados consejos en los momentos más requeridos.

Al Dr. Holger Mayta por haberme permitido realizar esta investigación y acogerme en su laboratorio, por haber sido un mentor y amigo todo este tiempo.

Al Dr. Hugo Gonzáles, quien ha sido desde el principio un verdadero maestro para mí. Su respaldo y apoyo han sido importantes a lo largo de mi desarrollo profesional.

A Helena, Gerardo, Karen, Carmen, Mayra, Águeda, Alejandra, Macarena y Jorge, por todo su apoyo, por sus consejos, por la amistad cultivada, por las sonrisas y buenos momentos.

A la Dr. Sarah-Blythe Ballard y Fabiola C. por la ayuda brindada en la realización de esta investigación.

A Karen Huamán por su gentil apoyo en el análisis estadístico de esta investigación.

A todo el equipo científico y administrativo del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la UPCH, encabezado por el Dr. Robert Gilman.

RESUMEN

La gastroenteritis ocasionada por rotavirus se encuentra entre las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil. En el Perú rotavirus representa el 30% de las muertes por diarrea y 4% del total de defunciones, afectando principalmente a niños menores de 5 años. Desde el año 2009 el Perú implementó la vacuna contra rotavirus en su programa de vacunación universal, sin embargo, debido a la aparición de genotipos emergentes, es importante monitorear la diversidad del virus para evaluar los posibles efectos sobre la eficacia de la vacuna. Pese a esto, existen escasos reportes de la epidemiología de rotavirus en nuestro país. El objetivo del presente estudio es determinar la presencia y los genotipos G y P de Rotavirus en muestras provenientes de niños con gastroenteritis aguda atendidos en un hospital de Lima entre Octubre del 2013 y Octubre del 2014. Como metodología se utilizó el RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) para la detección del rotavirus y el RT-PCR convencional para la genotipificación de las muestras positivas, asimismo se secuenciaron algunas muestras para determinar los genotipos finales. De las 448 muestras analizadas en el estudio, 45 (10%) tuvieron resultado positivo para rotavirus. Entre los genotipos identificados, G12 (40.9%), G2 (25%) y P[8] (77.3%) fueron los más frecuentes y la combinación G/P más dominante fue G12P[8] (54.5%). Los resultados evidenciaron una alta prevalencia de G12P[8] entre los casos positivos, genotipo no reportado previamente en el Perú. Se recomienda realizar nuevos estudios para evaluar las variaciones en la diversidad de rotavirus circulantes en el Perú y los posibles efectos ante la presión selectiva de la vacuna.

Palabras clave: Gastroenteritis aguda, Rotavirus, Perú, genotipos virales.

ABSTRACT

Rotavirus gastroenteritis is one of the leading causes of morbidity and mortality in children. In Peru rotavirus represents 30% of deaths due to diarrhea and is responsible of 4% of the total deaths, affecting mostly children under 5 years. Peru implemented the rotavirus vaccine in its universal vaccination program since 2009. Due to the appearance of emerging genotypes, it is important to evaluate the diversity of the virus in order to determine possible effects on vaccine efficacy. However there are few reports on the molecular epidemiology of rotavirus in our country. The aim of this study was to determine the presence and Rotavirus G and P genotypes in samples from children with acute gastroenteritis attended in a hospital in Lima between October 2013 and October 2014. The method used for the detection of rotavirus was real time RT-PCR (qPCR) and conventional RT-PCR to determine the genotype of positive samples. Additionally, sequencing was used to confirm the final genotype of some samples. Of the 448 samples analyzed, 45 (10%) were positive for rotavirus. G12 (40.9%), G2 (25%) and P[8] (77.3%) were the most frequent genotypes and the most prevalent G/P combination was G12P[8] (54.5%). The results showed a high prevalence of G12P[8] among the positive cases. G12P[8] has not been previously reported in Peru. We recommend more in deep studies to identify the diversity of circulating genotypes in Peru.

Key words: Acute gastroenteritis, Rotavirus, Peru, viral genotypes.

Índice

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO I: GENERALIDADES	10
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
1.2 JUSTIFICACION.....	11
1.3 OBJETIVOS.....	12
1.4 LUGAR DE PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS	13
1.5 HIPOTESIS	13
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	14
2.1 GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS	14
2.2 AGENTE INFECCIOSO.....	16
2.2.1 Estructura viral.....	16
2.2.2 Ciclo de replicación.....	17
2.2.3 Patogenia.....	19
2.3 CLASIFICACION Y GENOTIPOS	20
2.3.1 Genotipos frecuentes	20
2.3.2 Distribución mundial	22
2.3.3 Prevalencia y genotipos de rotavirus en el Perú	23
2.4 DIAGNOSTICO DE ROTAVIRUS	24
2.5 PREVENCIÓN Y VACUNA.....	25
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 DISEÑO METODOLOGICO	29
3.2 CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION.....	29
3.3 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	30
3.4 PROCEDIMIENTO.....	30
3.4.1 Preparación de las muestras fecales.....	30
3.4.2 Extracción del ARN viral	30
3.4.3 Detección de Rotavirus mediante qRT-PCR.....	31
3.4.4 Genotipificación de rotavirus	32

3.4.5 Genotipificación mediante secuenciamiento y análisis filogenético.....	32
3.4.6 Procesamiento de la información	33
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	34
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	43
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.....	48
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES.....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	58

INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis es una de las enfermedades con mayor índice de morbilidad y mortalidad para el ser humano, siendo la principal causa de hospitalización y muerte en la población infantil. Rotavirusse encuentra entre las principales causas de gastroenteritis en niños menores de 5 años. Es el agente etiológico responsable de 100 millones de infecciones, 2 millones de hospitalizaciones y más de 600 000 muertes por gastroenteritis infantil a nivel mundial cada año.

Rotavirus es un virus icosaédrico y sin envoltura perteneciente a la familia *Reoviridae*. El género Rotavirus está dividido en 7 grupos (A-G), siendo el grupo A el más predominante en brotes de diarrea viral en humanos. Rotavirus tiene un genoma con 11 segmentos que codifican 12 proteínas, entre las cuales VP7 (G) y VP4 (P), dos proteínas de la capa externa, han sido ampliamente estudiadas. El enfoque de los estudios epidemiológicos de rotavirus se concentra en la genotipificación de G y P a fin de evaluar la prevalencia y evolución de los genotipos circulantes. Hasta la fecha se han clasificados 27 genotipos G y 35 genotipos P, siendo las combinaciones G-P más predominantes a nivel mundial G1P[8], G2P[4] y G3P[8]. Está presente la posibilidad de que nuevos genotipos de importancia clínica como G9 y G12 puedan surgir, debido principalmente a la elevada capacidad de recombinación y mutación de rotavirus.

Desde el año 2004, Rotarix (RV1) y Rotateq (RV5), dos vacunas orales licenciadas para rotavirus, han ingresado al mercado mundial con éxito y se ha demostrado que ambas poseen una protección eficiente contra la gastroenteritis severa causada por rotavirus. En el año 2009, el Perú implementó dentro de su programa de inmunización infantil la vacuna Rotarix, basada en la cepa monovalente humana atenuada G1P[8].

A pesar del éxito de la vacuna, la vigilancia epidemiológica de las cepas circulantes es un aspecto importante para medir el impacto de la vacuna sobre variaciones en la diversidad y distribución de los genotipos del rotavirus y la aparición de nuevos genotipos. Hasta la fecha, en el Perú se han reportado escasos estudios que determinen la diversidad de las cepas circulantes de rotavirus tras la introducción de la vacuna.

Ante esta situación, el presente estudio identificó los genotipos de rotavirus circulantes en una población de niños con gastroenteritis aguda atendidos en un hospital de Lima en un periodo posterior a la implementación de la vacuna en el país. Se empleó la prueba de qPCR (PCR en Tiempo Real) como método de detección y como método de genotipificación de los genes VP7 (G) y VP4 (P) la prueba RT-PCR semianidada. La información obtenida en este estudio sobre los genotipos de rotavirus circulantes en una población infantil proporcionará datos de referencia para estudios posteriores sobre la distribución de los genotipos y evaluación del impacto de la vacuna en nuestra población.

CAPÍTULO I: GENERALIDADES

1.1 Planteamiento del problema

La gastroenteritis es una inflamación de la membrana mucosa del tracto intestinal caracterizada por la presencia de diarrea y vómito. Constituye una de las enfermedades con más altos niveles de morbilidad y mortalidad en infantes. Es la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años, ocasionando que anualmente 0.8 millones de niños principalmente de países en vías de desarrollo, perezcan a causa de esta enfermedad (Liu et al., 2012).

Las vacunas disponibles actualmente, Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) y RotaTeq® (Merck & Co. Inc., West Point, PA, USA), han demostrado brindar protección contra la gastroenteritis rotaviral, aprobando los estándares de calidad, seguridad y eficacia. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado implementar la vacuna contra rotavirus en todos los programas nacionales de inmunización como estrategia para contrarrestar la diarrea rotaviral.

A pesar de la efectividad de las vacunas, se debe considerar que la heterogeneidad genética del rotavirus humano, ocasionada por mecanismos naturales como reordenamientos y rearrreglos genéticos, podría influenciar el éxito de los programas de vacunación al favorecer el surgimiento de nuevos genotipos o variar la diversidad de los mismos, resultando en la predominancia de cepas menos afectadas o con resistencia a las vacunas (Matthijnssens et al., 2009). La presión selectiva inducida por la vacunación puede favorecer la selección de cepas de rotavirus no emparentadas con las cepas presentes en las vacunas (Matthijnssens et al., 2012). La vigilancia a largo plazo en los

países que adopten la vacuna para rotavirus es importante para medir el impacto de los programas de inmunización sobre los serotipos virales y detectar cepas que evadan la inmunidad proporcionada por la vacuna, lo cual puede ser un punto crítico para el diseño de mejores vacunas en el futuro (Gentsch et al., 2009). Por tal motivo, la vigilancia de rotavirus es una herramienta esencial para monitorear cambios en la distribución de genotipos de rotavirus y detectar posibles nuevos genotipos o nuevas variantes de los genotipos ya conocidos.

El Perú inició la vigilancia centinela de la diarrea por rotavirus en julio de 2009 en seis regiones del país: Lima, Cusco, Arequipa, Loreto, Cajamarca y Junín, con la participación de once hospitales (Suarez et al., 2012). Sin embargo, existen escasos reportes que indiquen la diversidad de genotipos en los casos detectados tras la introducción de la vacuna en el país. El presente estudio pretende responder la siguiente pregunta problema: ¿La introducción de la vacuna Rotarix en el programa de vacunación universal en el Perú ha permitido que genotipos G y P no cubiertos por la vacuna aparezcan en una población de niños con gastroenteritis aguda causada por rotavirus?

1.2 Justificación

Rotarix y Rotateq han sido implementadas en los programas de vacunación universal en varios países alrededor del mundo. Latinoamérica fue el primer continente en incorporar la vacuna en la mayoría de sus programas nacionales, destacando Brasil (en el 2006), El Salvador (2006), Panamá (2006), Venezuela (2006), Ecuador (2007), México (2007), Bolivia (2008), Honduras (2009), Perú (2009), Colombia (2009), Guatemala (2009) y Paraguay

(2010) (O’Ryan, Lucero, & Linhares, 2011). Sin embargo, el impacto epidemiológico de la vacunación contra rotavirus debe ser

monitoreado constantemente en los países en donde la vacuna haya sido implementada. Cambios en la epidemiología de la enfermedad, tales como la estacionalidad, la distribución de los serotipos, la edad promedio de infección, así como el surgimiento de variantes genéticas inusuales deben ser evaluados pues podrían ocurrir en el periodo postvacunación.

Las técnicas de biología molecular empleadas en este estudio han permitido identificar la presencia de rotavirus en los casos con gastroenteritis aguda, así como determinar los genotipos frecuentes. Dado que existen escasos estudios que evalúen la diversidad de rotavirus en nuestro país, la presente investigación permitirá conocer la variedad de las cepas circulantes en una población determinada, permitiendo detectar el surgimiento de nuevas cepas diferentes a genotipos regionales comunes. De esta manera, constituye un aporte significativo ante cualquier evento relacionado a cambios epidemiológicos/virológicos hoy no vislumbrados, que pudieran requerir a futuro de modificaciones de las vacunas o de los esquemas de vacunación en el país.

1.3 Objetivos

Objetivo General:

Determinar la presencia y los genotipos G y P de Rotavirus A en muestras de niños con gastroenteritis aguda atendidos en un hospital de Lima después de la introducción de la vacuna.

Objetivos Específicos:

Determinar la frecuencia de Rotavirus A en muestras diarreicas mediante la prueba de RT PCR en tiempo real.

Identificar los genotipos de Rotavirus A presentes en las muestras positivas mediante la amplificación de los genes VP7 (G) y VP4 (P) por RT-PCR.

Realizar el análisis filogenético para las secuencias de los genes VP4 y VP7 de las muestras no tipificables por RT-PCR.

Correlacionar los datos genotípicos obtenidos con las características de la población de estudio.

1.4 Lugar de procedencia de las muestras

Las muestras empleadas para el estudio proceden de la Unidad de Rehidratación Oral (URO) del Instituto Nacional de Salud del Niño, en la ciudad de Lima. El material biológico se procesó en el área de Virología Molecular del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

1.5 Hipótesis

“Tras la introducción de la vacuna antirotavirus en el 2009, la distribución de los genotipos de rotavirus circulantes en Lima ha presentado variaciones, dando lugar a la aparición de nuevos genotipos”.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Gastroenteritis por rotavirus

La gastroenteritis es un problema mayor en la salud pública mundial por ocasionar altas tasas de morbilidad y mortandad. Afecta especialmente a la población infantil, ocasionando malnutrición, disminución del crecimiento y trastornos del desarrollo cognitivo. La diarrea es la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años, responsable de 0.8 millones de muertes cada año (Liu et al., 2012). Se estima que cerca del 90% de casos ocurren en niños menores de 5 años provenientes de países de bajos y medianos ingresos, por lo que los niños en situación de pobreza tienen un mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad (Ahs et al., 2010). En el caso del Perú, hasta el año 2007, las estadísticas del Ministerio de Salud reportaron a la diarrea infecciosa como la tercera causa de consulta externa en todos los grupos etarios (Gonzales et al., 2011). Las enfermedades diarreicas son un problema de salud pública importante en el Perú, habiéndose encontrado que la incidencia de enfermedad diarreica en algunas regiones del país es de 4,38 episodios por niño cada año, cifra de un nivel muy superior al promedio mundial (Guillén, 2011).

Se define como diarrea la deposición, tres o más veces al día, de heces sueltas o líquidas, la cual suele ser un síntoma de una infección del tracto digestivo, transmitida por alimentos o agua de consumo contaminados, o bien de una persona a otra como resultado de una higiene deficiente (OMS, 2013). La diarrea puede ser causada por un amplio rango de agentes patógenos, entre los que se incluyen bacterias, protozoarios, helmintos y virus (Organización Mundial de Gastroenterología, 2012). Se ha identificado que los virus son los

responsables de aproximadamente un 70% de las diarreas agudas en niños (Webb & Starr, 2005).

Desde su primera detección por Bishop en 1973, rotavirus es considerado como la causa mundial más común de gastroenteritis aguda en la población infantil (Bishop, Davidson, Holmes, & Ruck, 1973; Desselberger, 2014). Tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, rotavirus es el agente responsable de 100 millones de infecciones, 2 millones de hospitalizaciones y más de 600 000 muertes cada año (Parashar, Gibson, Bresee, & Glass, 2006). El impacto de rotavirus en la salud pública es aún mayor en los países menos desarrollados, con efectos adversos sobre la economía de los sistemas nacionales de salud, así como en las familias de escasos recursos (Hong-Anh T et al., 2011). En el caso de Latinoamérica y el Caribe, rotavirus es la principal causa de morbilidad y mortandad asociada a diarrea en niños <5 años, reportándose en el 2008 cerca de 8 000 muertes anuales por rotavirus y en el 2010 de los 14 354 niños <5 años hospitalizados por diarrea, 4 266 (30%) presentaron rotavirus como agente etiológico (De Oliveira et al., 2011).

En un estudio realizado antes de la introducción de la vacuna en el Perú, rotavirus fue identificado como el principal causal de morbilidad y mortandad en niños, estimándose que para la edad de 5 años, más del 63% de niños peruanos habrían experimentado un episodio de diarrea por rotavirus, 1 en 20 sería hospitalizado y 1 en 375 fallecería a causa de la enfermedad, significando un costo social elevado para el país, por lo que la implementación de la vacuna fue considerada como una medida prioritaria (Ehrenkranz, Lanata, Penny, Salazar-Lindo, & Glass, 2001).

2.2 Agente infeccioso

2.2.1 Estructura viral

Rotavirus pertenece a uno de los nueve géneros dentro de la familia *Reoviridae*, cuyos miembros tienen genoma de ARN segmentados y de doble cadena. Es un virus de 70-75 nm de diámetro, 1000 Å con estructura icosaédrica y carente de envoltura. El genoma de rotavirus consta de 11 segmentos de ARN bicatenario rodeados de una cápside de tres capas, cuyo tamaño es de aproximadamente 18,550 pares de bases (pb) y segmentos de 667 a 3302 nucleótidos; codifica 6 proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y 6 proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) (Greenberg & Estes, 2009)(AnexoA).

Dentro de las principales proteínas no estructurales, NSP4 es antigénica, lo que permite la categorización de rotavirus en diferentes genotipos, además esta proteína actúa como una enterotoxina capaz de causar cuadros de diarrea (Chen, Tan, Huang, & Chen, 2012). Las proteínas NSP2 y NSP5 intervienen en la formación del viroplasma; NSP3 tiene funciones complejas, participando en la traducción del ARN viral mensajero e interfiere la traducción de ARN mensajero celular (Desselberger, 2010).

Las proteínas estructurales de la superficie VP7 y VP4, representan los principales antígenos del virus y son empleadas para la clasificación de rotavirus en genotipos G y P respectivamente. La proteína VP7 es glicosilada y está dispuesta en la cápside del virión de simetría icosaédrica; la proteína VP4 forma dímeros anclados en la matriz VP7 de la superficie del virus (Patton, Carpio, & Spencer, 2004).

La proteína VP7 es altamente inmunogénica e inductora de anticuerpos neutralizantes, se modifica post-traduccionalmente por la adición de azúcares. Es una N-glicoproteína que contiene

únicamente oligosacáridos del tipo de alfa manosa, lo que indica que no viaja por el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, donde normalmente los oligosacáridos con estas características son modificados (Infante et al., 2007). Por otro lado, la proteína VP4 permite la unión a la célula receptora, la penetración a la célula, formación de anticuerpos neutralizantes y una de sus funciones más importantes es la hemaglutinación. Las propiedades de esta proteína son determinantes del rango del huésped, su virulencia, tropismo e inducción de inmunidad protectora. Cuando la proteína es expuesta a tratamiento proteolítico por enzimas proteasas tipo tripsina se liberan dos polipéptidos de menor peso molecular denominados VP8 (aa 1-131) y VP5 (aa 247 al 776) (Infante et al., 2007).

2.2.2 Ciclo de replicación

Típicamente rotavirus es transmitido por vía fecal-oral e infecta a los enterocitos de la vellosidad intestinal, ingresando a las células como una partícula viral de tres capas (TLP, siglas en inglés de *Triple Layered Particle*) mediante mecanismos como la endocitosis o la penetración directa mediada por un receptor. Los viriones se anclan a los residuos de ácido siálico presente en los enterocitos con la ayuda de la proteína VP8, la cual es producto del clivaje de VP4 (Trask, McDonald, & Patton, 2012). En el Anexo B se esquematiza el ciclo de replicación de rotavirus.

Después de la entrada en la célula hospedera, las TLPs son transportadas al citoplasma con la ayuda de los endosomas tempranos, los viriones pierden la capa externa debido al bajo nivel de calcio (Ca^{2+}) en el interior del endosoma, produciéndose DLPs (*Double Layered Particles*), las cuáles son partículas transcripcionalmente activas (Arnoldi & Burrone, 2009a; Trask et al., 2012).

Una vez en el citosol, las DLPs comienzan a transcribir los ARN mensajeros virales. Durante la fase temprana se sintetizan los ARN mensajeros que codifican proteínas no estructurales (NSP) fundamentales para el ciclo productivo: NSP1, NSP2 (helicasa viral, fundamental para el inicio de la transcripción), NSP3 (proteína que desplaza a la Poli-A *binding protein* de los mensajeros celulares llevándolos a su degradación, permitiendo el secuestro de la maquinaria traduccional del huésped), NSP4, entre otras. Poco después o simultáneamente, comienzan a expresarse los mARNs para las proteínas estructurales (Sirok & Pera, 2008).

Tras la síntesis de cantidades críticas de algunas proteínas virales, éstas se acumulan en cuerpos de inclusión citoplasmáticos llamados viroplasmos, que aparecen muy temprano (2-3 horas) después de la infección. Las proteínas virales identificadas en estas estructuras son las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP6; y las no estructurales, NSP2 y NSP5, por ello los viroplasmos son considerados los sitios de la replicación del genoma y montaje de la progenie de DLPs (Arnoldi & Burrone, 2009b).

La progenie de DLPs recién formadas en el viroplasma brotan del retículo endoplásmico (RE) con la ayuda de la proteína NSP4 presente en la membrana del RE. Aquí las partículas virales nacientes están transitoriamente envueltas, para posteriormente adquirir la capa externa conformada por las proteínas VP4 (60 trímeros) y VP7 (260 trímeros), convirtiéndose en TLPs plenamente desarrollados (Desselberger, 2014). Los viriones maduros (TLPs) emergen de la célula por diferentes vías, ya sea por lisis en el caso de células no polarizadas (MA104) o, en el caso de células epiteliales (por ejemplo, Caco-2), por una especie de transporte vesicular no convencional que evita el aparato de Golgi y lisosomas, pero que no mata inmediatamente a la célula (Arnoldi & Burrone, 2009b; Desselberger, 2014).

2.2.3 Patogenia

Rotavirus infecta a seres humanos y animales, adhiriéndose a los enterocitos maduros a nivel del intestino delgado; pero también puede extenderse al íleon distal y colon (Sirok & Pera, 2008). La patogénesis de la diarrea causada por rotavirus es multifactorial, es decir, representa la combinación de un número de diferentes efectos del virus sobre el hospedero (Ramig, 2007).

Durante las primeras fases de la enfermedad, la secreción intestinal alterada, la motilidad y la permeabilidad contribuyen al mecanismo fisiopatológico de la diarrea; más tarde en el curso de la enfermedad, puede ocurrir la mala absorción (Franco & Greenberg, 2012). Inicialmente, la entrada del virus causa la destrucción de los enterocitos maduros en el revestimiento epitelial de las vellosidades intestinales, lo que conlleva a la mala absorción en el intestino. Sin embargo, esto último es principalmente atribuido a la enterotoxina NSP4. La diarrea posiblemente sea el resultado, sobre todo, de una menor superficie de absorción y de una disrupción del epitelio (Sirok & Pera, 2008).

La proteína NSP4 media la liberación de Ca^{2+} desde el RE, resultando en el aumento de la concentración Ca^{2+} intracelular, lo que conduce a la alteración de la red del citoesqueleto del enterocito y posteriormente produce la lisis celular. Por otro lado, NSP4 altera la biogénesis y la integridad de las uniones estrechas de los enterocitos que por consiguiente, resulta en el flujo paracelular de agua y electrolitos; además, la infección también altera la bomba de Sodio y Potasio (Na^{+}/K^{+}) que es esencial para la retención de líquido y nutrientes de las células debido a la disminución de la expresión de enzimas digestivas tras la infección con rotavirus (Sirok & Pera, 2008). El sistema nervioso entérico (SNE) el cual recibe las señales de los enterocitos dañados, puede representar una diana para la actividad de NSP4 de manera similar

a la acción de la toxina del cólera en el SNE; sin embargo aún se desconoce si los efectos en el SNE están mediados por otra molécula liberada (Ramig, 2007).

Aunque la replicación puede darse a toda edad, la aparición de los síntomas de la enfermedad depende de la edad del huésped infectado. La cantidad de receptores para el virus a nivel de los enterocitos en el adulto podría disminuir, siendo esto, en parte, responsable del desarrollo de infecciones asintomáticas. Que los lactantes sean los más propensos a desarrollar la enfermedad puede depender, entre otras cosas, de un nivel reducido de proteasas a nivel del intestino lo que favorece la infección, así como de una menor absorción a nivel del colon, de la dieta, de la inmadurez de la respuesta inmune, etc. (Sirok & Pera, 2008).

Inicialmente se pensaba que la infección de Rotavirus se limitaba al intestino, sin embargo, rotavirus causa periodos cortos de viremia en la fase aguda de infección en infantes inmunocompetentes, así como en animales infectados para fines experimentales; no obstante la significancia clínica de la infección sistémica de rotavirus todavía no es totalmente clara (Ramig, 2007).

2.3 Clasificación y genotipos

2.3.1 Genotipos frecuentes

Dentro del género Rotavirus existen siete serogrupos (A-G) diferenciados en base a la proteína VP6, siendo el grupo A el más predominante en los casos de diarrea entre humanos y animales (Chen et al., 2012). Los rotavirus del grupo B han sido identificados esporádicamente en brotes en adultos en China y niños en India; el grupo C se encuentra muy poco asociado a episodios de diarrea en humanos y animales; los grupos D-G solo han sido aislados en animales, principalmente en aves (Franco & Greenberg, 2012).

Los rotavirus humanos exhiben una enorme diversidad debido a que los segmentos que codifican las proteínas G y P se pueden segregar independientemente. Los métodos moleculares son los más empleados para tipificar (genotipificar) infecciones por rotavirus. A la fecha las cepas de rotavirus son clasificadas en 27 genotipos G (glicoproteína) y 35 genotipos P (actividad proteolítica), basados en diferencias en la secuencia de nucleótidos correspondientes a los genes VP7 (G) y VP4 (P) (Matthijnsens et al., 2011). La designación numérica para los serotipos G y genotipos G coincide, por lo cual se escribe un número para nombrar el tipo correspondiente (ej. G1). En cambio, los números asignados para el serotipo P y genotipo P no coinciden. Para evitar confusiones, para designar el serotipo P se emplea una P seguida por un número, mientras que el genotipo P es designado por una P seguida por un número entre corchetes (ej. P[8]) (Hoshino & Kapikian, 2000).

En abril del 2008 se desarrolló un nuevo sistema de clasificación en el que se asigna una codificación al genoma de cada uno de los 11 segmentos de rotavirus. Los genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 son descritos usando las abreviaturas: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax- Nx-Tx-Ex-Hx (Cunliffe, Glass, & Nakagomi, 2014; Matthijnsens et al., 2011). Los rotavirus responsables de la mayoría de infecciones en humanos pertenecen a una de las dos principales constelaciones genéticas (Wa-like y Ds-1-like) o una menor (AU-1), las que son designadas respectivamente como I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 y I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 (Jain, Vashistt, & Changotra, 2014)

A pesar de la amplia diversidad genética y antigénica de rotavirus, un escaso número de tipos han prevalecido globalmente durante las últimas tres décadas (Desselberger, 2014). Los genotipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], y G9P[8] son los más

predominantes, conformando el 95% de las cepas a nivel mundial. Sin embargo, aunque estos cinco genotipos son los más prevalentes, existe variabilidad geográfica y temporal (Usonis, Ivaskeviciene, Desselberger, & Rodrigo, 2012; World Health Organization, 2014). Durante los años 1990 y 2000 al menos 2 nuevas cepas, G9P[8] y G12P[8], emergieron para convertirse en cepas de importancia médica a nivel mundial. De hecho, se infiere que las variantes emergentes G9 y G12 se han extendido por todo el mundo a lo largo de una década para llegar a ser, la 5ta y 6ta cepas de rotavirus más reportadas, respectivamente (Matthijnsens et al., 2010).

La diversidad genética de rotavirus se atribuye por lo menos a cuatro mecanismos: (a) mutación puntual, (b) reordenamiento o recombinación genética, (c) rearreglo y (d) recombinación intragenética. Entre los principales mecanismos se encuentran la mutación puntual, que ocurre con frecuencia debido a la elevada tasa de error de la RV RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*), así como los reordenamientos genéticos (Desselberger, 2014). Entre 2.7 y 5.4% de rotavirus han demostrado reordenamiento, especialmente en los segmentos que codifican las proteínas de la envoltura (VP7 y VP4), lo cual está asociado con la evasión de la inmunidad del hospedero (Simon-Lorriere & Holmes, 2011).

2.3.2 Distribución mundial

En el 2011, el Boletín de Información y Vigilancia de Rotavirus de la Organización Mundial de la Salud (OMS) presentó la distribución de los genotipos de rotavirus en las distintas regiones de la OMS en el mundo (World Health Organization, 2011). La distribución genotipo varía ampliamente entre las distintas regiones en un período de tiempo determinado. G1P[8] fue el genotipo más frecuente en las Américas, (43 %), Europa (33%) y el Pacífico

Occidental (47%), es por lo tanto el genotipo de rotavirus A más frecuentemente detectado nivel mundial. Sin embargo, la prevalencia de G4P[8] (23%) en los países europeos y G3P [8] (25%) en el Pacífico Occidental fue notable. En el Mediterráneo Oriental, el genotipo G2P[4] (41%) fue el más comúnmente identificado, seguido de una proporción sustancial de cepas poco comunes (31%). Los datos de África y del sudeste asiático revelaron una imagen diferente, donde genotipos de rotavirus no comunes, como G2P[6], G3P[6], G12P[8], G12P[6] y G9P [6], fueron predominante. Su contribución al total de las infecciones por rotavirus es muy significativo, es decir, conforman el 35% en la región de África y el 55 % en Asia Suroriental (Jain et al., 2014; World Health Organization, 2011).

2.3.3 Prevalencia y genotipos de rotavirus en el Perú

En el Perú, la infección por rotavirus significó una causa importante de morbilidad y mortalidad en la población infantil, estimándose que 1 de 375 niños muere a causa de la enfermedad, y ocasiona 384000 casos, 64 000 visitas clínicas, 30 000 hospitalizaciones, y 1 600 muertes (Ehrenkranz et al., 2001). Un estudio realizado antes de la introducción de la vacuna en niños <5 años atendidos por episodios de gastroenteritis, detectó rotavirus en 52% de los casos, de los cuales el 95% pertenecía a los serotipos G1-G4 (Cama et al., 1999).

Desde el año 2009, Perú ha implementado dentro del calendario de inmunización infantil la vacuna Rotarix®; sin embargo, hasta la fecha existen pocos reportes de la epidemiología molecular de rotavirus en el Perú tras la introducción de la vacuna. En una publicación reciente, Espejo et al. realizaron un estudio sobre diarrea causada por rotavirus en un hospital regional de Cajamarca, detectando una alta prevalencia de G12 P[6], genotipo

que no es cubierto por la actual vacuna, por lo que los autores sugieren realizar estudios más profundos para determinar los genotipos de rotavirus presentes en el Perú (Espejo et al., 2014). No se han reportado estudios adicionales en el país, sobre la prevalencia de gastroenteritis aguda causada por rotavirus.

2.4 Diagnóstico de rotavirus

Debido a que la sintomatología de rotavirus y la de otros virus enteropatógenos y bacterias es bastante similar, no es posible diagnosticar la enfermedad únicamente por métodos clínicos. Por otro lado, el diagnóstico de laboratorio de rotavirus es bastante sensible, ya que se secretan un gran número de partículas virales (1.012 por gramo de heces) durante la primera fase de la enfermedad (Gastañaduy P., Hall, & Parashar, 2013).

Existen distintas técnicas para detectar al virus y la respuesta inducida por este en el hospedero, incluyendo la microscopía electrónica, PAGE, ensayos de detección del antígeno, RT-PCR y aislamiento del virus (Cunliffe et al., 2014). La microscopía electrónica para visualización de partículas virales es una técnica muy específica y sensible, sin embargo, requiere de personal plenamente capacitado y el uso de equipos costosos, además, es una técnica compleja para ser utilizada como rutina en el diagnóstico (World Health Organization, 2009). La herramienta más empleada para el diagnóstico de rotavirus en deposiciones diarreicas es el inmunoensayo enzimático (EIA o ELISA). El ELISA se aplica con gran frecuencia en los laboratorios de diagnóstico de rutina debido a la sencillez de su uso, la velocidad de los resultados obtenidos y su alta especificidad y sensibilidad (Desselberger, 2014; Gastañaduy P. et al., 2013).

El diagnóstico mediante PCR en tiempo real es altamente sensible y específico en la detección de rotavirus, llegando a considerarse la

prueba *gold standard* para el diagnóstico de rotavirus (Desselberger, 2010). La RT-PCR es también usada para estudios de tipo epidemiológico ya que permite identificar a que tipo pertenece un aislamiento dado, sin recurrir a técnicas de secuenciación o de identificación en base a anticuerpos monoclonales de tipo neutralizantes, las cuales son muy costosas (Sirok & Pera, 2008). Es importante mencionar que debido a los frecuentes cambios genómicos debido a mutaciones puntuales, los cebadores usados para la genotipificación deben ser cambiados periódicamente (Desselberger, 2014).

2.5 Prevención y vacuna

Si bien es cierto que las mejoras en el saneamiento y la higiene tienen un significativo impacto en la reducción de las enfermedades diarreicas y muertes asociadas a agentes bacteriales y parasitarios transmitidos mediante agua o comida contaminada; estas mejoras tienen un impacto menor en infecciones por rotavirus, el cual es mayormente transmitido de persona a persona; por ello la vacunación contra rotavirus es la principal medida para proteger contra la enfermedad (Tate & Parashar, 2011). Observaciones en niños han mostrado que (a) la primera infección con rotavirus ocurre mayormente durante el primer año de vida y es principalmente asintomático, (b) reinfección de rotavirus durante los primeros 2-3 años de vida son frecuentes, pero escasamente acompañadas por gastroenteritis aguda, (c) la protección alcanzada tras repetidas infecciones naturales está asociada con la presencia de anticuerpos anti rotavirus, en el suero y más importante, en el intestino (anticuerpos IgA); por ello, la infección por rotavirus es reconocida prevenible por vacunación (Desselberger, 2014).

La primera generación de vacunas se respaldó el enfoque Jenneriano, en el cual las vacunas fueron desarrolladas usando cepas de rotavirus

animal, que son naturalmente atenuadas para humanos y cuyos serotipos son heterotípicos en comparación con los rotavirus humanos más comunes (Tate & Parashar, 2011). Las cepas de rotavirus animales comparten especificidades antigénicas con las humanas, son capaces de infectar pero no enfermar al hombre y, además, tienen la ventaja de crecer muy eficientemente en cultivo celular, lo que facilita su producción a gran escala (Pérez et al., 2009). Se demostró la eficacia de la primera generación de vacunas mediante ensayos clínicos realizados en Finlandia, pero poca eficacia en países en vías de desarrollo (Georges-Courbot et al., 1991; Tate & Parashar, 2011).

RotaShield, desarrollada en los Estados Unidos en 1998, fue una vacuna oral tetravalente basada en una cepa recombinante de humano y una cepa del simio Rhesus. Pese a su alta eficacia (91%) contra la diarrea severa asociada a rotavirus, fue retirada del mercado debido a reportes de invaginación intestinal como un efecto infrecuente pero serio asociado con la vacuna. Esto creó la necesidad de desarrollar vacunas nuevas y más seguras para ofrecer protección contra rotavirus (Angel, Franco, & Greenberg, 2007).

Casi una década después del lanzamiento de RotaShield, dos vacunas atenuadas, de administración oral fueron licenciadas en el 2006, siendo disponibles para su comercialización: Rotarix® (RV1; GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium), compuesta por la cepa atenuada G1P[8] y Rotateq® (RV5; Merck & Co., PA, USA) una vacuna pentavalente recombinante que contiene G1, G2, G3, G4 y P[8]. Ambas vacunas fueron evaluadas en más de 70 000 infantes antes de su licencia, demostrando su seguridad y alta eficacia (>85%) contra la gastroenteritis severa causada por rotavirus (Perez Schael et al., 2012); por ello ambas vacunas han sido recomendadas por la OMS para inmunizar a infantes, especialmente en aquellos países con elevadas tasas de mortalidad infantil en niños menores a 5 años por gastroenteritis aguda (Lepage & Vergison, 2012). Para finales del

2013, ambas vacunas han sido implementadas en más de 50 países a nivel mundial (Anexo C) (Tate & Parashar, 2014).

Los esquemas de vacunación difieren entre ambas vacunas; para la RV5 se recomienda tres dosis orales a los 2, 4 y 6 meses de vida, la primera dosis podría ser administrada entre 6 a 12 semanas de vida y posteriormente dosis a intervalos de 4-10 semanas. La RV1, en cambio, es suministrada en dos dosis: la primera a las 6-14 semanas (preferiblemente antes de la 6 semana) y la segunda a las 14-24 semanas, con intervalo mínimo de 4 semanas (Peter et al., 2009).

Se estima que en el 2010, aproximadamente 7 millones de niños (66% del total de niños) de América Latina y El Caribe fueron inmunizados contra rotavirus, los cuales recibieron dosis completas de vacuna para rotavirus (Centers for Disease Control and Prevention, 2011). Esto ha tenido una repercusión notable sobre los casos de rotavirus. Estudios realizados en Brasil y México demuestran que la vacunación previno casi 140 000 hospitalizaciones y 13 000 muertes asociadas a diarrea aguda en niños menores de 5 años (Centers for Disease Control and Prevention, 2011).

Una revisión sobre los genotipos de rotavirus prevalentes tras seis años de implementación de la vacuna concluye que en los países que emplean RV1 y RV5 no existe un patrón consistente que demuestre una presión selectiva relacionada a la introducción de la vacuna, siendo que los seis genotipos más frecuentes entre las infecciones por rotavirus continúan siendo de importancia médica. Sin embargo, aún continúa abierta la interrogante sobre si la evolución de las cepas a largo plazo afectará la efectividad de la vacuna, especialmente ante tipos particulares o mutantes con una nueva constelación genética (Dóro et al., 2014). Ante ello, es importante el monitoreo de la efectividad de la vacuna ante nuevas cepas. Asimismo la vigilancia permitirá identificar la evolución y epidemiología de las cepas circulantes en la población ante la universalización de la vacuna. Por

lo tanto, existe la necesidad de realizar estudios robustos de vigilancia para mejorar la comprensión sobre la correlación entre vacunación y la diversidad de rotavirus, así como monitorear la prevalencia de cepas en regiones específicas a fin de estar preparados ante posibles epidemias (Jain et al., 2014).

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño metodológico

El presente estudio es de tipo descriptivo transversal, debido a que se determinarán los genotipos de rotavirus en las muestras provenientes de una población infantil con gastroenteritis aguda que acudieron a la Unidad de Rehidratación Oral del Instituto Nacional de Salud del Niño. La recolección de las muestras biológicas fue realizada mediante muestreo no probabilístico según los criterios señalados en la sección 3.2. Los resultados se analizaron con estadística descriptiva, permitiendo conocer las características de la muestra.

3.2 Criterios de inclusión y exclusión

Las muestras provinieron de pacientes con un cuadro de gastroenteritis aguda con episodios de diarrea. Se definió diarrea como la deposición, tres o más veces al día, de heces sueltas o líquidas. Se colectaron datos como sexo, edad y estatus de vacunación para la vacuna Rotarix. Para proteger la identidad de los pacientes se asignó un código a cada participante, el cual fue ingresado a una base de datos. Las muestras de heces fueron recolectadas durante el periodo de Octubre del 2013 a Octubre del 2014.

Criterios de inclusión:

Infantes con episodios de diarrea atendidos en la unidad de rehidratación.

Infantes de entre cuatro semanas y cinco años de edad.

Criterios de exclusión:

Infantes sin episodios de diarrea.

Infantes por debajo o por encima del intervalo asignado a la edad.

Pacientes inmunosuprimidos o con enfermedades crónicas.

3.3 Operacionalización de variables

Variables Independientes:

Gastroenteritis generada por Rotavirus.

Estatus de vacunación con Rotarix.

Variable Dependiente:

- Genotipos VP7 y VP4 de Rotavirus.

3.4 Procedimiento

3.4.1 Preparación de las muestras fecales

Las muestras fueron preparadas en una dilución 1/10 en PBS pH 7.2 con el siguiente procedimiento:

Muestras formadas (sólidas): 100mg de heces + 900µl PBS pH 7.2

Muestras no formadas (líquidas): 100µl de heces + 900µl PBS pH 7.2

La dilución fue mezclada empelando un vortex hasta obtener una suspensión uniforme. Las muestras diluidas fueron centrifugadas a 4,000 rpm por 10 minutos. Se empleó el sobrenadante de esta suspensión para la extracción de ARN.

3.4.2 Extracción del ARN viral

El ARN viral de doble cadena se extrajo con el kit de extracción QIAmp Viral RNA de Qiagen (Catalog #52904/6), siguiendo el protocolo

establecido por el fabricante. Para ello se emplearon 140 µl del sobrenadante de la suspensión de materia fecal. Las muestras de ARN se almacenaron a -70°C hasta su uso en la genotipificación de los segmentos VP7 y VP4.

3.4.3 Detección de Rotavirus mediante qRT-PCR

La detección de rotavirus se obtuvo mediante qRT-PCR, según el protocolo elaborado por laboratorio de Vigilancia de Rotavirus-CDC (2010) (Centers for Disease Control and Prevention, 2010a). Para amplificar la región de la proteína no estructural 3 (NSP3), una región altamente conservada del grupo A de rotavirus, se emplearon los cebadores *forward* 5'-ACC ATC TWC ACR TRA CCC TC-3' (963-982) y *reverse* 5'-GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA-3' (1034-1053); la sonda empleada fue 5'-ATG AGC ACA ATA GTTAAA AGC TAA CAC TGT CAA-3' (984-1026) (Anexo D).

Descripción del procedimiento:

Se preparó un pre mix con los cebadores, añadiendo 2 µl por reacción de 20 µM NVP3- FDeg y 2 µl por reacción de NVP3-R1. Posteriormente se añadieron 2 µl de ARN a la mezcla de cebadores. La mezcla se desnaturalizó en un termociclador a 97°C por 5 minutos.

Se preparó el master mix usando el Kit QuantiTect® Probe RT-PCR

(QIAGEN Catalog # 204443). Posteriormente, se agregaron los 6µl del mix

ARN y cebadores a los tubos con el master mix. Se colocaron los tubos en el termociclador (Lighcycle™ 96) y se realizó el siguiente perfil de ciclos: 30 minutos a 50°C, 15 minutos a 95°C, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos y 1 minutos a 60°C.

3.4.4 Genotipificación de rotavirus

La genotipificación se realizó mediante una PCR semi anidado. En primer lugar, se realizó la RT-PCR de las muestras positivas a qPCR para amplificar las regiones externas de los segmentos VP4 y VP7. Se empleó el Kit OneStep RT-PCR de QIAGEN®, el cual contiene Sensiscript® y Omniscript®, enzimas que participan en la transcripción reversa y ADN Polimerasa HotStarTaq® que realiza la PCR inmediatamente después de la retrotranscripción. La RT-PCR se realizó usando como molde el ARN doble cadena viral según el protocolo establecido por CDC, 2010 (Centers for Disease Control and Prevention, 2010b, 2010c).

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron: para VP7 *forward* 5'-TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT AT ' (37-59) y *reverse* 5'- AAC TTG CCA CCA TYT YTT CC-3' (914-932); para VP4 *forward* 5'- TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A-3' (11-32) y *reverse* 5'-ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC-3' (868-887).

Se empleó el producto obtenido en la reacción descrita anteriormente para una segunda amplificación de los genes VP7 y VP4. Se tomaron como referencia las condiciones y perfiles térmicos descritos en el manual de la CDC, 2010 (Anexo E).

Los productos de amplificación para VP7 y VP4 se corrieron en un gel de agarosa (Invitrogen) al 3% en buffer de TAE conteniendo 3 mg/L de bromuro de etidio a 100 voltios por una hora. Los patrones resultantes fueron comparados con el patrón establecido por la CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2010b, 2010c) (Anexo F).

3.4.5 Genotipificación mediante secuenciamiento y análisis filogenético

Se realizó el secuenciamiento de aquellas muestras que no fueron tipificables por PCR semi-anidada; para este caso se procedió con el protocolo de RT-PCR descrito anteriormente, usando doble cantidad de

extracto de ARN con volumen final de 50µl. Las muestras se enviaron a Macrogen, USA para determinar su secuencia. Para el análisis de las secuencias obtenidas se emplearon las plataformas UGene y BLAST.

Se realizó el análisis filogenético usando el método de *Neighbor-Joining* con 2000 *bootstrap*. Para ello las secuencias del estudio fueron comparadas con otras secuencias obtenidas de la base de GeneBank.

3.4.6 Procesamiento de la información

La data recolectada se almacenó en una base de datos en Excel. Se realizó la descripción, análisis y correlación de los resultados obtenidos. Se determinó la frecuencia en porcentajes de los casos positivos a rotavirus. Se empleará la prueba de Chi cuadrado para determinar la dependencia entre las variables analizadas. El análisis estadístico se empleó el software SPSS Statics.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

Desde Octubre del 2013 hasta Octubre del 2014 se analizaron un total de 448 muestras para la detección de rotavirus mediante qRT-PCR. Un total de 201 muestras fueron obtenidas de niñas (45%) y 247 fueron recolectadas de niños. La mayoría de los niños incluidos en el estudio recibieron la dosis completa de la vacuna Rotarix (87.72%; n=393), el 5.13% (n=23) solo recibió la primera dosis. Además, 16 niños no recibieron vacuna (3.57%), mientras que 16 (3.57%) no proporcionaron información referente a la vacuna. El mayor número de participantes estuvo entre los 12 y 23 meses de edad (46%), mientras que el mayor número de casos se registró en los meses de Enero (13%), Febrero (16%) y Marzo (14%).

Un total de 45 muestras (10%) tuvieron resultados positivos mediante el test de qRT-PCR. El 62.2% de los casos positivos se presentó entre niños, mientras que el 37.78% de niñas obtuvo resultados positivos; sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Chi cuadrado 1.016; p= 0.313; ver Tabla 1 y Fig. 1).

Tabla 1. Distribución de frecuencia de casos positivos y negativos a rotavirus según sexo

	F		M			
ROTAVIRUS	n	%	n	%	Total general	%
RV Negativo	184	45,66	219	54,34	403	90,0
RV Positivo	17	37,78	28	62,22	45	10,0
Total	201	44,87	247	55,13	448	100

Chi cuadrado=1.016

g.l.=1 p=0.313 No significativo

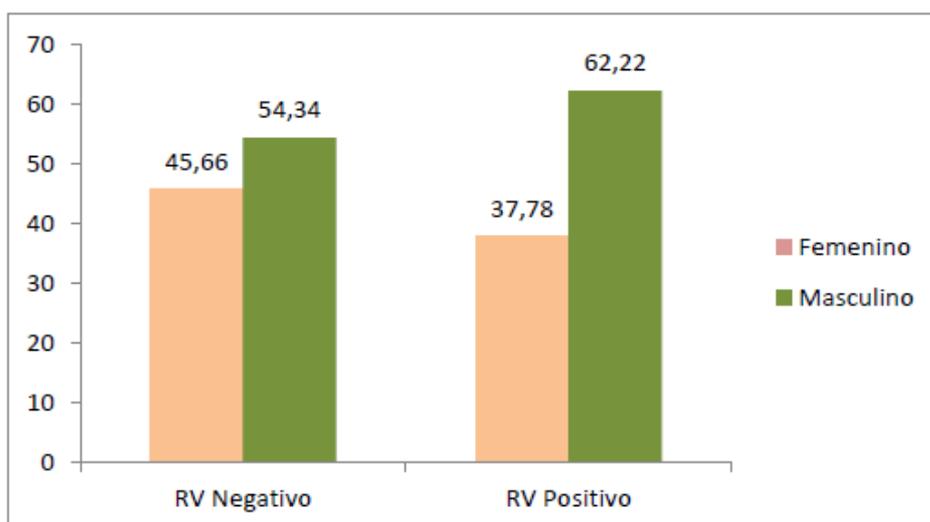


Figura 1.Prevalencia de rotavirus de acuerdo al sexo de la población analizada.

El rango de edad con mayor porcentaje de casos de gastroenteritis aguda fue de 12 a 23 meses (46%), siendo mayor el número de casos acumulados en niños menores de 24 meses (n=26; 57,78%). En el estudio, el grupo con mayor porcentaje de casos positivos a rotavirus se encontró entre los 24 y 35 meses (19%; 15/80) (Tabla 2, Fig. 2).

Tabla 2. Distribución de frecuencia de casos positivos y negativos a rotavirus según edad

EDAD (Meses)	Diagnóstico				Total	
	RV Negativo		RV Positivo			
	Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
1-5	7	88%	1	13%	8	2%
6-11	88	94%	6	6%	94	21%
12-23	185	91%	19	9%	204	46%
24-35	65	81%	15	19%	80	18%
36-59	58	94%	4	6%	62	14%
Total	403	90%	45	10%	448	100%

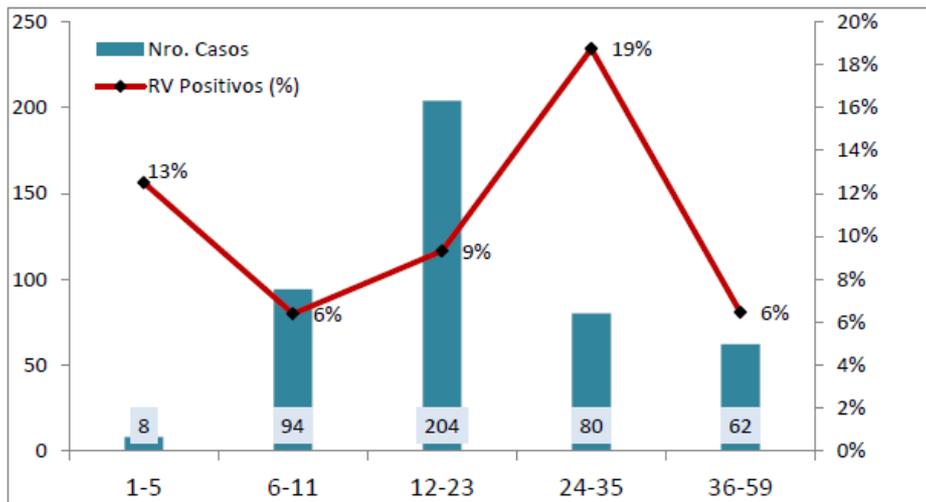


Figura 2. Distribución de frecuencia de casos positivos y negativos a rotavirus según edad

Durante el estudio, hubo un mayor número de casos de gastroenteritis durante los meses de Enero, Febrero y Marzo (13%, 16% y 14%, respectivamente) Tabla 3. En el mes de Octubre del 2013, se presentó un solo caso, el cual dio resultado positivo a Rotavirus. El mayor porcentaje de casos positivos para rotavirus fue detectado en el mes de Setiembre (33%, 11/33) y Octubre del 2014 (35%, 14/40).

Tabla 3. Distribución de frecuencia de casos positivos y negativos a rotavirus según el mes de recolección.

	ROTAVIRUS					
	Negativo		Positivo		Total	
	Fr	%	Fr	%	Fr	%
oct-13	0	0%	1	100%	1	0%
nov-13	9	75%	3	25%	12	3%
dic-13	12	75%	4	25%	16	4%
ene-14	59	100%	0	0%	59	13%
feb-14	73	100%	0	0%	73	16%
mar-14	62	98%	1	2%	63	14%
abr-14	29	97%	1	3%	30	7%
may-14	23	100%	0	0%	23	5%
jun-14	35	100%	0	0%	35	8%
jul-14	26	90%	3	10%	29	6%
ago-14	27	79%	7	21%	34	8%
set-14	22	67%	11	33%	33	7%
oct-14	26	65%	14	35%	40	9%
Total general	403	90%	45	10%	448	100%

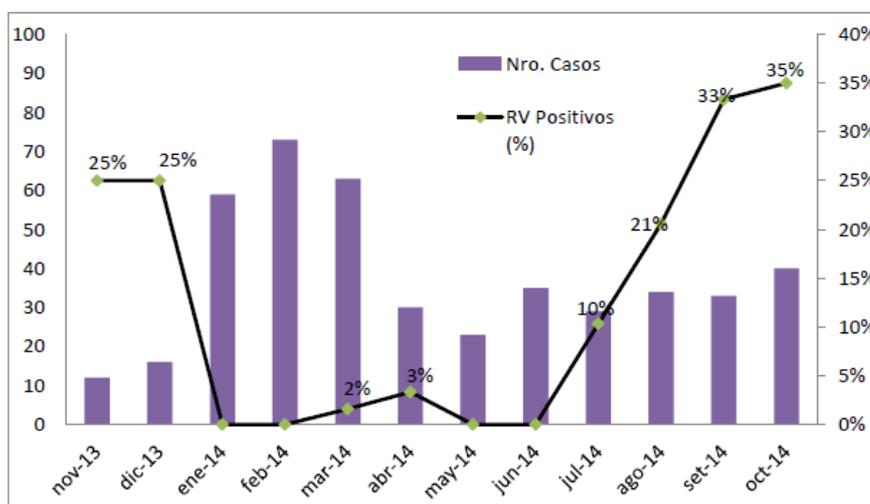


Figura 3. Distribución de frecuencia de casos positivos y negativos a rotavirus según el mes de recolección.

Se obtuvieron los datos de 432 casos sobre el estatus de vacunación para Rotarix, de los cuales el 87.72% había recibido las dos dosis de la vacuna, mientras que el 5.13% recibió por lo menos una dosis y el 3.57% no recibió vacunación para rotavirus. El test de Chi cuadrado (0.891; p=0.640) muestra que no hubo diferencia significativa entre las variables. (Tabla 4).

Tabla 4. Casos positivos y negativos a rotavirus vs. el estatus de vacunación del paciente.

Vacuna	ROTA PCR				Total	Total (%)
	RV Negativos		RV Positivos			
	Fr	%	Fr	%		
Ninguna						
Vacuna Dosis completa	14	87.50%	2	12.50%	16	3.57%
Dosis incompleta	352	89.57%	41	10.43%	393	87.72%
Total general	22	95.65%	1	4.35%	23	5.13%
	388	89.81%	44	10.19%	432	96.43%

Chi cuadrado=0.891 g.l.=2 p=0.640 No significativo

Se realizó la genotipificación para los genes VP4 y VP7 mediante RT-PCR semianidada de 44 de las 45 muestras positivas (Fig. 4). En total, 8 muestras (20%) fueron no tipificables para G y 4 (10%) fueron no tipificables para P.

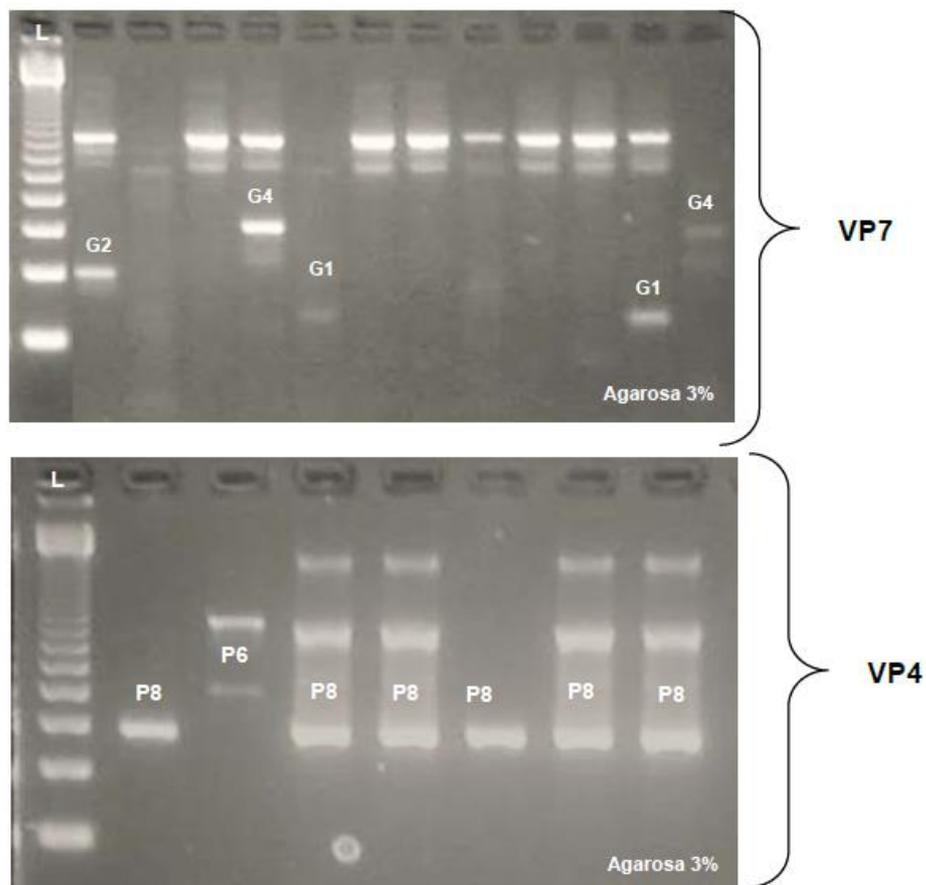
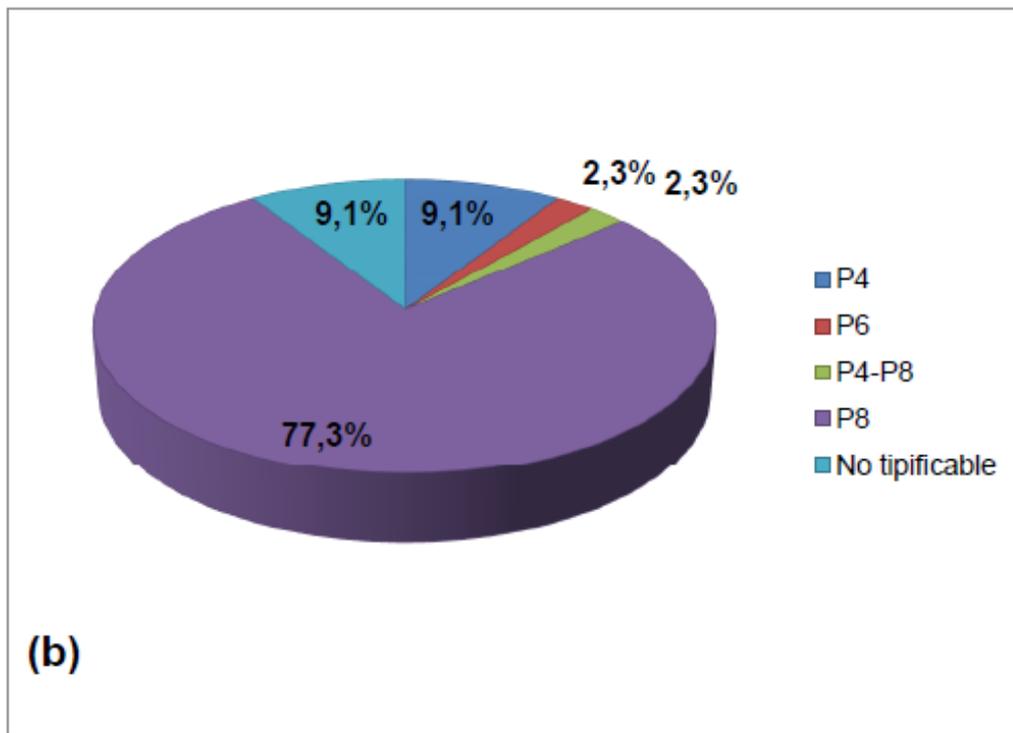
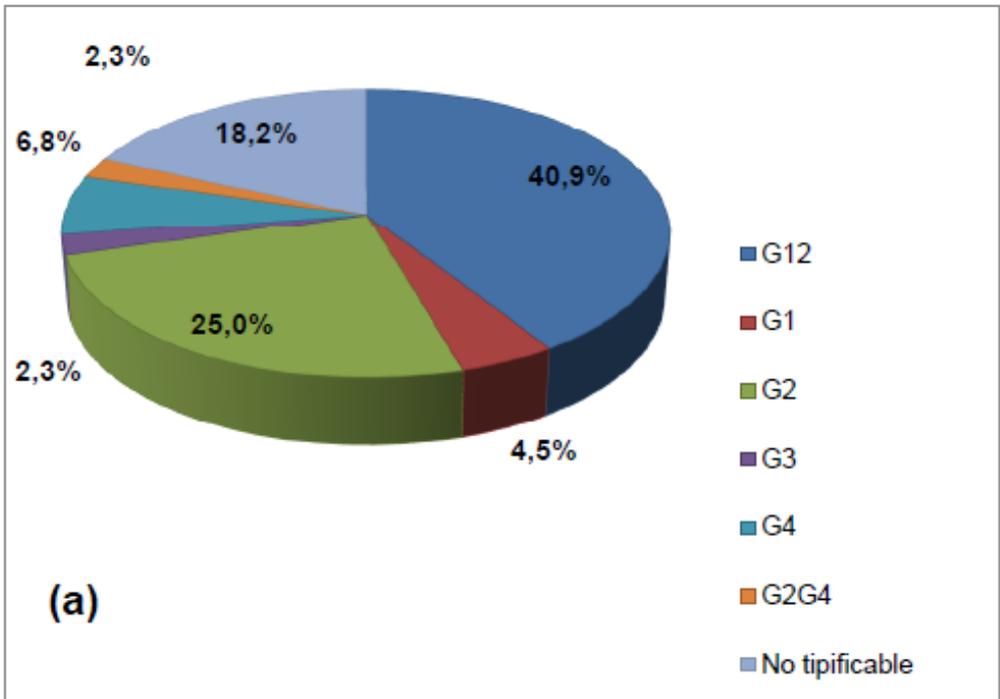


Figura 4. Productos de amplificación de los genes VP7 (G) y VP4 (P). L: 123 bp ladder.

Se determinó que G12 (40.9%; 18/44) fue el genotipo G más frecuente durante el estudio, seguido por G2 (25%, 11/44) y G4 (6,8%; 3/44). En el caso de P, el genotipo P[8] fue el más frecuente (77.3%; 34/44), seguido de P[4] (9%, 4/44). Se detectó un solo caso con el genotipo P[6]. Se identificaron dos casos de coinfección, uno para G (G2-G4) y uno para P (P4-P8)(ver Fig. 5a y 5b). La combinación G/P más dominante fue G12P[8] (54.5%; 18/44), seguido por G2P[8] (15.2%) y G2P[4] (12.1%). Las combinación G4P[8] y G1P[8] representaron el 9,1% (3/44) y 6,1% (2/44) respectivamente. Se detectó un solo caso de G3P[6] durante el estudio (Fig.5c).



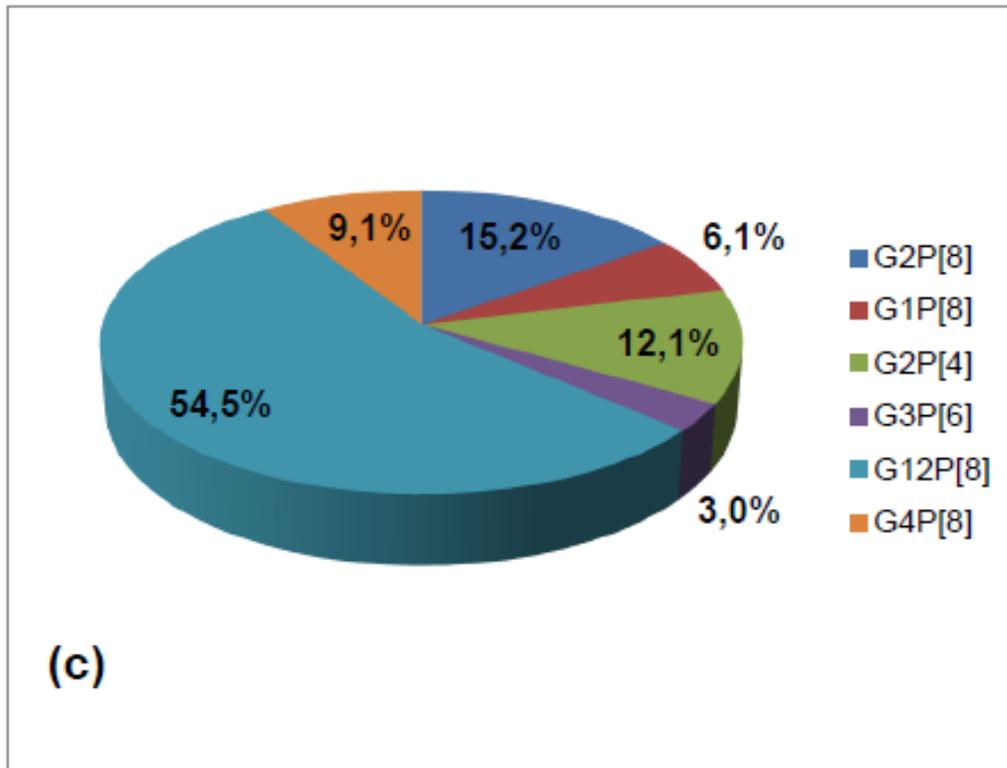


Figura 5. Frecuencias de los genotipos G y P identificados en el estudio.

(a) Genotipos VP7 (G); (b) Genotipos VP4 (P); (c) frecuencia de las combinaciones G-P.

Inicialmente 18 muestras fueron no tipificables mediante la RT-PCR semianidada, por lo que se realizó el secuenciamiento del gen VP7. Se determinó mediante BLAST que todas las muestras pertenecían al genotipo G12. El análisis filogenético de las secuencias demostró que pertenecen al linaje III (G12.III) (Fig. 6).

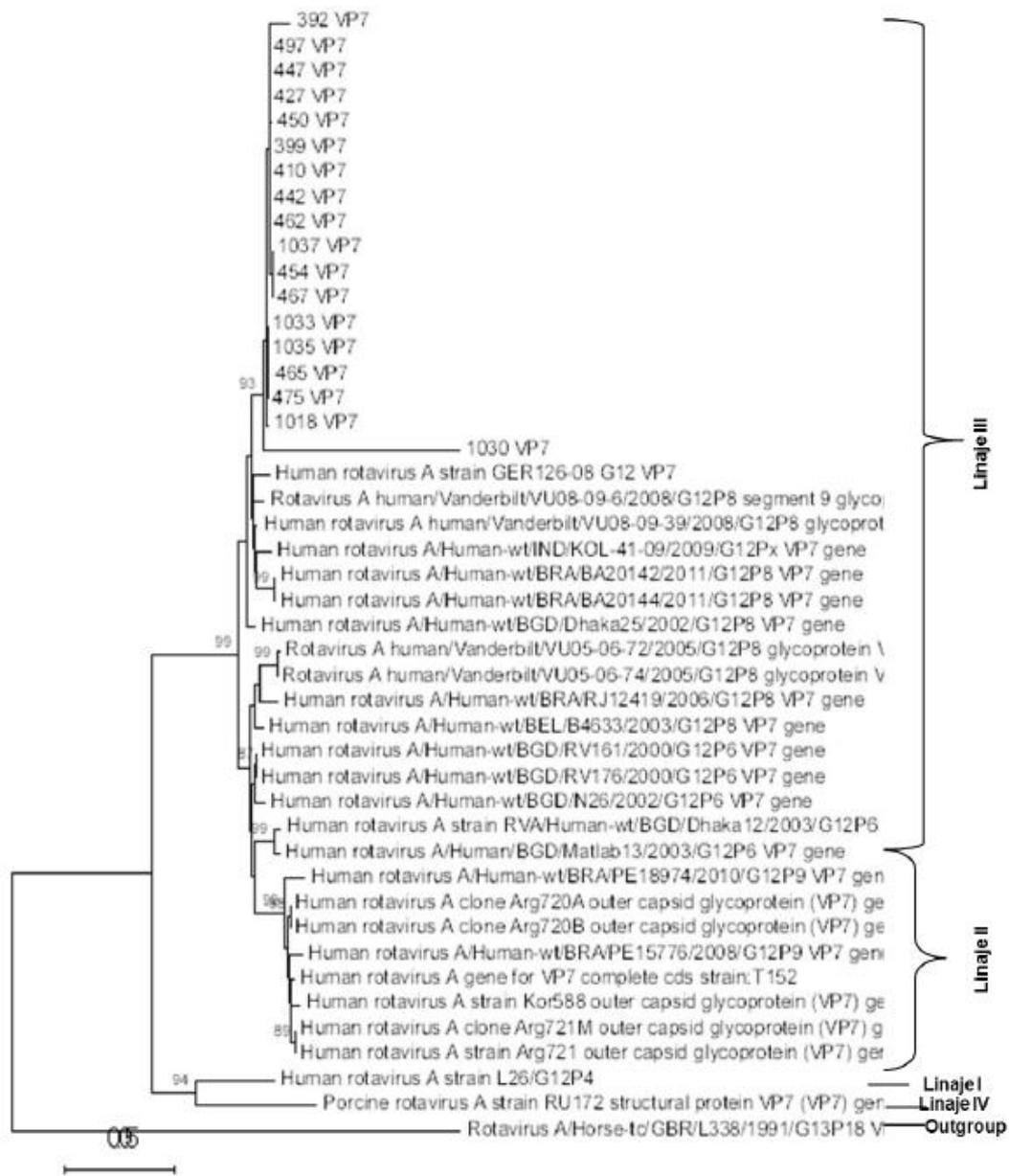


Figura 6. Análisis filogenético de las 18 secuencias G12 obtenidas en el estudio. Se muestran los valores *bootstrap* por encima de 80.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Rotavirus es considerado una de las causas más importantes de diarrea en todo el mundo. Desde el año 2009 el Perú ha implementado la vacuna monovalente Rotarix para prevenir las infecciones con rotavirus. Sin embargo, existen pocos estudios orientados a determinar cuál es la diversidad de los genotipos circulantes en la población vulnerable tras la introducción de la vacuna.

El presente estudio identificó los genotipos G y P de rotavirus presentes en una población de niños <5 años con gastroenteritis aguda atendidos en un hospital de la ciudad de Lima empleando el *real time* RT-PCR (q RT-PCR) para la detección. La prueba de PCR es una prueba simple y rápida, entre sus ventajas se incluye su elevada sensibilidad y bajo riesgo de contaminación cruzada, por lo cual es una herramienta muy útil para la detección e investigación de rotavirus (Pang et al., 2004). La investigación empleó la prueba de qRT-PCR, siendo el primer estudio de prevalencia de rotavirus en el Perú usando este método de detección.

Una estimación de la prevalencia de rotavirus entre niños <5 años en Lima, Perú, determinó que rotavirus fue el causante del 32% de los casos (Ehrenkranz et al., 2001). En el Perú, rotavirus representa el 30% de las muertes por diarrea, y 4% del total de defunciones (Ministerio de Salud, 2009). Los resultados obtenidos en el reporte de vigilancia epidemiológica realizado en el país en el periodo 2004-2006, demostraron que rotavirus fue el responsable del 30.8% de los casos pediátricos de gastroenteritis aguda en pacientes <5 años atendidos en un hospital de la ciudad de Lima (Luna Pineda, 2008). Sin embargo, ambos estudios han sido realizados en años anteriores a la introducción de la vacuna. En el presente trabajo el número total de niños menores de 5 años que presentaron resultado

positivo durante los meses de Octubre del 2013 a Octubre del 2014 representó el 10% del total de los casos analizados, porcentaje menor al reportado en estudios anteriores.

En cuanto a la distribución por sexo, se encontró que el 62.2% de los casos positivos se presentó en niños, mientras que el 37.78% en niñas; datos similares con otros reportados en el Perú, en los que existe un mayor número de casos positivos a rotavirus entre hombres (Mezarina, García, Ramirez, Asmat, & Rojas, 2012). Sin embargo, en el presente estudio no existe una dependencia entre las variables sexo y enfermedad diarreica por rotavirus.

Al igual que los informes de la organización Panamericana de la Salud para países en desarrollo, el mayor número de casos se produjo en los menores de 24 meses de edad. Esto se atribuye a que el 65% a 80% de los niños tienen anticuerpos contra el rotavirus a la edad de 12 meses y 95% a la edad de 24 meses. Por este motivo, la incidencia de la enfermedad sintomática disminuye rápidamente después de los 24 meses de edad, y las infecciones repetidas pueden ser asintomáticas o acompañarse de sintomatología leve (Organización Panamericana de la Salud, 2007). Estos resultados son similares a otros estudios realizados en el Perú (Mezarina et al., 2012).

En cuanto a la estacionalidad del virus, en países de clima templado las infecciones por rotavirus predominan en invierno, mientras que en los países tropicales los casos suelen ocurrir durante todo el año, aunque picos más altos en invierno (Organización Panamericana de la Salud, 2007). En este estudio los picos más altos de rotavirus ocurrieron en los meses correspondientes a invierno-primavera, temporada fría y húmeda en la ciudad de Lima.

Un reciente estudio reportó que en Latinoamérica los genotipos G más detectados son G1 (34.2%), seguido por G9 (14.6%) y G2 (14.4%) (Linhares et al., 2011). En el caso de P, el genotipo P[8]

presenta mayor frecuencia (56.2%), seguido por P[4] (22.1%) y P[1] (5,4%). La combinación más frecuente fue G1P[8](17.9%), G2P[4](9.1%) y G9P[8] (8.08%) (Linhares et al., 2011). El mismo estudio, basado en la revisión de 12 artículos, reportó que en Perú la prevalencia de G1 fue de 61.3%

(Linhares et al., 2011). Sin embargo ninguno de estos artículos fue diseñado para determinar la prevalencia de los genotipos circulantes, y solo dos artículos de 1996 describieron la prevalencia de G1, G2, G3 y G4 (Espejo et al., 2014). El reporte de vigilancia centinela del Ministerio de Salud identificó entre los genotipos de mayor prevalencia G1P[8] (29%), G2P[8] (12%), G1P[6] (11%) y G2P[4] (8%) (Suarez et al., 2012). Por otro lado, un estudio realizado en Cajamarca durante el periodo 2010-2012, encontró que los genotipos más frecuentes fueron G9 (35.7%; 15/42) y G12 (33.3%; 14/42), siendo la combinación G12P[6] (23.8%; 10/42) la más frecuente (Espejo et al., 2014).

Los genotipos más frecuentes identificados en este estudio fueron G12 (40.9%; 18/44), seguido por G2 (25%, 11/44) y G4 (6.8%;3/44). No se reportó ningún caso asociado al genotipo G9. En el caso de P, el genotipo P[8] fue el más frecuente (7.3%%; 34/44), seguido de P[4] (9%, 4/44). La combinación G/P más dominante fue G12P[8] (54.5%; 18/44), seguido por G2P[8](15.2%) y G2P[4] (12.1%). Las combinaciones G4P[8] y G1P[8] representaron el 9,1% y 6,1% respectivamente. Se detectó un solo caso de G3P[6] durante el estudio.

Se ha señalado al genotipo G12, junto al genotipo G9, como un genotipo emergente debido a su creciente incidencia en los casos clínicos, pudiendo llegar a ser un genotipo predominante en el futuro (Matthijnssens et al., 2010). A pesar de que G12 ha recibido mayor atención en los últimos años, se estima que esta cepa pudo haberse encontrado en hospederos humanos o animales desde 1950 (Matthijnssens et al., 2010). Desde 1998 el genotipo G12 ha sido

aislado en Asia, Europa, América del Sur y Norteamérica, sugiriendo su expansión mundial (Rahman et al., 2007). Dentro de los cuatro linajes VP7 de cepas G12, el linaje III corresponde a los tipos G12[P6] y G12[P8], rotavirus humanos que actualmente circulan y han sido capaces de propagarse alrededor del mundo (Soares et al., 2012). El genotipo [P8] es el tipo más comúnmente asociado con G12 en Europa, mostrando mayor frecuencia que los genotipos [P6] y [P4](Cilla et al., 2013). En América

Latina, se han reportado cepas G12P[9] y G12P[6]en Brasil (Pietruchinski et al., 2006; Soares et al., 2012), así como G12P[8] y G12P[6] en Argentina (Castello et al., 2009; Stupka, Degiuseppe, & Parra, 2012) demostrando la presencia del tipo G12 en esta parte del continente.

Los análisis moleculares demuestran que G12 linaje III posee la constelación genómica Wa-like, y se cree que esto juega un rol importante en la propagación de rotavirus G12, su virulencia y replicación eficiente (Freeman et al., 2009; Mijatovic-Rustempasic et al., 2014). No obstante, se estima que la vacuna Rotateq protege contra el genotipo emergente, G12P[8] (83%), no habiéndose determinado la eficacia para la vacuna Rotarix (Payne et al., 2013). El presente reporte encontró rotavirus G12[P8] en el 54.5% de los casos positivos, siendo su primera detección en el mes de Agosto del 2014. El análisis filogenético muestra su pertenencia la linaje III. Este constituye el primer reporte de G12.III en el Perú.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Rotavirus estuvo presente en el 10% de las muestras analizadas mediante el test de qRT-PCR. El 62.2% de los casos positivos se presentó entre niños, mientras que el 37.78% de niñas obtuvo resultados positivos; no existiendo diferencia significativa.

El mayor número de casos positivos de rotavirus se presentó en los niños <24 meses (57,78%) involucrados en este estudio.

En los meses de Setiembre y Octubre se presentó el mayor número de casos positivos a rotavirus (33% y 35% respectivamente).

Los genotipos más frecuentes identificados en este estudio fueron G12 (40.9%), seguido por G2 (25%) y G4 (6.8%). En el caso de P, el genotipo P[8] fue el más frecuente (75%), seguido de P[4] (11.4%).

La combinación G/P más dominante fue G12P[8] (54.5%), G2P[4] (12.1%) y G2P[8] (15.2%) fueron el segundo grupo más prevalente. Las combinación G4P[8] y G1P[8] representaron el 9,1% y 6,1% respectivamente. Se detectó un solo caso de G3P[6].

En el presente estudio, se reporta por primera vez en el Perú la presencia del genotipo G12P[8] perteneciente al linaje III.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Reforzar el programa de vigilancia epidemiológica para genotipos de rotavirus en el Perú, de manera que pueda determinarse la dinámica y cambios en los genotipos circulantes y evaluar los posibles efectos en el programa de vacunación.

Implementar cebadores para G12 en los procedimientos de genotipificación, ya que G12 se perfila como el sexto genotipo más prevalente a nivel mundial.

Caracterizar el genoma completo de las cepas G12 circulantes, de manera que se pueda comprender su evolución y monitorear su posible impacto en la eficacia de la vacuna.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahs, J. W., Tao, W., Löfgren, J., & Forsberg, B. C. (2010). Diarrheal Diseases in Low- and Middle-Income Countries: Incidence, Prevention and Management. *The Open Infectious Diseases Journal*, 4(1), 113–124. doi:10.2174/1874279301004010113
- Angel, J., Franco, M., & Greenberg, H. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(7), 529–39. doi:10.1038/nrmicro1692
- Arnoldi, F., & Burrone, O. R. (2009a). Role of viral nonstructural proteins in rotavirus replication. *Future Virology*, 4(2), 185–196. doi:10.2217/17460794.4.2.185
- Arnoldi, F., & Burrone, O. R. (2009b). Role of viral nonstructural proteins in rotavirus replication. *Future Virology*, 4(2), 185–196. doi:10.2217/17460794.4.2.185
- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., & Ruck, B. J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, 2(7841), 1281–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4127639>
- Cama, R. I., Parashar, U. D., Taylor, D. N., Hickey, T., Figueroa, D., Ortega, Y. R., ... Glass, R. I. (1999). Enteropathogens and other factors associated with severe disease in children with acute watery diarrhea in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(5), 1139–44. doi:10.1086/314701
- Castello, A. A., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Jiang, B., Kang, J. O., Glass, R. I., ... Gentsch, J. R. (2009). Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. *Journal of Medical Virology*, 81(2), 371–81. doi:10.1002/jmv.21384
- Centers for Disease Control and Prevention. (2010a). Detection of Rotavirus by Real-Time RT-PCR on the Stratagene MX3005P Instrument.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2010b). Rotavirus VP4 (P) Genotyping by two amplification reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Centers for Disease Control and Prevention. (2010c). Rotavirus VP7 (G) Genotyping by two amplification reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Centers for Disease Control and Prevention. (2011). Progress in the introduction of rotavirus vaccine--Latin America and the Caribbean, 2006-2010. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60(47), 1611-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22129995>

Chen, S.-C., Tan, L.-B., Huang, L.-M., & Chen, K.-T. (2012). Rotavirus infection and the current status of rotavirus vaccines. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, 111(4), 183-93. doi:10.1016/j.jfma.2011.09.024

Cilla, G., Montes, M., Gomariz, M., Alkorta, M., Iturzaeta, a, Perez-Yarza, E. G., & Perez-Trallero, E. (2013). Rotavirus genotypes in children in the Basque Country (North of Spain): rapid and intense emergence of the G12[P8] genotype. *Epidemiology and Infection*, 141(4), 868-74. doi:10.1017/S0950268812001306

Cunliffe, N. A., Glass, R. I., & Nakagomi, O. (2014). *Manson's Tropical Infectious Diseases. Manson's Tropical Diseases* (Twenty Thi, pp. 207-214.e3). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-7020-5101-2.00019-4

De Oliveira, L., Sanwogou, J., M., Ruiz-Matus, C., Tambini, G., Wang, S. A., & Agocs, M. (2011). *Progress in the introduction of rotavirus vaccine - latin america and the caribbean, 2006-2010*.

Desselberger, U. (2010). Rotaviruses: from basic research to disease prevention by vaccination. *Future Virology*, 4, 11-16.

Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *VirusResearch*, 190, 7596. doi:10.1016/j.virusres.2014.06.016

Dóro, R., László, B., Martella, V., Leshem, E., Gentsch, J., Parashar, U., & Bányai, K. (2014). Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 28, 446-61. doi:10.1016/j.meegid.2014.08.017

Ehrenkranz, P., Lanata, C., Penny, M., Salazar-Lindo, E., & Glass, R. (2001). Rotavirus diarrhea disease burden in Peru: the need for a rotavirus vaccine

and its potential cost savings. *Revista Panamericana de Salud Pública = Pan American Journal of Public Health*, 10(4), 240–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11715170>

Espejo, P. W., Peralta, F. O., Pachares, H. C., del Valle, L. J., Tapia, A. C., Mayra, J. B., ... Mendoza, J. D. V. (2014). Diarrhoea caused by rotavirus in a regional Peruvian hospital: determination of circulating genotypes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 108(7), 425–30. doi:10.1093/trstmh/tru059

Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (2012). *Goldman's Cecil Medicine*. *Goldman's Cecil Medicine*, 24/e (Twenty Fou, pp. 2144–2147). Elsevier. doi:10.1016/B978-1-4377-1604-7.00388-2

Freeman, M. M., Kerin, T., Hull, J., Teel, E., Esona, M., Parashar, U., ...

Gentsch, J. R. (2009). Phylogenetic analysis of novel G12 rotaviruses in the United States: A molecular search for the origin of a new strain. *Journal of Medical Virology*, 81(4), 736–46. doi:10.1002/jmv.21446

Gastañaduy P., Hall, A. J., & Parashar, U. D. (2013). Foodborne Infections and Intoxications, 303–311. doi:10.1016/B978-0-12-416041-5.00021-4

Gentsch, J. R., Parashar, U. D., & Glass, R. I. (2009). Impact of rotavirus vaccination: the importance of monitoring strains. *Future Microbiology*, 4(10), 1231–4. doi:10.2217/fmb.09.105

Georges-Courbot, M. C., Monges, J., Siopathis, M. R., ROUNGOU, J. B.,

Gresenguet, G., Bellec, L., ... Hessel, L. (1991). Evaluation of the efficacy of a low-passage bovine rotavirus (strain WC3) vaccine in children in Central Africa. *Research in Virology*, 142(5), 405–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1663261>

Gonzales, C., Bada M., C., Rojas G., R., Bernaola A., G., & Chávez B., C. (2011). Guía de práctica clínica sobre el diagnóstico y tratamiento de la diarrea aguda infecciosa en pediatría Perú - 2011. *Revista de Gastroenterología Del Perú*, 31(3), 258–277. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292011000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Greenberg, H. B., & Estes, M. K. (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 136(6), 1939–51. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.076

- Guillén, A. (2011). Enfermedad Diarreica: Un problema recurrente de la salud pública. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 28(1), 7–8.
- Hong-Anh T, Woerdenbag, H. J., Kane, S., Rozenbaum, M. H., Li, S. C., & Postma, M. J. (2011). Economic evaluations of rotavirus immunization for developing countries: a review of the literature. *Expert Review of Vaccines*, 10(7), 1037–51. doi:10.1586/erv.11.65
- Hoshino, Y., & Kapikian, A. Z. (2000). Rotavirus Serotypes: Classification and Importance in Epidemiology, Immunity, and Vaccine Development. *Journal of Health and Popular Nutrition*, 18(1), 5–14.
- Infante, R., Miranda, D. G., Reye, A. B. T., Cisneros, H. E., Cruz, Q. R., Cendón, T. S., & Vega, G. E. D. La. (2007). Rotavirus y vacunas. *Synthesis*, 1–7.
- Jain, S., Vashistt, J., & Changotra, H. (2014). Rotaviruses: is their surveillance needed? *Vaccine*, 32(27), 3367–78. doi:10.1016/j.vaccine.2014.04.037
- Lepage, P., & Vergison, A. (2012). Impact of rotavirus vaccines on rotavirus disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(5), 547–61. doi:10.1586/eri.12.39
- Linhares, A. C., Stupka, J. A., Ciapponi, A., Bardach, A. E., Glujovsky, D., Aruj, P. K., ... Colindres, R. (2011). Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Reviews in Medical Virology*, 21(2), 89–109. doi:10.1002/rmv.682
- Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., ... Black, R. E. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 379(9832), 2151–61. doi:10.1016/S0140-6736(12)60560-1
- Luna Pineda, M. (2008). *Vigilancia epidemiológica de diarreas y vigilancia de rotavirus basada en sitios centinela 2008*. Lima, Peru. Retrieved from http://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/miguelangel.co_.pdf
- Matthijnssens, J., Bilcke, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., Rahman, M., ... Van Ranst, M. (2009). Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiology*, 4(10), 1303–16. doi:10.2217/fmb.09.96

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S. M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., ... Van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of Virology*, *156*(8), 1397–413. doi:10.1007/s00705-011-1006-z

Matthijnssens, J., Heylen, E., Zeller, M., Rahman, M., Lemey, P., & Van Ranst, M. (2010). Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(10), 2431–6. doi:10.1093/molbev/msq137

Matthijnssens, J., Nakagomi, O., Kirkwood, C. D., Ciarlet, M., Desselberger, U., & Van Ranst, M. (2012). Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? *Expert Review of Vaccines*, *11*(11), 1347–54. doi:10.1586/erv.12.105

Mezarina, H., García, J. C., Ramirez, G., Asmat, K., & Rojas, A. (2012). Severidad de las manifestaciones clínicas y características epidemiológicas de la Enfermedad Diarreica por Rotavirus en menores de 5 años en el Hospital Emergencias Pediátricas. *Revista Peruana de Pediatría*, *65*(3), 131–134. Retrieved from [http://www.endocrinologiapediaticaperu.com/cs/Satellite?blobcol=urldocument&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition&blobheadervalue1=inline%3B+filename%3Ddiabetes-insipidarrpp-2012.pdf&blobkey=id&blobtable=UXDocument&blobwhere=1301846631519&ssbinary=true&moddate=2013-06-28 18:28:02](http://www.endocrinologiapediaticaperu.com/cs/Satellite?blobcol=urldocument&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition&blobheadervalue1=inline%3B+filename%3Ddiabetes-insipidarrpp-2012.pdf&blobkey=id&blobtable=UXDocument&blobwhere=1301846631519&ssbinary=true&moddate=2013-06-28%2018:28:02)

Mijatovic-Rustempasic, S., Teel, E. N., Kerin, T. K., Hull, J. J., Roy, S., Weinberg, G. a, ... Bowen, M. D. (2014). Genetic analysis of G12P[8] rotaviruses detected in the largest U.S. G12 genotype outbreak on record. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *21*, 214–9. doi:10.1016/j.meegid.2013.11.004

Ministerio de Salud. (2009). Vigilancia centinela de la diarrea por Rotavirus en el Perú 2009. Retrieved February

08, 2015, from <http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2009/rotavirus-neumo-y-menin--Peru>.

OMS. (2013). Enfermedades diarreicas. Retrieved December 16, 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>

Organización Mundial de Gastroenterología. (2012). Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial. Retrieved from http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012_Acute Diarrhea_SP.pdf

Organización Panamericana de la Salud. (2007). Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por Rotavirus: Guía Práctica. Retrieved from http://cidbimena.desastres.hn/filemgmt/files/guiapractica_rotavirus.pdf

Pang, X. L., Lee, B., Boroumand, N., Leblanc, B., Preiksaitis, J. K., & Yu Ip, C. C. (2004). Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *Journal of Medical Virology*, 72(3), 496–501. doi:10.1002/jmv.20009

Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresee, J. S., & Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 304–6. doi:10.3201/eid1202.050006

Patton, J., Carpio, R., & Spencer, E. (2004). Replication and Transcription of the Rotavirus Genome. *Current Pharmaceutical Design*, 10(30), 3769–3777. doi:10.2174/1381612043382620

Payne, D. C., Boom, J. A., Staat, M. A., Edwards, K. M., Szilagyi, P. G., Klein, E. J., ... Parashar, U. D. (2013). Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among US children <5 years of age, 2009-2011. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(1), 13–20. doi:10.1093/cid/cit164

Pérez, I., González, R., Salinas, B., Villaroel, M., Tomat, M., & Yarzabal, J. P. (2009). Rotavirus: Control y Vacunas. Retrieved from http://vitaie.ucv.ve/pdfs/VITAE_3500.pdf

Perez Schael, I., O’Ryan, M., Sáez-Llorens, X., Linhares, A. C., Velázquez, F. R., Colindres, R. E., ... Ortega-Barria, E. (2012).

- Clinical development, registration, and introduction of human rotavirus vaccine: The Latin American experience. *Trials in Vaccinology*, 1, 10–20. doi:10.1016/j.trivac.2012.01.001
- Peter, G., Aguado, T., Bhutta, Z., Oliveira, L. De, Neuzil, K., Parashar, U., & Steele, D. (2009). Detailed Review Paper on Rotavirus Vaccines, (April), 1–57.
- Pietruchinski, E., Benati, F., Lauretti, F., Kisielius, J., Ueda, M., Volotão, E. M., ... Santos, N. (2006). Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. *Journal of Medical Virology*, 78(9), 1241–9. doi:10.1002/jmv.20686
- Rahman, M., Matthijssens, J., Yang, X., Delbeke, T., Arijs, I., Taniguchi, K., ... Van Ranst, M. (2007). Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *Journal of Virology*, 81(5), 2382–90. doi:10.1128/JVI.01622-06
- Ramig, R. (2007). Systemic rotavirus infection. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 5(4), 591–612. doi:10.1586/14787210.5.4.591
- Simon-Loriere, E., & Holmes, E. C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nature Reviews. Microbiology*, 9(8), 617–26. doi:10.1038/nrmicro2614
- Sirok, A., & Pera, V. Le. (2008). Agentes virales de gastroenteritis Rotavirus. In *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (pp. 519–534).
- Soares, L. D. S., Lobo, P. D. S., Mascarenhas, J. D. P., Neri, D. L., Guerra, S. D. F. D. S., de Oliveira, A. D. S. L., ... Linhares, A. D. C. (2012). Identification of lineage III of G12 rotavirus strains in diarrheic children in the Northern Region of Brazil between 2008 and 2010. *Archives of Virology*, 157(1), 135–9. doi:10.1007/s00705-011-1111-z
- Stupka, J. A., Degiuseppe, J. I., & Parra, G. I. (2012). Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008-2009: whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 54(2), 162–7. doi:10.1016/j.jcv.2012.02.011
- Suarez, M., Aguilera, C., Balbuena, J., Fiestas, V., Luna, M., & Ticona, M. (2012). Vigilancia centinela de la diarrea por Rotavirus en niños menores de

cinco años en seis regiones del Perú, 2009-2011. *Boletín Instituto Nacional de Salud*, 88.

Tate, J. E., & Parashar, U. D. (2011). Monitoring impact and effectiveness of rotavirus vaccination. *Expert Review of Vaccines*, 10(8), 1123–5. doi:10.1586/erv.11.94

Tate, J. E., & Parashar, U. D. (2014). Rotavirus vaccines in routine use. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 59(9), 1291–301. doi:10.1093/cid/ciu564

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), 165–77. doi:10.1038/nrmicro2673

Usonis, V., Ivaskeviciene, I., Desselberger, U., & Rodrigo, C. (2012). The unpredictable diversity of co-circulating rotavirus types in Europe and the possible impact of universal mass vaccination programmes on rotavirus genotype incidence. *Vaccine*, 30(31), 4596–605. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.097

Webb, A., & Starr, M. (2005). Acute gastroenteritis in children. *Australian Family Physician*, 34(4), 227–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15861741>

World Health Organization. (2009). Manual of rotavirus detection and characterization methods Manual of rotavirus detection and characterization methods Immunization , Vaccines and Biologicals. Retrieved from http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/who_ivb_08.17_eng.pdf

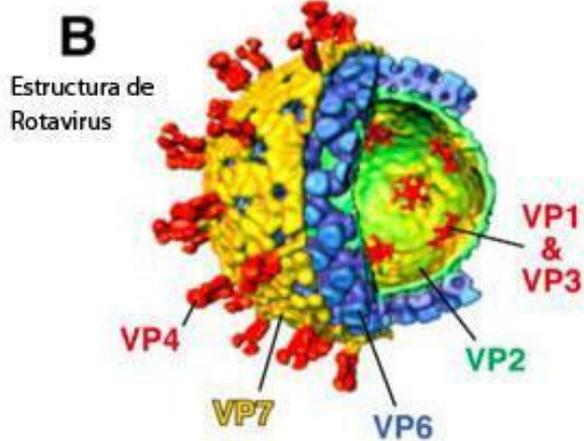
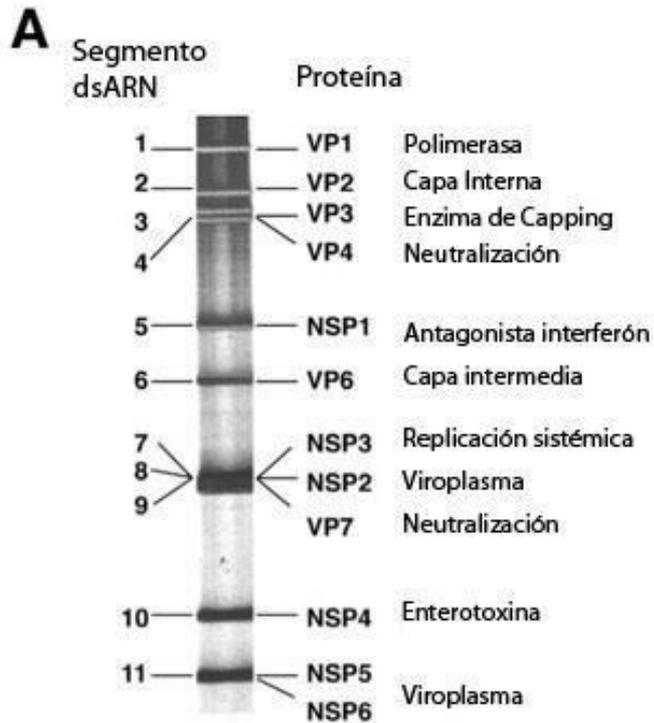
World Health Organization. (2011). *Global Rotavirus Information and Surveillance Bulletin. Reporting period: January through December 2010*. (Vol. 4, pp. 1–10).

World Health Organization. (2014). WHO Global rotavirus surveillance network – a strategic review of the first 5 years (2008–2012). *Relevé Épidémiologique Hebdomadaire / Section D'hygiène Du Secrétariat de La Société Des Nations = Weekly Epidemiological Record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*, 89(30), 340–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25072069>

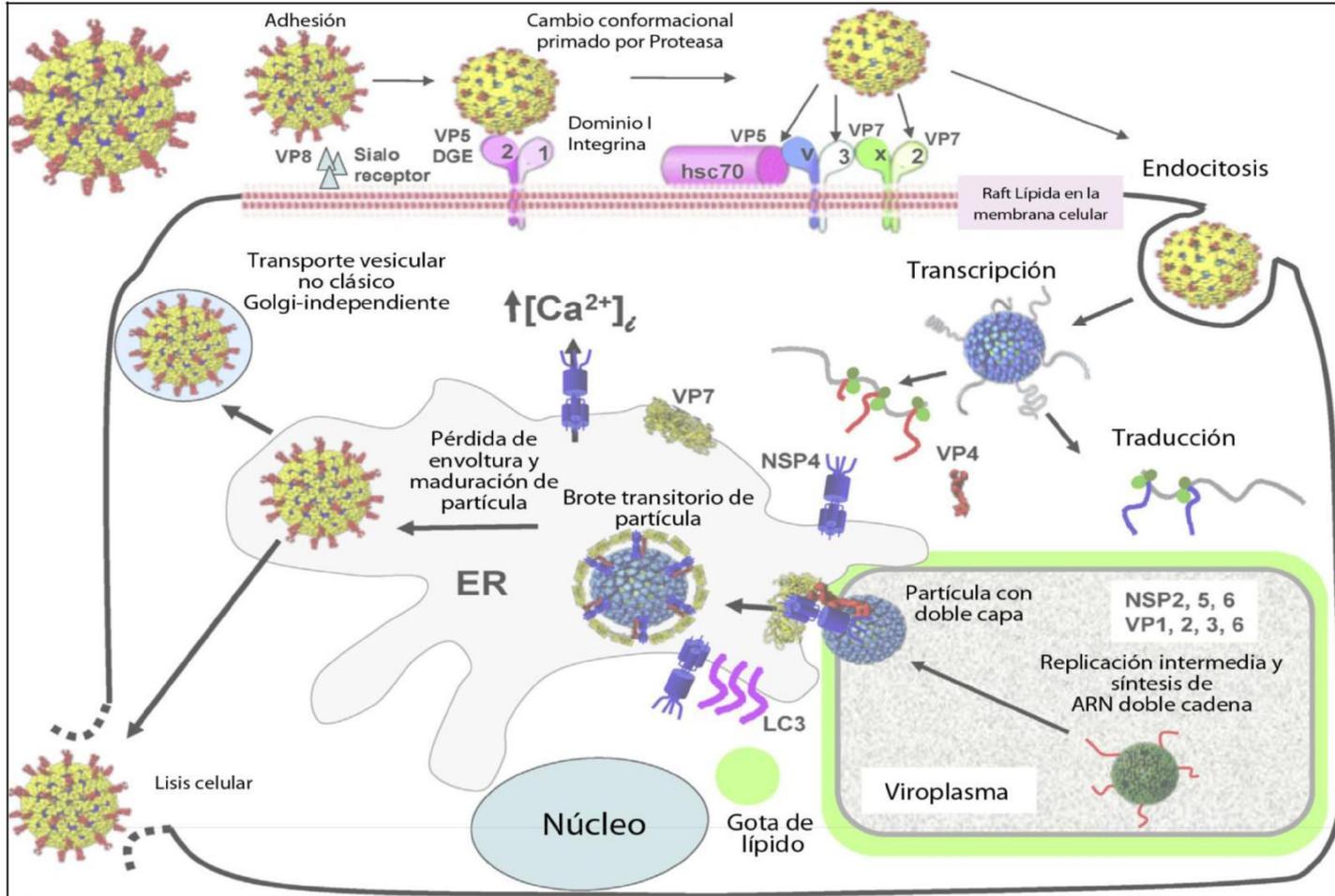
ANEXOS

Anexo A. Proteínas y estructura de Rotavirus.

Fuente: Greenberg & Estes, 2009).



Anexo B. Ciclo de replicación de rotavirus. Fuente: Desselberger, 2014.



Anexo D. Condiciones de qPCR para la detección de rotavirus A

Tabla D-1. Secuencia y localización de cebadores y sonda para la región codificante de la proteína no estructural 3 (NSP3) en RV.

Cebador y sonda	Secuencia (5' a 3')	Localización	Polaridad	Tamaño de Amplicón
NVP3-FDeg	ACC ATC TW ^a C ACR TR ^b A CCC TC	963 - 982	<i>Forward</i>	87 pb
NVP3-R1	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA	1034 - 1053	<i>Reverse</i>	
Taqman Probe	A ^c TG AGC ACA ATA GTT ^d AAA AGC TAA CAC TGT CAA	984 - 1026		

^aW=T, U, o A (código IUPAC).

^bR=A o G (código IUPAC).

^cNucleótido marcado con el *reporter* FAM

^dNucleótido marcado con *quencher* BHQ1

Tabla D-2. Concentraciones del Mix de qPCR de rotavirus A.

Reactivo	Conc. Final	Volumen (µl)
2x QuantiTect Probe RT-PCR master mix	1x	12.5
25 mM MgCl ₂	6 mM	2.0
10 µM Sonda NVP3	0.2 µM	0.5
QuantiTect RT Mix	-	0.25
H ₂ O libre de RNasa	-	3.75
Total		19

Tabla D-3. Condiciones de ciclamiento para qPCR de rotavirus A.

Ciclo	Tiempo	Temp (°C)
1	30 minutos	50
2	15 minutos	95
3	15 segundos	95
4	1 minuto	60
	Repetir 4 y 5 por 45 ciclos	
5	Mantener a 4°C.	

Anexo E. Condiciones del RT-PCR convencional para la genotipificación de rotavirus A

Tabla E-1. Secuencias de cebadores para fragmento VP7, genotipo G.

Primer	Secuencia 5' a 3'	Posición de nucleótidos/polaridad	Genotipo
1° amplificación. Primers consenso			
9con1-L	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT AT	37-59/+	G1
VP7R	AAC TTG CCA CCA TYT YTT CC	914-932/-	G1
2° amplificación. Primers de tipificación (9con1-L incluido)			
9T-1	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	176-195/-	G1
9T-2	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	262-281/-	G2
9T-3P	GTC CAG TTG CAG TGT AGC	484-501/-	G3
9T-4	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	123-440/-	G4
9T-9B	TAT AAA GTC CAT TGC AC	131-147/-	G9

Tabla E-2. Secuencias de cebadores para fragmento VP4, genotipo P.

Primer	Secuencia 5' a 3'	Posición de nucleótidos/polaridad	Genotipo
1° amplificación. Primers consenso			
con3	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32/+	P[8]
con2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	868-887	P[8]
2° amplificación. Primers de tipificación (con3 incluido)			
1T-1	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	339-356/-	P[8]
2T-1	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	474-494/-	P[4]
3T-1	TGT TGA TTA GTT GA TTC AA	259-278/-	P[6]
4T-1	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	385-402/-	P[9]
5T-1	ATC ATA GTT AGT AGT CGG	575-594/-	P[10]
1T-1Wa	TCT ACT GGA TCG ACG TGC	339-356/-	P[8]
1T-VN	TCT ACT GGG TTA ACG TGC	339-356/-	P[8]

Tabla E-3. Concentraciones del Mix RT-PCR para la genotipificación de rotavirus A (Primera amplificación).

Reactivos	Volumen (μ l) por reacción
H ₂ O libre de RNasa	16
5X Buffer	5
dNTP mix	1
Enzima One step RT-PCR	1
Total	23

Tabla E-4. Condiciones de ciclamiento para la RT-PCR de rotavirus A (Primera amplificación).

Repeticiones	Tiempo	Temp (°C)
1	30 minutos	42
1	15 minutos	95
30	30 segundos	94
	30 segundos	42
	45 segundos	72
1	7 minutos	72

Mantener a 4°C.

Tabla E-5. Concentraciones del Mix RT-PCR para la genotipificación de rotavirus A (Segunda amplificación).

Reactivos	Volumen (μ l) por reacción
H ₂ O libre de RNasa	27.5/26.5
2.5 mM dNTPs	8
10X Buffer	5
25 mM MgCl ₂	4
10 μ M Gen9/Gen4 pool	1
20 μ M 9con1-L/con3	1
20 μ M 9T-9B/1T1-Wa	1
20 μ M 1T1-VN	1
Taq	0.5
Total	48

Tabla E-6. Condiciones de ciclamiento para la RT-PCR de rotavirus A (Segunda amplificación).

Repeticiones	Tiempo	Temp (°C)
30	45 segundos	94
	30 segundos	42
	1 minuto	72
1	7 minutos	72

Mantener a 4°C.

Anexo F. Patrones de bandas de los genotipos G y P más comunes (Tomado de CDC; 2010).

