

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



Título:

**Caracterización del curso de excreción viral en infecciones
por Sapovirus detectadas en una cohorte de niños recién
nacidos del distrito de San Juan de Miraflores**

Tesis para optar el Título de Licenciada en Biología

Tesista:

Noelia Stephanie Coronado Barrios

Asesor:

Holger Mayta Malpartida, PhD.

Lima - Perú

2022

Asesor
Holger Mayta Malpartida, MSc., PhD.

Jurado de Tesis

PRESIDENTE

Patricia Sheen Cortavarria, PhD.

VOCAL

Manuela Renee Verastegui Pimentel, PhD.

SECRETARIO (A)

Ana Cecilia Colarossi Salinas, MSc.

Dedicatoria

A mis padres y abuelitos, por su apoyo y amor incondicional.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial al Dr. Holger Mayta, por brindarme su apoyo y ánimo para perseverar en la realización del presente trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Virología y Nanopartículas por su colaboración durante la ejecución del proyecto.

A mis padres, Clara y Jesús por su confianza en mí, y alentarme a dar lo mejor.

A mis amigos y colegas, Alexandra, María Claudia y Jorge por estar siempre dispuestos a ayudarme y compartir momentos agradables.

Fuente de financiamiento

Este trabajo de investigación se realizó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC, 110-2015-CIENCIACTIVA FINCyT) y el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (1R21AI099737-01, 3R01AI108695).

TABLA DE CONTENIDO

I	INTRODUCCIÓN	1
II	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	4
III	MARCO TEÓRICO	8
3.1	GASTROENTERITIS AGUDA (GEA).....	8
3.2	PATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO.....	8
3.3	DESAFÍOS PARA LA ELIMINACIÓN DE SAPOVIRUS	11
IV	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS	12
V	MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1	DISEÑO DE ESTUDIO.....	14
5.2	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	14
5.3	ÁREAS DE ESTUDIO	19
5.4	MUESTRAS	20
5.5	DEFINICIONES.....	22
5.6	DETECCIÓN DE SAPOVIRUS POR RT-QPCR EN DOS PASOS	22
5.6.1	<i>Extracción de ARN usando QIAamp Viral RNA mini Kit</i>	22
5.6.2	<i>Síntesis de cADN usando el kit SuperScript® III Reverse Transcriptase</i>	24
5.6.3	<i>PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan para la detección de Sapovirus</i>	25
5.6.4	<i>Secuenciamiento y análisis de secuencias</i>	26
5.7	PLAN DE ANÁLISIS.....	28
5.8	CONSIDERACIONES ÉTICAS	29
VI	RESULTADOS	31
6.1	DESCRIPCIÓN DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DE SAPOVIRUS DETECTADOS EN LA COMUNIDAD PERUANA PAMPA DE SAN JUAN DE MIRAFLORES	31

6.2 DURACIÓN DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DE SAPOVIRUS EN HECES.....	34
6.2.1 Según edad en meses del individuo.....	34
6.2.2 Según presencia de diarrea en el episodio	36
6.2.3 Según genogrupo de Sapovirus.....	38
6.2.4 Según el valor de la carga viral inicial (Cq) de los episodios.....	39
6.3 CARACTERÍSTICAS DE LA EVOLUCIÓN DE LA CARGA VIRAL EN EL CURSO DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DE SAPOVIRUS.....	40
6.3.1 Según el geogrupo y la presencia de diarrea.....	40
6.3.2 Según la presencia de diarrea en los episodios de excreción por Sapovirus.....	42
6.3.3 Carga viral inicial (Cq) de los episodios de excreción de Sapovirus respecto a la edad	43
VII DISCUSIÓN	44
VIII CONCLUSIONES.....	52
IX LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES	53
X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

Índice de figuras:

FIGURA 1. DISEÑO DEL ESTUDIO MATRIZ Y EL PRESENTE ESTUDIO.....	17
FIGURA 2. FLUJOGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO MATRIZ Y EL PRESENTE ESTUDIO.18	
FIGURA 3. UBICACIÓN ESPACIAL DE LA COMUNIDAD DE PAMPAS DE SAN JUAN (CÍRCULO ROSADO) EN EL DISTRITO DE SAN JUAN DE MIRAFLORES, DEPARTAMENTO DE LIMA, PERÚ.	19
FIGURA 4. FLUJOGRAMA DE LA DISTRIBUCIÓN DE INDIVIDUOS DEL ESTUDIO MATRIZ Y EL PRESENTE ESTUDIO.	21
FIGURA 5. FÓRMULA PARA EL CÁLCULO DE LA DURACIÓN DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN EN DÍAS.	28
FIGURA 6. COMPARACIÓN DE LA DURACIÓN DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DE SAPOVIRUS SEGÚN RANGO DE EDAD EN MESES DE LOS NIÑOS INFECTADOS.....	35
FIGURA 7. COMPARACIÓN DE LA DURACIÓN DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DE SAPOVIRUS SEGÚN LA PRESENCIA O AUSENCIA DE DIARREA.	37
FIGURA 8. COMPARACIÓN DE LA DURACIÓN DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DE SAPOVIRUS SEGÚN GENOTIPO.....	38
FIGURA 9. CORRELACIÓN ENTRE LA DURACIÓN DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DE SAPOVIRUS EN HECES VS LA CARGA VIRAL INICIAL (Cq) DE LOS EPISODIOS.	39
FIGURA 10. CURSO DE LA CARGA VIRAL (Cq) DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DE SAPOVIRUS CATEGORIZADOS POR GENOGRUPO DE SAPOVIRUS Y PRESENCIA DE DIARREA EN EL EPISODIO.	41
FIGURA 11. CURSO DE LA CARGA VIRAL (Cq) DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DE SAPOVIRUS QUE REGISTRARON DIARREAS.....	42
FIGURA 12 CORRELACIÓN ENTRE LA EDAD EN MESES DE LOS INDIVIDUOS VS LA CARGA VIRAL INICIAL (Cq) DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DE SAPOVIRUS EN HECES.	43

Índice de tablas:

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN DEL VIRUS DE LOS NIÑOS CON INFECCIÓN POR SAPOVIRUS (N=60)	33
--	----

Índice de anexos:

ANEXO 1 PRIMERS Y SONDAS PARA LA DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE SAPOVIRUS.	
ANEXO 2. ESQUEMA DEL GENOMA DE SAPOVIRUS Y LA UBICACIÓN DE LOS PRIMERS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO.	

ANEXO 3. DIAGRAMA DE TORTA QUE MUESTRA LA DIFERENCIACIÓN DE LOS 60 EPISODIOS DE EXCRECIÓN POR SAPOVIRUS POR GENOTIPO.

ANEXO 4. DIAGRAMA DE LOS GENOTIPOS DE LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN SUCESIVOS POR SAPOVIRUS PRESENTES EN 11 NIÑOS

ANEXO 5. NÚMERO DE CO-INFECCIONES EN LOS EPISODIOS DE EXCRECIÓN POR SAPOVIRUS SEGÚN RANGO DE EDAD

Resumen

Introducción: Una prolongada excreción de Sapovirus y un alto nivel de carga viral en heces puede ser un obstáculo para el control de la gastroenteritis infantil en comunidad. El objetivo de este estudio fue estimar la duración y caracterizar la evolución del nivel de la carga viral de los episodios de excreción por Sapovirus en heces de niños menores de dos años.

Métodos: Para la determinación del periodo de excreción, se detectó la presencia de Sapovirus mediante transcripción reversa seguido de PCR cuantitativo (RT-qPCR) de la región de unión de los genes que codifican la polimerasa y la proteína de la cápside VP1, en un subconjunto de muestras de heces semanales colectadas antes y después de las infecciones por Sapovirus (n=440). Las infecciones por Sapovirus fueron reportadas previamente por el estudio cohorte de niños recién nacidos en la comunidad Pampas de San Juan de Miraflores, Lima – Perú. Asimismo, se realizó la genotipificación del genogrupo de Sapovirus mediante la amplificación y el secuenciamiento del gen que codifica la proteína de la cápside VP1 para confirmar que el episodio perteneciera al mismo genotipo.

Resultados: La mediana de la duración de los episodios de excreción por Sapovirus sin diarrea fue de 20.5 días (n = 15; [RIQ], 7.5-25); mientras que los episodios de excreción por Sapovirus con diarrea tuvieron una mediana de 16.5 días (n = 41; [RIQ], 12.5-22), sin diferencias significativas entre los grupos ($p>0.05$). La duración de la excreción de Sapovirus no mostró relación con la edad del individuo, la presencia de diarrea en el episodio, el genogrupo del virus, ni con la carga viral inicial ($p>0.05$).

Además, se observó una disminución de la carga viral inicial de los episodios de excreción por Sapovirus en niños infectados mayores a los 10 meses de edad, y una evolución de la carga viral en el curso de los episodios de excreción con una tendencia a reducirse con el tiempo.

Conclusión: El presente estudio encontró un periodo de excreción por Sapovirus en heces de 18 días en niños menores de 2 años de edad. Estos hallazgos son información esencial para proponer mejores medidas de vigilancia y control de la gastroenteritis infantil causada por Sapovirus en el Perú.

Palabras claves: Gastroenteritis infantil, Sapovirus, excreción viral, duración, carga viral.

Abstract

Introduction: A prolonged excretion of Sapovirus and a high level of viral load in stool can be an obstacle for the control of infantile gastroenteritis in the community. The aim of this study was to estimate the duration and characterize the evolution of the viral load level of episodes of Sapovirus excretion in feces of children under two years of age.

Methods: For the determination of the excretion period, the presence of Sapovirus was detected by reverse transcription followed by quantitative PCR (RT-qPCR) of the binding region of the genes encoding the polymerase and the capsid protein VP1 in a subset (n=440) of weekly stool samples collected before and after Sapovirus infections. Sapovirus infections were previously reported from the study cohort of newborn children in the Pampas community of San Juan de Miraflores, Lima - Peru. Likewise, genotyping of the Sapovirus genogroup was performed by amplification and sequencing of the gene encoding the capsid protein VP1 to confirm that the episode belonged to the same genotype.

Results: The median duration of Sapovirus excretion episodes without diarrhea was 20.5 days (n = 15; [RIQ], 7.5-25); while Sapovirus excretion episodes with diarrhea had a median of 16.5 days (n = 41; [RIQ], 12.5-22), with no significant differences between groups (p>0.05). The duration of Sapovirus excretion showed no relationship with the age of the individual, the presence of diarrhea in the episode, the genogroup of the virus, nor with the initial viral load (p>0.05). In addition, a decrease in the initial viral load of Sapovirus shedding episodes was observed in infected children older than

10 months of age, and an evolution of the viral load in the course of shedding episodes with a tendency to reduce with time.

Conclusion: The present study found a period of excretion of Sapovirus in feces of 18 days in children under 2 years of age. These findings are essential information to propose better surveillance and control measures for childhood gastroenteritis caused by Sapovirus in Peru.

Key words: Infantile gastroenteritis, Sapovirus, viral shedding, duration, viral load.

I Introducción

La diarrea es la tercera causa de muerte entre los niños menores de 5 años principalmente en los países más pobres del mundo. Más de medio millón de niños murieron por diarrea según el estudio sobre la Carga Mundial de Enfermedades, Lesiones y Factores de Riesgo (GBD) en el 2017 (Reiner *et al.*, 2020).

La infección por Rotavirus era la causa principal de diarrea aguda en niños lactantes antes de la introducción de la vacuna contra este virus. En el Perú la vacuna contra Rotavirus se introdujo en el Programa Nacional de Inmunización como vacunación universal en el 2009, y su cobertura nacional al 85% fue alcanzada en 2013 (Juliao *et al.*, 2021). Después de la implementación de la vacuna de Rotavirus, otros agentes virales causantes de gastroenteritis aguda (GEA), como Norovirus, Sapovirus y otros virus diarreicos emergieron, contribuyendo a la persistencia de la enfermedad entre los niños (Bucardo *et al.*, 2014).

Los estudios realizados sobre Sapovirus en Latinoamérica son limitados. En el Perú, un estudio realizado en una comunidad periurbana, demostró que la tasa de detección de Sapovirus en niños con gastroenteritis aguda fue de 12.4%. (Liu *et al.*, 2016). En la actualidad, se sigue describiendo los principales agentes

etiológicos de diarrea, incluyendo Sapovirus en comunidad, para establecer prioridades de intervención y tratamiento. Así como, fomentar la investigación en vacunas específicas para los causantes de diarreas en niños.

Sapovirus pertenece a la familia *Caliciviridae*, es un virus redondo, pequeño y sin envoltura, con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de entre 7,1 y 7,5 kb que contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF1 codifica una poliproteína que contiene las proteínas no estructurales: NS1, NS2, NS3 (NTPasa), NS4, NS5 (VPg), NS6 (proteasa), NS7 (ARN polimerasa dependiente ARN polimerasa) y la proteína de la cápside (VP1), mientras que el ORF2 codifica proteínas con funciones desconocidas (Oka *et al.*, 2015).

Las cepas de Sapovirus se dividen en cinco genogrupos, GI-GV, basados en las secuencias del gen VP1, de los cuales GI, GII, GIV y GV infectan humanos, mientras que las cepas del genogrupo GIII infectan a cerdos (Oka *et al.*, 2015). Las cepas GI y GII se clasifican además en siete genotipos cada una (GI.1-GI.7 y GII.1-GII.7), mientras que las cepas GV incluyen dos genotipos (GV.1 y GV.2), y las cepas GIV tienen un único genotipo (GIV.1). También, se han notificado recombinantes de Sapovirus inter e intragenogrupo (inter e intragenotipo) (Lasure and Gopalkrishna, 2017). Las cepas de Sapovirus que infectan a humanos no son cultivables. Su detección morfológica se realiza

mediante la microscopía electrónica y su diagnóstico definitivo mediante la detección de antígenos o la identificación del genoma de Sapovirus mediante RT-qPCR (Takagi *et al.*, 2020).

Sapovirus se trasmite por vía fecal-oral, directamente por contacto de persona a persona o indirectamente a través de aerosoles, alimentos, agua o ambientes contaminados. Su tratamiento consiste en hidratación. No se dispone de quimioterapia antiviral específica ni de una vacuna (Cunliffe, Glass and Nakagomi, 2014). No está claro el momento en el que un niño infectado deja de representar un riesgo significativo de contagio. Además, se ha informado que la diseminación de Sapovirus en las heces puede continuar después de la desaparición de los síntomas (de 1 a 4 semanas después del inicio de la enfermedad) (Oka *et al.*, 2015). Un estudio previo en Perú tipo caso-control anidado a una cohorte de recién nacidos reportó que en promedio la duración de los síntomas se encuentra entre los 3-5 días (Liu *et al.*, 2016). No obstante, la duración de los síntomas de Sapovirus puede subestimar el tiempo de la excreción viral en heces, medida valiosa para prevenir la transmisión, ya que en comunidad podemos encontrar niños que podrían ser reservorio infeccioso asintomático. Por lo que es importante conocer el tiempo que un niño infectado excreta Sapovirus en heces y la carga viral en el curso del episodio de excreción en comunidad, pues ya se sabe que niños y personas inmuno-suprimidas

hospitalizadas eliminan el virus durante períodos prolongados, incluso después de haber superado los síntomas (Pietsch and Liebert, 2019).

En este estudio, mediante monitoreo molecular por transcripción reversa seguido de PCR cuantitativo (RT-qPCR) de Sapovirus en heces, se estimó la duración y caracterizó la evolución del nivel de la carga viral en el curso de los episodios de excreción de Sapovirus, y se exploró su relación con la edad del individuo, presencia o ausencia de diarrea y genogrupo de Sapovirus, en niños menores de 2 años con infección por Sapovirus del distrito de San Juan de Miraflores de Lima – Perú.

II Planteamiento del problema y justificación de la investigación

Planteamiento del problema

Las enfermedades diarreicas que con frecuencia son causadas por virus diarreicos representan un serio problema para la salud pública en todo el mundo. Estas enfermedades se caracterizan por afectar en su mayoría a poblaciones vulnerables como personas desnutridas, inmuno-suprimidas, ancianos y niños, incluso pueden llegar a causar la muerte (Stuempfig and Seroy, 2021).

Según el estudio sobre la Carga Mundial de Enfermedades, Lesiones y Factores de Riesgo (GBD) en el 2017, la gastroenteritis por infecciones víricas fue responsable de más de 500 000 muertes de niños en todo el mundo, sobre

todo en países con recursos limitados (Reiner *et al.*, 2020). Convirtiéndose en la tercera causa de muerte en este grupo de edad. Otras consecuencias que acompañan a las enfermedades diarreicas en los niños son el retraso del crecimiento, la desnutrición y el deterioro del desarrollo cognitivo (Stuempfig and Seroy, 2021).

Después de la implementación de la vacuna contra Rotavirus por los programas de salud, Norovirus y Sapovirus emergieron como la causa principal de diarrea aguda en niños menores de 5 años de edad (Ballard *et al.*, 2022).

En este contexto, específicamente para Perú, será muy difícil avanzar en el control de la diarrea infantil, si se sigue pasando por alto la contribución de las infecciones por Sapovirus a la carga de la enfermedad. Aún existen pocos estudios epidemiológicos que describen la magnitud de las infecciones por Sapovirus detectadas por métodos moleculares como RT-qPCR, y aún menos que examinen el tiempo que un niño infectado podría seguir transmitiendo el virus a través de sus deposiciones o que exploren la evolución del nivel de la carga viral, y la influencia de la edad del individuo, presencia de diarrea y genogrupo del virus sobre estas medidas. Conocer esta información permitirá elaborar estrategias de prevención para reducir la transmisión y la carga por diarrea infantil.

Justificación de la investigación

Sapovirus ha sido identificado como principal causante, después de Norovirus, de la gastroenteritis en niños en países donde se ha introducido las vacunas contra Rotavirus. La transmisión de Sapovirus ocurre por varias vías, como por la ingesta oral de alimentos o agua contaminados, el contacto de persona a persona por la vía fecal-oral y la inhalación de aerosoles que se general durante los vómitos (Oka *et al.*, 2015). Se ha sugerido que, de forma similar a Norovirus, Sapovirus podría resistir a distintas condiciones ambientales y que podría causar infección activa con cantidades bajas de partículas virales. Por lo que, es necesario conocer las características de la excreción de Sapovirus en heces de niños peruanos para el desarrollo de estrategias de prevención de la transmisión.

Si bien hay estudios que han reportado periodos prolongados de excreción de Sapovirus en heces (15 y 28 días después del inicio de la enfermedad) (Oka *et al.*, 2015), se desconoce la duración de los episodios de excreción por Sapovirus en una comunidad peruana, y si características como la carga viral, edad del individuo, presencia de diarrea y genogrupo de Sapovirus están relacionados con un mayor tiempo de excreción del virus en heces.

Este estudio proporciona la estimación de la duración y caracteriza la evolución del nivel de la carga viral en el curso de los episodios de excreción por

Sapovirus en heces, y su relación con la edad del individuo, presencia de diarrea y genogrupo de Sapovirus, en niños menores de 2 años con infección por Sapovirus del distrito de San Juan de Miraflores de Lima – Perú. Se espera que esta información contribuya a prevenir la transmisión de Sapovirus en comunidades periurbanas del Perú.

III Marco Teórico

3.1 Gastroenteritis aguda (GEA)

La gastroenteritis aguda (GEA) es una inflamación del aparato gastrointestinal debido a una infección o a una intoxicación por alimentos. Se caracteriza por la presencia de diarrea y vómitos. En el 2019, representó el 9% del total de muertes en niños menores de cinco años (Perin *et al.*, 2021).

La GEA en humanos es causada por patógenos virales y bacterianos. Sin embargo, en el mundo los virus intestinales son la principal causa de los casos agudos de diarrea en comunidad. Entre los virus entéricos importantes para la gastroenteritis en humanos están: Rotavirus, Caliciviridae (Norovirus y Sapovirus), Adenovirus entéricos y Astrovirus. Siendo Norovirus uno de los principales objetivos de vigilancia por GEA, y Sapovirus recientemente reconocido como un importante agente causante de la GEA en niños menores de 5 años, tras la incorporación de las vacunas contra Rotavirus en los programas nacionales de inmunización de todo el mundo (Chiejina and Samant, 2021).

3.2 Patología y diagnóstico

Las infecciones por Sapovirus están asociados a síntomas menos graves en comparación a Norovirus y Rotavirus. Los principales síntomas clínicos son la diarrea y los vómitos; sin embargo, también se notifica con frecuencia síntomas

como: náuseas, dolor abdominal, escalofríos, dolor de cabeza y malestar general. La fiebre es un síntoma clínico poco frecuente. Los síntomas de la gastroenteritis suelen ceder espontáneamente al cabo de un par de días. No obstante, estudios recientes han informado que las infecciones por Sapovirus pueden provocar hospitalizaciones y deshidratación grave. El deterioro cognitivo en niños también se ha asociado a las infecciones por Sapovirus en países de ingresos bajos y medios (Chiejina and Samant, 2021).

El diagnóstico de Sapovirus en la última década ha evolucionado hacia métodos moleculares más sensibles que han aumentado la tasa de detección en comparación a la detección por microscopía electrónica o a los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). La técnica de transcripción reversa seguida de la prueba de PCR cuantitativo (RT-qPCR) se ha convertido en el método de rutina para la detección de Sapovirus en muestras clínicas (heces), debido a su especificidad y sensibilidad. Entre los genes blancos usados para la detección de Sapovirus están: la región parcial de RdRp (Berke *et al.*, 1997; Noel *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1999; Honma *et al.*, 2000; Farkas *et al.*, 2004; Rachakonda *et al.*, 2008), la unión RdRp-VP1 (Chan *et al.*, 2006; Oka *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2014), la región parcial de VP1 (Okada *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2003; Monica *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012) o los motivos conservados de la región RdRp (por ejemplo, p290 y p289). Sin embargo, es la prueba diagnóstica dirigida a la región de unión RdRp-VP1 la que tiene la mayor tasa de detección y pueden utilizarse

como primera opción para la identificación de Sapovirus a partir de muestras clínicas (Harada *et al.*, 2009; Iwakiri *et al.*, 2009). Por otro lado, la PCR dirigida a la VP1 permite obtener una genotipificación fiable a partir del secuenciamiento del producto de amplificación.

3.3 Desafíos para la eliminación de Sapovirus

Hasta la fecha, no se dispone de vacunas ni de medicamentos antivirales para el control y la prevención de las infecciones por Sapovirus en humanos. Los mecanismos de unión y entrada del virus en las células diana, así como la replicación y traducción del ARN viral no están definidos, debido a la falta de un sistema de cultivo celular. La carencia de un cultivo celular para Sapovirus obstaculiza el estudio de su infectividad e inmunidad protectora, ya que no hay producción de antígenos para medir la inmunidad humoral. No obstante, la expresión de la proteína de la cápside VP1 recombinante (rVP1) en células de insectos da lugar al autoensamblaje de partículas similares a virus (VLP) que son antigénicamente similares a los virus nativos (Hansman *et al.*, 2007). Estos estudios podrían conducir a implementar medidas de control más específicas para la prevención de la gastroenteritis por Sapovirus en el futuro (Oka *et al.*, 2015).

El conocimiento que se tiene de Sapovirus que infecta a humanos es en gran medida al uso de la cepa de Sapovirus porcino que pueden propagarse con éxito *in vitro* e *in vivo*, así como estudios en individuos voluntarios sanos y casos clínicos.

IV Pregunta de Investigación y objetivos

La duración y la evolución del nivel de carga viral en el curso de los episodios de excreción de Sapovirus en heces han sido poco estudiados, y menos aún si estos se modifican según la edad del individuo, la presencia de diarrea, genogrupo de Sapovirus y carga viral.

Con un diseño de cohorte retrospectivo de niños menores de dos años de edad infectados por Sapovirus se responde la siguiente pregunta de investigación: ¿La duración y la evolución del nivel de la carga viral en el curso del episodio de excreción durante una infección por Sapovirus se ve influenciado por la edad del niño infectado, la presencia de diarrea y/o el genogrupo del virus?

Objetivos

Objetivo general:

- Determinar la duración y caracterizar la evolución del nivel de la carga viral en el curso de los episodios de excreción de Sapovirus en heces de niños menores de 2 años con infección por Sapovirus del distrito de San Juan de Miraflores de Lima – Perú.

Objetivos específicos:

- Estimar el tiempo de duración de los episodios de excreción viral de Sapovirus en heces provenientes de niños con y sin diarrea.
- Cuantificar la carga viral en el curso de los episodios de excreción de Sapovirus en heces.
- Determinar si la duración de los episodios de excreción de Sapovirus en heces se relacionan con la edad del individuo, presencia de diarrea, genogrupo de Sapovirus y el nivel de carga viral inicial de los episodios.
- Determinar si el nivel de la carga viral en el curso de los episodios de excreción de Sapovirus en heces se relaciona con la edad del individuo, presencia de diarrea y genogrupo de Sapovirus

V Materiales y métodos

5.1 Diseño de estudio

El presente estudio es de tipo retrospectivo que estimó la duración de los episodios de excreción por Sapovirus y caracterizó la evolución del nivel la carga viral en heces desde el inicio del episodio de excreción de Sapovirus hasta volverse indetectable por RT-qPCR.

5.2 Diseño experimental

El presente estudio parte de un estudio matriz tipo cohorte realizado en recién nacidos. El proyecto matriz se tituló “Detección de agentes etiológicos en casos de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años en la comunidad de Pampas de San Juan de Miraflores” (código SIDISI: 50347) a cargo del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

El proyecto matriz se ejecutó con la finalidad de estimar la prevalencia de infección por Sapovirus por RT-qPCR y la incidencia de la diarrea en la comunidad peruana de Pampas de San Juan de Miraflores. Previamente, realizó un censo completo de la comunidad y seleccionó aleatoriamente 100 individuos entre mujeres embarazadas y recién nacidos menores de 3 meses. La cohorte inició en junio del 2007 hasta abril del 2011. El personal de campo realizó visitas transversales consecutivas cada semana para coleccionar muestras

de heces, independientemente de los síntomas. También, colectaron muestras de heces durante cada deposición diarreica. La detección se realizó mediante transcripción reversa seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR) de la región de unión de los genes que codifican la polimerasa y la proteína de la cápside VP1 de todas las muestras de heces diarreicas (n=877) y no diarreicas colectadas trimestralmente (n=792) provenientes de 100 niños de hasta 2 años de edad. Las muestras positivas a Sapovirus fueron genotipificadas por PCR anidado y secuenciamiento del gen VP1. Todas las muestras fueron colectadas antes de la incorporación de la vacuna contra Rotavirus “Rotarix” al calendario nacional de vacunación del Perú.

En el presente estudio, para identificar los episodios de excreción de Sapovirus se usó de referencia las infecciones positivas por Sapovirus con genotipificación detectadas por el estudio matriz. Luego, empleando el mismo protocolo del estudio matriz, se usó la transcripción reversa seguida de la PCR cuantitativa (RT-qPCR) para la detección de Sapovirus en las muestras de heces semanales adicionales (n = 440) colectadas antes y después de la infección de referencia. El episodio de excreción por Sapovirus se definió como un conjunto de muestras positivas consecutivas semanales alrededor de la muestra de infección de referencia hasta hallar dos muestras consecutivas negativas antes del inicio y después del final del episodio. Asimismo, se realizó la genotipificación de la cepa de Sapovirus en las muestras de heces

que conformaron el episodio mediante la amplificación y el secuenciamiento de la región del gen de la cápside VP1, de esta manera se confirmó la pertenencia del episodio a una misma infección por el mismo genotipo, (figura 1).

En la figura 2, se muestra el esquema de los experimentos realizados por el estudio matriz y el presente estudio.

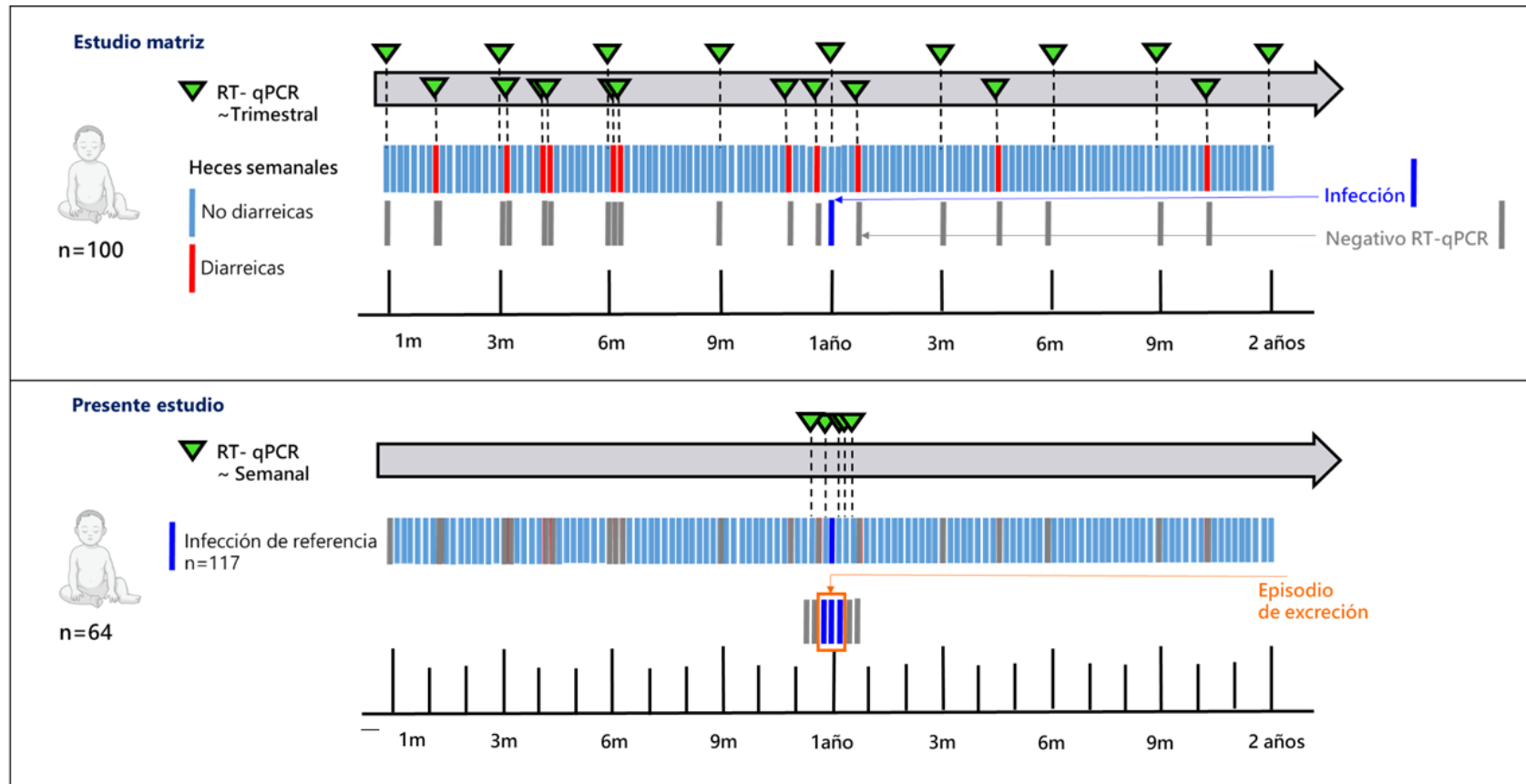


Figura 1. Diseño del estudio matriz y el presente estudio.

Ciento diecisiete infecciones positivas a Sapovirus con genotipificación (Infecciones de referencia) fueron consideradas para armar los episodios de excreción en el presente estudio. Se hallaron 60 episodios de excreción por Sapovirus con confirmación del mismo genotipo.

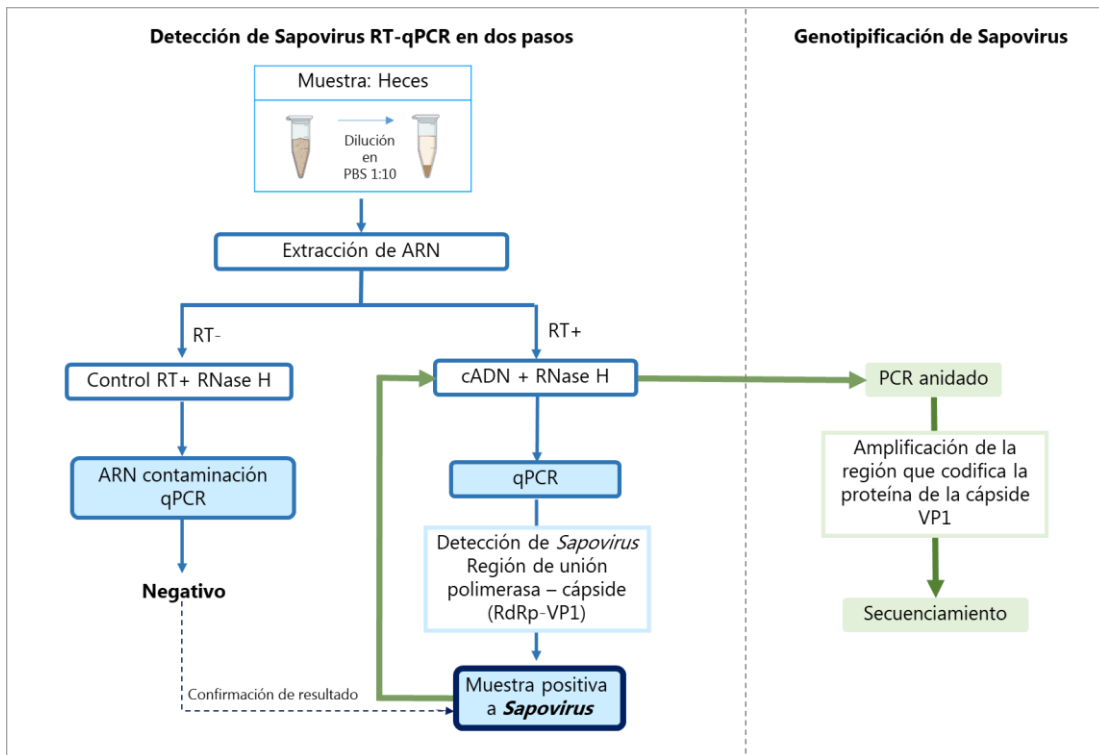


Figura 2. *Flujograma del diseño experimental del estudio matriz y el presente estudio.*

5.3 Áreas de estudio

El estudio matriz se llevó a cabo en Las Pampas de San Juan de Miraflores, población de aproximadamente 50 000 habitantes al sur de la provincia Lima, Perú. Esta comunidad es un asentamiento humano con problemas de impacto sanitario debido a las condiciones de pobreza, mal estado de las viviendas (pisos de tierra) y saneamiento, así como la falta de agua y desagüe, menor acceso a eliminación de excretas y la mala práctica de higiene. La presencia de niños con diarrea es elevada en esta población. El diagnóstico y tratamiento en el área siguen los procedimientos y pautas según las guías del Ministerio de Salud, hidratación; no se administra antibióticos (figura 3).



Figura 3. Ubicación espacial de la comunidad de Pampas de San Juan (círculo rosado) en el distrito de San Juan de Miraflores, Departamento de Lima, Perú.

5.4 Muestras

El estudio matriz seleccionó aleatoriamente 100 niños recién nacidos, los cuales fueron muestreados semanalmente. Se recogieron 9860 muestras de heces durante el seguimiento de los niños enrolados en Pampas de San Juan de Miraflores, incluidas todas las muestras de heces de episodios diarreicos. Las muestras fueron trasladadas a la Universidad Peruana Cayetano Heredia en un plazo de 12 horas para su almacenamiento a -80°C.

El estudio matriz analizó por transcripción reversa y luego por qPCR (RT-qPCR), 1669 muestras de heces (877 muestras de heces diarreica y 792 heces no diarreicas trimestrales por dos años), el resto de muestras de heces fueron conservadas para análisis posteriores. El análisis por RT-qPCR reportó 223 muestras positivas a Sapovirus, solo 117 infecciones obtuvieron genotipificación correspondientes a 64 niños.

El presente estudio para hallar los episodios de excreción por Sapovirus se basó en 117 infecciones genotipificadas de referencia encontradas en 64/100 niños del estudio cohorte.

Se excluyeron 48 infecciones de referencia correspondientes a 17/64 niños por no contar con muestras semanales antes y después con menos de 7 días de diferencia y sin genotipificación exitosa.

Solo 69 infecciones de referencia permitieron detectar 60 episodios de infección por Sapovirus en 47/64 niños, de los cuales 11/47 niños mostraron más de un episodio de excreción de Sapovirus sucesivos. En los 60 episodios detectados se confirmó que el episodio pertenecía a un mismo genotipo, (figura 4).

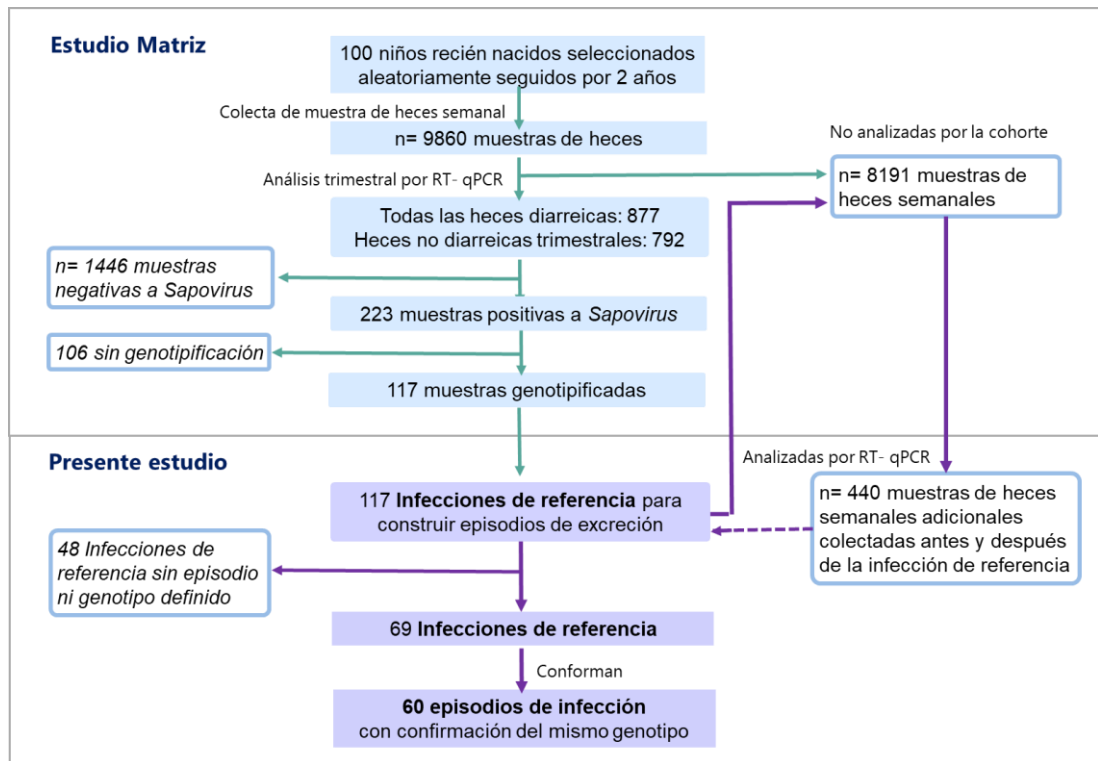


Figura 4. Flujograma de la distribución de individuos del estudio matriz y el presente estudio.

5.5 Definiciones

El proyecto matriz definió como episodio de diarrea a la presencia de tres a más (≥ 3) deposiciones líquidas o semilíquidas en un niño, en un periodo de 24 horas, las mismas que fueron reportadas por el cuidador o la madre.

En el presente estudio se definió a un episodio de excreción por Sapovirus en heces como diarreico cuando al menos una muestra positiva a Sapovirus del episodio correspondía a una deposición diarreica en los siguientes 7 días iniciado el episodio. Mientras que, un episodio de infección por Sapovirus no diarreico se caracterizó cuando todas las muestras positivas que conformaron el episodio correspondían a deposiciones no diarreicas. Los episodios de infección por Sapovirus indefinidos se produjeron cuando al menos una muestra positiva por Sapovirus dentro del episodio correspondía a una deposición diarreica después de los 14 días iniciado el episodio. Se encontraron 60 episodios de infección por Sapovirus, de los cuales: 41 fueron episodios diarreicos, 15 fueron episodios no diarreicos y 4 fueron episodios no definidos.

5.6 Detección de Sapovirus por RT-qPCR en dos pasos

5.6.1 Extracción de ARN usando QIAamp Viral RNA mini Kit

El ARN se purificó a partir de muestras de heces almacenadas a -80°C siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras de

heces se descongelaron a 4°C. A partir de estas muestras, se preparó una suspensión de heces al 10% empleando tampón fosfato salino (PBS, Life Technologies, Estados Unidos)(Apaza *et al.*, 2012). La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 20 000 g. Se tomó una alícuota de 140 µl del sobrenadante sin alterar el sedimento. Se añadió 600 µl de Buffer AVL con carrier ARN (proporcionado por el kit) y la mezcla se incubó durante 10 minutos para permitir una mayor homogenización. Se añadió 560 µl de etanol absoluto al lisado de células y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto. Se transfirió 630 µl del lisado a la columna de purificación, insertada en un tubo colector. Se centrifugó la columna por 1 minuto a 6 000 g. Se descartó el líquido filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo colector. Se añadió 500 µl de buffer AW1 (proporcionado por el kit) a la columna de purificación. Se centrifugó por 1 minuto a 6 000 g. Se descartó el filtrado y se reusó el tubo colector. Luego, se añadió 500 µl de buffer AW2 (incluido en el kit). Se centrifugó por 3 minutos a 20 000 g. Se descartó el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo libre de ARNasas de 1,5 ml. Se añadió 70 µl de buffer AVE al centro de la membrana de la columna. Se centrifugó por 3 minutos a 8 000 rpm para eluir el ARN. El ARN se conservó a -80°C hasta la síntesis del cADN, por un plazo no mayor a una semana.

5.6.2 Síntesis de cADN usando el kit SuperScript® III Reverse Transcriptase

La síntesis de cADN se realizó empleando el kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Estado Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezcló 7 µl de ARN con 1 µl de hexámeros aleatorios (250 µg), 1 µl de dNTPs (10 uM) y 1 µl de agua libre de nucleasas. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos, y se transfirió inmediatamente a un recipiente con hielo durante al menos 1 minuto. Luego, los 10 µl de la mezcla anterior fueron añadidos a un tubo con 4 µl de 5X First-Strand Buffer, 4 µl MgCl₂ (50mM), 1 µl DTT (0.1M), 1 µl RNase Out (40 U/µl), 1 µl SuperStrand III RT (20u/µl). El tubo con la mezcla final se incubó bajo las siguientes condiciones de ciclado: 25°C por 10 minutos, 50°C por 50 minutos y 85°C por 5 minutos, luego en hielo por 1 minuto. Finalmente, se añadió 1 µl de RNase H a la mezcla, se incubó a 37°C por 20 min. La muestra de cADN se almacenó a -20°C hasta su uso en las distintas pruebas de PCR.

Para la reacción control de la transcripción reversa (RT) se reemplazó en la mezcla final 1 µl SuperStrand III RT (20u/µl) por 1 µl de agua libre de nucleasas. La condición de ciclado de la reacción fue la misma descrita antes.

5.6.3 PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan para la detección de Sapovirus

Para la detección de Sapovirus por qPCR se usó el instrumento LightCycler 480 (Roche, Alemania) y el protocolo de TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life Technologies, Foster City, California). El qPCR tuvo como blanco de amplificación la región de unión de la polimerasa y la proteína de la cápside VP1 de Sapovirus. La amplificación se realizó utilizando cebadores y sondas previamente descritos (Oka *et al.*, 2006).

Con el fin de determinar el límite de detección se preparó una curva estándar que cubrió el rango de 10 copias a 1 millón de copias por reacción del plásmido GII.4 proporcionada por el Departamento de Virología de la Universidad de Tohoku (Sendai, Japón). El límite de detección fue de 10 copias que corresponden a un ciclo de cuantificación (Cq) de 38. Una muestra con un valor de $Cq \leq 38$ y una curva de amplificación sigmoideal en la RT-qPCR se consideró como positiva. Las muestras con valores de $Cq > 38$ y < 40 se consideraron positivas si la PCR convencional para el genotipificado era positiva y se identificaba su genotipo.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 10 μ l con 1 μ l de cADN, 2 μ l agua libre de nucleasas, 5 μ L de 2X de

TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Estados Unidos), 10 pmol de cada cebador (Sapovirus124F, Sapovirus1F, Sapovirus5F y Sapovirus1245R) y 10 pmol de cada sonda (Sapovirus124TP y Sapovirus5TP) (Oka *et al.*, 2006), Anexo 1 y 2.

Los controles en la placa de PCR fueron: una muestra positiva a Sapovirus (control positivo), controles sin RT para detectar la presencia de contaminación por ARN, muestra positiva a Norovirus (control negativo) y diluciones de la curva estándar. Para el blanco se usó agua libre de nucleasas.

Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 15 minutos, 45 ciclos, cada uno de los cuales consistió en 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 60 °C durante 30 segundos, y finalmente 60 °C durante 2 minutos. Los resultados fueron analizados empleando el programa del equipo.

5.6.4 Secuenciamiento y análisis de secuencias

Se utilizó la región parcial de la cápside VP1 de Sapovirus para la genotipificación. Todas las muestras positivas de Sapovirus por RT-qPCR se amplificaron mediante una PCR anidado dirigida a la región parcial del gen VP1. La primera reacción de PCR se realizó con los cebadores externos SV F13/F14 y SV R13/R14, mientras que la segunda reacción de PCR se realizó con los cebadores internos SV

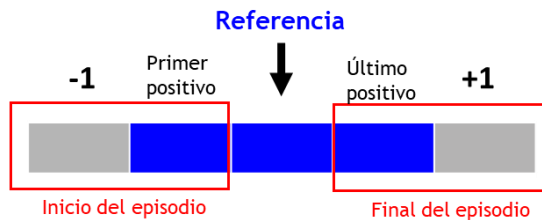
F22 y SV R2(Okada *et al.*, 2006), Anexo 1 y 2. Las condiciones de amplificación para la primera y segunda rondas de PCR anidado fueron 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos, cada uno de los cuales consistió en 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 40 segundos y 72°C durante 1 minuto y luego 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos.

Los productos de amplificación finales del PCR anidado se enviaron para su secuenciamiento a MacroGen USA (Rockville, Maryland). La secuenciación se realizó con los cebadores F22/R2. Los datos de secuenciación se alinearon y recortaron utilizando el software bioinformático Geneious. Los genogrupos y genotipos se asignaron utilizando BLAST y las secuencias consenso.

5.7 Plan de análisis

Los resultados obtenidos por RT-qPCR de dos pasos para la detección de Sapovirus en las muestras de heces adicionales fueron analizados en el software LightCycler480 v1.5 (Roche, Alemania). Luego, los datos fueron ingresados en una base datos construida en Excel 2016 (Microsoft) y se procesaron en el software Prism (Graphpad San Diego, CA).

La duración de los episodios de excreción de Sapovirus se estimó como la diferencia del tiempo en días entre: i) la mediana de las dos fechas al final del episodio, correspondientes al último positivo del episodio y el negativo siguiente y ii) la mediana de las dos fechas al inicio del episodio, correspondientes al negativo anterior al inicio del episodio y el primer positivo del episodio, de acuerdo a la fórmula de Saito, *et al.* 2014 (figura 5).



$$\text{Duración (días)} = \text{Mediana(dos fechas del final)} - \text{Mediana(dos fechas del inicio)}$$

Figura 5. Fórmula para el cálculo de la duración de los episodios de excreción en días.

Se utilizó la prueba estadística no paramétrica U Mann-Whitney para comparar la mediana de la duración en días de los episodios según: los

genogrupos de Sapovirus que infectan humanos (GI, GII, GIV y GV), la edad en meses (0-5, 6-11, 12-17, 18-24), la presencia o ausencia de diarrea y la carga viral, estimación semicuantitativa de la cantidad de Sapovirus (Valor de Cq). En todos los análisis las diferencias con valores $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Para caracterizar la evolución del nivel de la carga viral en el curso de los episodios de excreción de Sapovirus desde el inicio del episodio hasta volverse indetectables por RT-qPCR se graficó las trayectorias de la carga viral (Valor de Cq) por episodio según: los genogrupos de Sapovirus (GI, GII, GIV y GV) y la presencia o ausencia de diarrea en el episodio. Finalmente, el coeficiente de correlación de rangos de Spearman se calculó para la asociación de conjuntos de datos continuos no paramétricos entre las variables carga viral inicial del episodio de excreción (Cq) y la duración del episodio, y también en carga viral inicial del episodio de excreción (Cq) y la edad en meses de los niños infectados.

5.8 Consideraciones éticas

El presente estudio obtuvo aprobación del Comité Institucional de Ética para Humanos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (código SIDISI: 66552) para acceder a las muestras de heces y base de datos del estudio matriz (código SIDISI: 50347). Todos los niños reclutados en el

estudio matriz contaron con un consentimiento informado otorgado por la madre.

VI Resultados

El presente estudio determinó la duración y caracterizó la evolución del nivel de carga viral en el curso de los episodios de excreción de Sapovirus en heces relacionadas a características como edad del individuo, presencia de diarrea, genogrupo del virus y carga viral en niños menores de 2 años con infección por Sapovirus pertenecientes a la comunidad Pampas de San Juan de Miraflores, Lima- Perú, mediante el monitoreo molecular por RT-qPCR de dos pasos, del gen de unión de la polimerasa y la cápside VP1 de Sapovirus, y genotipificación de la cápside VP1 por PCR anidado y secuenciamiento.

6.1 Descripción de los episodios de excreción de Sapovirus detectados en la comunidad peruana Pampa de San Juan de Miraflores

El presente estudio identificó 60 episodios de excreción de Sapovirus en heces de 47 niños infectados (69 infecciones de referencia conformaron episodios). Once niños mostraron más de un episodio de excreción de Sapovirus sucesivos, de los cuales: 9 niños infectados presentaron hasta dos episodios sucesivos y 2 niños infectados hasta tres episodios sucesivos, Tabla 1. Solo 4 niños infectados desarrollaron episodios de excreción sucesivos por el mismo genogrupo, pero distintos para el genotipo.

La categorización por edades (en meses) mostró que más de la mitad (70%) de los episodios de excreción de Sapovirus en heces se presentaron en el segundo año de vida de los niños. La presencia de diarrea en los episodios de

excreción (73.2%) superó a los episodios de excreción con ausencia de diarrea. Entre los episodios, los genogrupos más frecuentes fueron GI (46.7%) y GII (33.3%) mientras que GIV y GV fueron poco frecuentes y predominan en niños mayores a 10 meses de edad. El 60 % de los episodios se presentó una sola vez durante el seguimiento en 24 meses, Tabla 1. En 60 episodios de excreción viral de Sapovirus, no hubo presencia de co-infección con Rotavirus. Sin embargo, 5 episodios de excreción de Sapovirus mostraron co-infección con Norovirus, de los cuales 4 episodios desarrollaron diarrea (Data de proyectos relacionados).

Tabla 1. Características de los episodios de excreción viral de los niños con infección por Sapovirus (n=60)

Características de los episodios de excreción del virus de los niños con infección por Sapovirus		
	n	%
Total	60	100.0
Edad (meses)		
0-5	5	8.3
6-11	13	21.7
12-17	26	43.3
18-24	16	26.7
Presencia de diarrea en el episodio		
No	15	26.8
Si	41	73.2
Indefinido	4	
Genogrupo		
GI	28	46.7
GII	20	33.3
GIV	7	11.7
GV	5	8.3
Episodios sucesivos de excreción en 24 meses		
1	36 (36)	60.0
2	18 (9)	30.0
3	6 (2)	10.0

() Número de niños infectados por Sapovirus

6.2 Duración de los episodios de excreción de Sapovirus en heces

La mediana de la duración de los episodios de excreción de Sapovirus en los niños fue de 18 días (n = 60; rango intercuartílico [RIQ], 12.3-24.5; máximo = 63).

6.2.1 Según edad en meses del individuo

Con el fin de determinar si existe alguna diferencia en la duración de los episodios de excreción por Sapovirus según edad en meses de los niños infectados por Sapovirus, se comparó la duración de los 60 episodios de excreción entre los rangos de edad (0-5, 6-11, 12-17 y 18-24 meses) (figura 6).

La mediana de la duración de los episodios de excreción por Sapovirus en los niños con rango de edad de 0-5 meses fue de 12 días (n = 5; rango intercuartílico [RIQ], 6.5-20; máximo = 29); mientras que la mediana de la duración en los rangos de edad: 6-11 meses (n = 13; rango intercuartílico [RIQ], 12.5-23.5; máximo = 40.5), 12-17 meses (n = 28; rango intercuartílico [RIQ], 13.5-22; máximo = 63) y 18-24 meses (n = 16; rango intercuartílico [RIQ], 7.7-25.3; máximo = 43.5) fue de 18 días, más alta a la duración de los episodios de excreción de los niños con edad 0-5 meses. Sin embargo, no se encontró una diferencia

significativa de la duración de los episodios de excreción de Sapovirus entre los rangos de edades de los niños infectados ($p=0.56$).

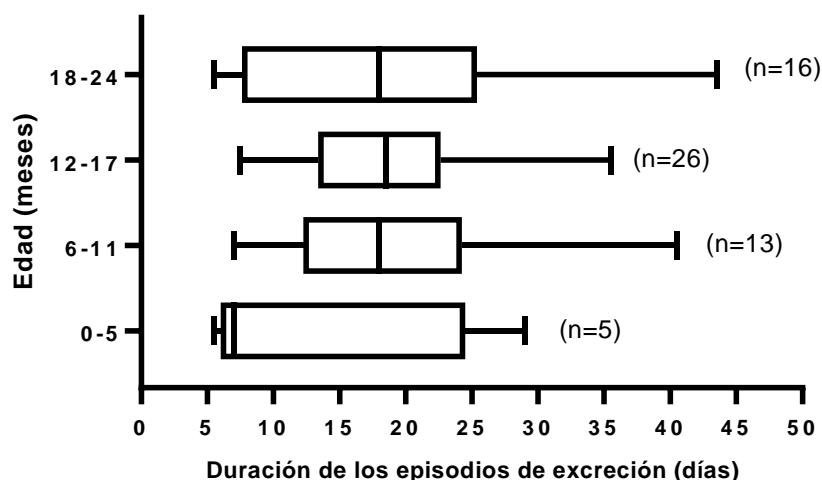


Figura 6. Comparación de la duración de los episodios de excreción de Sapovirus según rango de edad en meses de los niños infectados.

Los niños infectados con Sapovirus en el rango de edad de 0-5 meses mostraron menor duración de excreción de Sapovirus que en los rangos de edades 6-11, 12-17 y 18-24 meses, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Los episodios de excreción de Sapovirus se detectaron mediante RT-qPCR en dos pasos. Los recuadros representan el percentil 25, la mediana y el percentil 75, y los bigotes muestran la duración mínima y máxima de la excreción en días.

6.2.2 Según presencia de diarrea en el episodio

Con el fin de determinar si existe alguna diferencia en la duración de los episodios de excreción de Sapovirus influenciado por la presencia de diarrea en los episodios, se comparó la duración de 56 episodios de excreción entre presencia y ausencia de diarrea. Cuatro episodios de excreción con diarrea fueron excluidos del análisis por presentar la deposición diarreica después de los 14 días iniciado el episodio, es decir se halló en 4 episodios de excreción incertidumbre al atribuir diarrea a causa de la infección por Sapovirus (figura 7).

La mediana de la duración de los episodios de excreción de Sapovirus que no presentaron diarrea fue de 20.5 días ($n = 15$; rango intercuartílico [RIQ], 7.5-25; máximo =43.5); mientras que la mediana de la duración de los episodios de excreción con diarrea fue de 16.5 días ($n = 41$; rango intercuartílico [RIQ], 12.5-22; máximo =63). No se encontró una diferencia significativa de la duración de los episodios de excreción de Sapovirus entre los que presentaron o ausencia de diarrea ($p=0.74$).

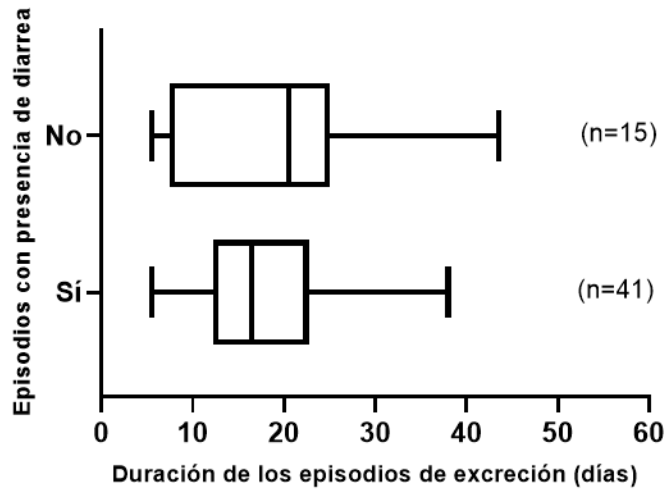


Figura 7. Comparación de la duración de los episodios de excreción de Sapovirus según la presencia o ausencia de diarrea.

Los episodios de excreción de Sapovirus sin diarrea mostraron según la mediana mayor duración en comparación con los episodios de excreción de Sapovirus con diarrea. Esta observación no fue estadísticamente significativa. Los episodios de excreción de Sapovirus se detectaron mediante RT-qPCR en dos pasos. Los recuadros representan el percentil 25, la mediana y el percentil 75, y los bigotes muestran la duración mínima y máxima de la excreción en días.

6.2.3 Según genogrupo de Sapovirus

La duración de los 60 episodios de excreción de Sapovirus con respecto al genogrupo no mostró diferencias. La mediana de la duración de los episodios de excreción de Sapovirus con genotipo GI fue de 15.5 días (n = 28; rango intercuartílico [RIQ], 7.7-24.2; máximo =63); para GII fue 20.2 días (n = 20; rango intercuartílico [RIQ], 14-24; máximo =33.5), para GIV fue 18 (n = 7; rango intercuartílico [RIQ], 11.5-25.5; máximo =29.5) y para GV fue 20 (n = 5; rango intercuartílico [RIQ], 17.5-30; máximo =38), (figura 8).

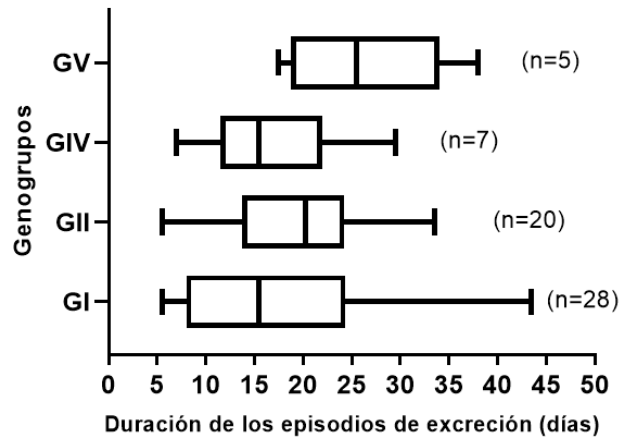


Figura 8. Comparación de la duración de los episodios de excreción de Sapovirus según genotipo.

Los episodios de excreción de Sapovirus no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre genogrupos. Los episodios de excreción de Sapovirus se detectaron mediante RT-qPCR en dos pasos. Los recuadros representan el percentil 25, la mediana y el percentil 75, y los bigotes muestran la duración mínima y máxima de la excreción en días.

6.2.4 Según el valor de la carga viral inicial (Cq) de los episodios

No se identificó correlación significativa entre la duración de los episodios de excreción de Sapovirus y la carga viral inicial del episodio ($p=0.96$). La carga viral inicial de los cuatro genogrupos de Sapovirus es variables y oscilan entre el límite de detección de la RT-qPCR $Cq=38$ y el valor más alto, $Cq=16$ (figura 9).

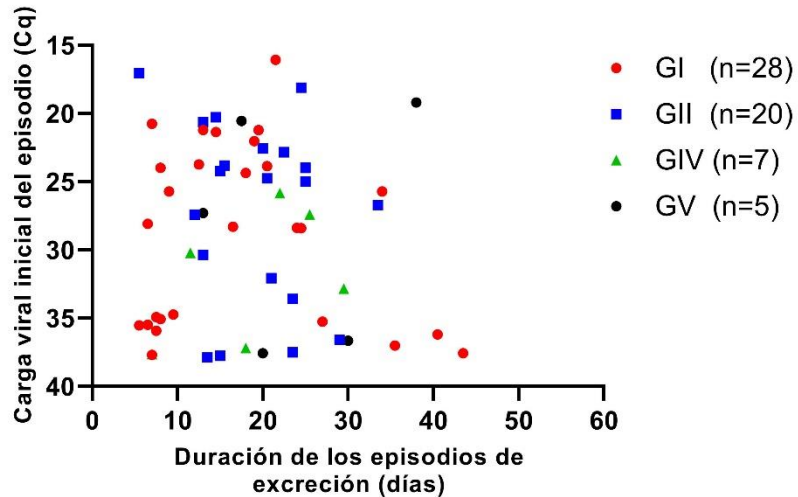


Figura 9. Correlación entre la duración de los episodios de excreción de Sapovirus en heces vs la carga viral inicial (Cq) de los episodios.

La duración de los episodios de excreción de Sapovirus no presentó correlación significativa con la carga viral inicial medidos por RT-qPCR.

6.3 Características de la evolución de la carga viral en el curso de los episodios de excreción de Sapovirus

Los valores del curso de la carga de Sapovirus oscilan entre el límite de detección de la RT-qPCR $C_q=38$ y el valor más alto $C_q=16$. La mediana de todas las muestras positivas a lo largo de los episodios fue de $C_q=30$, [RIQ], 24-35.4.

6.3.1 Según el geogrupo y la presencia de diarrea

Las trayectorias de la carga viral de los 56 episodios de excreción de Sapovirus categorizados en episodios con diarrea y sin diarrea, y por genogrupo de Sapovirus muestran una alta variabilidad en la carga inicial entre los episodios (figura 10). Se presenta una mezcla de episodios con picos pronunciados de carga viral y otros episodios en los que la carga viral se reduce a través del tiempo. No parecen haber diferencias marcadas de los niveles de la carga viral entre los genogrupos de Sapovirus ni una relación con la presencia de diarrea durante el episodio. Se observó una tendencia a la disminución de la carga viral a medida que transcurre el episodio de excreción viral de Sapovirus. No se encontró trayectorias del curso de excreción viral del genogrupo V (GV) entre los episodios de excreción en ausencia de diarrea.

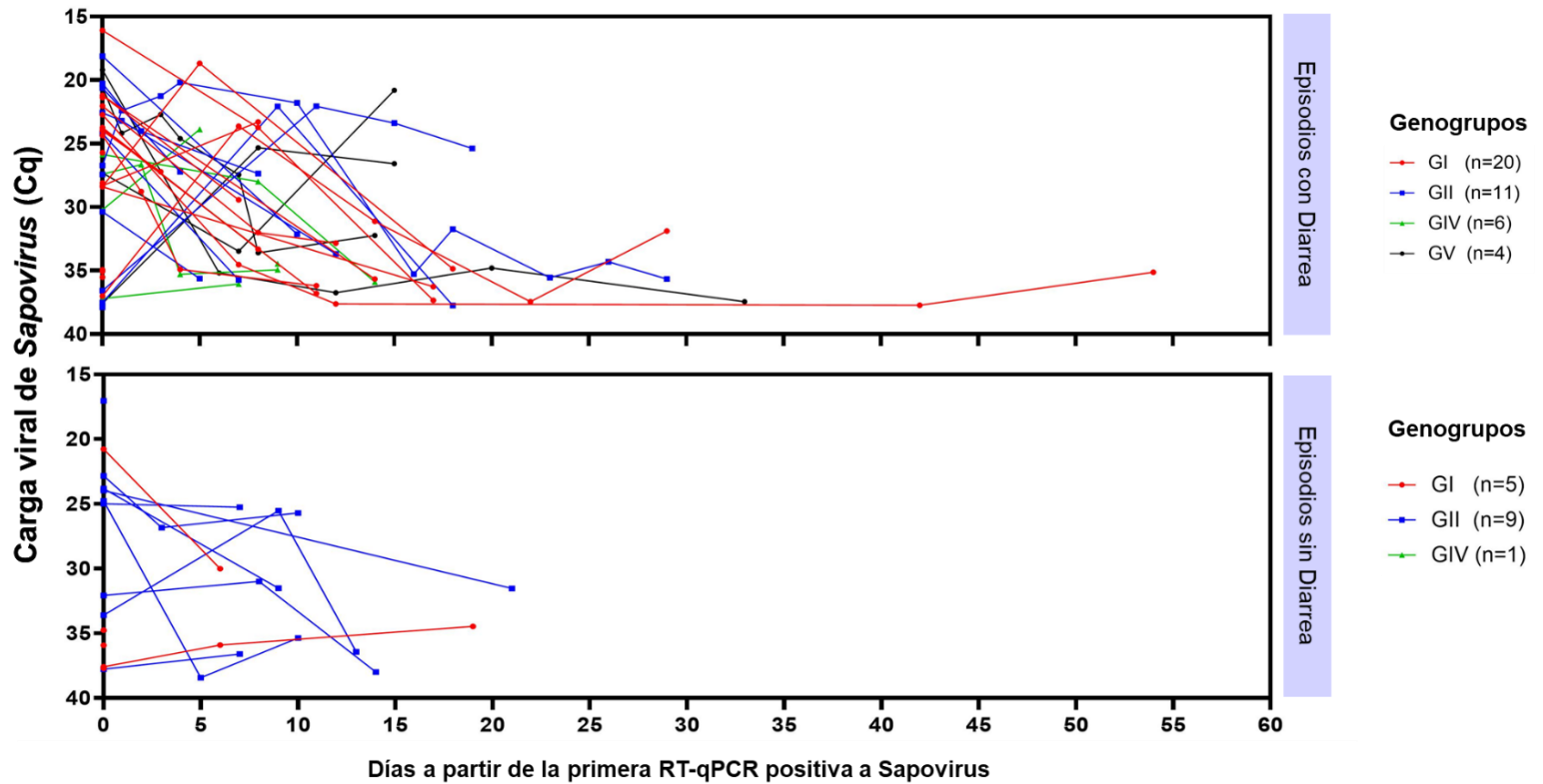


Figura 10. Curso de la carga viral (Cq) de los episodios de excreción de Sapovirus categorizados por genogrupo de Sapovirus y presencia de diarrea en el episodio.

Se muestra la carga viral en la unidad de detección de diagnóstico por RT-qPCR (Cq) en las muestras de heces que conformaron los episodios de excreción con respecto al tiempo en días. El día 0 del eje de las abscisas se ha definido como el día de la primera prueba de RT-qPCR positiva para Sapovirus.

6.3.2 Según la presencia de diarrea en los episodios de excreción por Sapovirus

Se puede apreciar que el signo clínico, diarrea, en 41 episodios de excreción de Sapovirus en su mayoría ocurrieron en los 10 primeros días del episodio. Sin embargo, la carga viral en este periodo de tiempo muestra una alta variabilidad entre los episodios. Tras los 10 días iniciales, se observa una tendencia de disminución de las cargas virales (figura 11).

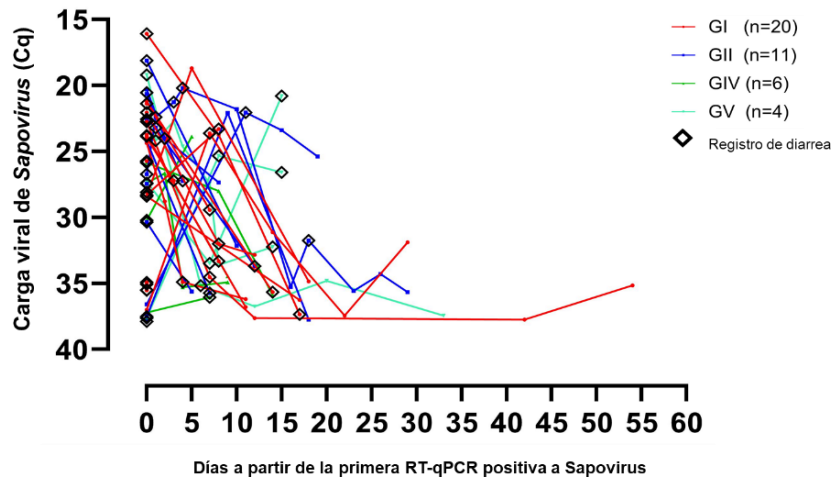


Figura 11. Curso de la carga viral (Cq) de los episodios de excreción de Sapovirus que registraron diarreas.

El símbolo rombo en la gráfica corresponde al registro de diarrea dentro del episodio de excreción de Sapovirus en heces.

6.3.3 Carga viral inicial (Cq) de los episodios de excreción de Sapovirus respecto a la edad

La mayoría de episodios de excreción de Sapovirus ocurren a partir del décimo mes de edad (figura 12). La variabilidad en la carga viral inicial es elevada en todo momento. Se identificó una correlación significativa entre edad y la carga viral inicial del episodio ($p=0.04$). Se muestra una tendencia de reducción de la carga viral inicial del episodio a partir de los 10 meses de edad. Los genogrupos IV y V muestran una tendencia a aparecer después de los genogrupos I y II. No se evaluó una relación entre genogrupo y edad en meses debido al reducido tamaño de muestra por genogrupo.

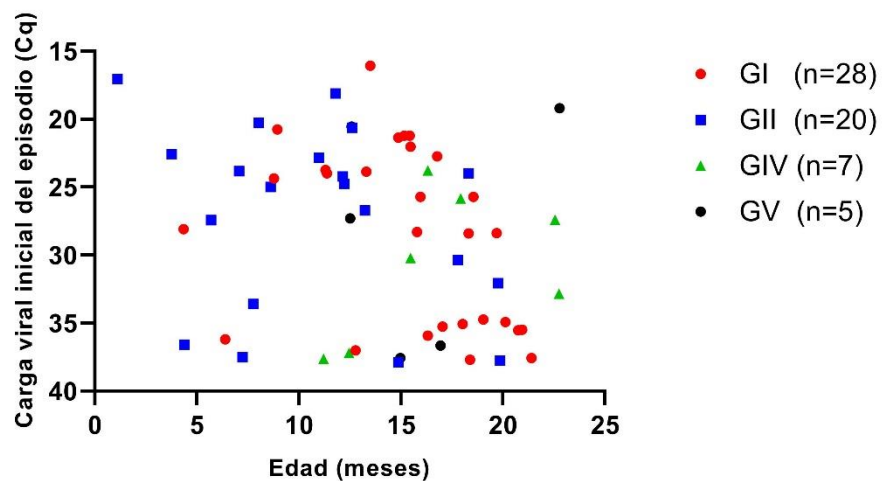


Figura 12 Correlación entre la edad en meses de los individuos vs la carga viral inicial (Cq) de los episodios de excreción de Sapovirus en heces.

VII Discusión

Se ha reportado que la medida de la duración de los síntomas por Sapovirus subestima la duración de la excreción viral en heces. Estudios en niños de Alemania con el sistema inmune deprimido señalan que Sapovirus se excreta de manera prolongada, incluso después de haberse recuperado de los síntomas (Pietsch and Liebert, 2019). Por lo que, se necesita conocer la duración de la excreción viral y cómo evoluciona la carga viral por Sapovirus en entornos comunitarios.

En este contexto, el presente estudio estimó la duración y caracterizó la evolución del nivel de carga viral del curso de los episodios de excreción de Sapovirus en heces, en valores del ciclo de RT-qPCR (Cq), e intentó relacionar ambas medidas respecto a la edad del individuo, el genogrupo del virus, la presencia o ausencia de diarrea en los episodios y la carga viral inicial del episodio.

Para lograr esto, se identificó por RT-qPCR de dos pasos y genotipificación, 60 episodios de excreción de Sapovirus en heces de 47 niños infectados por Sapovirus, provenientes de Pampas de San Juan de Miraflores, Lima – Perú.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la excreción de Sapovirus en heces tienen un periodo de excreción de alrededor de dos semanas. Además, se reportó que una menor carga viral inicial de los episodios de excreción se relaciona con niños infectados mayores de 10 meses de edad, y que la carga viral disminuye con el curso del episodio de excreción.

Con el fin de demostrar que las duraciones de los episodios de excreción varían de acuerdo a la edad del individuo infectado, presencia o en ausencia de diarrea, genogrupos y/o carga viral inicial, se analizó la mediana de la duración de 60 episodios de excreción por Sapovirus según las características mencionadas.

Se encontró que la presencia de los episodios de excreción por Sapovirus fue mayor en el segundo año de vida de los niños (70%) en comparación al primer año de vida (30%) (Tabla 1). Además, que el rango de edad de 0-5 meses mostró una tendencia de menor duración de los episodios de excreción en comparación a los rangos de edades de 6-11, 12-17 y 18-24 meses (Figura 6). Estos hallazgos sugieren, la protección de la lactancia materna y/o los anticuerpos maternos transferidos a los bebés en el útero o a través de la lactancia, o una baja exposición a Sapovirus durante los primeros seis meses de vida. Sin embargo, esta diferencia en la duración del episodio de excreción por el rango de edad en meses no fue estadísticamente significativa. Un estudio previo, especula que la protección contra Sapovirus podría seguir a la de Norovirus, para el que se han detectado anticuerpos en la leche materna (Makita *et al.*, 2007; Labayo *et al.*, 2020).

Respecto a la duración de los episodios de excreción y la presencia y/o ausencia de diarrea, se encontró que el 73.2% de los episodios de excreción presentaron diarrea y el 26.8% se mantuvieron en ausencia de ella (Tabla1). El rango de edad de 12-17 meses fue el que más proporción tuvo en el grupo de diarrea (91.3%). Lo que se corrobora con informes recientes que, Sapovirus se presenta con diarrea en el segundo año de vida y en ausencia de diarrea en menores de 1 año de edad (Saito *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016), posiblemente reflejando el efecto protector de la lactancia materna.

Asimismo, no se evidenció diferencia significativa entre la duración de los episodios de excreción por Sapovirus en presencia o ausencia de diarrea (Figura 7), lo que sugiere que la leche materna interrumpe la progresión hacia la diarrea, pero no evita la colonización intestinal por el virus (Levine and Robins-Browne, 2012). De esta manera, el virus seguirá siendo excretado de forma asintomática.

En este estudio, los genogrupos más frecuentes fueron GI (46.7%) y GII (33,3%) mientras que GIV (11.7%) y GV (8.3%) fueron poco frecuentes (Tabla1), similar a lo reportado en los casos de gastroenteritis en todo el mundo (Lasure and Gopalkrishna, 2017). Los resultados de la duración de los episodios de excreción frente a los genogrupos no lograron tener diferencias estadísticamente significativas (Figura 8). Sin embargo, para el genogrupo GV, se observa una tendencia de mayor duración de los episodios de excreción por Sapovirus respecto a GI, GII y GIV.

Debido a que no se encontró diferencias significativas entre la duración de los episodios de excreción y las características aquí evaluadas, se decidió analizar la carga inicial de los episodios de excreción por Sapovirus versus su duración. No se encontró correlación entre la carga inicial de los episodios de excreción y la duración. Se observó una alta variabilidad de la carga inicial entre genogrupos y no se halló una carga viral inicial “*umbral*” que pronostique una duración de excreción viral prolongada (Figura 9).

En resumen, nuestros resultados podrían indicar dos escenarios: el primero, en el cual las características edad, diarrea y genogrupo no generan una diferencia en la duración

de los episodios de excreción por Sapovirus; o el segundo, en el cual el tamaño muestral empleado en este estudio no fue suficiente para lograr evidenciar una diferencia entre grupos respecto a la duración de los episodios de excreción. No obstante, este trabajo muestra un escenario que amerita que se hagan más estudios sobre si la duración de los episodios de excreción difieren según la edad del individuo, el genogrupo del virus, la presencia de diarrea en los episodios y la carga viral inicial del episodio.

Este estudio mostró un número muestral de los episodios de excreción por genogrupo reducido. Es posible que este hecho, se deba a una baja sensibilidad de la prueba de PCR anidado empleada para la genotificación del gen de la cápside VP1 en muestras positivas a Sapovirus o que efectivamente este genogrupo se encuentre en baja frecuencia. Cabe resaltar que se analizaron 117 muestras positivas a Sapovirus con genotipificación provenientes del estudio matriz para armar los episodios de excreción, tomando muestras antes y después de la muestra de referencia. Ciento seis muestras positivas a Sapovirus no obtuvieron genotipificación por el estudio matriz, por lo que no se procedió a armar los episodios de excreción en ellos. Se dio prioridad a los episodios de excreción con genotificación, ya que hay especial interés en proponer genotipos como blanco de vacuna específicos.

En general, este trabajo encontró una mediana de duración de 18 días para la excreción de Sapovirus en heces de niños menores de dos años en Pampas de San Juan de Miraflores, similar a lo encontrado por un estudio tipo cohorte en Japón que analizó niños mayores y adultos infectados por Sapovirus en comunidad, quienes reportaron que la excreción de Sapovirus en heces disminuyó después de los 14 días (Iwakiri *et*

al., 2009). Por otro lado, si se comparara la duración de la excreción de Sapovirus con la duración de excreción por Norovirus, Sapovirus muestra una duración de los episodios de excreción inferior (Saito *et al.*, 2014). Esta diferencia sugiere que la respuesta inmunitaria podría ser más eficaz para la eliminación de Sapovirus a diferencia de Norovirus, o que Norovirus sea más virulento.

Con respecto a las trayectorias de la carga viral de los 56 episodios de excreción de Sapovirus, categorizados en episodios con diarrea y sin diarrea, y por genogrupo de Sapovirus, se observó una alta variabilidad en la carga inicial entre los episodios. Además, se evidenció una mezcla de picos pronunciados de carga viral y otros episodios en los que la carga viral se reduce a través del tiempo. No se evidenció diferencias marcadas de los niveles de la carga viral entre los genogrupos de Sapovirus ni una relación con la presencia de diarrea durante el episodio (Figura 10). Esta descripción de los episodios de excreción por Sapovirus concuerda con la variabilidad reportada por Iwakiri *et al.*, que encontró individuos con excreciones de Sapovirus que disminuían hasta un nivel indetectable en 2 semanas, y otros que excretaban Sapovirus en las heces en altas concentraciones durante 2-4 semanas después del inicio de la enfermedad.

El signo clínico, diarrea, en 41 episodios de excreción de Sapovirus en su mayoría ocurrieron en los 10 primeros días del episodio de excreción, con una tendencia de disminución de la carga viral después de la desaparición de la diarrea (Figura 11). Sin embargo, la carga viral en la deposición diarreica mostró una alta variabilidad entre los episodios. Lo que podría indicar que, la carga viral de Sapovirus no puede utilizarse

para predecir la condición de salud del individuo, por ejemplo, si el niño tendrá o no diarrea. Esto sugiere que durante todo el episodio de excreción de Sapovirus hay riesgo de transmisión, y no solo en el momento que se coincide con diarrea. No obstante, es necesario estudios que determinen la cantidad mínima de partículas virales de Sapovirus necesaria para infectar al hospedero y el tiempo que puede permanecer viable la partícula viral en el ambiente a través de estudios en cultivos celular para Sapovirus.

Se identificó una tendencia de reducción de la carga viral inicial del episodio a medida que la edad aumenta, coincidente con un estudio previo que reportó que la edad avanzada es un factor de protección contra la diseminación de los virus gastrointestinales (Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2019). Además, se identificó que la mayoría de episodios de excreción de Sapovirus ocurrieron a partir del décimo mes de edad, siendo GI y GII quienes predominaron a lo largo de los 2 años de vida de los niños, y GIV y GV a partir del segundo año (Figura 12). Dado que Sapovirus comprende solo 4 genogrupos, es posible que los niños menores a los 6 meses de edad en comunidad hayan desarrollado inmunidad a cepas frecuentes como GI y GII, permitiendo que cepas poco comunes como GV se propaguen en el segundo año de vida del niño, ya que no tiene una historia previa de infección a esta cepa, y no han desarrollado inmunidad.

Este estudio observó una mayor frecuencia de los episodios de excreción de Sapovirus en heces en el segundo año de vida de los recién nacidos, lo que podría ser efecto del decaimiento de la inmunidad materna y la cada vez más habitual exposición del niño a

los alimentos o ambientes contaminados. Lo opuesto sucede con las cargas virales iniciales de Sapovirus, que se reducen a partir del décimo meses de vida, sugiriendo que la exposición frecuente al virus permite al niño desarrollar una respuesta inmune frente a Sapovirus. Como ya se ha señalado, la lactancia materna durante los primeros 6 meses de vida se asocia con una menor probabilidad de detectar patógenos entéricos importantes en los primeros meses de vida (McCormick *et al.*, 2021), lo que corrobora la baja presencia de episodios de excreción en los primeros meses de vida de los niños infectados del estudio.

Los niños presentaron hasta 3 episodios de excreción por Sapovirus sucesivos en sus 2 primeros años de vida. Treinta y seis niños presentaron un único episodio, 9 niños presentaron 2 episodios, y 2 niños presentaron hasta 3 episodios (Tabla 1). Se detectaron 12 genotipos de 17 que se conocen, basados en una variación de >20-1% en las secuencias completas de la cápside VP1 (Oka *et al.*, 2015) (Anexo 3). Once niños tuvieron reinfección con diferentes genotipos (Anexo 4), también observado en Japón y Perú. De forma similar a otros informes, GI.1 (28.3%) y GII.1 (13.3%) fueron los genotipos más comunes detectados en nuestro estudio (Anexo 3). El GII.5 no se detectó, en comparación a estudios en Tailandia, Guatemala, Sudáfrica, Estados Unidos e incluso Perú (Liu *et al.*, 2016; Murray *et al.*, 2016; Diez-Valcarce *et al.*, 2018). Lo que sugiere que este genotipo circula en área y años diferentes. Nuestros datos indican que las vacunas contra Sapovirus pueden necesitar incluir múltiples genotipos, por la gran diversidad de variantes circulantes halladas en comunidad.

Se dispone de muy poca información sobre la inmunidad protectora contra la infección por Sapovirus. Los sueros recogidos de humanos infectados de forma natural o de animales inmunizados contra la proteína VP1 recombinante de Sapovirus han demostrado poca reactividad cruzada entre los genogrupos (Zweigart *et al.*, 2021). Lo que ha sugerido que las primeras infecciones por Sapovirus proporcionan inmunidad frente a las infecciones homólogas, pero poca protección frente a las infecciones de diferentes genogrupos, y posiblemente diferentes genotipos. Además, la baja incidencia de episodios sintomáticos de Sapovirus en los primeros meses de vida en los estudios epidemiológicos apoya la protección temprana de la inmunidad materna (Zweigart *et al.*, 2021).

Por último, se ha notificado con frecuencia co-infecciones de Sapovirus y otros enteropatógenos (Makhaola, Moyo and Kebaabetswe, 2020). En el presente estudio se encontró 5 episodios de excreción mixta con Norovirus (8.3%) a partir del sexto mes de vida de los niños, 4 episodios tuvieron presencia de diarrea y 1 episodio se desarrolló en ausencia de diarrea. Ningún episodio de excreción mostró co-infección con Rotavirus (Anexo 5), a pesar que durante el seguimiento aún no se había implementado la vacuna contra Rotavirus en los niños. Lo que sugiere que los niños del estudio infectados por Sapovirus probablemente también albergaban co-patógenos (virales, bacterianos o parasitológicos), no detectados por este estudio, que contribuían a los síntomas.

VIII Conclusiones

- La mediana de tiempo de los episodios de excreción de Sapovirus fue ~ 18 días por RT-qPCR.
- La edad del individuo, la presencia de diarrea, el genogrupo de Sapovirus y la carga viral inicial del episodio no demostraron afectar la duración de los episodios de excreción por el virus.
- La evolución de la carga viral en el curso de los episodios de excreción muestra una tendencia a reducirse con el tiempo. No se muestra una diferencia marcada entre los genogrupos ni una relación con la presencia de diarrea durante el episodio.
- Las cargas virales iniciales de los episodios de excreción se reducen a partir de los 10 meses de edad de los niños infectados por Sapovirus.

IX Limitaciones y Recomendaciones

- El diseño del estudio matriz fue usado como recurso para estimar la duración de los episodios de excreción de Sapovirus en heces y caracterizar la evolución del nivel de carga viral en el curso del episodio, y explorar la relación entre ambas medidas respecto a la edad del individuo, el genogrupo del virus, la presencia o ausencia de diarrea en los episodios y la carga viral inicial del episodio. Se recomienda enrolar a 150 niños recién nacidos al azar en un estudio tipo cohorte por dos años, interesado en conocer la duración de los episodios de excreción de Sapovirus en una comunidad peruana.
- En éste estudio se estimó la cantidad de Sapovirus presente en las muestras de heces según el valor de Cq de la RT-qPCR. Se recomienda elaborar curvas estándar para cada genogrupo de Sapovirus, así obtener una cuantificación precisa de carga viral para cada cepa de Sapovirus.
- No se evaluó la relación entre la inmunidad y la duración de la excreción por Sapovirus. Se recomienda explorar la inmunidad a Sapovirus en una cohorte de niños menores de cinco años que incluyan también marcadores de inmunidad general y específicos de las cepas de Sapovirus.
- Este estudio identificó episodios de excreción de Sapovirus en heces de niños con infección por Sapovirus; sin embargo, cabe la posibilidad que el niño este coinfectado con otros patógenos entéricos, lo que dificulta la capacidad para atribuir a un episodio de excreción con presencia de diarrea a un único patógeno. Se recomienda realizar diagnósticos para otros patógenos diarreicos.

X Referencias bibliográficas

1. Reiner, R. C. et al. Mapping geographical inequalities in childhood diarrhoeal morbidity and mortality in low-income and middle-income countries, 2000–17: analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* 395, 1779–1801 (2020).
2. Juliao, P. et al. Acute Gastroenteritis Morbidity and Mortality Trends Following Universal Rotavirus Vaccination in Children in Peru: Ecological Database Study with Time-Trend Analysis. *Infect. Dis. Ther.* 10, 2563–2574 (2021).
3. Bucardo, F., Reyes, Y., Svensson, L. & Nordgren, J. Predominance of Norovirus and Sapovirus in Nicaragua after Implementation of Universal Rotavirus Vaccination. *PLoS ONE* 9, e98201 (2014).
4. Liu, X. et al. Etiological Role and Repeated Infections of Sapovirus among Children Aged Less than 2 Years in a Cohort Study in a Peri-urban Community of Peru. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1598–1604 (2016).
5. Oka, T., Wang, Q., Katayama, K. & Saif, L. J. Comprehensive Review of Human Sapoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 32–53 (2015).
6. Lasure, N. & Gopalkrishna, V. Epidemiological profile and genetic diversity of sapoviruses (SaVs) identified in children suffering from acute gastroenteritis in Pune, Maharashtra, Western India, 2007–2011. *Epidemiol. Infect.* 145, 106–114 (2017).

7. Takagi, H. et al. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 32078–32085 (2020).
8. Cunliffe, N. A., Glass, R. I. & Nakagomi, O. 18 - Rotavirus and Other Viral Diarrhoea. in *Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-third Edition)* (eds. Farrar, J. et al.) 207-214.e3 (W.B. Saunders, 2014).
9. Pietsch, C. & Liebert, U. G. Intrahost viral evolution during chronic sapovirus infections. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 113, 1–7 (2019).
10. Stuempfig, N. D. & Seroy, J. Viral Gastroenteritis. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
11. Ballard, S.-B. et al. Enteropathogen Changes After Rotavirus Vaccine Scale-up. *Pediatrics* 149, e2020049884 (2022).
12. Perin, J. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet Child Adolesc. Health* 0, (2021).
13. Chiejina, M. & Samant, H. Viral Diarrhea. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
14. Noel, J. S. et al. Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *J. Med. Virol.* 52, 173–178 (1997).

15. Farkas, T. et al. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch. Virol.* 149, 1309–1323 (2004).
16. Berke, T. et al. Phylogenetic analysis of the caliciviruses. *J. Med. Virol.* 52, 419–424 (1997).
17. Jiang, X. et al. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 83, 145–154 (1999).
18. Honma, S., Nakata, S., Kinoshita-Numata, K., Kogawa, K. & Chiba, S. Evaluation of Nine Sets of PCR Primers in the RNA Dependent RNA Polymerase Region for Detection and Differentiation of Members of the Family Caliciviridae, Norwalk Virus and Sapporo Virus. *Microbiol. Immunol.* 44, 411–419 (2000).
19. Rachakonda, G. et al. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children with acute sporadic gastroenteritis in New Delhi, India. *J. Clin. Virol.* 43, 42–48 (2008).
20. Oka, T. et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 78, 1347–1353 (2006).
21. Chan, M. C. W. et al. Sapovirus detection by quantitative real-time RT-PCR in clinical stool specimens. *J. Virol. Methods* 134, 146–153 (2006).
22. Jiang, Y. et al. Simultaneous Detection of Five Enteric Viruses Associated with Gastroenteritis by Use of a PCR Assay: a Single Real-Time Multiplex Reaction and Its Clinical Application. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1266–1268 (2014).

23. Okada, M., Shinozaki, K., Ogawa, T. & Kaiho, I. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch. Virol.* 147, 1445–1451 (2002).
24. Monica, B. et al. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. *J. Med. Virol.* 79, 544–551 (2007).
25. Yan, H., Yagyu, F., Okitsu, S., Nishio, O. & Ushijima, H. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J. Virol. Methods* 114, 37–44 (2003).
26. Liu, Y. et al. Simultaneous Detection of Seven Enteric Viruses Associated with Acute Gastroenteritis by a Multiplexed Luminex-Based Assay. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2384–2389 (2012).
27. Harada, S. et al. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J. Med. Virol.* 81, 1117–1127 (2009).
28. Iwakiri, A. et al. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Arch. Virol.* 154, 689–693 (2009).
29. Hansman, G. S. et al. Outbreak of Gastroenteritis Due to Sapovirus. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1347–1349 (2007).

30. Apaza, S. et al. Detection and Genogrouping of Noroviruses from Children's Stools By Taqman One-step RT-PCR. *J. Vis. Exp. JoVE* 3232 (2012).
31. Okada, M. et al. Genetic variability in the sapovirus capsid protein. *Virus Genes* 33, 157–161 (2006).
32. Makita, K. et al. First detection of IgA against norovirus in breast milk. *Clin. Lab.* 53, 125–128 (2007).
33. Labayo, H. K. M. et al. Norovirus-specific immunoglobulin A in breast milk for protection against norovirus-associated diarrhea among infants. *eClinicalMedicine* 27, (2020).
34. Saito, M. et al. Multiple Norovirus Infections in a Birth Cohort in a Peruvian Periurban Community. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 58, 483–491 (2014).
35. Levine, M. M. & Robins-Browne, R. M. Factors That Explain Excretion of Enteric Pathogens by Persons Without Diarrhea. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 55, S303–S311 (2012).
36. Hebbelstrup Jensen, B. et al. Children Attending Day Care Centers are a Year-round Reservoir of Gastrointestinal Viruses. *Sci. Rep.* 9, 3286 (2019).
37. McCormick, B. J. J. et al. Full breastfeeding protection against common enteric bacteria and viruses: results from the MAL-ED cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.* nqab391 (2021).

38. Murray, T. Y., Nadan, S., Page, N. A. & Taylor, M. B. Diverse sapovirus genotypes identified in children hospitalised with gastroenteritis in selected regions of South Africa. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 76, 24–29 (2016).
39. Diez-Valcarce, M. et al. Genetic diversity of human sapovirus across the Americas. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 104, 65–72 (2018).
40. Zweigart, M. R. et al. Serological Humoral Immunity Following Natural Infection of Children with High Burden Gastrointestinal Viruses. *Viruses* 13, 2033 (2021).
41. Makhaola, K., Moyo, S. & Kebaabetswe, L. P. Distribution and Genetic Variability of Sapoviruses in Africa. *Viruses* 12, 490 (2020).

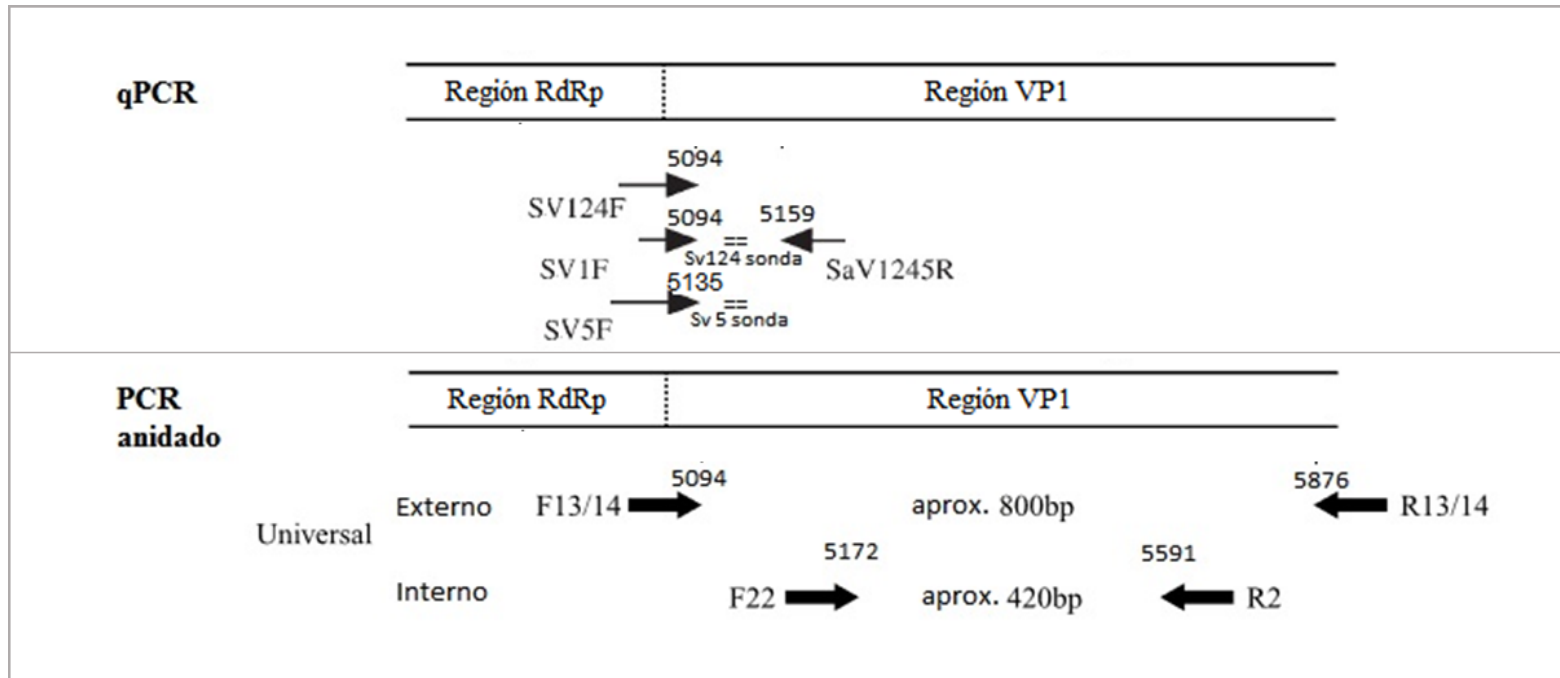
Anexos

Anexo 1 Primers y sondas para la detección y genotipificación de Sapovirus.

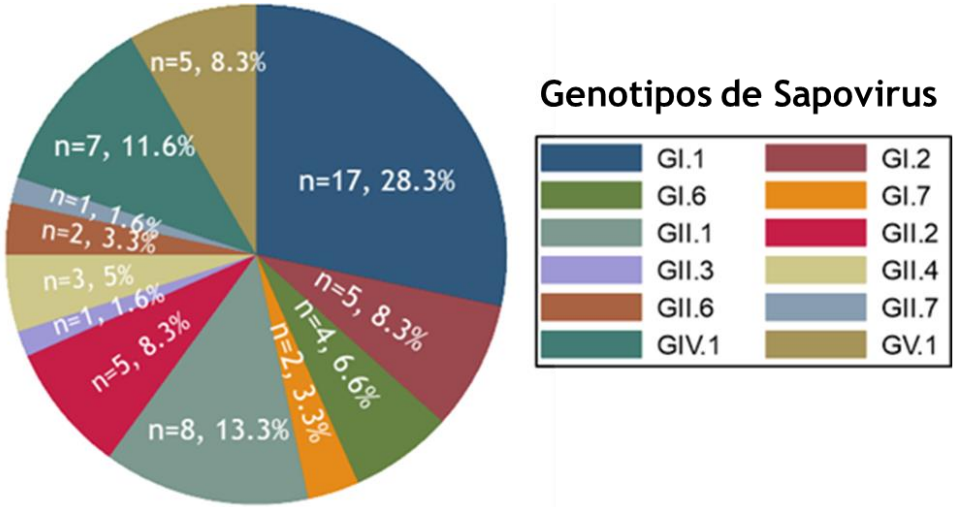
Uso	Cebador/Sonda	Secuencia de nucleótidos (5'→3')	Polaridad ^a	Posición
qPCR	SAV 1F	TTGGCCCT+D9:D14CGCCACCTAC	+	5077-5094
	SAV 5F	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC	+	5112-5135
	SAV 124F	GAYCASGCTCTCGCYACCTAC	+	5074-5094
	SAV1245R	CCCTCCATYTCAAACACTA	-	5159-5177
	SAV 124 sonda	VIC-CCRCCTATRAACCA-MGB	-	5101-5117
	SAV 5 sonda	VIC-TGCCACCAATGTACCA-MGB	-	5142-5157
Genotificación cápside	SV F13	GAYYWGGCYCTCGCYACCTAC	+	5074-5094
	SV R13	GGTGANAYNCCATTKTCCAT	-	5876-5861
	SV F14	GAACAAGCTGTGGCATGCTAC	+	5074-5094
	SV R14	GGTGAGMMYCCATTCTCCAT	-	5876-5861
	SV F22	SMWAWTAGTGTTTGARATG	+	5154-5172
	SV R2	GWGGGRTCAACMCCWGGTGG	-	5591-5177

a. + (sentido) y – (antisentido)

Anexo 2. Esquema del genoma de Sapovirus y la ubicación de los primers empleados en el estudio.



Anexo 3. Diagrama de torta que muestra la diferenciación de los 60 episodios de excreción por Sapovirus por genotipo.



Anexo 4. Diagrama de los genotipos de los episodios de excreción sucesivos por Sapovirus presentes en 11 niños



Anexo 5. Número de co-infecciones en los episodios de excreción por Sapovirus según rango de edad

