

MONITOREO POBLACIONAL DE GENOTIPOS DE ROTAVIRUS EN EFLUENTES CLOACALES Y MUESTRAS CLÍNICAS

ROTAVIRUS GENOTYPES SURVEILLANCE IN SEWAGE AND CLINICAL SAMPLES.

Patricia A. Barril, Miguel O. Giordano, María B. Isa, Gisela Masachessi, Laura C. Martínez, Silvia V. Nates

RESUMEN

Antecedentes. La vigilancia de rotavirus se basa en casos clínicos, los cuales sólo incluyen infecciones sintomáticas. La implementación de un método que permita obtener una visión global de la epidemiología de los rotavirus circulantes en la comunidad sería importante. **Objetivos.** Evaluar si el monitoreo de aguas cloacales municipales podría ser una alternativa para la investigación de la epidemiología de los rotavirus. **Materiales y métodos.** Se comparó la distribución genotípica de los rotavirus presentes en efluentes cloacales con aquellos detectados en muestras clínicas locales. El estudio se llevó a cabo desde Enero a Diciembre de 2006, colectando semanalmente muestras cloacales (n=52) y materias fecales de niños con diarrea aguda por rotavirus (n=50) según demanda. Los efluentes cloacales fueron concentrados 100X y los ARN extraídos de los concentrados cloacales y muestras clínicas fueron G tipificados. **Resultados.** Se detectaron coinfecciones de G tipos de rotavirus en el 31.9% de las muestras clínicas, totalizando 66 G tipos. Del mismo modo, más de un G tipo fue frecuentemente identificado en muestras cloacales, contabilizando 64 G tipos detectados en estas muestras. La distribución proporcional de los G tipos de rotavirus en muestras clínicas y cloacales fue similar: G1 fue detectado en el 28.8% de las muestras clínicas y en el 26.6% de las muestras cloacales; G3 25.8% y 21.9%; G2 10.6% y 15.6%; G4 21.2% y 17.2%; G8 0% y 1.6%; G9 13.6% y 17.2%, respectivamente. **Conclusión.** La vigilancia ambiental podría ser un sistema alternativo a la clínica para monitorear los G tipos de rotavirus circulantes en una comunidad.

Palabras claves: Rotavirus, infección por rotavirus, Aguas residuales, Vigilancia sanitaria

ABSTRACT

Background. Routine rotavirus surveillance is based in clinical cases, which only includes symptomatic infections. The implementation of a method which provides an overview of the epidemiology of rotaviruses circulating in the community would be important. **Objective.** To evaluate whether the monitoring of communal sewage could provide a surrogate for investigating the epidemiology of rotavirus. **Materials and Methods.** The genotype distribution of rotavirus in effluent samples from a local sewage treatment plant was compared to those from local clinical cases. The study was carried out from January to December 2006, collecting weekly sewage samples (n=52) and stool samples from children with acute non-bacterial diarrhea (n=70). The effluent specimens were 100X concentrated and RNA extracts from concentrated sewage and clinical samples were genotyped for rotavirus VP7 gene. **Results.** Rotavirus G genotype coinfections were detected in 31.9% of the clinical samples, rendering a total of 66 G types detected. In the same way, more than one rotavirus G genotype was frequently identified in sewage with a total of 64 G types detected in this kind of samples. The proportional distribution of the rotavirus G types in sewage and clinical samples was similar: G1 accounted for 26.6% of the typed sewage isolates and 28.8% of the clinical infections; G3 type 21.9% and 25.8%; G2 type 15.6% and 10.6%; G4 type 17.2% and 21.2%; G8 type 1.6% and 0%; G9 type 17.2% and 13.6%, respectively. **Conclusion.** Sewage surveillance could be used as an alternative system to monitor rotavirus G types circulating in a community.

Keywords: Rotavirus, Rotavirus Infections, Sewage, Health Surveillance

Laboratorio de Gastroenteritis Virales y Sarampión. Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Enfermera Gordillo Gómez s/n - Ciudad Universitaria. CP 5000. Córdoba, Argentina. snates@cmefcm.uncor.edu

INTRODUCCIÓN

La diarrea aguda constituye un importante problema de salud pública en los países en desarrollo debido a las altas tasas de morbi-mortalidad que registra principalmente en niños menores de 5 años. Según la Organización Mundial de la Salud se estima que cada año se presentan 1300 millones de episodios de diarrea en este grupo etareo en los países en desarrollo y 1.6 millones de muertes por diarrea aguda como consecuencia de deshidratación, en el 50-70% de los casos. Los países en vías de desarrollo son el escenario más fértil para la enfermedad grave ya que desde el punto de vista ecológico, las diarreas son consecuencia de la infección con un agente patógeno, más la concurrencia de factores múltiples de causalidad cuya relación es tan fuerte y determinante como para considerarlos también factores etiológicos, siendo los más relevantes las condiciones sanitarias, el evidente sinergismo con la desnutrición, las pautas culturales, y el estado inmunitario.

Los virus productores de diarrea se detectaron por primera vez en la década del '70 en estudios de heces diarreicas utilizando el microscopio electrónico y desde entonces la búsqueda de virus causantes de gastroenteritis ha sido exhaustiva. En los últimos tres decenios se descubrieron virus capaces de producir gastroenteritis en niños de corta edad, entre los que se destacan los rotavirus, astrovirus, adenovirus y norovirus, en conjunto responsables de aproximadamente el 60% de los casos de diarrea aguda. Los estudios de asociación etiológica han demostrado que el principal agente viral causante de gastroenteritis es el rotavirus; agente etiológico del 80% de las diarreas virales. Nuestro grupo de investigación, integrantes del Laboratorio de Gastroenteritis Virales del Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella" de la Facultad de Ciencias Médicas, se encuentra esencialmente abocado al estudio de este patógeno desde el año 1979. En el camino recorrido se han realizado aportes al conocimiento de los rotavirus en las áreas de epidemiología clínica y molecular y diagnóstico (1,2,3,4).

Los rotavirus poseen un genoma de 11 segmentos de ARN de doble cadena, rodeado por una triple cápside proteica (5).

Las proteínas que constituyen la cápside externa, VP4 y VP7, contienen las características antigénicas que inducen en el huésped una respuesta inmune protectora ante una nueva exposición al virus. En base a la diversidad de estas proteínas, los rotavirus grupo A se clasifican en genotipos P (según la proteína VP4) y G (en base a la proteína VP7). Los genotipos de mayor prevalencia a nivel mundial y local asociados con infecciones en humanos son G1, G2, G3, G4, G9, P[4] y P[8] (6,7).

Desde el año 2006 se encuentran disponibles en el mercado argentino dos fórmulas vacunales anti-rotavirus, una monovalente (G1 P[8]) y otra pentavalente (G1-G4 P[8]). Los estudios de eficacia de ambas vacunas mostraron un alto nivel de protección contra los genotipos más prevalentes (8,9). Sin embargo, ante la licencia de toda nueva vacuna es importante que su introducción sea acompañada de un sistema integrado de vigilancia epidemiológica clínica y molecular para monitorear su seguridad e impacto en la disminución de la enfermedad, así como también la dinámica de circulación de genotipos en cada región. En la actualidad, la vigilancia molecular de rotavirus se basa en el análisis de genotipos virales aislados de casos clínicos, los cuales sólo incluyen pacientes con sintomatología lo suficientemente severa como para requerir atención médica y acota el estudio a uno o unos pocos centros asistenciales. Para salvar estas limitaciones, sería importante implementar un método que permita obtener una visión más global de la epidemiología molecular de los rotavirus circulantes en la comunidad, incluyendo también en el análisis molecular los genotipos excretados por individuos que no demandaron asistencia médica y aquellos asintomáticos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si el monitoreo de las aguas cloacales de la comunidad sería una fuente alternativa a la de los casos clínicos para investigar la epidemiología molecular de los rotavirus. En este sentido, se compararon los genotipos G de rotavirus identificados en aguas cloacales de la Ciudad de Córdoba con los G tipos detectados en muestras de pacientes que requirieron atención médica por diarrea por rotavirus en el Hospital

Privado de la misma ciudad durante el mismo período de tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras clínicas. Se analizaron 50 muestras de materia fecal rotavirus positivas, obtenidas de niños menores de 3 años de edad que requirieron atención médica en el Hospital Privado de la Ciudad de Córdoba por un cuadro diarreico agudo. Período de muestreo: Enero-Diciembre 2006.

Muestras cloacales. Se colectaron semanalmente muestras de 1.5 L de agua cloacal del caño colector de la red cloacal que llega como punto final a la planta de tratamiento de efluentes cloacales Bajo Grande de la Ciudad de Córdoba (n=52). Esta red cloacal cubre aproximadamente al 60% de la población de la Ciudad de Córdoba. Período de muestreo: Enero-Diciembre 2006. Las muestras fueron concentradas 100X por centrifugación y precipitación con polietilenglicol (10,11,12).

Extracción de ácidos nucleicos y transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La extracción del ARN viral de las muestras clínicas y concentrados cloacales se realizó mediante el método de fenol-cloroformo seguido de precipitación alcohólica de acuerdo a procedimientos estándares (13). Los ARN extraídos fueron procesados por RT-PCR con el par de primers Beg9/End9 para amplificar el gen 9 del genoma de rotavirus (VP7) (14).

Genotipificación. Los productos de PCR fueron procesados por heminested-PCR con un set de primers específicos para los genotipos G1, G2, G3, G4, G8 y G9, y el primer consenso End9 (14). Los amplicones obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida y los productos revelados por tinción argéntica (PAGE/SS) (15,16).

Análisis estadístico. Se utilizó el test Z para comparar proporciones, con el fin de analizar las frecuencias de detección de G tipos de rotavirus en muestras clínicas y cloacales (17).

RESULTADOS

Frecuencia de detección de G tipos de rotavirus. De las 50 muestras clínicas rotavirus positivas colectadas durante el año 2006, 3 fueron obtenidas durante los meses cálidos del año (Enero-Marzo) y 47

durante los meses fríos (Abril-Septiembre). Del total de muestras cloacales colectadas (n=52), 26 se obtuvieron durante los meses cálidos y 26 durante los meses fríos; siendo el 100% de las muestras positivas para rotavirus por RT-PCR seguida de heminested-PCR. Debido al bajo número de muestras clínicas rotavirus positivas obtenidas durante los meses cálidos sólo se realizó la comparación de G tipos detectados por ambos sistemas de vigilancia analizando los muestreos obtenidos en los meses fríos del año.

La totalidad de las muestras de materia fecal (n=47) y cloacales (n=26) fueron genotipificadas y los resultados se muestran en la Tabla I.

El 31.9% de las muestras clínicas (15/47) correspondieron a infecciones mixtas de G tipos de rotavirus, alcanzando un total de 66 G tipos detectados. Del mismo modo, más de un G tipo fue detectado en el 77% de las muestras cloacales (20/26), contabilizando un total de 64 G tipos detectados.

Distribución proporcional de G tipos de rotavirus. La distribución proporcional de genotipos G de rotavirus detectados por ambos sistemas de vigilancia durante los meses fríos se muestra en la Figura I. Los resultados indican que no existe diferencia estadísticamente significativa ($P>0.05$) entre el análisis de G tipos de rotavirus detectados en muestras clínicas y cloacales.

DISCUSIÓN

Está ampliamente descrito que la diarrea por rotavirus es una patología estacional, característica del período invernal. Esto se ve reflejado en el presente estudio en el que el 90% de las muestras de casos clínicos rotavirus-positivos fueron recolectadas durante los meses fríos del año. Esto llevaría a concluir que la circulación del virus estaría acotada al período invernal del año. Sin embargo, la vigilancia ambiental detectó la circulación de rotavirus tanto en los meses fríos como en los cálidos, poniendo en evidencia la circulación continua de rotavirus. Esto sugeriría que la vigilancia ambiental sería un método más sensible que la clínica para el monitoreo de los G tipos virales que circulan en la comunidad. Se desconoce el/las causa que llevan a un registro significativamente más alto de diarrea por

rotavirus en los meses fríos respecto a los cálidos. Se postulan factores fisiológicos del hospedador y/o ambientales que facilitarían el proceso mórbido de la infección.

La caracterización viral de muestras cloacales mostró un perfil de circulación de G tipos de rotavirus concordante con el observado al analizar muestras clínicas. Ambos sistemas de vigilancia detectaron G1 y G3 como los genotipos predominantes, seguidos de los tipos G4, G9 y G2. El genotipo G8 fue sólo detectado en cloacas, siendo este un genotipo común en ganado bovino, pero atípico en humanos (excepto en algunos países africanos). Este resultado aporta una evidencia más de la mayor sensibilidad del muestreo poblacional respecto a casos clínicos, indicando que el solo muestreo clínico en un único centro asistencial no reflejaría en su totalidad los G tipos que circulan en la comunidad.

Los resultados por otra parte indican que la comparación del análisis de muestras clínicas y cloacales muestra una imagen similar de la circulación de los G tipos más frecuentes de rotavirus en la comunidad (G1, G2, G3 y G4) y que ambos detectan un aumento en la circulación del genotipo emergente G9 respecto a las frecuencias anteriormente registradas en la misma población (7). Este resultado es interesante debido a que el genotipo G9 no está incorporado en las fórmulas vacunales disponibles en el mercado y que no hay estudios de eficacia de inmunidad heterotípica para proteger contra la infección de cepas rotavirus genotipo G9.

De esta manera, el análisis de muestras cloacales sería un método sensible para la vigilancia epidemiológica de genotipos de rotavirus circulantes en una comunidad, que incorpora los G tipos excretados por todo individuo rotavirus-infectado, proponiendo un sistema alternativo a la vigilancia clínica para monitorear la actividad viral y la diversidad y emergencia de cepas de rotavirus, independiente del ámbito asistencial.

REFERENCIAS

1. Giordano, M O, Ferreyra, L J, Isa, M B, Martinez, L C, Yudowsky, S I, Nates, S V. The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children

in Cordoba City, Argentina: an insight of disease burden. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2001; 43:193-198.

2. Basnec, S N, Giordano, M O, Bennun, F R, Nates, S V, Vergara, M, Depetris, A R. Detection of two atypical rotaviruses in the Province of Misiones, Argentina. *Acta Virol*. 1991; 35:408-412.
3. Giordano, M O, Basnec, S N, Nates, S V, Bennun, F R, Depetris, A R. Rapid techniques for diagnosis and epidemiological studies of rotavirus infection, *J Virol Methods*. 1991; 35:59-63.
4. Giordano, M O, Depetris, A R, Nates, S V. Retrospective study of circulation of human rotavirus electropherotypes in the city of Cordoba, Argentina, 1979-1989. *Rev Arg Microbiol*. 1995; 27:1-10.
5. Greenberg, H B, Valdesuso, J, van Wyke, K, Midthun, K, Walsh, M, McAuliffe, V, Wyatt, R G, Kalica, A R, Flores, J, Hoshino, Y. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J Virol*; 1983, 47:267-275.
6. Widdowson, M A, Bresee, J S, Gentch, J R, Glass, R I. Rotavirus disease and its prevention. *Curr Opin Gastroenterol*; 2004, 21:26-31.
7. Barril, P A, Martinez, L C, Giordano, M O, Castello, A A, Rota, R P, Isa, M B, Masachessi, G, Ferreyra, L J, Glikmann, G, Nates, S V. Detection of group A human rotavirus G9 genotype circulating in Córdoba, Argentina, as early as 1980. *J Med Virol*; 2006, 78:1113-1118.
8. Ruiz-Palacios, G M, Perez-Schael, I, Velazquez, F R, Abate, H, Breuer, T, Clemens, S C. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*; 2006; 354:11-22.
9. Matson, D O. The pentavalent rotavirus vaccine, Rotateq. *Semin Pediatr Infect Dis*; 2006, 17:195-199.
10. Lewis, G D, Metcalf, T G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl Environ Microbiol*; 1988, 54:1983-1988.

11. Greening, G E, Hewitt, J, Lewis, G D. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J Appl Microbiol*; 2002, 93:745-750.
12. Huang, Q S, Greening, G E, Baker, M G, Grimwood, K, Hewitt, J, Hulston, D, van Duin, L, Fitzsimons, A, Garrett, N, Graham, D, Lennon, D, Shimizu, H, Miyamura, T, Pallansch, M A. Persistence of oral poliovirus vaccine virus after its removal from the immunization schedule in New Zealand. *Lancet*; 2005, 366:394-396.
13. Perry, R, La Torre, J, Kelley, D, Greemberg, J. On the lability of poly(A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. *Biochim Biophys Acta*; 1972, 262:220-226.
14. Gouvea, V, Glass, R, Woods, P, Taniguchi, K, Clark, H, Forrester, B, Fang, Z Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microb*; 1990, 28:276-282.
15. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 1970, 227:680-685.
16. Herring, A, Inglis, N, Ojeh, C, Snodgrass, D, Menzies, J. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microb*; 1982, 16:473-477.
17. Zar, J H. Z-test for comparing two proportions. In: *Biostatistical analysis*, 3rd ed. NJ: Electronic Technical Publishing; 1996.

Figura I. Distribución proporcional de G tipos de rotavirus detectados en muestras clínicas (n=66) y cloacales (n=64). Abril-Septiembre 2006.

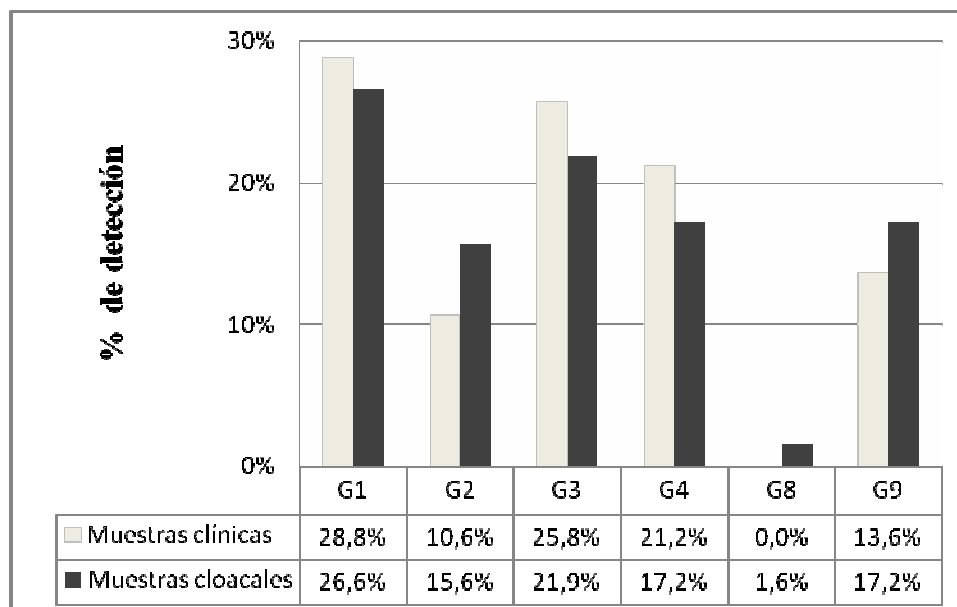


Tabla I. Número (%) de G tipos de rotavirus detectados en muestras clínicas (n=47) y cloacales (n=26). Abril-Septiembre 2006.

Genotipo G	Muestras clínicas, n (%)	Muestras cloacales, n (%)
G1	19 (40.4)	17 (65.4)
G2	7 (14.9)	10 (38.5)
G3	17 (36.2)	14 (53.8)
G4	14 (29.8)	11 (42.3)
G8	0 (0)	1 (3.8)
G9	9 (19.1)	11 (42.3)