

TOMO LV **ACADEMIA NACIONAL**
DE AGRONOMIA Y VETERINARIA ISSN 0327-8093
BUENOS AIRES REPUBLICA ARGENTINA

-Seminario-
Rotavirus Animales y Humanos
Ohio (USA) State University,
Lab. Gastroenteritis Virales -
Inst. C. Malbrán e
Inst. de Virología - INTA
Castelar



SESION PUBLICA EXTRAORDINARIA
del
20 de Marzo de 2001

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ROTAVIRUS HUMANOS EN ARGENTINA

Karin Bok y J. A. Gómez *

Introducción

Los Rotavirus son el principal agente productor de diarrea infantil aguda en todo el mundo (6, 14). El virus se transmite por vía fecal-oral de persona a persona, enfermando solo a los individuos no inmunes, en general niños en los primeros años de vida. Con episodios sucesivos de este trastorno, la inmunidad contra este virus se incrementa y los síntomas se manifiestan de manera más leve (1, 16). La infección por rotavirus presenta características estacionales con picos de la enfermedad durante los meses de otoño-invierno, cuando puede llegar a ser responsable del 80% de los episodios de diarrea en niños menores de tres años (15). Además, el virus circula durante todo el año lo que probablemente funcione como un importante reservorio para la aparición de nuevas cepas (9).

Los rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae. Son virus no envueltos formados por una triple cápside proteica que encierra 11 segmentos de RNA doble cadena. Se clasifican primero en grupos en base a la proteína viral 6 (VP6), que forma la cápside intermedia del virus. Dentro del Grupo A, los rotavirus se clasifican en distintos genotipos basados la proteína VP7 (serotipo o genotipo conocido como "G", por ser una glicoproteína), y la proteína VP4 (serotipo o genotipo conocido como "P", por ser una proteína sensible a una proteasa). Por ello, la clasificación de los rotavirus es binaria: genotipos G y P (7). Hasta el momento

* Depto. Virología, Inst. C. Malbrán

se han descrito 14 tipos de G y 20 tipos de P, siendo las asociaciones más frecuentes en el hombre, las siguientes: G1P8, G2P4, G3P8, y G4P8 (12).

Estudio Multicéntrico de Vigilancia Epidemiológica de Rotavirus

En Abril de 1995 se realizó un taller sobre gastroenteritis virales en el entonces "Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán" organizadas por la Sociedad Argentina de Virología, destinado a realizar un análisis minucioso de la información disponible hasta el momento para poder evaluar la situación de la Argentina. Dado que los diferentes estudios analizados mostraron discrepancias entre sí, se decidió llevar a cabo un "Estudio Multicéntrico de Vigilancia Epidemiológica de Rotavirus" con el apoyo de la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud y Acción Social. El objetivo general del mismo fue obtener información epidemiológica sobre los rotavirus previa a la disponibilidad de la vacuna y evaluar las características moleculares de las cepas de rotavirus circulantes en la Argentina. La vigilancia comenzó en Octubre de 1996 y continuó hasta Septiembre de 1998. El programa contó con un laboratorio de referencia además de nueve Unidades Centinelas (UC) (La Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Córdoba, Resistencia, Tucumán, Mendoza, Santa Fe y Rosario). El estudio contaba con un protocolo de trabajo común, relevando información epidemiológica y recolectando muestras

de heces. Se estudiaron pacientes internados menores de 3 años de edad con diarrea aguda de menos de 5 días de evolución. El diagnóstico de rotavirus en materia fecal se realizaba mediante la utilización de reactivos diagnósticos comerciales, Pathfinder (Kallestadt, Austin, TX USA) o Rotazyme® II (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Una vez completado el diagnóstico, las muestras positivas se almacenaban a -20°C hasta el momento de su envío al laboratorio de referencia, para ser caracterizadas (3). La tipificación tanto de VP4 como de VP7 de las cepas de rotavirus se realizó mediante una técnica múltiple nested RT-PCR después de realizada la extracción del genoma viral. Los genes correspondientes fueron retrotranscritos y amplificados utilizando un par de primers consenso, y luego tipificados utilizando dos juegos de primers específicos capaces de amplificar G1-G5, G9 y P[4], P[6], P[8], P[9] y P[10] (5, 8, 11).

Un total de 2336 casos de rehidratación fueron detectados en la UC de Tucumán, mientras que 14847 hospitalizaciones fueron evaluadas en el resto de las UC. Del total de hospitalizaciones, el 50% (1169) en Tucumán y el 11,7% (1733) en el resto de las UC fueron debidas a síntomas de diarrea. El 42% (550) de las muestras recolectadas resultó positiva en el diagnóstico de rotavirus. Finalmente, 490 muestras fueron recibidas en el laboratorio de referencia para realizar estudios de caracterización de cepas.

En 5 del total de 7 UC se observó un patrón de estacionalidad típico de rotavirus de regiones con clima templado. El pico de detección de rotavirus fue siempre observado durante el otoño (desde abril a junio).

El 50% de los casos ocurrieron antes de los 9,8 meses de edad

(rango desde 8 a 11 meses). La media de la aparición acumulativa de la diarrea por rotavirus por edad fue 21% en los primeros 6 meses, 62% en el primer año de vida, y 92% en el segundo año de vida.

Durante el primer año de estudio, G2 (60,3%) fue el tipo más prevalente, seguido por G1 (24,8%) y por G4 (5,1%). Durante el segundo año de estudio, G1 (48%) fue el tipo más prevalente, seguido por G4 (31,3%). Las infecciones mixtas ocurrieron en el 6,4% y el 9,4% de los casos durante el primer y segundo año respectivamente. Solamente 13 (2,6%) muestras no pudieron ser tipificadas con la metodología utilizada. Por otro lado, el genotipo 9 es una de las cepas no comunes encontradas durante el estudio, ya que se lo detectó en 3 muestras (0,4% y 0,8% cada año respectivamente). Lo mismo ocurrió con el genotipo 5, el cual fue detectado en dos muestras provenientes de la UC de Santa Fe (0,8%).

Durante los dos años del estudio, las asociaciones comunes correspondieron al 64% de las muestras estudiadas. La combinación entre los tipos G2P[4] (29,6%) fue la que más frecuentemente se detectó, seguida de G1P[8] (22,9%). En el 6% de los casos se detectaron asociaciones no comunes. La más frecuente y ampliamente distribuida fue G1P[4] (2,7%) mientras que G1 también se encontró asociada a P[6] (1,4%). Las muestras caracterizadas como G9 y G5 siempre se encontraron asociadas a P[6] y a P[8] respectivamente. El porcentaje de muestras no tipificables en el caso de la tipificación de "P" fue mayor que para "G", ya que el 23,1% y 16% de las muestras no pudieron ser tipificadas durante el primer y segundo año de estudio respectivamente (2).

Finalmente, este estudio demostró que los Rotavirus son el agente causal de diarrea más importante en niños menores de 3 años, presentando una estacionalidad marcada durante el otoño y una distribución de diarrea por edad significativamente menor a la informada en otros estudios que incluyen pacientes ambulatorios (10).

Por otro lado, el estudio de caracterización informó que el 96% de las cepas detectadas correspondieron a genotipos comunes, aunque los genotipos prevalentes cambiaron de año a año, ya que G4 emergió durante el segundo año de estudio. Se detectó que una mayor cantidad de cepas G2 (70.5%) infecta niños menores de un año de edad en comparación con cepas G4 (57%). Esto podría indicar que genotipos que emergen durante un periodo determinado pueden causar diarrea en niños mayores, los cuales no habían estado expuestos a estos genotipos previamente. En general, genotipos de P comunes se encontraron asociados a los tipos de G más prevalentes. Sin embargo, se encontraron asociaciones no comunes en bajos porcentajes en todas las UC. El porcentaje de cepas no tipificables para P fue mayor al informado anteriormente. Esto se debió en gran parte a que los primers específicos no son absolutamente homólogos a las cepas argentinas, señalando la necesidad de rediseñar esta metodología.

Nuestros resultados, junto a una estimación previa de los costos de la enfermedad, sugieren que una vacuna contra este virus podría disminuir substancialmente el impacto de la enfermedad en nuestro país. Dada la distribución etaria de la diarrea por rotavirus, los niños deberían vacunarse en los primeros meses de vida.

En base a la gran diversidad de cepas encontradas, sería necesario organizar un programa de vigilancia de cepas circulantes en la Argentina, con el objetivo de detectar la emergencia de cepas no comunes. Además, el alto porcentaje de infecciones mixtas encontradas en la Argentina favorecería la aparición de reasociaciones naturales que deberían ser detectadas mediante este programa.

Emergencia de Rotavirus G9 P[6] en la República Argentina

Después de completar los dos primeros años de estudio, se detectó un incremento en la prevalencia de cepas caracterizadas por medio de una técnica de RT-PCR como G9 P[6], desde septiembre de 1998 hasta junio de 1999. Se recolectaron un total de 88 muestras positivas para rotavirus de niños menores de tres años. El genotipo prevalente fue G1 (47%), seguido por G4 (28%) y por G9 (18%). El análisis filogenético de las cepas G9 argentinas comparadas con cepas del mismo tipo de otros países disponibles en el GenBank, demostró que las secuencias argentinas se agrupan junto con la mayoría de las cepas analizadas presentando menos del 2% de divergencia de nucleótidos, pero que a su vez contienen características únicas que las distinguen de cepas secuenciadas anteriormente (4).

Gracias a la vigilancia continua de la diarrea por Rotavirus en la Argentina, fue posible detectar el aumento de la prevalencia de estas cepas. El alto grado de homología observada entre las cepas G9 de todo el mundo y el hecho de que estas estén más relacionadas entre sí que con la cepa de referencia, sugieren que el

mismo tipo de cepas está emergiendo globalmente y que son una introducción reciente en la población. Por otro lado, considerando el bajo grado de sustitución encontrado entre las cepas estudiadas, el hecho de encontrar cambios sólo presentes en cepas Argentinas hace que sea más significativo, sobretodo teniendo en cuenta que es la primera vez que se describen variaciones similares. Finalmente, estos resultados sugieren que debería evaluarse la incorporación de esta cepa en las vacunas en estudio y demuestran la importancia de la instalación de un sistema de vigilancia continuo para poder detectar las variantes de rotavirus circulantes.

Variación Genética de la Proteína VP7 de los Rotavirus G4 Humanos

A partir de la emergencia de G4 observada durante el segundo año de estudio, se comenzaron a estudiar en más detalle las características genéticas de la proteína VP7 de estas cepas argentinas, comparadas con cepas provenientes de otros países. La

distancia nucleotídica que se encontró entre cepas G4 es mayor a la informada para otros genotipos (13, 17). Esto permitió su clasificación en linajes y sublinajes dentro de un mismo genotipo. De esta manera se demostró que las infecciones por rotavirus G4 durante la temporada 1997-1998 en la Argentina fueron causadas por la emergencia de al menos dos grupos monofiléticos diferentes y que esta división se refleja también en los cambios aminoacídicos presentes. Uno de los grupos de cepas Argentinas emergió en la población después del pico de diarrea por rotavirus (Mayo 1998), mientras el otro grupo fue el causante de todas las infecciones por G4 antes de esa fecha. La diferencia en la distribución etaria entre cepas G2 y G4 reportada anteriormente, parece deberse a las infecciones causadas por uno de los sublinajes exclusivamente. Finalmente, las implicancias de las diferencias encontradas entre los grupos de G4 en diferentes aspectos como respuesta inmune, severidad de la enfermedad, o eficacia de cualquier vacuna disponible deberán ser evaluadas posteriormente.

Bibliografía

1. Bernstein, D. I., D. S. Sander, V. E. Smith, G. M. Schiff, and R. L. Ward. 1991. Protection from rotavirus reinfection: 2-year prospective study. *J Infect Dis.* 164:277-83.
2. Bok, K., N. Castagnaro, A. Borsa, S. Nates, C. Espul, O. Fay, A. Fabri, S. Grinstein, I. Miceli, D. Matson, and J. Gomez. 2001. Surveillance for rotavirus in Argentina. *J Med Virol* (in press).
3. Bok, K., N. C. Castagnaro, N. E. Diaz, A. Borsa, M. R. Cagnoli, S. Nates, S. Yudowsky, C. Espul, H. Cuello, O. Fay, B. Brunet, O. C. Ues, R. Santoro, S. Grinstein, F. Gonzalez, I. Miceli, and J. A. Gomez. 1999. [Rotavirus laboratory network: results after one year of observation]. *Rev Argent Microbiol.* 31:1-12.
4. Bok, K., G. Palacios, K. Sirjvarger, D. O. Matson, and J. A. Gomez. 2000. Emergence of G9P[6] Human Rotaviruses in Argentina. Submitted for publication.
5. Das, B. K., J. R. Gentsch, H. G. Cicirello, P. A. Woods, A. Gupta, M. Ramachandran, R. Kumar, M. K. Bhan, and R. I. Glass. 1994. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *Journal of Clinical Microbiology.* 32:1820-2.
6. de Zoysa, I., and R. G. Feachem. 1985. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. *Bull World Health Organ.* 63:569-83.
7. Estes, M. 1996. Rotaviruses and their replication, p. 1625-1655. In B. N. Fields and D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed, vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
8. Gentsch, J. R., R. I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B. K. Das, and M. K. Bhan. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 30:1365-73.
9. Gentsch, J. R., P. A. Woods, M. Ramachandran, B. K. Das, J. P. Leite, A. Alfieri, R. Kumar, M. K. Bhan, and R. I. Glass. 1996. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis.* 174:S30-6.
10. Gonzalez, F. S., M. E. Sordo, G. Rowensztein, L. Sabbag, A. Roussos, E. De Petre, M. Garelo, A. Medei, K. Bok, S. Grinstein, and J. A. Gomez. 1999. [Rotavirus diarrhea. Impact in a pediatric hospital of Buenos Aires]. *Medicina (B Aires).* 59:321-6.
11. Gouvea, V., R. I. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H. F. Clark, B. Forrester, and Z. Y. Fang. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 28:276-82.

12. Hoshino, Y., and A. Z. Kapikian. 1994. Rotavirus antigens. *Curr Top Microbiol Immunol.* 185:179-227.
13. Jin, Q., R. L. Ward, D. R. Knowlton, Y. B. Gabbay, A. C. Linhares, R. Rappaport, P. A. Woods, R. I. Glass, and J. R. Gentsch. 1996. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. *Arch Virol.* 141:2057-76.
14. Kapikian, A. Z. 1993. Viral gastroenteritis [clinical conference] [see comments]. *Jama.* 269:627-30.
15. Torok, T. J., P. E. Kilgore, M. J. Clarke, R. C. Holman, J. S. Bresee, and R. I. Glass. 1997. Visualizing geographic and temporal trends in rotavirus activity in the United States, 1991 to 1996. National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System Collaborating Laboratories. *Pediatric Infect Dis J.* 16:941-6.
16. Velazquez, F. R., D. O. Matson, J. J. Calva, L. Guerrero, A. L. Morrow, S. Carter-Campbell, R. I. Glass, M. K. Estes, L. K. Pickering, and G. M. Ruiz-Palacios. 1996. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 335:1022-8.
17. Zao, C. L., W. N. Yu, C. L. Kao, K. Taniguchi, C. Y. Lee, and C. N. Lee. 1999. Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *J Gen Virol.* 80:1407-15.