

ARTICULO ORIGINAL

Electroferotipos cortos de rotavirus detectados en adultos con diarrea en Paraguay

Amarilla A¹, Fariña N², Russomando G¹, Parra GI^{1}. ¹Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción.

²Laboratorio del Sanatorio San Roque, Asunción, Paraguay.

RESUMEN

La presencia de rotavirus en adultos ha sido subestimada por mucho tiempo debido a que la mayor incidencia y patogenicidad se observa en niños menores de 5 años. Con el fin de determinar los electroferotipos circulantes en adultos, se empleó la técnica de PAGE para analizar 23 aislados de rotavirus de individuos adultos (promedio de edad: 42,5 años; rango: 24 a 67 años), recolectados entre Septiembre de 2003 a Febrero de 2005 del Laboratorio del Hospital San Roque, Asunción. En las 23 muestras se detectaron 5 electroferotipos diferentes, 19 presentaron alguno de los 3 patrones largos detectados (denominados LA, LB y LC) y 4 presentaron algún patrón corto (SA y SB). Desde 1998 hasta la fecha, nuestro grupo de trabajo detectó un solo caso de rotavirus con patrón corto (aislado en septiembre de 1999) luego de analizar más de 1500 heces de niños con diarrea aguda. Estudios previos en población infantil, han reportado que se necesitan varios años de estudio para identificar rotavirus con patrones cortos en una comunidad, sin embargo nuestros resultados sugieren que además es importante ampliar las variables demográficas de la población de estudio para encontrar más variantes de rotavirus, como en este caso es la aparición de patrones cortos en adultos sin que estos se presenten en niños.

Palabras claves: diarrea en adultos, rotavirus, electroferotipos.

Short electropherotypes of rotavirus detected in adults with diarrhea in Paraguay**ABSTRACT**

Although rotavirus is recognized as the major etiologic agent of acute diarrheal disease in children, the role of rotavirus as a pathogen in adults has long been underappreciated. In order to determine the electropherotypes of rotavirus that circulated in adults in Paraguay, 23 rotavirus isolated from patients older than 24 years (mean=42.5; range = 24-67) were analyzed by PAGE. Samples were collected at the Clinical Lab of the San Roque Hospital, Asunción, Paraguay from September 2003 to February 2005. Five different electropherotypes were detected, 19 samples showed long patterns (named LA, LB and LC) and 4 samples a short pattern (named SA and SB). Since 1998, our group has only detected one sample with a short pattern electropherotype (isolated in September 1999) in more than 1500 grounds of children with acute diarrhea. These results showed that it is necessary to study many epidemic years to detect rotavirus with short electropherotypes. However, we found that it is important to increase the demographic variables to find more rotavirus variability in a community, exemplified here by the short electropherotypes detected in adults.

Keywords: diarrhea in adults, rotavirus, electropherotypes.

INTRODUCCION

El rotavirus (RV) es mundialmente considerado la mayor causa de gastroenteritis aguda en niños, por lo que una vacuna y una mayor comprensión de las variaciones que presentan en la naturaleza son importantes para la efectividad de la misma^{1,2}.

El RV posee un genoma constituido por 11 segmentos de ARN de doble cadena, cuya

electroforesis en un gel de poliacrilamida (PAGE) produce un patrón de migración característico llamado electroferotipo. Se han identificado 7 grupos de RV (A-G), de los cuales el grupo A es el más común en humanos y animales. Los segmentos del genoma de los RV del grupo A se ordenan en cuatro clusters de acuerdo a su tamaño: el cluster I incluye los

*Correspondencia: gabriel_parra@hotmail.com

segmentos 1 al 4, el cluster II a los segmentos 5 y 6, el III a los segmentos 7, 8 y 9 y el IV a los segmentos 10 y 11. Dependiendo de la movilidad del segmento 11 pueden presentarse dos patrones de migración denominados: largo o corto. En humanos las cepas con patrón corto usualmente corresponden al subgrupo I y las del patrón largo al subgrupo II^{1,3}.

Trabajos realizados en diversas regiones del mundo han demostrado que, durante largos periodos de tiempo, en niños predominan RV con patrón largo, con la aparición esporádica de epidemias causadas por RV con patrón corto, por lo que se requiere largos periodos de estudio para la identificación de RV con patrones cortos⁴⁻⁷.

Comúnmente la transmisión de RV dentro de las familias es de niños a padres o abuelos, aunque se ha reportado casos de adultos sin un obvio contacto con niños^{8,9}.

En adultos, la infección con RV ha sido asociada a un amplio espectro de síntomas y severidad en las manifestaciones y, aunque típicamente se manifiesta con náuseas, malestar, dolor de cabeza, molestias abdominales, diarrea acuosa y fiebre, también puede ser asintomática, por ello es difícil dar una descripción concisa de las presentaciones clínicas^{10,11}.

Aunque el RV presenta un padrón endémico, algunos estudios han reportado que el RV contribuye también a la diarrea de los viajeros entre los adultos, ocasionando así brotes epidémicos¹⁰.

En Paraguay, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en niños los rotavirus presentan un patrón epidemiológico estacional, con la máxima incidencia en los meses fríos del año^{12,13}. Sin embargo se observó que el RV en adultos se presenta a lo largo de todo el año con la misma incidencia¹⁴.

En este trabajo reportamos la aparición de 5 electroferotipos en muestras de adultos con cuadros de diarrea, de muestras colectadas durante 18 meses (Setiembre 2003 – Febrero 2005).

MATERIALES Y METODOS

Colección de muestras: Desde Setiembre de 2003 a Febrero de 2005 fueron colectadas 70 muestras fecales de individuos mayores de 18 años de edad, con un diagnóstico de diarrea acuosa, remitidas al Laboratorio del Hospital San Roque. Las

muestras fueron congeladas a -20°C y posteriormente analizadas por PAGE.

Extracción de ARN y PAGE: El ARN viral fue extraído como se describe en Candia et al., 2003, con pequeñas modificaciones. Brevemente, 60 µl de la muestra fue resuspendida en 540 µl de PBS, seguidamente fue centrifugada a 3000 rpm, para clarificar la muestra. Del sobrenadante se tomo 400 µl y fue tratada con SDS al 10% y desproteínizada con Fenol:Cloroformo (1:1). El ARN fue precipitado con etanol absoluto y cloruro de sodio al 20% durante 18 horas a -20 °C y resuspendidas en 20µl de agua autoclavada.

Los productos de extracción fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando un gel separador al 7.5% y un gel concentrador al 4.5%; finalmente fueron visualizados después de la tinción con plata¹⁵. Para determinar las diferencias entre los electroferotipos se realizaron co-electroforesis.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se analizaron los electroferotipos de rotavirus aislados de 23 muestras positivas para RV, de adultos (promedio de edad: 42,5 años; rango: 24 a 67 años), con cuadro de diarrea. Se detectaron 5 electroferotipos diferentes, 3 de ellos presentaron patrón largo (denominados LA, LB y LC) y 2 patrón corto (SA y SB) (Figura 1). Las diferencias entre los patrones LA y LB, como SA y SB, se resolvieron por coelectroforesis de dichos patrones (Figura 2). Los electroferotipos LA y LB mostraron diferencias en los clusters II, III y IV (Figura 2a), mientras que en los electroferotipos SA y SB solo se observó diferencias en la migración del primer segmento (cluster I) (Figura 2b).

FIGURA 1

Patrones electroferotipos largos (LA y LB) y cortos (SA y SB) detectados en heces de adultos. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% teñido con nitrato de plata.

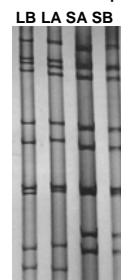


Tabla 1. Distribución anual de los electroferotipos de rotavirus aislados a partir de heces de adultos.

Año	Positivos/Total de muestras	Electroferotipos				
		LA	LB	LC	SA	SB
2003**	2/19	2/2 (100*)	-	-	-	-
2004	20/40	-	2/20 (10)	15/20 (75)	2/20 (10)	1/20(5)
2005***	1/11	-	-	-	1/1(100)	-

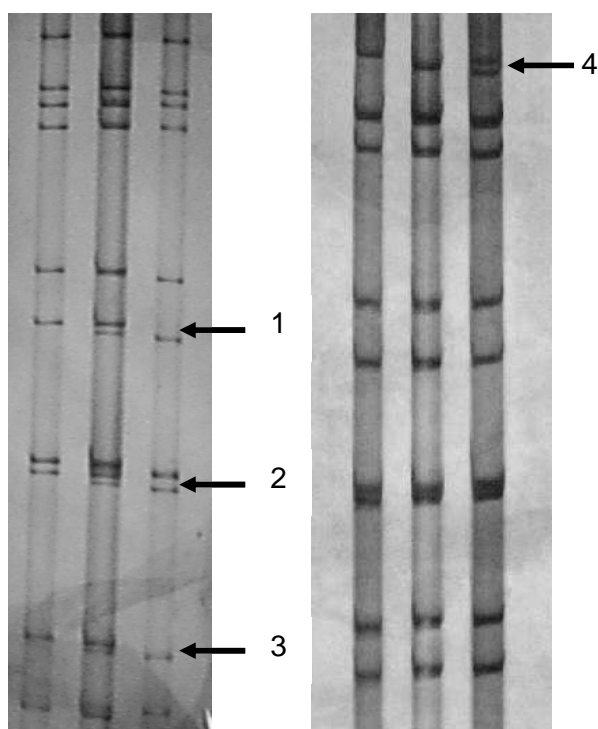
* Porcentaje del total de muestras positivas.
 **Periodo correspondiente a: Septiembre-Diciembre de 2003.
 ***Periodo correspondiente a: Enero-Febrero de 2005.

FIGURA 2

Diferencias en la movilidad de los segmentos de los patrones (a) LA y LB (largos) y (b) SA y SB (cortos) detectadas por coelectroforesis (carril CE). Las flechas 1, 2 y 3 muestran las diferencias migratorias del segmento 6, segmentos 7, 8 y 9 y segmentos 10 y 11, respectivamente; entre los patrones LA y LB. La flecha 4 muestra la diferencia migratoria del segmento 1 entre los patrones SA y SB.

(a) LA CE LB

(b) SA SB CE



En el periodo de setiembre a diciembre del 2003 se detectó, en 2 muestras, el electroferotipo LA. Sin embargo, durante el 2004 se detectaron 4 electroferotipos (LB, LC, SA y SB), donde predominó ampliamente el LC (Tabla 1). Los electroferotipos cortos SA y SB fueron detectados en los meses de setiembre y octubre del 2004, y podrían estar ligados epidemiológicamente al electroferotipo SA que se detectó en enero del 2005 (Tabla 1).

El análisis de los electroferotipos de rotavirus aislados de niños en Paraguay, durante los años 1998 a 2000, han demostrado la presencia de 10 electroferotipos, de los cuales 2 fueron los más predominantes y un solo aislado poseía patrón corto¹². Sin embargo, durante el periodo 2002 – 2004 solo se detectaron tres electroferotipos y ningún RV con patrón corto, de las 285 muestras positivas analizadas (13; datos no publicados). Así, durante 6 años de estudios realizados en niños por nuestro grupo de trabajo, solo un aislado presentó patrón corto (aislado en setiembre de 1999), lo que refuerza la idea de que varios años de estudio se necesitan para identificar RV con patrones cortos⁴. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que también es importante ampliar las variables demográficas de la población de estudio para encontrar más variantes de RV en una comunidad, ejemplificado aquí por los 4 RV con electroferotipo corto detectados en adultos, sin que estos se presenten en niños en el mismo periodo de estudio. Por lo que, para lograr una verdadera eficacia de las futuras vacunas y aumentar los conocimientos de la dinámica de transmisión de RV, es importante analizar más

variables demográficas en una comunidad y las variantes virales que circulan en otras especies, ya que ha sido ampliamente demostrada la presencia de variantes virales que evidencian la transmisibilidad interespecies^{16,17}.

Aunque, para identificar las verdaderas rutas de transmisión y dinámica de los genes del RV son necesarias la genotipificación por RT-PCR y la secuenciación de diversos segmentos¹⁸⁻²¹, la técnica de PAGE permite discriminar la diversidad viral en una población, siendo una técnica muy útil para estudios de epidemiología molecular de rotavirus.

REFERENCIAS

- Desselberger U, Iturriza-Gomara M, and Gray JJ. Rotavirus epidemiology and surveillance. *Novartis Found Symp* 2001;238:125-47; discussion 147-52.
- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, and Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:565-72.
- Estes M. Rotaviruses and their replication. In Knipe DN, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, and Straus SE (ed), *Fields virology*. Lippincott-Williams-Wilkins, Philadelphia, Pa. 4 ed, 2001: 2.
- De Sierra MJ, Sanchez AM, Quiricci L, Diamont A, Rodriguez G, Chiparelli H, Ferrari AM, Russi J and Arbiza J. Electropherotypes of rotaviral RNA from cases of infantile diarrhea in Uruguay. *Acta Virol* 2002;46:103-6.
- Hortal M, Benítez RJ, Somma RE. Presencia de antígenos y perfiles electroforéticos del ARN a partir de heces de niños con diarrea infecciosa aguda. *Arch. Pediatr. Uruguay* 1986; 57:143-8.
- Rasool N, Othman RY, Adenan MI, and Hamzah M. Temporal variation of Malaysian rotavirus electropherotypes. *J Clin Microbiol* 1989; 27:785-7.
- Ruggeri FM, Marziano ML, Tinari A, Salvatori E, and Donelli G. Four-year study of rotavirus electropherotypes from cases of infantile diarrhea in Rome. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1522-6.
- Kim HW, Brandt CD, Kapikian AZ, Wyatt RG, Arrobio JO, Rodríguez WJ, Chanock RM, and Parrott RH. Human reovirus-like agent infection. Occurrence in adult contacts of pediatric patients with gastroenteritis. *Jama* 1977;238:404-7.
- Von Bonsdorff CH, Hovi T, Makela P and Morttinen A. Rotavirus infections in adults in association with acute gastroenteritis. *J Med Virol* 1978; 2:21-8.
- Anderson EJ and Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis* 2004;4:91-9.
- Echeverria P, Blacklow NR, Cukor GG, Vibulbandhitkit S, Changchawalit S, and Boonthai P. Rotavirus as a cause of severe gastroenteritis in adults. *J Clin Microbiol* 1983; 18:663-7.
- Candia N, Parra GI, Chirico M, Velazquez G, Farina N, Laspina F, Shin J, De Sierra MJ, Russomando G and Arbiza J. Acute diarrhea in Paraguayan children population: detection of rotavirus electropherotypes. *Acta Virol* 2003;47:137-40.
- Parra GI, Martínez M, Amarilla A, Zunini M, Achucarro C, Martínez V, Mayor ME, Fariña N, Canas de Chirico M, and Russomando G. Incidence of rotaviral infection in Central and East Paraguay between 2002 and 2003: a single electropherotype detected. *Virus Reviews and Research* 2004;9:73-6.
- Martínez M, Fariña N, Rodríguez M, Russomando G, and Parra GI. Incidence of Rotavirus in adults with diarrhea in Asuncion, Paraguay. *Rev. Arg. de Microbiología* 2005; 37:99-101.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, and Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; 17:914-21.
- Martella V, Ciarlet M, Pratelli A, Arista S, Terio V, Elia G, Cavalli A, Gentile M, Decaro N, Greco G, Cafiero MA, Tempesta M, and Buonavoglia C. Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5/6 genes of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3] rhesus rotavirus-like VP4 gene allele. *J Clin Microbiol* 2003;41:5665-75.
- Palombo EA. Genetic analysis of Group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. *Virus Genes* 2002; 24:11-20.
- Maunula L, and Von Bonsdorff CH. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. *J Virol* 2002; 76:11793-800.
- Palombo EA, Bugg HC, and Bishop RF. Characterisation of rearranged NSP5 gene of a human rotavirus. *Acta Virol* 1998; 42:55-9.
- Parra GI, Bok K, Martínez M, and Gómez JA. Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. *J Gen Virol* 2004; 85:1713-6.
- Watanabe MT, Koshimura Y, and Nakagomi O. Direct evidence for genome segment reassortment between concurrently-circulating human rotavirus strains. *Arch Virol* 2001; 146:557-70.