

Diversidad genética de virus entéricos en el ambiente y en niños hospitalizados con gastroenteritis

Rodney Colina, Matías Victoria, Fernando López Tort, Andrés Lizasoain, Matías Castells, Luciana Burutarán, Leticia Maya, María J. Benítez, Matías Salvo, Estefany Bertony.

Laboratorio de Virología Molecular, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay.

A nivel mundial, la gastroenteritis aguda infantil (GAI) ha sido reportada como uno de los principales problemas de salud pública y es la segunda causa de mortalidad en niños menores de 5 años de edad, apenas superada por las neumonías. Los pacientes con mayor riesgo de hospitalización y muerte debido a la GAI son principalmente niños entre 6 meses y 2 años de edad. La GAI afecta mayormente a los niños en países en vías de desarrollo, donde existe una tasa de mortalidad más elevada debido principalmente a un acceso limitado al agua potable, carencias en el saneamiento básico y factores de riesgo nutricional, como el amamantamiento por un tiempo inferior al adecuado, deficiencia de zinc y vitamina A. A estos, se les suma un servicio precario de asistencia médica, en particular en algunas regiones geográficas de difícil acceso.

Debido a los importantes avances científicos de los últimos años en el área de la biología molecular, ha sido posible generar poderosas metodologías diagnósticas que nos permiten detectar y estudiar rápidamente los agentes infecciosos que causan la GAI, tanto a nivel clínico como a partir de distintas matrices de origen ambiental.

Los virus se definen como los agentes etiológicos más importantes de gastroenteritis aguda (GA) y GAI en el mundo, y entre los más comunes están aquellos pertenecientes a las familias virales *Reoviridae* (principalmente los rotavirus del Grupo A – RVA), *Caliciviridae* (principalmente los norovirus -NV- de los genogrupos I y II – NVGI y NVGII), *Astroviridae* 6 (principalmente los mamastrovirus 1 – MAsV-1), y *Adenoviridae* (principalmente los adenovirus entéricos – AdVE).

Solamente los RVA y NV en conjunto han sido reportados como responsables de más del 50% de las muertes por GAI de niños menores de cinco años de edad a nivel global.

A su vez, los RVA constituyen los agentes etiológicos más importantes de GAI en niños menores de 5 años de edad en todo el mundo. Debido a esto, 79 países en todo el mundo han incorporado las vacunas anti-RVA en sus Programas Nacionales de Vacunación (PNV).

Uruguay, junto a Chile, Surinam y Guayana Francesa, son los únicos países de América del Sur que aún no han incorporado estas vacunas en sus PNV. Estas vacunas han demostrado ser muy eficaces en reducir las hospitalizaciones y muertes por GAI. Los NV humanos son los agentes etiológicos más importante de brotes de GA en humanos a nivel mundial y, a diferencia de RVA, afecta a personas de todos los grupos etarios. Debido a esto, actualmente vacunas contra el NV están en fase de desarrollo en diferentes regiones del mundo. En el caso de las GAI, los NV han sido definidos como los segundos en importancia epidemiológica luego de los RVA. Al igual que los RVA y NV, los MAsV-1 han sido reporta-

DEBIDO A LOS AVANCES CIENTÍFICOS

de los últimos años en el área de la biología molecular, ha sido posible generar poderosas metodologías diagnósticas que nos permiten detectar y estudiar rápidamente los agentes infecciosos que causan la gastroenteritis aguda infantil, tanto a nivel clínico como a partir de distintas matrices de origen ambiental.

dos en todas las regiones del planeta y han sido establecidos como el segundo o tercer agente etiológico más importante de GAI, luego de los RVA y los NV, respectivamente, dependiendo de la región geográfica.

En América latina existen importantes antecedentes de detección y caracterización molecular de las cepas de RVA, NV y MAsV-1 en casos de GAI en la mayoría de los países de la región. En este contexto, es de destacar la enorme cantidad de estudios que se han realizado en Brasil y Argentina, siendo ambos los principales países que han contribuido al conocimiento de la epidemiología molecular de estos virus en la región desde mediados de 1990, sobre todo en RVA. Estos resultados han permitido generar un detallado conocimiento del impacto en la salud infantil y la sociedad en general por parte de los mencionados virus y a establecer la epidemiología molecular de las cepas que circulan en todo el territorio y en cada una de sus regiones. Estos logros >>>

han hecho posible que hoy en día se haya implementado la vacuna para RVA en ambos países.

En el caso de Uruguay, no hay informes sobre estudios de NV y MAstV-1 en casos de GAI. Solamente el RVA ha sido estudiado y todos los estudios han sido llevados a cabo a partir de muestras obtenidas en la ciudad de Montevideo, con solo un reporte de este virus realizado en el interior del país. La mayoría de estos estudios fueron publicados en revistas científicas nacionales y solo cuatro de ellos fueron publicados en revistas internacionales indexadas. De estos cuatro estudios, solo uno de ellos realizó la caracterización molecular parcial de los genotipos de RVA de acuerdo a los estándares que recomienda la OMS y en muestras obtenidas hace 15 años atrás.

A su vez, es importante destacar que en Uruguay existen muy pocos laboratorios que hacen investigación en virología y los mismos están focalizados en otros tópicos; es decir, que el desarrollo de la virología en Uruguay es bastante reciente y aún incipiente. En este contexto es importante mencionar que el Laboratorio de Virología Molecular, ubicado en el noroeste del Uruguay en la ciudad de Salto, fue creado a propuesta del Dr. Rodney Colina (responsable académico del mismo) en el marco de los llamados a proyectos a “Radicalización de grupos de investigación en calidad de dedicación exclusiva en el interior del Uruguay” por parte de la Universidad de la República realizados durante el último quinquenio. La radicación de investigadores en todas las áreas del conocimiento, equipamiento y construcción de nuevos laboratorios, creación de nuevas ofertas de enseñanza terciaria; han constituido sin lugar a dudas un hito de carácter histórico en cuanto al desarrollo y construcción de universidad pública en todo el territorio del Uruguay, en particular en un país muy altamente centralizado en su capital.

Nuestro laboratorio hoy en día está conformado por un grupo de nueve jóvenes investigadores que están realizando sus tesis de maestría o doctorado en el marco del

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas” (PEDECIBA), del Uruguay. Dicho laboratorio es el único en realizar investigación en Virología en el interior del Uruguay o mejor dicho fuera de la capital del país.

Hemos desarrollado este laboratorio de investigación en esa zona del país debido a: 1) se encuentra ubicado en una región de gran importancia epidemiológica debido a la cercanía geográfica con Argentina y Brasil, lo que genera una constante alerta de ingreso de virus al país; 2) es a su vez una zona agropecuaria altamente productiva; 3) las condiciones climáticas subtropicales existentes; 4) la afluencia constante de turistas procedentes de distintos países debido a la existencia de varios complejos turísticos termales en la zona; 5) existe allí un importante desarrollo de la Universidad de la República, con más de 7.000 mil estudiantes de grado y más de 20 carreras funcionando; 6) apostar a sumar esfuerzos en la dirección de fortalecer la investigación y el desarrollo de la única universidad pública que tiene el Uruguay y que permite de forma gratuita formar a todos nuestros jóvenes a nivel terciario; en particular, llegar a aquellos jóvenes que por cuestiones sociales o económicas no pueden acceder a dicha formación.

Una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo es estudiar el grado de diversidad genética y evolución de los principales virus gastroentéricos que afectan a nuestra población pediátrica y a la población en general, así como determinar el grado de contaminación viral y bacteriana de nuestros principales cursos de agua. Es nuestro objetivo generar datos y conocimientos de gran importancia para la salud pública.

En este contexto, a partir de mediados de 2011 hemos abordado dichas investigaciones dentro dos subcampos del conocimiento de la Virología: uno que tiene que ver con la epidemiología molecular y evolución viral partiendo de muestras clínicas de niños hospitalizados con cuadro clínico de GAI y otro que tiene que ver con el estudio y caracterización de los mismos virus pero a partir de muestras ambienta-

Positivos (%) / media de concentración (g.c./l)²

| Ciudad | RVA ^b | NoV ^c | HAstV ^d |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Bella Unión | 11 (46) / 7.5x10 ⁵ | 8 (33) / 4.2x10 ⁵ | 10 (42) / 4.5x10 ⁴ |
| Salto | 13 (54) / 5.4x10 ⁶ | 9 (38) / 4.9x10 ⁵ | 15 (63) / 7.8x10 ⁵ |
| Paysandú | 14 (58) / 2.8x10 ⁶ | 15 (63) / 2.0x10 ⁶ | 7 (29) / 6.6x10 ⁵ |
| Fray Bentos | 9 (38) / 4.6x10 ⁶ | 17 (71) / 1.0x10 ⁶ | 11 (46) / 6.6x10 ⁵ |
| Total | 47 (49) | 49 (51) | 43 (45) |

^ag.c./l: copias genómicas por litro; ^bRVA: rotavirus grupo A; ^cNoV: norovirus; ^dHAstV: astrovirus humanos.

TABLA 1.

Frecuencia y concentración de rotavirus grupo A, norovirus y astrovirus humano, respecto a los puntos de colecta a lo largo del río Uruguay.

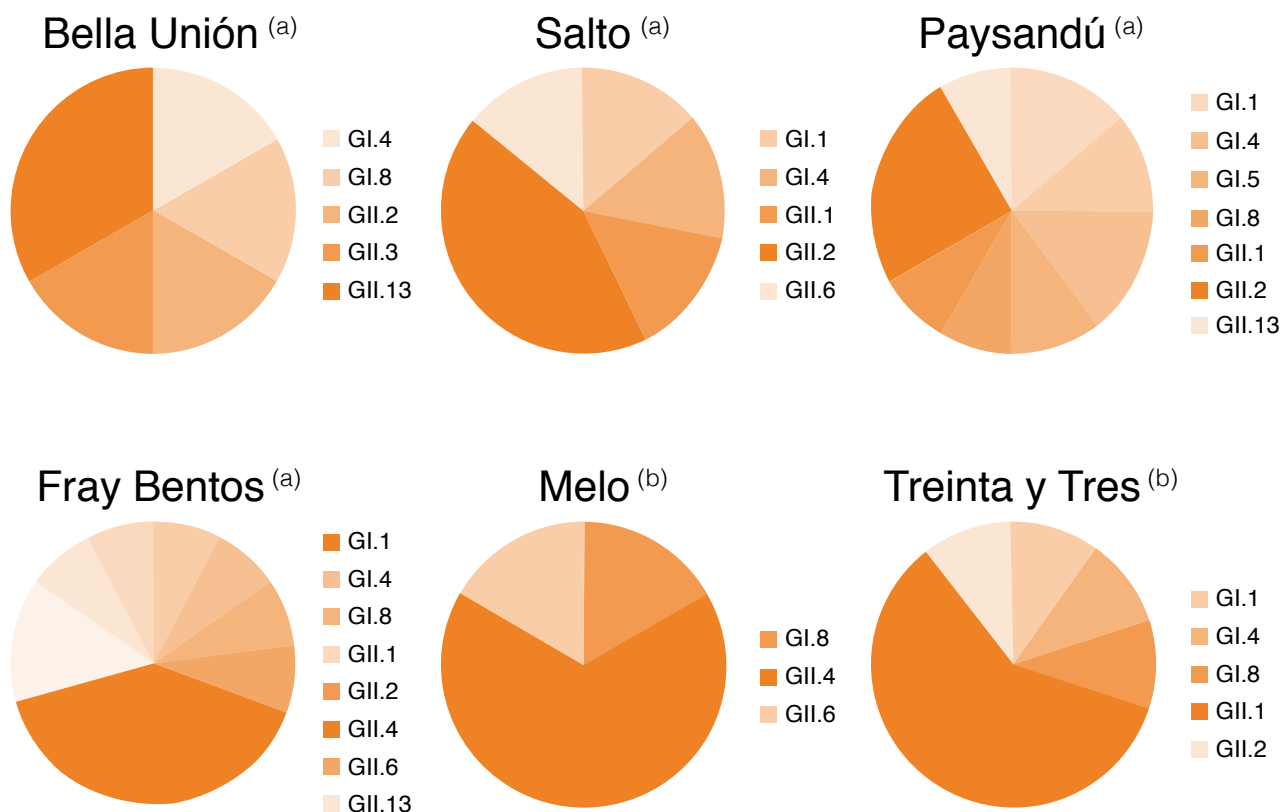


FIGURA 1

Distribución de genotipos de rotavirus GI y GII detectados de acuerdo con los sitios de colecta de agua residual en el noroeste (a: Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos) y este (b: Melo y Treinta y Tres) del Uruguay.

>>> los procedentes de aguas residuales no tratadas que son directamente vertidas a los principales cursos de agua del Uruguay. En el caso del estudio de virus gastroentéricos mediante virología ambiental en Uruguay, es importante destacar que no había antecedentes previos al respecto. Estamos realizando importantes colaboraciones con el Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental del Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil; Catedra de Virología, Universidad de Buenos Aires, Argentina; Instituto Pasteur de París, Francia; Universidad de Roma “Tor Vergata”, Roma, Italia; así como con varias instituciones locales.

Estos abordajes nos han permitido generar un importante caudal de datos de gran valor científico, los cuales han sido y están siendo publicados por nuestro grupo en diversas revistas arbitradas indexadas internacionales y presentados en distintos eventos del área a nivel nacional e internacional (ver sección “Para leer más”).

A continuación nos referiremos a los principales resultados obtenidos en cuanto al estudio de los virus gastroentéricos que afectan la salud de nuestros niños, así como también demostrar la existencia de contaminación ambiental en los principales cursos de agua del país.

El objetivo de este estudio fue detectar y caracterizar molecularmente RVA, NVGI, NVGII y MAstV-1 a partir de muestras clínicas y ambientales colectadas en distintas

regiones geográficas del Uruguay. La colecta de muestras clínicas fue realizada en la ciudad de Salto mediante un estudio de epidemiología molecular de dos años de duración (2011-2012), totalizando 175 muestras. Las muestras ambientales, fueron aguas residuales colectadas en las regiones Noroeste y Este del país. Las muestras al Noroeste fueron recogidas de manera quincenal en cuatro ciudades desde marzo de 2011 a febrero de 2012, totalizando 96 muestras. Las muestras al Este, fueron recogidas de manera bimestral en dos ciudades desde setiembre de 2011 a abril de 2013, totalizando 20 muestras. Los virus presentes en las muestras ambientales fueron concentrados por ultracentrifugación y contaminados con el bacteriófago PP7 a modo de controlar todo el proceso. Las muestras clínicas y los concentrados de las muestras ambientales, fueron analizados mediante protocolos de RT-PCR globalmente utilizados. Luego se realizó la caracterización molecular a través de análisis filogenético de las secuencias genómicas obtenidas. Fue observada una prevalencia de 37% para RVA, 10,3% para MAstV-1 y 8% para NV, a partir de análisis de las muestras clínicas. Se pudo determinar la prevalencia de cada virus por edad y la estacionalidad de los mismos en dichas muestras. Se observó la presencia de genotipos comunes (G1P[8], G2P[4] y G3P[8]) y emergentes (G12P[8], G12P[9]) en humanos de RVA. Se

detectaron genotipos globalmente distribuidos de NVGII, con la importante detección de la cepa pandémica GII.4 New Orleans 2009, y la detección de la cepa recombinante GII.P7-GII.6. Fueron detectados los genotipos HAsV-1, -2 y -3 de MAsV-1 circulando en las muestras clínicas. Interesantemente, fue posible detectar y caracterizar molecularmente RVA y NV a partir de muestras de vómito. Por otro lado, la caracterización molecular de estos virus a partir de agua residual mostro: I) una mayor prevalencia de estos virus en estas aguas que en casos clínicos, (ver *tabla 1*) II) una mayor diversidad genética de cepas circulantes (ver *figura 1 y 2*), III) la circulación de cepas inusuales en humanos de RVA (G3P[3]), IV) la sustitución de una cepa pandémica de GII.4 por otra en el período de un año, siendo ambas introducciones asociadas a un aumento en

el número de infecciones en la población, y V) una correlación casi total entre las cepas observadas en las muestras clínicas y ambientales. Esto último, remarca la importancia de la investigación de virus entéricos a partir de aguas residuales como alternativa de vigilancia epidemiológica cuando no se tiene acceso a muestras clínicas de la población. Los datos generados en este estudio, representan los primeros que han sido obtenidos sobre estos tres virus en el país, y en particular en dos regiones geográficas diferentes de Uruguay, que son limítrofes con Argentina y Brasil. Por último, destacar que los resultados obtenidos remarcan la importancia de establecer una red de vigilancia a nivel nacional para estas virosis que afectan sobre todo a niños, debido a su amplia distribución en todo el territorio nacional. >>>

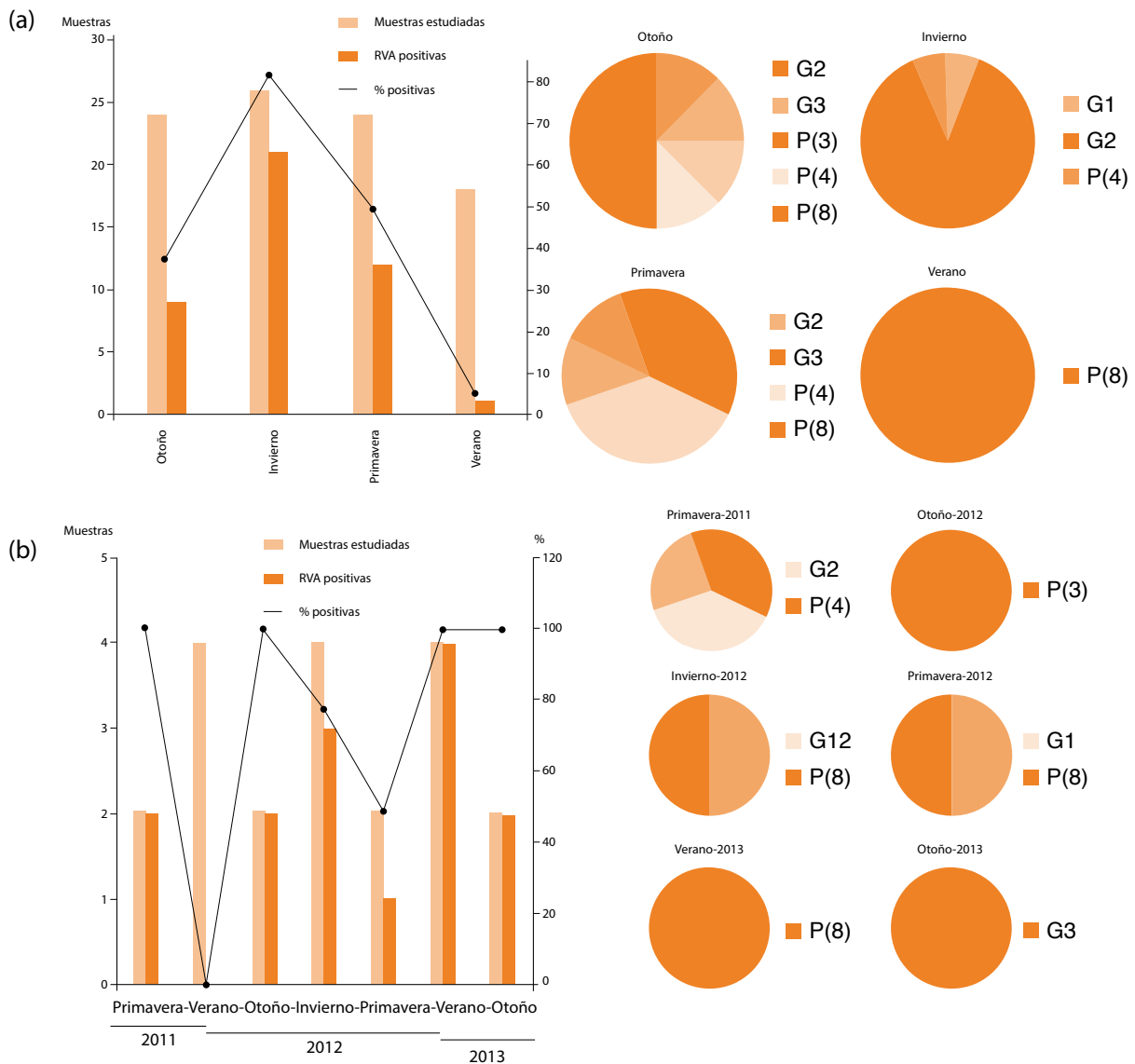


FIGURA 2 Tasas de detección y distribución de rotavirus (RVA) grupo A. Detección en las aguas residuales de las seis ciudades estudiadas situadas en la región, noroeste (a) y Este (b) de Uruguay, entre 2011 a 2013, de acuerdo con la temporada de colecta.

OTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO (I+D) EN MARCHA EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA MOLECULAR, SALTO:

1) Uruguay posee históricamente una elevada actividad agropecuaria en la cual la exportación de carne bovina constituye uno de los principales ingresos económicos. Recientemente hemos comenzado a estudiar virus similares a los humanos pero que causan gastroenteritis y/o problemas reproductivos en bovinos del Uruguay. Virus como rotavirus bovino, coronavirus bovino, norovirus bovino y diarrea viral bovina, han generado y generan gran preocupación a nivel nacional debido a las enormes pérdidas productivas y reproductivas que año a año ocurren en los rodeos del Uruguay. Hasta el momento no hay estudios científicos en profundidad sobre el grado de afectación y la diversidad viral existente a nivel nacional, lo que compleja aún más el problema. Debido a esto entendemos que es necesario investigar sobre dichos temas. Dichos estudios los estamos realizando con el Instituto Nacio-

VIRUS COMO ROTAVIRUS BOVINO, coronavirus bovino, norovirus bovino y diarrea viral bovina, han generado y generan una gran preocupación a nivel nacional debido básicamente a las enormes pérdidas productivas y reproductivas que año a año ocurren en los diferentes rodeos del Uruguay.

nal de Investigación Agropecuaria (INIA) y la Dirección de laboratorios veterinarios del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca del Uruguay.

El objetivo central es generar conocimiento epidemiológico de base que aporte a encontrar una solución a las pérdidas existentes mediante el aislamiento de cepas para ser utilizadas en una vacuna.

2) Uruguay exporta importantes volúmenes de cítricos a diferentes destinos en el mundo y la demanda es creciente cada año. Sin embargo, existen a nivel global distintos patógenos, algunos de origen viral, que afectan seriamente la producción cítrica. Estamos investigando activamente con INIA la prevalencia y caracterización molecular de virus y viroides en cítricos del Uruguay, debido que se estima que las pérdidas económicas causadas por los mismos son elevadas. En este contexto estamos caracterizando a nivel molecular y evolutivo, al virus de la *Tristeza de los Cítricos* y hemos descubierto la existencia de un nuevo genotipo viral que a su vez está circulando predominantemente en Argentina y Uruguay.

3) Hemos comenzado también el estudio de la diversidad de Enterovirus en el ambiente.

Este proyecto busca caracterizar la presencia de Enterovirus Humanos (EvH) en distintas matrices ambientales de Uru-

guay. En primer lugar se realizará una descripción profunda a nivel estacional de la diversidad ambiental de los EvH mediante la secuenciación masiva de muestras de agua residual no tratada, colectadas en diferentes ciudades del país. Luego, se estudiará el impacto en nuestro país del reemplazo de la vacuna oral antipoliomielítica (OPV) por la vacuna inactivada (IPV), implementada en 2012, en la circulación y diversidad genética de Poliovirus (PV) y Enterovirus No Polio (ENP) mediante el estudio de las variantes presentes en el agua residual durante la vacunación con OPV. También se analizará de manera comparativa la concentración y diversidad genética de PV y ENP presentes en aguas superficiales de dos ríos de gran importancia en el Uruguay, en un monitoreo mensual realizado durante un año. Por otro lado, se buscará describir el impacto de la afluencia de turistas en la concentración y diversidad genética de los EvH presentes en efluentes de piscinas de aguas termales de la ciudad de Salto, y se ensayará la viabilidad de dichas partículas virales para luego estimar mediante modelos matemáticos el riesgo de infección que existe para las personas que entran en contacto con dichas

aguas recreacionales. Finalmente, se reconstruirá la historia evolutiva de las variantes de EvH más significativas desde el punto de vista epidemiológico. Este proyecto hará una importante contribución a la epidemiología molecular de los EvH que circulan en Uruguay, y será una oportunidad para estandarizar metodologías y generar capacidad nacional para la vigilancia ambiental de los mismos, especialmente de PV, lo cual a pesar de las recomendaciones de OMS, aun no es realizado en nuestro país.

4) Se ha comenzado a construir el primer laboratorio BLS3 del Uruguay, del cual el Dr. Rodney

Colina ha sido proponente y es el responsable, en la sede Universitaria de la ciudad de Salto. El mismo estará disponible a fines de 2017 y constará de cuatro áreas de trabajo: 1) área de oficinas, para cuatro investigadores, 2) área de BSL2 con dos puestos de trabajo, 3) cuatro salas de biología molecular dentro del área BSL2 (extracción de ácidos nucleicos, Pre-PCR, Post-PCR, y área de preparación de mixes y reactivos) y 4) área de BSL3 de 40 metros cuadrados con dos puestos de trabajo. Dicho laboratorio tendrá como fin investigar todos aquellos virus (ej: Arbovirus, Rabia, etcétera) que presenten un riesgo para la población y que estén en las zonas fronterizas o que hayan ingresado al país. El objetivo final es generar, en el mediano plazo, un Instituto de Investigación en Virología de excelencia. ■

PARA LEER MÁS

Principales trabajos publicados por nuestro laboratorio en los últimos dos años:

1. Phylogenetic analyses of Norovirus strains detected in Uruguay reveal the circulation of the novel GII.P7/GII.6 recombinant variant. Fajardo Á, Tort FL, Victoria M, Fumian TM, Miagostovich MP, Leite JP, Cristina J, Colina R. *Infect Genet Evol.* 2014 Dec;28:328-32. doi: 10.1016/j.meegid.2014.10.026. Epub 2014 Nov 4. PMID: 25445648.

2. Environmental assessment reveals the presence of MLB-1 human astrovirus in Uruguay. Lizasoain A, Tort LF, García M, Gómez MM, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R, Victoria M. *J Appl Microbiol*. 2015 Sep;119(3):859-67. doi: 10.1111/jam.12856. Epub 2015 Jul 8. PMID: 26010679.
3. Environmental Assessment of Classical Human Astrovirus in Uruguay. Lizasoain A, Tort LF, García M, Gómez MM, Cristina J, Leite JP, Miagostovich MP, Victoria M, Colina R. *Food Environ Virol*. 2015 Feb 14. PMID: 25680829.
4. Detection of Common, Emerging and Uncommon VP4, and VP7 Human Group A Rotavirus Genotypes from Urban Sewage Samples in Uruguay. Tort LF, Victoria M, Lizasoain A, García M, Berois M, Cristina J, Leite JP, Gómez MM, Miagostovich MP, Colina R. *Food Environ Virol*. 2015 Dec;7(4):342-53. doi: 10.1007/s12560-015-9213-5. Epub 2015 Aug 13. PMID: 26267835.
5. Molecular epidemiology of group A rotavirus among children admitted to hospital in Salto, Uruguay, 2011-2012: first detection of the emerging genotype G12. Tort LF, Victoria M, Lizasoain A, Castells M, Maya L, Gómez MM, Arreseigor E, López P, Cristina J, Leite JP, Colina R. *J Med Virol*. 2015 May;87(5):754-63. doi: 10.1002/jmv.24123. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25650154.
6. Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. Victoria M, Tort LF, García M, Lizasoain A, Maya L, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R. *Food Environ Virol*. 2014 Jun;6(2):116-24. doi: 10.1007/s12560-014-9143-7. Epub 2014 Apr 29. PMID: 24777819.

OTROS ARTÍCULOS DEL GRUPO

1. Borrelia infection in Ixodes pararicinus ticks (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina. Nava S, Barbieri AM, Maya L, Colina R, Mangold AJ, Labruna MB, Venzal JM. *Acta Trop*. 2014 Nov;139:1-4. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.06.010. Epub 2014 Jun 28. PMID: 24979685.
2. Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. Maya L, Puentes R, Reolón E, Acuña P, Riet F, Rivero R, Cristina J, Colina R. *Arch Virol*. 2015 Nov 23. PMID: 26597189.
3. Detection and Molecular Characterization of Aichivirus 1 in Wastewater Samples from Uruguay. Burutarán L, Lizasoain A, García M, Tort LF, Colina R, Victoria M. *Food Environ Virol*. 2015 Oct 11. PMID: 26456918.
4. Sewage surveillance reveals the presence of canine GVII norovirus and canine astrovirus in Uruguay. Lizasoain A, Tort LF, García M, Gómez MM, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Berois M, Colina R, Victoria M. *Arch Virol*. 2015 Nov;160(11):2839-43. doi: 10.1007/s00705-015-2571-3. Epub 2015 Aug 18. PMID: 26280526.
5. Phylogenetic Studies of the Three RNA Silencing Suppressor Genes of South American CTV Isolates Reveal the Circulation of a Novel Genetic Lineage. Benítez-Galeano MJ, Rubio L, Bertalmío A, Maeso D, Rivas F, Colina R. *Viruses*. 2015 Jul 22;7(7):4152-68. doi: 10.3390/v7072814. PMID: 26205407.
6. Epidemic history of major genotypes of hepatitis C virus in Uruguay. Castells M, Bello G, Ifrán S, Pereyra S, Boschi S, Uriarte R, Cristina J, Colina R. *Infect Genet Evol*. 2015 Jun;32:231-8. doi: 10.1016/j.meegid.2015.03.021. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25801607.