

Caracterización molecular de norovirus, sapovirus y astrovirus en niños con gastroenteritis aguda en Belém (Pará, Brasil)

Caracterização molecular de norovírus, sapovírus e astrovírus em crianças com gastroenterite aguda em Belém, Pará, Brasil

Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil

Glicélia Cruz Aragão
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Darleise de Souza Oliveira
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Mirleide Cordeiro dos Santos
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil
Consuelo Silva de Oliveira

Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Alexandre da Costa Linhares
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

Yvone Benchimol Gabbay
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brasil

RESUMEN

La importancia de los norovirus (NoVs), sapovirus (SaVs) y astrovirus humanos (HAstVs) como causa de brotes de gastroenteritis ya está bien definida. Sin embargo, pocos estudios han descrito casos esporádicos de gastroenteritis aguda causados por esos agentes. El objetivo de este estudio fue el de determinar el papel de esos virus en la etiología de las gastroenteritis agudas en niños atendidos durante una vigilancia intensiva realizada en hospitales y ambulatorios de Belém, Brasil, de marzo a setiembre de 2003. Un total de 305 especímenes fecales de pacientes con gastroenteritis grave fueron colectados y analizados por reacción en cadena de polimerasa precedida de transcripción reversa (RT-PCR), utilizando iniciadores específicos Mon 269 y Mon 270 para los HAstVs; p289 y p290 para los calcivirus humanos (HuCVs); y Mon 431/433 y Mon 432/434 para los NoVs. Secuenciación de los amplicones de HAstV, HuCV y NoV, obtenidos por RT-PCR, se realizó usando los mismos iniciadores. De las 305 muestras analizadas, 96 (31,5%) fueron positivas, 51 diagnosticadas como HuCVs, 40 como HAstVs y cinco infecciones mixtas. De las 56 (18,4%) muestras de HuCVs secuenciadas, 30 fueron NoVs (9,8%) pertenecientes a los genogrupos GI-4 y GII-4, y 15 (4,9%) fueron SaVs de los grupos GI-1, GI-2 y GII-1. HAstVs fueron detectados en 45 (14,7%) muestras, incluyendo los genotipos 1, 8 y 2. Esta investigación resalta la importancia de estas virosis como causa de gastroenteritis aguda y demuestra la circulación de diferentes genotipos durante el período de estudio. Estos resultados refuerzan la necesidad de establecer una vigilancia intensiva de las gastroenteritis causadas por estos virus, de forma a poder evaluar el impacto de la enfermedad y monitorear los genotipos circulantes.

Palabras clave: Norovirus; Sapovirus; Astrovirus Humano; Gastroenteritis; Datos de Secuencia Molecular.

INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis aguda es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la infancia, especialmente en países en desarrollo. Se estima que más de mil millones de casos de diarrea aguda involucrando a niños y adultos ocurra anualmente en el mundo, hecho responsable por una tasa de mortalidad de cerca de seis

millones, entre niños menores de cinco años de edad³². Además de bacterias y parásitos, muchos virus están asociados a esos episodios de gastroenteritis. Entre ellos, se destacan los rotavirus del grupo A, como principal patógeno. Sin embargo, la importancia de los norovirus (NoVs), sapovirus (SaVs), astrovirus humanos (HAstV) y los adenovirus entéricos ha aumentado debido a la utilización de nuevas metodologías⁴⁷.

NoVs y SaVs pertenecen a la familia *Caliciviridae*, y acometen principalmente a humanos. Son virus pequeños, no envueltos, con simetría icosaédrica, de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva². Análisis filogenéticos clasificaron a los NoVs en cinco genogrupos distintos (GI-GV). Los genogrupos GI, GII y GIV se encuentran en humanos, siendo que el GII ha sido descrito como el más prevalente a nivel mundial⁴⁴. Los SaVs se dividen en siete

Correspondencia / Correspondência / Corresponding :

Yvone Benchimol Gabbay
Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia
Rodovia BR316, km 7, s/nº, Levilândia
CEP: 67.030-000 Ananindeua, Pará, Brasi
E-mail: yvonegabbay@iec.pa.gov.br

Traducido por / Traduzido por / Translated by:

Rocio Tamara (resumen) y Lota Moncada (artículo)

genogrupos (GI-GVII), entre los que el GI, GII, GIV y GV son conocidos por infectar al hombre³⁴.

Los NoVs son mundialmente considerados como principal causa de brotes de gastroenteritis, siendo responsables por cerca de 80-90% de los casos, y su transmisión ocurre principalmente a través del agua y de alimentos contaminados. Estudios recientes también describen estos virus como uno de los principales responsables por casos esporádicos de gastroenteritis aguda detectados en hospitales y en comunidades. Los SaVs también han sido asociados tanto a brotes como a casos esporádicos de gastroenteritis aguda³³.

Los HAsVs pertenecen al género *Mamastrovirus* (familia *Astroviridae*). Están asociados a brotes, siendo reconocidos como causa común de gastroenteritis no apenas en niños, sino también en ancianos e individuos inmunocomprometidos²⁷. Son virus pequeños, esféricos (28-30 nm de diámetro), no envueltos, con polaridad positiva y genoma de RNA poliadenilado de cadena sencilla (ssRNA), de aproximadamente 7kb de largo¹³. Hasta el momento, han sido descritos ocho genotipos de HAsVs (HAsV-1-HAsV-8), siendo HAsV-1 el más prevalente, tanto en países desarrollados como en los en desarrollo^{6,46}.

La importancia de los NoVs, SaVs y HAsVs como causa de brotes de gastroenteritis aguda ya está bien definida, sin embargo, pocas investigaciones han descrito el comprometimiento de estos virus en casos esporádicos, especialmente en países en desarrollo. Por este motivo, este estudio tiene como objetivo determinar el papel de estos agentes en la etiología de las gastroenteritis agudas. Para ello, han sido analizadas muestras fecales de niños atendidos durante una vigilancia intensiva realizada en hospitales y ambulatorios de Belém, de marzo a setiembre de 2003. Los principales objetivos de esta vigilancia fueron: crear una red que abarcara a las unidades de salud locales y entrenar equipos, tanto de los hospitales como del Instituto Evandro Chagas (IEC), para investigaciones futuras de vacuna contra rotavirus del grupo A (RV-A). Este estudio tuvo como foco principal la prevalencia de estos agentes, bien como su caracterización molecular, con el fin de determinar los genotipos circulantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES Y ESPECÍMENES

Los especímenes oriundos de muestras fecales se colectaron en episodios graves de diarrea aguda durante vigilancia para RV-A realizada en Belém, Estado de Pará, región norte de Brasil, de marzo a setiembre de 2003. Al momento de la atención, se obtuvo de los padres o responsables legales de los niños participantes, un término de consentimiento. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del IEC. Un análisis inicial fue realizado en todos los hospitales pediátricos, ambulatorios y unidades de salud localizadas en Belém, que ofrecían asistencia a niños menores de tres años, principalmente a aquellos provenientes de familias de baja renta, que vivían en condiciones sanitarias precarias y en elevados índices de aglomerados humanos. Se realizaron contactos previos en todos esos locales y la vigilancia de las gastroenteritis se realizó en visitas diarias, con el fin de detectar cualquier episodio de diarrea, definido por tres o más evacuaciones líquidas o semilíquidas en un período de 24h, con duración inferior a 14 días. Se obtuvo un total de 762 muestras

fecales durante los seis meses de investigación. Las muestras fueron inicialmente analizadas con relación a la presencia de los RV-A y adenovirus entéricos, utilizando "kits" comerciales de ensayo inmunoenzimático (EIE). En el presente estudio, todos los especímenes negativos para ambos virus (305) fueron analizados para los HAsVs y HuCVs por la reacción en cadena de la polimerasa precedida de la transcripción reversa (RT-PCR).

OBTENCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL RNA VIRAL

El ssRNA viral se extrajo de 300 μ L de una suspensión fecal a 10% utilizándose para esto sílica/ tiocianato de guanidina, conforme descrito por Boom et al³, incluyendo modificaciones introducidas por Cardoso et al⁶. En la reacción de transcriptasa reversa fue usado un iniciador aleatorio [hexamer pd (N) 6-50 A260 units; Amersham Biosciences] para obtención del cDNA. Fue realizada a reacción de PCR usando los pares de iniciadores Mon 269/270 (región ORF2) para los HAsVs³⁰ y p289/290 (región de la RNA polimerasa) para los HuCVs²³. Los productos obtenidos por RT-PCR fueron aplicados en gel de agarosa a 1%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados en aparato Gel Doc 1000 (BioRad). Las muestras que presentaron fragmentos específicos de 449 pb, 319 pb y 331 pb, fueron consideradas positivas para HAsVs, NoVs y SaVs, respectivamente. Muestras positivas para HAsVs y HuCVs y agua Milli-Q estéril fueron incluidas en todas las reacciones como controles positivos y negativo, respectivamente. Algunas muestras que presentaron baja concentración de producto (bandas débiles) con los iniciadores para HuCVs también fueron analizadas con los iniciadores Mon 432/434 e Mon 431/433 (región de la RNA polimerasa), específicos para los NoVs de los genogrupos GI y GII, respectivamente¹¹.

SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLICONS DE HASTVS, HUCVS Y NOVOS OBTENIDOS POR RT-PCR

Los productos fueron purificados con el "kit" de extracción de gel QiaQuick® (QIAGEN), conforme orientación del fabricante, y cuantificados en gel de agarosa a 1% con el marcador de peso molecular "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen). Las secuencias de nucleótidos fueron determinadas por ciclo directo usando el "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems) con los iniciadores Mon 269 y Mon 270 para HAsVs, p289 y p209 para HuCVs y Mon 431/433 y Mon 432/434 para NoVs. Los fragmentos amplificados fueron purificados por precipitación con isopropanol (60 y 70%). Los productos fueron analizados en el secuenciador automático "3130X/Genetic Analyzer" (AB Applied Biosystems/ Hitachi).

ANÁLISIS FILOGENÉTICA

Los datos de las secuencias de ambas cintas fueron alineados y editados usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (v. 7.0.5.3) y comparados a otras secuencias estándar disponibles en el banco de datos (GenBank). Los dendrogramas fueron construidos utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ) y software MEGA, versión 4.0⁴². El análisis del "Bootstrap" fue realizado con 2.000 réplicas¹⁴.

NÚMERO DE ACCESO DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIPOS

Las secuencias de nucleótidos determinadas en este estudio fueron depositadas en el banco de datos "GenBank" con lo siguientes números de acceso: GU012316 a

GU012345 para NoVs, GQ984294 a GQ984308 para SaVs y GQ920650 a GQ920672 para HAsTVs.

RESULTADOS

De un total de 305 muestras analizadas por RT-PCR, 96 (31,5%) presentaron resultados positivos, siendo 51 clasificadas como HuCVs, 40 como HAsTVs y cinco infecciones mixtas. De los 56 (18,4%) especímenes positivos para HuCVs, 45 fueron secuenciados: 30 (66,7%) clasificados como NoVs, genogrupos GI-4 (1; 3,3%) y GII-4 (29; 96,7%), y 15 (33,3%) como SaVs, genogrupos GI-1 (3; 20%), GI-2 (2; 13,3%) y GII-1 (10; 66,7%) (Figura 1, Tabla 1). Las 11 muestras que

presentaron un fragmento amplificado con baja concentración (banda débil) en la PCR fueron nuevamente analizadas, con el uso de iniciadores específicos para NoVs; en ocho se observaron dos fragmentos específicos y tres fueron negativos. Luego de la secuenciación, tan sólo una muestra resultó positiva para el genogrupo GII-4; con relación a las otras siete, como algunos nucleotidos no pudieron ser definidos, sus cepas no fueron incluidas en el dendrograma. De las 45 (14,7%) muestras clasificadas como HAsTVs, 37 (82,2%) pertenecían al genotipo 1,4 (8,9%) al genotipo 8, 2 (4,4%) al genotipo 2 y 2 (4,4%) no fueron secuenciadas (Figura 2, Tabla 1). Se observaron cinco infecciones mixtas: cuatro involucrando NoV/GII-4 y HAsTV-1 y una SaV/GII-1 y HAsTV-8.

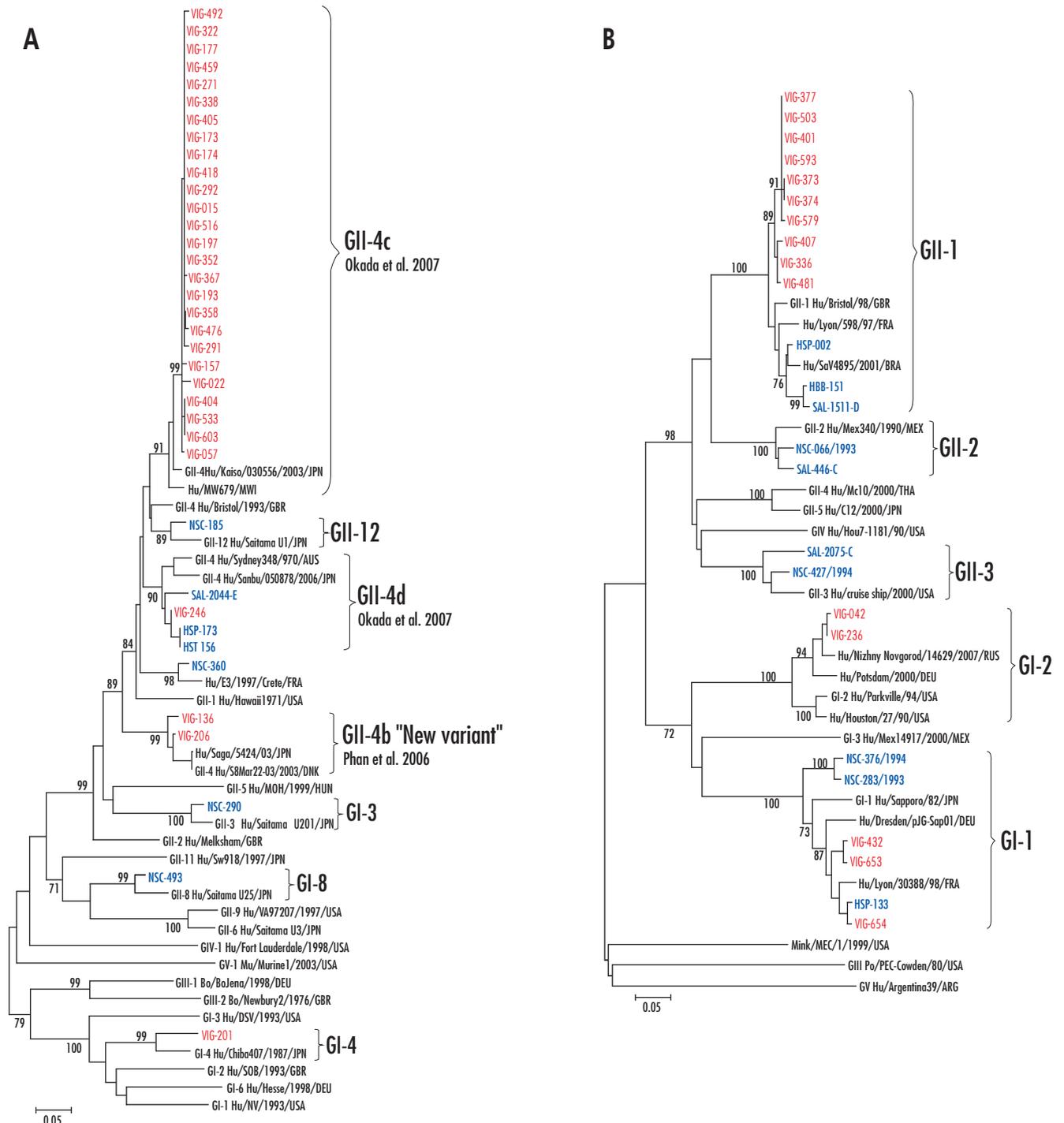


Figure 1 – Dendrogramas de secuencia parcial de RNA polimerasa de norovirus (A) y sapovirus (B) amplificados de 45 pacientes de Belém, Brasil, de marzo a setiembre de 2003. Cepas de prototipos se presentan en el dendrograma, junto a cepas de otras localidades. El número anterior de cada ramo corresponde al valor de bootstrap. La escala es proporcional a la distancia genética. Muestras oriundas de Belém, colectadas en 2003 (VIG) están en rojo; muestras de Belém colectadas anteriormente se presentan en negra

Tabla 1 – Distribución de genotipos de norovirus, sapovirus y astrovirus con base en análisis secuenciado de especímenes fecales colectadas de 305 niños diarreicos en Belém, Brasil, de marzo a setiembre de 2003.

Pos HuCVs Iniciadores 289/290 N = 56 (18.4%) Secuenciados – 45		Pos HuCVs Iniciadores 431-433 N = 11 (3.6%)		Pos HAstVs N = 45 (14.7%)			Infecciones Mixtas N = 5 (1.6%)	
NoVs ^o	SaVs	NoVs*	Negative	HAstV-1a	HAstV-2	HAstV-8	NT [†]	
30 (9.8%) GII-4 (96.7%) GI-4 (3.3%)	15 (4.9%) GII-1 (66.7%) GI-2 (13.3%) GI-1 (20%)	8 (2.6%) GII-4 (12.5%) NT [†] (87.5%)	3	37 (12.1%)	2 (0.7%)	4 (1.3%)	2 (0.7%)	HAstV-1/Nov-GII-4 – (80%) HAstV-8/SaV-GII-1 – (20%)

* Total de muestras positivas para NoV: 30 + 8 = 38 (12.5%);

† NT- No tipadas;

HuCVs: Calicivirus humano, NoVs: Norovirus, SaVs: Sapovirus, HAstVs: Astrovirus humano.

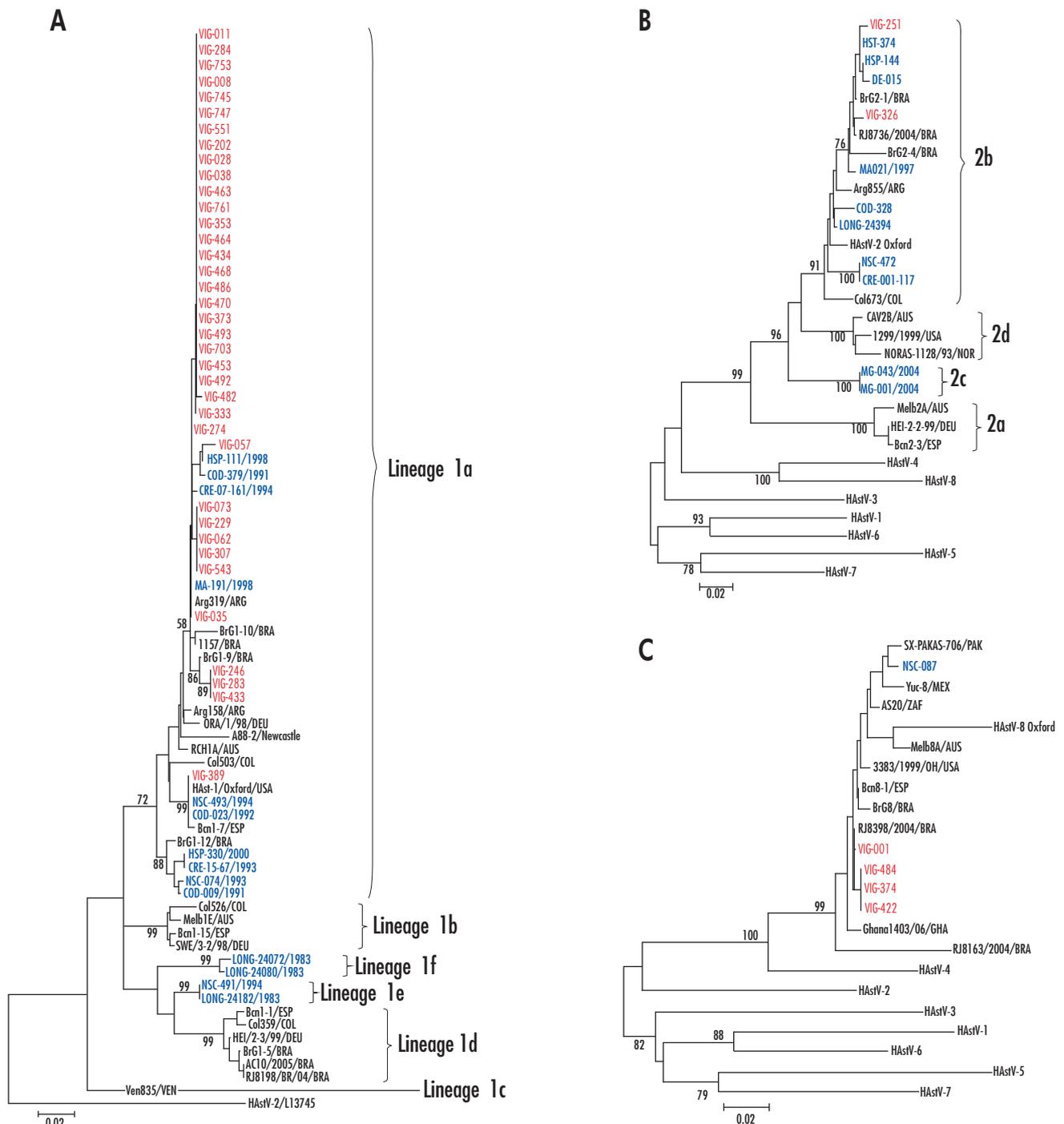


Figure 2 – Dendrograma de región parcial de ORF2 de astrovirus tipo 1 (A), tipo 2 (B) y tipo 8 (C) amplificado de 45 pacientes de Belém, Brasil, de marzo a setiembre de 2003. Cepas del prototipo se presentan en el dendrograma junto a cepas de otras localidades. El número anterior de cada ramo corresponde al valor de bootstrap. La escala es proporcional a la distancia genética. Muestras oriundas de Belém, colectadas en 2003 (VIG) están en rojo; muestras de Belém colectadas anteriormente se presentan en negrita.

Las muestras clasificadas como NoVs/GII-4 se agruparon en tres sublinajes distintos: GII-4b "nueva variante" (2/29; 6,9%), GII-4c (26/29; 89,6%) y GII-4d (1/29; 3,4%). La divergencia promedio observada entre las muestras clasificadas como NoV GII-4c e GII-4b "nueva variante" fue de 0,5% y 2,9%, respectivamente, y, con el prototipo específico, fue de 3,1% (GII-4b "nueva variante"), 3% (GII-4c), 4,9% (GII-4d) y 11,3% (GI-4). Los análisis abarcando solamente muestras de Belém demostraron una divergencia promedio de 9,6% entre GII-4c y GII-4d, y 16,4% entre GII-4b y GII-4d. En relación a GI-4, esta variación fue mayor que 49,3%. Una pequeña divergencia se observó cuando fueron analizados los especímenes clasificados en el genogrupo GII-4, con relación a la secuencia de aminoácidos (datos no mostrados).

Entre los SaVs, una variación mínima fue observada dentro de cada uno de los tres genogrupos detectados: GI-1 (0,9%), GI-2 (0,3%) y GI-1 (3,1%). En relación a los prototipos, la divergencia promedio fue: GI-1 (4,1%), GI-2 (10,3%) y GI-1 (10,3%). Usando la secuencia de aminoácidos del prototipo Bristol (AJ 249939; aminoácido 1460 a 1555) como referencia, fueron notadas muchas sustituciones, caracterizando a los diversos genogrupos/genotipos analizados. Sin embargo ninguna sustitución exclusiva se observó con relación a las muestras de Belém (datos no mostrados).

Todas las cepas de HAsTV detectadas en este estudio pertenecían al linaje I y hubo una divergencia de 0 - 3,6% (promedio de 0,6%) y 2,7% en relación al prototipo Oxford HAsTV-1. Ninguna sustitución significativa de aminoácido fue observada para la región analizada (datos no mostrados).

Los especímenes de este estudio fueron provenientes de 21 hospitales y 11 unidades de salud. La comparación de las tasas de positividad obtenidas en los hospitales para NoVs (13,2% - 37/281), SaVs (5,3% - 15/281) y HAsTVs (14,6% - 41/281) con las unidades de salud - 4,2% (1/24), 0% y 16,7% (4/24), respectivamente - no reveló diferencia estadística significativa cuando aplicado el test de Fisher ($p < 0.05$). Sin embargo, cuando considerados juntos NoVs y SaVs (como HuCVs), esta diferencia fue significativa ($p = 0.04$).

La tabla 2 demuestra el porcentaje de positividad obtenido para NoVs, SaVs y HAsTVs en casos de gastroenteritis observados durante el período de estudio (marzo a setiembre de 2003). Se verificaron picos de incidencia para NoVs en mayo (13/43; 30,2%); SaVs en junio (4/50; 8,0%) y julio (5/64; 7,8%); y HAsTVs en marzo (8/16; 50%) y julio (14/64; 21,9%).

La distribución por franja etaria de los casos positivos para NoVs y SaVs y HAsTVs está demostrada en la tabla 3. La mayor tasa de detección para los NoVs se verificó en niños de 6 a 12 meses de edad (17,1%), y, para los SaVs, la franja etaria fue más alta, 24 a 30 meses (10,7%). Con relación a los HAsTVs las tasas fueron semejantes (19,0% e 18,2%) para las edades de 0 a 6 y 12 a 18 meses de vida.

La mayoría de los especímenes se colectó en el período de 42 h de la hospitalización o de la atención en las unidades de salud. Los principales síntomas observados en los casos positivos para esas virosis fueron: diarrea, vómitos, fiebre y deshidratación, pero síntomas similares fueron observados en los casos negativos (datos no mostrados).

Tabla 2 – Distribución mensual de cepas de norovirus, sapovirus y astrovirus detectadas en 305 especímenes fecales colectados de niños diarreicos en Belém, Pará, Brasil, de marzo a setiembre de 2003.

Mes	No. Total de Muestras	Calicivirus Humanos		Astrovirus Pos (%)
		Sapovirus Pos (%)	Sapovirus Pos (%)	
Marzo	16	2 (12.5)	1 (6.3)	8 (50)
Abril	42	2 (4.8)	–	3 (7.1)
Mayo	43	13 (30.2)	1 (2.3)	5 (11.6)
Junio	50	7 (14)	4 (8.0)	8 (16)
Julio	64	9 (14.1)	5 (7.8)	14 (21.9)
Agosto	44	5 (11.4)	2 (4.5)	2 (4.5)
Setiembre	46	–	2 (4.3)	5 (10.9)
Total	305	38 (12.5)	15 (4.9)	45 (14.7)

Notes: Tres muestras positivas para calicivirus no fueron incluidas porque no fueron secuenciadas;
Señal convencional utilizada: – Dato numérico igual a cero.

Tabla 3 – Frecuencia de astrovirus, norovirus y sapovirus humanos en 305 especímenes fecales colectadas de niños diarreicos en Belém, Pará, Brasil, de marzo a setiembre, en relación a su edad.

Edad (en meses)	No. Total de Muestras	Human Calicivirus		Astrovirus Pos (%)
		Sapovirus Pos (%)	Norovirus Pos (%)	
0-6	42	1 (2.4)	–	8 (19.0)
>6-12	82	14 (17.1)	3 (3.7)	11 (13.4)
>12-18	77	11 (14.3)	5 (6.5)	14 (18.2)
>18-24	56	8 (14.3)	4 (7.1)	8 (14.3)
>24-30	28	2 (7.1)	3 (10.7)	1 (3.6)
>30-36	20	2 (10.0)	–	3 (15.0)
Total	305	38 (12.5)	15 (4.9)	45 (14.7)

Notes: Tres muestras positivas para calicivirus no fueron incluidas porque no fueron secuenciadas;
Señal convencional utilizada: – Dato numérico igual a cero.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, por lo menos un agente viral fue detectado en 31,5% de las muestras analizadas. Ese resultado fue un poco superior a la tasa de 29% encontrada en una vigilancia realizada durante cinco años en la Provincia de Gyeonggi, Corea del Sur²². Las tasas de detección obtenidas en Belém para HuCVs, NoVs, SaVs y HAsTVs fueron de: 18,4%, 12,5%, 4,9% y 14,7%, respectivamente. En hospitales de Campo Grande (7,6%), Goiânia y Brasília-DF (8,6%) y Salvador (9%), las tasas obtenidas para los HuCVs fueron inferiores a las registradas en Belém^{1,4,48}. Con relación a los NoVs, la positividad observada (12,5%) fue menor que la registrada en niños de Corea (36,2%) y Espírito Santo

(39,7%), pero semejante a la encontrada en dos estudios realizados en Rio de Janeiro (14,5% e 20%) y São Paulo (15,7%) y superior a la de una investigación realizada en Tailandia (6,5%)^{24,26,28,37,41,44}.

La investigación de SaVs en Brasil todavía es limitada en virtud de que la mayoría de los trabajos utilizan iniciadores específicos para los NoVs. Sin embargo, estos virus ya han sido detectados en una muestra de Salvador (0,7%) y descritos en especímenes diarreicos colectados en un hospital (5,9%) y en una unidad de salud (3%) de Belém en porcentajes similares a los del estudio actual (4,9%)^{29,40,48}. Este porcentaje fue semejante a los relatados en Tailandia y Australia (4,8% y 4,1%, respectivamente) y menor que los de India (10,2%)^{20,21,35}. En esta investigación, tres muestras que se presentaron positivas para HuCVs, fueron negativas para NoVs (cuando se utilizaron iniciadores específicos), sugiriendo que, probablemente, pertenecían al género SaVs, lo que aumentaría la tasa de detección de esos virus para 5,9%.

La tasa de positividad para los HAsTV (14,7%) fue semejante a las registradas en ambulatorios y/u hospitales de Corea del Sur, Ciudad de Córdoba y Rio de Janeiro (11,%, 12,4% y 14%, respectivamente)^{19,22,45}. Este porcentaje fue mayor que los obtenidos anteriormente en diferentes estudios realizados en Belém durante 18 años abarcando hospitales, unidades de salud, comunidades y guarderías, que varió entre 2,7% y 9,9%¹⁵.

El dendrograma de NoVs mostrado en el presente estudio se construyó en base a las secuencias obtenidas con los iniciadores 289/290, que codifican parte de la RNA polimerasa, y que fueron usados por detectar tanto los NoVs como los SaVs. En contrapartida, la mayoría de los estudios realizados en Brasil utiliza otros pares de iniciadores que amplifican la región B de la RNA polimerasa y son específicos para NoVs. Como esos iniciadores codifican la misma región de la RNA polimerasa, fue posible comparar los resultados de esta investigación con otras realizadas en Brasil. En el presente estudio, el genogrupo GII-4 fue detectado en un 96,7% de las muestras analizadas. Estos resultados confirman los obtenidos en Rio de Janeiro (64%) y en São Paulo (76,9%)^{7,44}. Este genogrupo también fue el más encontrado en muestras colectadas en Belém en los años de 1992-1994 y 1998-2000 (datos no mostrados). Muchos artículos relatan un aumento significativo en la circulación de cepas de GII-4 desde la década de 1990, con una gran variabilidad genética, relacionados tanto a brotes extensivos como a casos esporádicos^{5,31,43}.

Tres diferentes genogrupos de SaVs fueron encontrados en este estudio, siendo el GII-1 el más prevalente (66,7%). Este también fue detectado en una muestra de Salvador, el único otro lugar en Brasil en que este virus ha sido descrito⁴⁸. Sin embargo, en estudios realizados anteriormente en Belém, el genogrupo más frecuente fue el GI-140. También fue observada una ocurrencia semejante de esta cepa en Bangladesh, en niños diarreicos⁸.

Tres diferentes genotipos de HAsTVs cocircularon en Belém durante los seis meses de estudio, siendo HAsTV-1 el más prevalente (82,2%), como también relatado en otros locales^{6,16,39,45}. La circulación simultánea de otros genotipos se observó en otras regiones de Brasil y del mundo^{6,10,36,39}. Todas las muestras positivas para HAsTVs-1 fueron clasificadas como siendo del linaje I. Anteriores

investigaciones realizadas en Belém demostraron que un 93,8% (76/81) de las cepas de HAsTVs-1 detectadas a lo largo de 18 años (1982-2000) pertenecían al linaje 1¹⁵. Sin embargo, estudios conducidos en otras localidades de Brasil, como en las ciudades de Rio de Janeiro y Goiânia, de 2003 a 2005, demostraron la circulación del linaje 1d^{38,45}. Los datos obtenidos en este trabajo, a partir de muestras colectadas en 2003, mostraron que no hubo ninguna alteración en Belém, visto que el linaje 1 continuó siendo el único en circulación. Vale destacar que el HAsTVs tipo 8 fue encontrado en 8,9% de las muestras. Este genotipo es considerado raro, aunque ya haya sido observado en otros estudios realizados en Belém, con menor frecuencia. Resultados semejantes se observaron en Rio de Janeiro^{17,45}.

Se verificó coinfección involucrando a los tres virus en un 1,6% de los casos. Esta situación es relativamente común en episodios de gastroenteritis, conforme a lo descrito por otros autores^{9,18,25,36,44}. Este hecho probablemente refleja las precarias condiciones de saneamiento y el bajo nivel socioeconómico en que viven esos niños.

Este estudio abarcó muestras colectadas en hospitales y unidades de salud. Fue observada una mayor frecuencia de estos virus en los nosocomios, lo que indica mayor gravedad en la asociación de esos agentes a cuadros de gastroenteritis. Sin embargo, el número de especímenes (42) colectados en las unidades de salud fue muy pequeño como para permitir un mejor análisis.

Fue observado también que los NoVs fueron más prevalentes entre niños de 6 a 12 meses, mientras que los SaVs lo fueron entre los niños de 24-30 meses de edad. Estos datos están de acuerdo a lo descrito en la literatura, lo que indica que los SaVs son más frecuentemente detectados en niños de edad más elevada¹². Un estándar de estacionalidad para esos tres agentes no puede ser definido porque este estudio abarcó solamente seis meses de vigilancia.

De este modo, los datos obtenidos demuestran la importancia de estos virus en los casos de gastroenteritis aguda tanto en hospitales como en unidades de salud. La detección de SaVs refuerza la necesidad de establecer un sistema de monitoreo para evaluar el impacto de estos virus en otras regiones de Brasil. La caracterización molecular de esos agentes demostró que diferentes genotipos circulan a lo largo del tiempo (o sea, no fueron los mismos en esta investigación y en otras previamente realizadas en Belém). Por lo tanto, estudios moleculares adicionales son necesarios para monitorear esas variaciones. La introducción reciente de vacuna para RV-A en el programa Nacional de Inmunización Pediátrica de Brasil refuerza la necesidad de investigaciones permanentes sobre estas virosis.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo técnico prestado por Maria Silva Sousa de Lucena, Jones Anderson Monteiro Siqueira, Ian Carlos Lima, Dielle Monteiro Teixeira y Jefferson Oliveira, bien como a todo el equipo de campo y a los médicos que trabajaron durante el proyecto "Vigilancia Intensiva de las Diarreas en Hospitales". Este trabajo tuvo el apoyo financiero del IEC/SVS/MS.



Caracterização molecular de norovírus, sapovírus e astrovírus em crianças com gastroenterite aguda em Belém, Pará, Brasil

RESUMO

A importância dos norovírus (NoVs), sapovírus (SaVs) e astrovírus humanos (HAstVs) como causa de surtos de gastroenterites já está bem definida. Entretanto, poucos estudos têm descrito casos esporádicos de gastroenterite aguda causados por esses agentes. O objetivo deste estudo foi determinar o papel destes vírus na etiologia das gastroenterites agudas em crianças atendidas durante uma vigilância intensiva realizada em hospitais e ambulatórios de Belém, Brasil, de março a setembro de 2003. Um total de 305 espécimes fecais de pacientes com gastroenterite grave foram coletados e testados por reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), utilizando iniciadores específicos Mon 269 e Mon 270 para os HAstVs; p289 e p290 para os calicivírus humanos (HuCVs); e Mon 431/433 e Mon 432/434 para os NoVs. Sequenciamento dos amplicons de HAstV, HuCVs e NoVs, obtidos por RT-PCR, foi realizado usando os mesmos iniciadores. Das 305 amostras testadas, 96 (31,5%) apresentaram resultados positivos, sendo que 51 diagnosticadas como HuCVs, 40 como HAstVs e cinco infecções mistas. Das 56 (18,4%) amostras de HuCVs sequenciadas, 30 foram NoVs (9,8%) pertencentes aos genogrupos GI-4 e GII-4, e 15 (4,9%) SaVs dos grupos GI-1, GI-2 e GII-1. HAstVs foram detectados em 45 (14,7%) das amostras, incluindo os genótipos 1, 8 e 2. Esta pesquisa ressalta a importância destas viroses como causa de gastroenterite aguda e demonstra a circulação de diferentes genótipos durante o período de estudo. Estes resultados reforçam a necessidade de se estabelecer uma vigilância intensiva das gastroenterites causadas por estes vírus, de forma a poder avaliar o impacto da doença e monitorar os genótipos circulantes.

Palavras-chave: Norovírus; Sapovírus; Astrovírus Humano; Gastroenterite; Dados de Sequência Molecular.

Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil

ABSTRACT

The importance of norovirus (NoVs), sapovirus (SaVs) and human astrovirus (HAstVs) as causes of gastroenteritis outbreaks is already well-defined, but a few studies have described sporadic cases of acute gastroenteritis caused by these viral entities. The aim of this study was to determine the role of these viruses in the etiology of acute gastroenteritis in children enrolled to participate in hospital – and emergency department – based intensive surveillance carried out in Belém, Brazil, from March to September 2003. A total of 305 stool specimens from patients with severe gastroenteritis were collected and screened by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR), using the specific primers Mon 269 and Mon 270 for HAstVs, p289 and p290 for human calicivirus (HuCVs), and Mon 431/433 and Mon 432/434 for NoVs. Sequencing of RT-PCR HAstV, HuCV and NoV amplicons was carried out using the same primers. Of the 305 samples tested, 96 (31.5%) were positive, with 51 diagnosed as HuCVs, 40 as HAstVs and five as mixed infections. Of the 56 (18.4%) HuCVs sequenced, 30 were NoVs (9.8%) of genogroups GI-4 and GII-4, and 15 (4.9%) were SaVs of types GI-1, GI-2 and GII-1. HAstVs, including genotypes 1, 8 and 2, were detected in 45 (14.7%) samples. This study has highlighted the importance of these viruses as causes of acute gastroenteritis and established the circulation of different genotypes during the study period. These results reinforce the need for establishing an intensive surveillance for gastroenteritis caused by these viruses to assess the burden of disease and to monitor the circulation of genotypes.

Keywords: Norovirus; Sapovirus; Human, Astrovirus; Gastroenteritis; Molecular Sequence Data



REFERENCIAS

- 1 Andreasi MS, Cardoso DD, Fernandes SM, Tozetti IA, Borges AM, Fiaccadori FS, et al. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Nov;103(7):741-4.
- 2 Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jan;14(1):15-37.
- 3 Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):495-503.
- 4 Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco RC, et al. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Nov;101(7):721-4.

- 5 Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II. 4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2006 Feb;44(2):327-33.
- 6 Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Martins RM, Leite JPG. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit.* 2002 Sep;8(9):CR624-8.
- 7 Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé J, Rácz ML. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2006 Nov;44(11):3947-53.
- 8 Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AF, Yagyu F, et al. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. *J Med Virol.* 2007 May;79(5):633-8.
- 9 Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Nakagomi O, et al. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol.* 2005 Dec;77(4):522-7.
- 10 Espul A, Martinez N, Noel JS, Cuello H, Abrile C, Grucci S, et al. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J Med Virol.* 2004 Jan;72(1):75-82.
- 11 Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, et al. Epidemiological and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 2002 Jul;186(1):1-7.
- 12 Farkas T, Deng X, Ruiz-Palacios G, Morrow A, Jiang X. Development of an enzyme immunoassay for detection of sapovirus-specific antibodies and its application in a study of seroprevalence in children. *J Clin Microbiol.* 2006 Oct;44(10):3674-9.
- 13 Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Family Astroviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on the taxonomy of viruses.* San Diego: Elsevier Academic Press; 2005. p. 859-64.
- 14 Felsenstein J. PHYLIP, Version 3.57c. Seattle, WA: Department of Genetics, University of Washington; 1995.
- 15 Gabbay YB, Leite JP, Oliveira DS, Nakamura LS, Nunes MR, Mascarenhas JD, et al. Molecular epidemiology of astrovirus type 1 in Belém, Brazil, as an agent of infantile gastroenteritis, over a period of 18 years (1982-2000): identification of two possible new lineages. *Virus Res.* 2007 Nov;129(2):166-74.
- 16 Gabbay YB, Linhares AC, Cavalcante-Pepino EL, Nakamura LS, Oliveira DS, Silva LD, et al. Prevalence of human astrovirus genotypes associated with acute gastroenteritis among children in Belém, Brazil. *J Med Virol.* 2007 May;79(5):530-8.
- 17 Gabbay YB, Linhares AC, Oliveira DS, Nakamura LS, Mascarenhas JD, Gusmão RH, et al. First detection of a human astrovirus type 8 in a child with diarrhea in Belém, Brazil: comparison with other strains worldwide and identification of possible three lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Jun;102(4):531-4.
- 18 Gabbay YB, Luz CR, Costa IV, Cavalcante-Pepino EL, Sousa MS, Oliveira KK, et al. Prevalence and genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Nov;100(7):709-14.
- 19 Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Paez Rearte M, Nates SV. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a public hospital in Cordoba City, Argentina. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2004 Mar-Apr;46(2):93-6.
- 20 Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, et al. Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol.* 2004 Mar;42(3):1305-7.
- 21 Hansman GS, Takeda N, Katayama K, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, et al. Genetic diversity of sapovirus in children, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jan;12(1):141-3.
- 22 Huh JW, Kim HW, Moon SG, Lee JB, Lim YH. Viral etiology and incidence associated with acute gastroenteritis in a 5-year survey in Gyeonggi province, South Korea. *J Clin Virol.* 2009 Feb;44(2):152-6.
- 23 Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods.* 1999 Dec;83(1-2):145-54.
- 24 Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Yeephoo T, Khamrin P, Ushijima H. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol.* 2009 Feb;81(2):345-53.
- 25 Klein EJ, Boster DR, Stapp JR, Wells JG, Qin X, Clausen CR, et al. Diarrhea etiology in a Children's Hospital Emergency Department: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2006 Oct;43(7):807-13.

- 26 Koh H, Baek SY, Shin JI, Chung KS, Je YM. Coinfection of viral agents in Korean children with acute watery diarrhea. *J Korean Med Sci.* 2008 Dec; 23(6):937-40.
- 27 Méndez E, Arias CF. Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 981-1000.
- 28 Morillo SG, Cilli A, Carmona RC, Timenetsky MC. Identification and molecular characterization of norovirus in São Paulo State, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2008 Dec;39(4):619-22.
- 29 Nakamura LS, Oliveira DS, Silva PF, Lucena MS, Mascarenhas JD, Gusmão RH, et al. Molecular characterization of calicivirus in feces of children with acute diarrhea, attending a public hospital, in Belém, Pará. In: XVII National Meeting of Virology; 2006 19-22; Campos do Jordão: Sociedade Brasileira de Virologia; 2006. p. 95. (*Virus Reviews & Research*; vol. 11; supl. 1).
- 30 Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol.* 1995 Apr;33(4):797-801.
- 31 Okada M, Ogawa T, Yoshizumi H, Kubonoya H, Shinozaki K. Genetic variation of the norovirus GII-4 genotype associated with a large number of outbreaks in Chiba prefecture, Japan. *Arch Virol.* 2007;152(12): 2249-52.
- 32 Parashar UD, Gibson CJ, Breese JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006 Feb;12(2):304-6.
- 33 Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1224-31.
- 34 Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, et al. Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infect Genet Evol.* 2007 Jul;7(4):542-6.
- 35 Rachakonda G, Choudekar A, Parveen S, Bhatnagar S, Patwari A, Broor S. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children with acute sporadic gastroenteritis in New Delhi, India. *J Clin Virol.* 2008 Sep;43(1):42-8.
- 36 Resque HR, Munford V, Castilho JG, Schmich H, Caruzo TA, Rácz ML. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Dec;102(8): 969-74.
- 37 Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP, et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Mar;103(2):201-6.
- 38 Silva PA, Cardoso DD, Schreier E. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. *Arch Virol.* 2006 Jul;151(7): 1405-17.
- 39 Silva PA, Santos RA, Costa PS, Teixeira JM, Giugliano LG, Andreasi MS, et al. The circulation of human astrovirus genotypes in the Central West Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104(4): 655-8.
- 40 Siqueira JM, Aragão GC, Nascimento IS, Oliveira DS, Santos MC, Lima IC, et al. Estudos da prevalência de calicivírus humanos em crianças com gastroenterite atendidas em um posto de saúde de Belém-Pará no período de 1998-1999. In: Anais do II Congresso Norte Nordeste de Infectologia; 2008 nov. 28-30; Belém: Sociedade Brasileira de Infectologia; 2008.
- 41 Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN, et al. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007 Aug;13(8):1244-6.
- 42 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007 Aug;24(8): 1596-9.
- 43 Tu ET, Bull RA, Greening GE, Hewitt J, Lyon MJ, Marshall JA, et al. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clin Infect Dis.* 2008 Feb;46(3):413-20.
- 44 Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J.* 2007 Jul;26(7):602-6.

- 45 Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich MP. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol*. 2007 Jul;79(7):939-44.
- 46 Walter JE, Mitchell DK, Guerrero ML, Berke T, Matson DO, Monroe SS, et al. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a Periurban community of Mexico City. *J Infect Dis*. 2001 Mar;183(5):681-6.
- 47 Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2003 Apr;9(4):247-62.
- 48 Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MS, Victoria M, Miranda V, Silva MF, et al. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2009 May; 42(5):438-44.

Recibido en / Recebido em / Received : 31/7/2009
Aceito en / Accepted / Aceito em : 19/10/2009