



Caracterización electroferotípica de rotavirus aislados de infantes con gastroenteritis en la ciudad de Bogotá

- **Carlos Arturo Guerrero MD. MSc Profesor Asistente. Liz Patricia Moreno MSc. Investigadora Asociada. José Peñaranda MSc. Profesor Titular. Orlando Acosta PhD. Profesor Asociado. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Unidad de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.**

Los rotavirus aislados de muestras diarreicas de infantes atendidos por gastroenteritis en diferentes centros asistenciales pediátricos de la ciudad de Bogotá, fueron sometidos a análisis electroforético de patrones de dsRNA. Los rotavirus examinados presentaron 11 segmentos de dsRNAs genómicos distribuidos en cuatro regiones. La movilidad electroforética de estos fragmentos genómicos permitió agrupar los rotavirus examinados en seis electroferotipos, correspondientes a los tipos generales corto y supercorto, aparentemente diferentes a los informados hasta ahora para Latinoamérica. En los electroferotipos cortos se observó variación en los fragmentos genómicos 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9. Con base en estas diferencias se establecieron cinco variantes, designadas en este trabajo con las convenciones S1, S2, S3, S4 y S5. El patrón electroforético supercorto (SS1) presentó variación en las regiones I y II del electroferotipo. El número de muestras positivas encontradas en este estudio, así como su procedencia geográfica, el corto intervalo en que fueron tomadas y su heterogeneidad electroforética sugieren una variabilidad genética relativamente alta en los rotavirus que afectan a la población infantil de Bogotá.

INTRODUCCION

La gastroenteritis aguda es una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en niños con edades menores de cinco años en los países en desarrollo (1-5). Se ha considerado que los rotavirus son el agente etiológico viral más importante de estas gastroenteritis agudas (2-6). Los rotavirus, además de causar diarrea en individuos jóvenes de muchos mamíferos y aves, fueron asociados en la gastroenteritis aguda en humanos desde 1973 (2,7-10). Desde entonces, el conocimiento sobre estos agentes virales se ha incrementado muy rápidamente debido a su gran importancia económica y clínica.

Las partículas virales de los rotavirus están compuestas por 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) encapsidados por proteínas dispuestas en una doble capa (4,6,10-12). Esta doble cubierta proteica está compuesta por seis polipéptidos

(12), cuatro de los cuales conforman la cápside interna (VP1, VP2, VP3 y VP6), mientras que los dos restantes (VP4 y VP7) se ubican en la cápside externa de la partícula viral (11-13). La proteína viral VP4 se halla codificada por el segmento genómico 4 y la VP7 por el segmento 7, 8 o 9 dependiendo de la cepa viral (9). Se ha demostrado que estas dos proteínas presentan epítopes capaces de inducir anticuerpos neutralizantes (14-20). Además se ha identificado que la proteína VP4 presenta actividad de hemaglutinina (21) y que su fragmentación con tripsina, en los polipéptidos VP5 (60 KDa) y VP8 (28 KDa), incrementa la infectividad del virus en cultivos celulares (8,22). Sobre la base de las reactividades serológicas de las proteínas VP4 y VP7 se han identificado tres subgrupos y siete serotipos, respectivamente (23).

Los estudios de los patrones electroforéticos de los dsRNA genómicos de los rotavirus han sido de gran utilidad en su caracterización (21,24-29). Estos análisis de dsRNA han permitido establecer patrones electroforéticos típicos y atípicos (30), lo mismo que evidenciar la variación genética y evolutiva de los rotavirus a través de rearrreglos genómicos, duplicaciones y mutaciones (10,31).

El genoma de los rotavirus está conformado por 11 segmentos de dsRNA que pueden ser separados en ocho a 11 bandas diferentes por electroforesis en gel de poliacrilamida (6,21).

Los rotavirus comprenden, de acuerdo a sus patrones electroforéticos, seis grupos distintivos de los cuales A, B y C se halla comúnmente en animales y humanos, mientras que D, E y F están solo en animales (8). Los rotavirus del grupo A han asociado con diarrea en infantes y los del grupo B con epidemias severas en adultos y niños en China. Los del grupo C han sido identificados esporádicamente en niños con diarrea, pero su significado clínico no es claro aún. El grupo A, donde

se encuentran los más comunes en humanos, se caracteriza electroforéticamente por la migración de los 11 segmentos genómicos en cuatro regiones distintivas. No obstante, el patrón electroforético del grupo A presenta variación en la migración de varios segmentos incluidos los de la región III, que en algunas cepas migran en tripleta y en otras en dupleta. Con base en diferencias en la migración relativa de los segmentos 10 y 11 los rotavirus presentan tres patrones electroforéticos denominados largos, cortos y supercortos (4, 11).

En diferentes partes del mundo (21, 24-29) han caracterizados electroforéticamente numerosas cepas de rotavirus. En México han descrito rotavirus humanos con dos patrones de migración, uno largo (2L) y otro corto (2S). En cada uno de estos patrones se encontró amplia variación en la migración de los segmentos genómicos 2, 3, 5, 10 y 11 (25-28). Rotavirus aislados en Chile presentaron patrones electroforéticos muy similares a los encontrados en México, los cuales difieren notablemente de los reportados por Kalica en 1978 para Washington (21). En el campo médico los análisis de los perfiles de dsRNA de estos enterovirus han posibilitado estudios, en términos moleculares, sobre etiología y epidemiología de la gastroenteritis aguda en infantes de diferentes países (21, 24-31).

En el presente trabajo se describe la variación de los patrones electroforéticos de RNA de los rotavirus presentes en una muestra de infantes atendidos por gastroenteritis en diferentes centros asistenciales pediátricos de la ciudad de Bogotá.

MATERIALES Y METODOS

Se obtuvieron muestras diarreicas de niños con edades entre seis meses y cinco años, que ingresaron con gastroenteritis a los centros asistenciales pediátricos: Clínica del Niño del Seguro Social, Hospital Lorencita Villegas de Santos y Hospital La Misericordia durante los meses de abril y mayo de 1994. Un total de 300 individuos fueron muestreados. Las muestras fueron almacenadas a -20°C y se procesó 0,5 a 1 g dentro de las cuatro siguientes semanas para análisis electroforético de patrones de dsRNA.

Extracción del RNA viral. Las muestras fueron homogenizadas en buffer STE 2X (0.1M Tris, 0.2 NaCl, 3mMEDTA, pH 6,8) en una relación de 1-2 g/5 ml y centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos. El sobrenadante (1 ml) fue emulsificado con 0.7 ml de fenol, 1 mg de bentonita y 142 μl de SDS al 10% mediante agitación por tres minutos. La emulsión se centrifugó a 8000 g durante 10 minutos y la fase acuosa, que contiene los ácidos nucleicos, fue mezclada con 2,5 volúmenes de etanol y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3,5 M. Después de permanecer a -20°C durante una hora los dsRNAs fueron

precipitados por centrifugación a 10000 g durante 10 minutos y resuspendidos en volumen mínimo (20 - 40 μl) de buffer de electroforesis (80mM acetato de sodio, 0,16M Tris, 4Mn EDTA, 10% sacarosa, pH 7,8) (2). La suspensión fue centrifugada a 10000 g por 10 minutos y el sobrenadante constituyó la muestra de electroforesis.

Análisis de PAGE. Los segmentos de dsRNA fueron resueltos por electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un sistema discontinuo (32) en condiciones no desnaturizantes libre de SDS. Se utilizó un gel de concentración de 4,5% de poliacrilamida y uno de resolución de 10% de poliacrilamida. El buffer de las cámaras fue 0,025M Tris, 0,192 M glicina, pH 8.3. Todos los buffers contuvieron 2mM EDTA. La electroforesis fue realizada a 100 v constantes durante 3,5 horas en una minicámara vertical (modelo 250 Hoefer). El gel fue teñido en una solución acuosa de bromuro de etidio (1 g/ml) en 2,5 mM de EDTA durante 15 minutos y fotografiado usando un filtro anaranjado bajo luz ultravioleta. Posteriormente los geles fueron teñidos con nitrato de plata (33).

RESULTADOS

De las 300 muestras sometidas a análisis electroforético 43 fueron positivas para rotavirus por esta técnica. Dentro de las muestras positivas se observaron seis electroferotipos correspondientes a los tipos generales corto y supercorto, previamente descritos para otros países (4,11,21,24-29,34). Estos rotavirus, de acuerdo a su patrón electroforético de dsRNAs, pueden ser incluidos en el grupo A. Este grupo se caracteriza electroforéticamente por presentar los segmentos genómicos distribuidos en cuatro regiones (I: 1-4, II: 5-6, III: 7-9 y IV: 10-11) (Figuras 1 y 2).

En los electroferotipos cortos se observa variación en los fragmentos genómicos 2, 3, 5, 6, 7, 8, y 9. Con base en estas diferencias se establecieron cinco variantes, designadas en este trabajo con las convenciones S1, S2, S3, S4 y S5 (Figura 2). En los electroferotipos S1, S2 y S3 los fragmentos genómicos de la región III migran en tripleta, mientras que en S4 y S5 se presentan a manera de dupleta. En S1 el fragmento genómico 8 presenta menor migración hallándose muy cercano al fragmento 7, en tanto que en S2 y S3 los fragmentos 7, 8 y 9 son equidistantes. El electroferotipo S3 se caracteriza por presentar en la región II una aparente duplicación de estos segmentos. El electroferotipo S5 difiere de los anteriores por presentar en la región I solo tres bandas en lugar de las cuatro usuales (Figura 1A).

El patrón electroforético supercorto (SS1), además de presentar una menor migración de los segmentos 10 y 11, presenta 3 bandas en la región I, como el electroferotipo S5. Además el

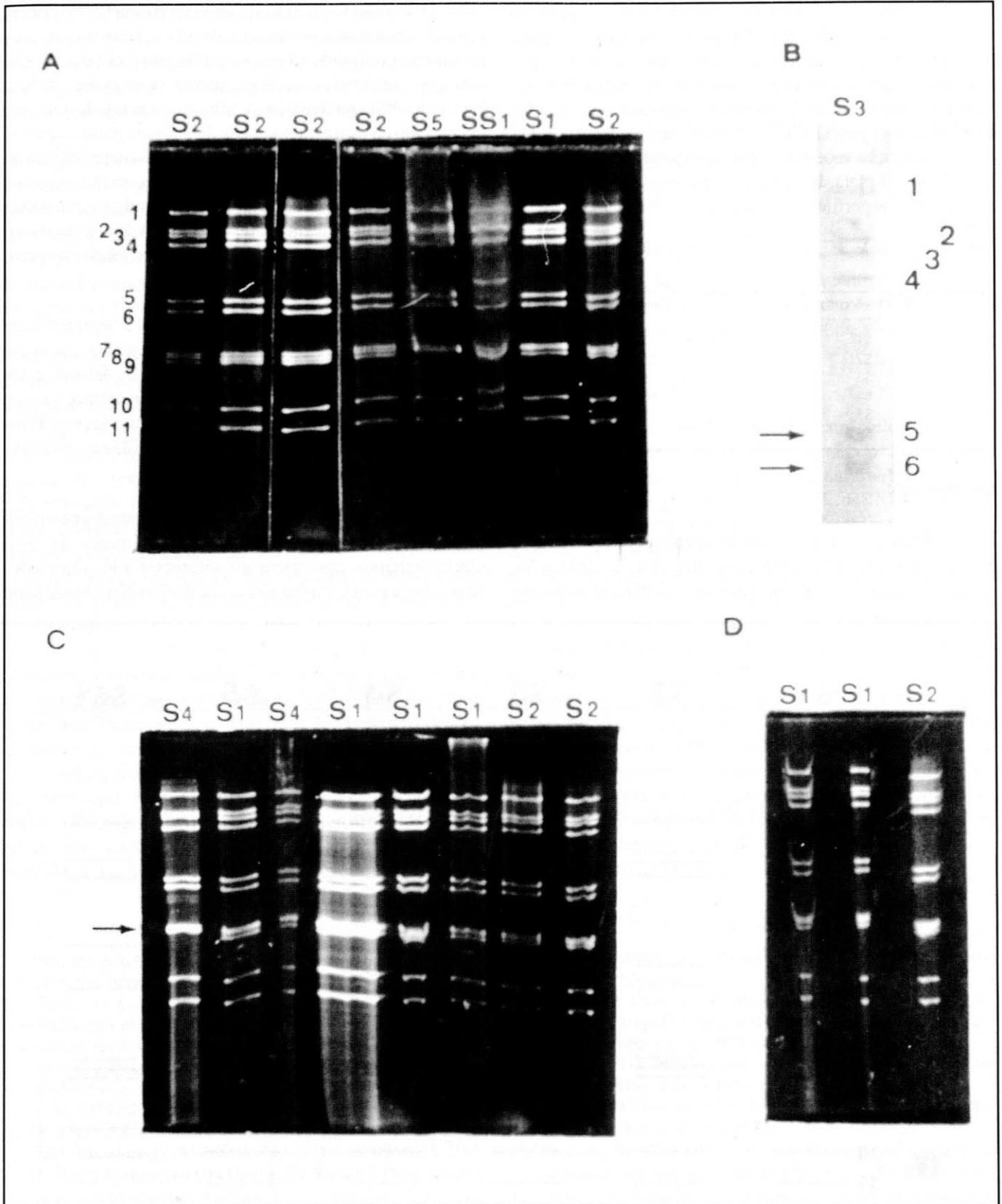


Figura 1. Patrón de bandas de dsRNA de rotavirus aislados de infantes con gastroenteritis. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, 100 v constantes, 4 horas. A, C y D tinción con bromuro de etidio. B tinción con nitrato de plata. Las flechas indican duplicación de segmentos en la región II (B) y comigración de segmentos en la región III (C).

segmento genómico 5 presenta una menor migración con respecto a la observada en los demás electroferotipos (Figura 1A). Adicionalmente, dentro de cada uno de los electroferotipos descritos se apreció una muy ligera variación en casi todos los segmentos genómicos. En las muestras positivas analizadas los electroferotipos S1 y S2 fueron los más frecuentes (Tabla 1). Algunas de las muestras solo fueron positivas en la tinción con nitrato de plata, la cual tiene una mayor sensibilidad y agudeza en los perfiles (Figura 1B).

Tabla 1. Porcentaje de cada electroferotipo en las muestras positivas analizadas.

Electroferotipos	Porcentaje
S1	33.3
S2	43.3
S3	3.3
S4	10.0
S5	3.3
SS1	7.0

DISCUSION

De las 300 muestras diarreicas de infantes examinadas solo 15% fueron positivas para rotavirus, por la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida. Este porcentaje resulta

bajo, pues se conoce que en el mundo, en promedio 75% de las gastroenteritis son causadas por rotavirus (2). Sin embargo, en un trabajo preliminar (datos no publicados) el 50% de 120 muestras analizadas serológicamente (Rotazyme, Abbot) fueron positivas para rotavirus. El bajo porcentaje de rotavirus encontrado en este estudio puede deberse, en parte, a que los pacientes muestreados son ambulatorios con cuadro clínico no agudo y la mayoría con diarrea semisólida, en tanto que los rotavirus son causantes de gastroenteritis aguda, caracterizada por diarrea líquida de difícil recolección. Además se conoce que la técnica de electroforesis tiene baja sensibilidad respecto a la técnica serológica.

Los rotavirus examinados presentan los 11 segmentos de dsRNAs genómicos distribuidos en cuatro regiones, por lo que pueden ser incluidos en el grupo A (Figura 2). Además estos patrones corresponden a los tipos corto y supercorto, que son los más comunes del subgrupo I, excepto que algunos de los segmentos genómicos mostraron movilidades relativas diferentes.

La movilidad electroforética de los fragmentos genómicos permitió agrupar los rotavirus examinados en seis electroferotipos, aparentemente diferentes a los reportados hasta ahora para Latinoamérica (21,24-28). Esta agrupación

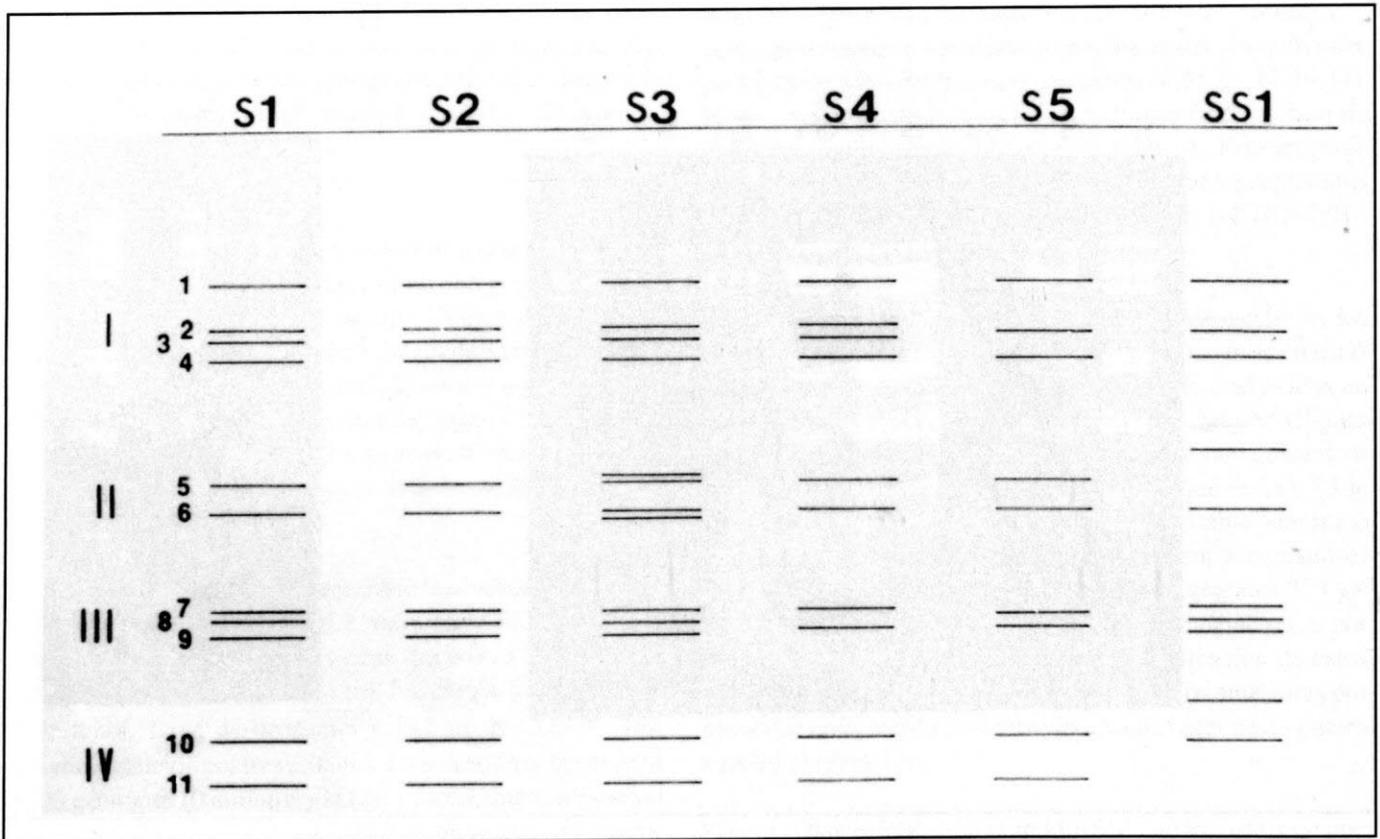


Figura 2. Representación esquemática de los electroferogramas de dsRNA de rotavirus aislados de infantes con gastroenteritis. Los números arábigos identifican los segmentos de dsRNA genómicos y los romanos indican las diferentes regiones en que éstos se agrupan.

se realizó utilizando los parámetros empleados por otros autores para clasificar los rotavirus de diferentes países (21,29). Los patrones electroforéticos de migración fueron agrupados en seis electroferotipos con base en diferencias en la migración de por lo menos un segmento genómico (Figura 2).

Cinco de los electroferotipos de tipo corto (S1 a S5) presentaron una movilidad lenta de los segmentos genómicos 10 y 11, mientras que SS1, al presentar una movilidad aún más lenta de estos segmentos fue clasificado como supercorto. Resulta interesante la ausencia, al menos en las muestras analizadas, de electroferotipos largos, que ocurren con alta frecuencia en otros países (21,24-28).

Los segmentos genómicos que presentaron mayor variabilidad en movilidad en las muestras examinadas y que permitieron el agrupamiento en seis electroferotipos fueron los 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. La región III presentó variación en al menos uno de sus componentes. Teniendo en cuenta que uno de estos segmentos codifica para la proteína VP7, implicada en la antigenicidad e inmunogenicidad de la partícula viral, existe la probabilidad de que algunas de estas variaciones en migración estén asociadas con diferencias serológicas y de grado de patogenicidad. De esta manera las variaciones observadas pueden significar diferencias patogénicas entre estos rotavirus.

El número de muestras positivas encontradas en este estudio, así como su procedencia geográfica, el corto intervalo en que fueron recolectadas y su heterogeneidad electroforética sugieren una variabilidad genética relativamente alta en los rotavirus que afectan a la población infantil de Bogotá. Los electroferotipos hallados no son aparentemente iguales a ninguno de los descritos por otros autores en diferentes partes del mundo, incluido México, Chile y Norteamérica. La morbilidad descrita en este trabajo, que podría ser mayor a

nivel nacional, permite suponer que los rotavirus están implicados en una amplia gama de cuadros clínicos de gastroenteritis, desde leves hasta severos, y que pueden igualmente afectar un número variado de individuos. No obstante, esta diversidad de cuadros clínicos está dada no solo por las características de los rotavirus, sino muy probablemente por las características genéticas de los individuos afectados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración prestada por el personal de Bacteriología y demás servicios de los centros asistenciales pediátricos: Clínica del Niño del Seguro Social, Hospital Lorencita Villegas de Santos y Hospital La Misericordia.

SUMMARY

Genomic dsRNAs of rotavirus isolated from children affected with gastroenteritis in pediatric health centres of Bogotá were submitted to an electrophoresis pattern analysis. Examination of their genome profiles showed 11 dsRNA segments distributed among four regions. The relative electrophoretic migration of the genomic fragments showed six different electropherotypes which were apparently different from those previously reported in other latinoamerican countries. All the electropherotypes found corresponded to the short and supershort general types. Short electropherotypes revealed variations in genomic fragments 2, 3, 5, 6, 7, 8 and 9. According to these variations five variants were established, which we named S1, S2, S3, S4, and S5. The supershort electropherotype (SS1) exhibited variation in the electropherotype regions I and II. The number of positive samples analysed, the geographical origin, the short collection time and the electrophoretic heterogeneity suggested a genetic variability relatively high for rotavirus isolates affecting infant population in Bogotá.

REFERENCIAS

- Greenberg BH. Principios de Medicina. 11a.Ed. Mexico DF: Editorial Interamericana 1989: 868-871.
- Davidson GP, Townley RRW, Bishop RF, Holmes LH. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1975; i: 242-245.
- Bern C. Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (12): 3224-3238.
- Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology*. New York: Raven Press 1990: 1353-1375.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis *Lancet* 1974; ii: 149-151.
- Rodger SM, Holmes IH. Comparison of the genomes of simian, bovine, and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *J Virol* 1979; 30: 839-846.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis *Lancet* 1973; ii: 1281-1283.
- Flewett TH, Bryden AS, Davis H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 1973; ii: 1497.
- Holmes IH. Rotaviruses. In: Jokik WK, ed. *The reoviridae*. New York: Plenum 1983: 359-423.
- Raming RF, Ward RL. Genomic segment reassortment in rotaviruses and other reoviridae. *Adv Virus Res* 1991; 39: 163-206.
- Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM eds. *Virology*. New York: Raven Press 1990: 1329-1352.
- Bellamy AR, Both GW. Molecular biology of rotaviruses. *Adv*

- Virus Res 1990; 38: 1-43.
13. Sestak K, Musilova J. Isolation of rotavirus strains from naturally infected piglets. *Acta Virol* 1994; 38: 27-30.
 14. Kohli E. Localization of group-specific epitopes on the major capsid protein of group A rotavirus. *J Gen Virol* 1992; 73: 907-914.
 15. Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. Analysis of the neutralization epitopes on human rotavirus VP7 recognized by monotype-specific monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 1991; 72: 1855-1861.
 16. Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 1992; 2129-2134.
 17. Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis* 1993; 167: 577-583.
 18. Larralde G, Gorziglia M. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *J Virol* 1992; 7438-7443.
 19. Brüssow H, Snodgrass D, Fitzgerald T, Eichhorn W, Gerhards R, Bruttin A. Antigenic and biochemical characterization of bovine rotavirus V1005, a new member of rotavirus serotype 10. *J Gen Virol* 1990; 71: 2625-2630.
 20. Gorziglia M, Larralde G, Kapikian AZ, Chanock RM. Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7155-7159.
 21. Kalika AR, Sereno MM, Wyatt RG, Mebus CA, Chanock RM, Kapikian, AZ. Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of viral RNA. *Virology* 1978; 87: 247-255.
 22. Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB, Spendlove. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J Virol* 1981; 816-822.
 23. Pedley S, Bridger JC, Brown JF, McCrae MA. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. *J gen Virol* 1983; 63: 2093-2101.
 24. Espejo, RT, et al. Comparison of human rotaviruses isolated in Mexico city and in Santiago, Chile, by electrophoretic migration of their double-stranded ribonucleic acid genome segments. *Infect Immun* 1980; 30: 342-348.
 25. Espejo RT, Martinez E, López S, Muñoz O. Different polypeptide composition of two human rotavirus types. *Infect Immun* 1980; 28: 230-237.
 26. Espejo RT, Muñoz O, Sefarin F, Romero P. Shift in the prevalent human rotavirus detected by ribonucleic acid segment differences. *Infect Immun* 1980; 27: 351-354.
 27. Espejo RT, Calderon E, Gonzalez N. Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1977; 6: 502-506.
 28. Espejo RT, et al. Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico city, 1977. *J Infect dis* 1979; 138: 474-477.
 29. Steele AD, Mnise YN, Williams MM, Bos p, Aspinall S. Electrophoretic typing of nosocomial rotavirus infection in a general paediatric unit showing the continual introduction of community strains. *J Med Virol* 1993; 40: 126-132.
 30. Pocock DH. Isolation and characterization of two group A rotaviruses with unusual genome profiles. *J Gen Virol* 1987; 68: 653-660.
 31. Ginn DI, Ward RL, Hamparian VV, Hughes JH. Inhibition of rotavirus in vitro transcription by optimal concentrations of monoclonal antibodies specific for rotavirus VP6. *J Gen Virol* 1992; 73: 3017-3022.
 32. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
 33. Blum H, Beier H, Gross JH. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987; 8: 93-99.
 34. Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HB, Flores J, Kapikian AZ. Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin by plaque-reduction neutralization. *J Infect dis* 1984; 149: 694-702.