

Prevalencia de rotavirus y su relación con factores climáticos en Cumaná, Venezuela

Prevalence of rotavirus and its relation with climatic factors in Cumana, Venezuela

**Rojas, Yacqueline J.¹;
Bastardo, Jesús W.² y Sulbarán, María Z.³**

¹Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Venezuela.

²Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

³Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Venezuela.

Resumen

Durante el período de junio de 1993 a junio de 1995, se recolectaron 377 muestras de heces de niños menores de cinco años, con diarrea aguda, recluidos en el Hospital Antonio Patricio de Alcalá de la ciudad de Cumaná, Venezuela, y de 89 niños asintomáticos con el mismo rango de edades. A las muestras se les realizó extracción del ARN viral con phenol-cloroformo, precipitación con etanol, electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y tinción con plata. Se encontró rotavirus en 116 (30,77%) de las muestras diarreicas y en 7 (7,87%) de las muestras no diarreicas. A sólo 105 de las muestras diarreicas fue posible observarle un patrón electroforético definido, de las cuales, ochenta y cuatro (80%) presentaron electroferotipo largo; diecinueve (18,09%) presentaron electroferotipo corto; y dos (1,91%) presentaron una mezcla electroforética. En las muestras no diarreicas se encontró que cinco (71,43%) correspondían al patrón largo y dos (28,57%) al patrón corto. Por coelectroforesis se encontraron 7 patrones electroferotípicos distintos; cuatro de patrón largo, dos de patrón corto y una mezcla electroferotípica. Se encontró una correlación inversa significativa ($r = -0,5583$, $p < 0,05$) entre la prevalencia mensual de rotavirus y la temperatura media mensual y una correlación inversa significativa ($r = -0,5724$, $p < 0,05$) entre la prevalencia mensual de rotavirus y la precipitación media mensual.

Palabras clave: Rotavirus, prevalencia estacional, electroferotipos, clima, epidemiología, diarrea.

Recibido: 09-05-02 / Aceptado: 28-05-02

Abstract

During the period June 1993 to June 1995, 377 fecal samples from hospitalized young children with extreme diarrhea in the Antonio Patricio de Alcala Hospital in Cumana, Venezuela were taken, as well as similar samples from 89 asymptomatic children of the same age range. Viral ARN was extracted from the samples with phenol-chloroform, ethanol precipitation, gel electrophoresis of poly-acrylamide (Page) and silver tincture. Rotavirus was found in 116 (38.77%) of the diarrhea samples and in 7 (7.87%) of the non-diarrhea samples. Only in 105 of the diarrhea samples was it possible to detect electro-ferrotype patterns, in which 84 (80%) were the long electro-ferrotype; 19 (18.09%) were short electro-ferrotype; and two (1.91%), had mixed electro-ferrotypes. In the non-diarrhea 5 (71.43%) were the long type, and 2 (28.57%) were short. Using co-electrophoresis, 7 electro-ferrotype patterns were distinguished: four long, two short, and one electro-ferrotype mixture. A significant inverse correlation was found between the monthly prevalence of rotavirus and the mean temperature ($r=-0.5583$, $p< 0.05$) and a significant inverse relationship between the monthly prevalence of rotavirus and average monthly precipitation.

Key words: Rotavirus, seasonal prevalence, electro-ferrotype, climate, epidemiology, diarrhea.

Introducción

Las infecciones por rotavirus humanos constituyen la principal causa de gastroenteritis aguda en niños sobre todo en países subdesarrollados donde se estima que anualmente ocurren alrededor de 870.000 muertes de niños entre 1-4 años y se presentan 17 millones de casos de diarrea por rotavirus (11). En Venezuela, se ha estimado que ocurren anualmente alrededor de 101.400 casos de diarrea en niños menores de dos años de edad (21).

Las infecciones por rotavirus ocurren durante todo el año tanto en climas templados como en climas tropicales y subtropicales, sin embargo, en los climas templados se ha observado una mayor prevalencia de rotavirus durante los meses más fríos del año (2, 17, 3, 15). En los climas tropicales y subtropicales no se ha observado un patrón de distribución relacionado con una condición climática en particular; así se han observado picos de infección que coinciden con la estación seca (12, 30), con la estación lluviosa (7), con los meses más fríos del año (32, 4, 30, 6).

Debido a que las diarreas por rotavirus representan un problema de salud pública, sobre todo en países subdesarrollados, se consideró necesario determinar la prevalencia de rotavirus y su posible relación con los factores climáticos en la ciudad de Cumaná, Venezuela.

Materiales y Métodos

A. Muestras fecales

Durante el período comprendido entre junio de 1993 y junio de 1995, se recolectaron 377 muestras de heces de niños menores de 5 años con diarrea aguda, recluidos en la sala de hidratación del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" (H.U.A.P.A.) de Cumaná, Venezuela, y de 89 niños menores de 5 años, que no hubieran padecido de episodios diarreicos durante las 6 semanas anteriores a la recolección de la muestra y que asistían a consultas ambulatorias o se encontraban recluidos por otras causas en las salas de hospitalización del H.U.A.P.A. Las muestras se trasladaron bajo refrigeración, y se

guardaron bajo congelación a -70°C hasta el momento del análisis.

B. Datos climáticos

Los datos climáticos: temperatura media, precipitación media y humedad relativa media, fueron suministrados por la Estación Meteorológica de la Fuerza Armada Venezolana que funciona en el aeropuerto "Antonio José de Sucre" de la ciudad de Cumaná.

C. Métodos

Caracterización de rotavirus por electroforesis del ARN viral en Geles de Policrilamida (PAGE): Para la determinación de los electroferotipos se siguió el método de electroforesis en geles de poliácridamida (PAGE) descrito por Herring y col. (13). El ARN viral se extrajo usando una mezcla de fenol-cloroformo y precipitado con etanol frío según Sambrook y col. (26). La electroforesis se realizó en geles de poliácridamida al 5% a una corriente constante de 30 mA por 7 horas a temperatura ambiente. Al finalizar la corrida, los geles se tiñeron con nitrato de plata 12 mM. A los electroferotipos que a simple vista parecieron distintos, se les realizó una coelectroforesis (31), la cual consiste en correr simultáneamente en un mismo pozo del gel, una mezcla de dos muestras

que presentan electroferotipos presuntamente diferentes, y a cada lado de este se corren las mismas muestras individualmente, para precisar los segmentos del genoma rotaviral que presenten diferencias en su movilidad electroforética.

D. Análisis estadístico

Para establecer la posible relación entre la prevalencia mensual de rotavirus con los factores climáticos se utilizó el análisis estadístico de correlación a un nivel de confiabilidad de 95% (27).

Resultados

De un total de 377 muestras de heces de niños con diarrea aguda, 116 (30,77%) resultaron positivas para rotavirus del grupo A. De las 89 muestras provenientes de niños no

Tabla 1. Prevalencia de rotavirus en niños menores de 5 años, admitidos al H.U.A.P.A. entre junio de 1993 y junio de 1995.

Casos Estudiados	Total	Positivos	%
Con diarrea	377	116	30,77
Sin diarrea	89	7	7,87

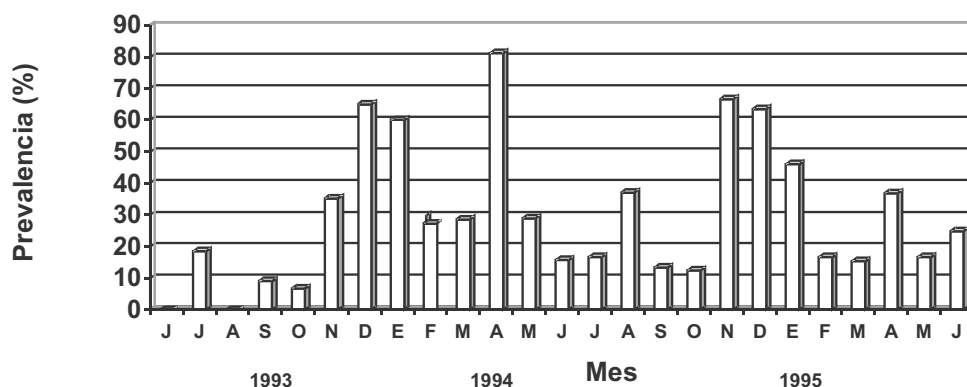


Figura 1. Prevalencia mensual de rotavirus en niños menores de 5 años, con diarrea aguda, admitidos al H.U.A.P.A. entre junio de 1993 y junio de 1995.

diarreicos, siete (7,87%) resultaron positivas para rotavirus (Tabla 1). La prevalencia mensual de los rotavirus se muestra en la Figura 1, donde se observa que los rotavirus estuvieron presentes, con la excepción de los meses de junio y agosto de 1993, en todos los meses que abarcó el estudio. Durante el período de estudio se observaron varios picos de infección: diciembre de 1993 y enero de 1994, abril de 1994, noviembre y diciembre de 1994 y enero de 1995. El mayor pico de prevalencia se presentó en el mes de abril de 1994.

De las 116 muestras positivas a rotavirus, a 11 no pudo determinársele el patrón electroforético. En las 105 muestras restantes se encontró que 84 (80%) presentaron electroferotipo largo; 19 (18,09%) electroferotipo corto y 2 (1,91%) presentaron una mezcla electroforética, la cual incluye un patrón largo y uno corto en la misma corrida. En las muestras provenientes de niños no diarreicos se encontró que 5 (71,43%) correspondían al patrón largo y 2 (28,57%) al patrón corto.

Por coelectroforesis, se pudo diferenciar siete patrones electroforéticos distintos del ARN viral, de los cuales cuatro pertenecían al patrón largo (L1, L2, L3, L4), dos al patrón corto (C1, C2) y uno a una mezcla electroforética (M) (Figura 2). El electroferotipo largo L3 fue el más frecuentemente aislado (44,76%), seguido por el electroferotipo L4 (20,00%). En los patrones electroforéticos cortos predominó el electroferotipo C1 (12,38%). En los niños sin diarrea se determinaron solamente tres electroferotipos: L3 (40%), C1 (20%) y C2 (40%).

La distribución mensual de los electroferotipos largos: L1, L2, L3 y L4; cortos: C1, C2 y la mezcla electroforética M se presenta en la Figura 3. Los electroferotipos L3 y L4 se detectaron regularmente en el período com-

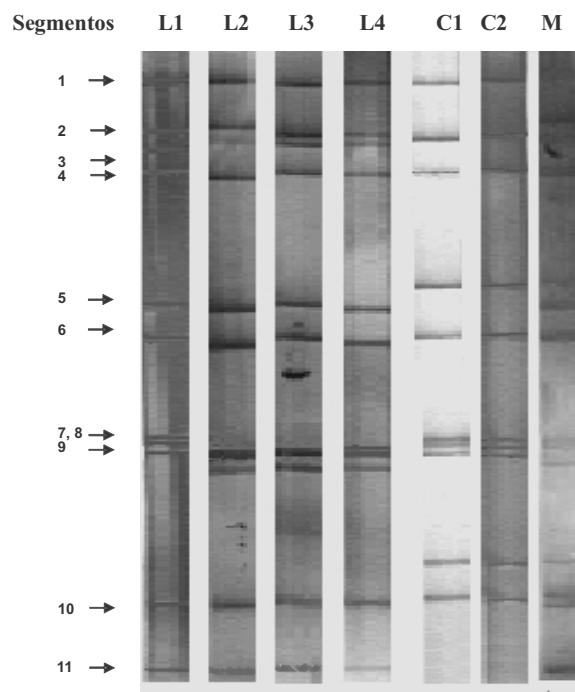


Figura 2. Electroferotipos de rotavirus del grupo A en niños menores de 5 años, con diarrea aguda, recluidos en el H.U.A.P.A. entre junio de 1993 y junio de 1995. Las flechas indican los once segmentos del ARN rotaviral. L1-L4: electroferotipos largos, C1-C2: electroferotipos cortos y M: electroferotipo mezclado. Electroforesis vertical (de arriba hacia abajo) a una corriente constante de 30 mA, a temperatura ambiente por 7 horas.

prendido entre julio de 1993 y febrero de 1995, estos electroferotipos predominaron hasta abril de 1994. En mayo de 1994 se detectaron dos nuevos electroferotipos: un electroferotipo largo L2 y un electroferotipo mezclado M. En julio de 1994 apareció por primera vez en este estudio el electroferotipo corto C1, y al siguiente mes el electroferotipo C2. En el período entre julio de 1994 y enero de 1995 se detectó la mayor variabilidad ge-

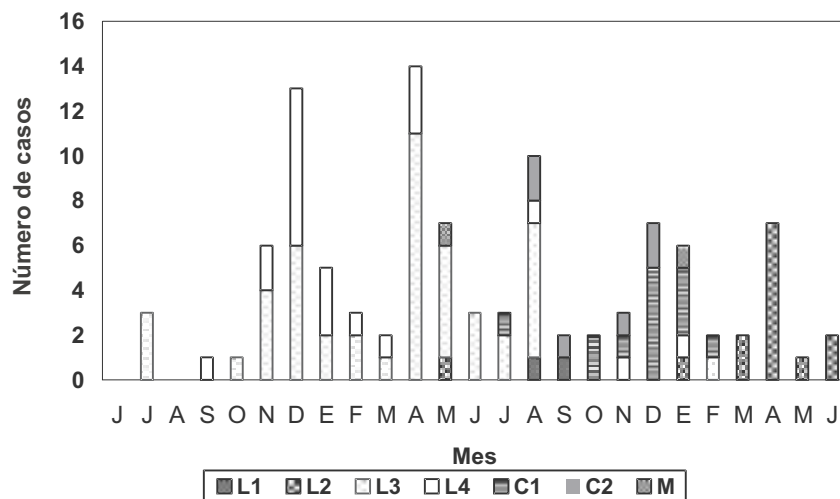


Figura 3. Distribución mensual de los electroferotipos L1, L2, L3, L4, C1, C2 y M, en niños menores de 5 años con diarrea aguda recluidos en el H.U.A.P.A. entre 1993 y 1995.

nética de los rotavirus ya que se encontraron circulando en la población los electroferotipos largos L1, L2, L3 y L4; los cortos C1 y C2 y la mezcla electroferotípica M.

Se encontró una correlación inversa significativa ($r = -0,5583$, $p < 0,05$) entre la prevalencia mensual de rotavirus y la temperatura media mensual y una correlación inversa significativa ($r = -0,5724$, $p < 0,05$) entre la prevalencia mensual de rotavirus y la precipitación media mensual. La relación entre la prevalencia mensual de rotavirus y la humedad relativa fue estadísticamente no significativa. En las Figuras 4 y 5 se muestra la distribución de la prevalencia mensual de rotavirus en relación a la temperatura media y precipitación media respectivamente.

Discusión

Debido a su alta frecuencia y amplia distribución mundial, la infección por rotavirus es considerada un problema de salud pública. La Organización Mundial de la Salud reporta una prevalencia de rotavirus entre 34 a 54% en países desarrollados y de 20 a 40% en países en vías de desarrollo (34).

La prevalencia de rotavirus de 30,77% encontrada en este estudio en niños con diarrea aguda, coincide con los encontrados por otros investigadores en Venezuela y en otros países tropicales y subtropicales (32, 12, 30, 18, 10, 5, 14, 22, 33). En las muestras de heces provenientes de niños sin diarrea se detectó una positividad de 7,87%, lo cual coincide con los resultados de otros investigadores (30, 6). La presencia de rotavirus en niños sin diarrea evidencia la existencia de una circulación asintomática del virus en las comunidades. Este hallazgo puede explicarse por la presencia de inmunidad adquirida a los diferentes electroferotipos circulantes; lo cual previene la aparición de diarrea aguda en los casos de reinfección.

La prevalencia mensual de rotavirus varió mes a mes con picos mayores de infección en algunos meses del año: diciembre de 1993; enero, abril, noviembre y diciembre de 1994 y enero de 1995. Algunos autores han reportado esta variación de la prevalencia mensual de rotavirus y la han relacionado con factores climáticos (12, 30, 10).

En las muestras provenientes de niños con y sin diarrea se observó un predominio

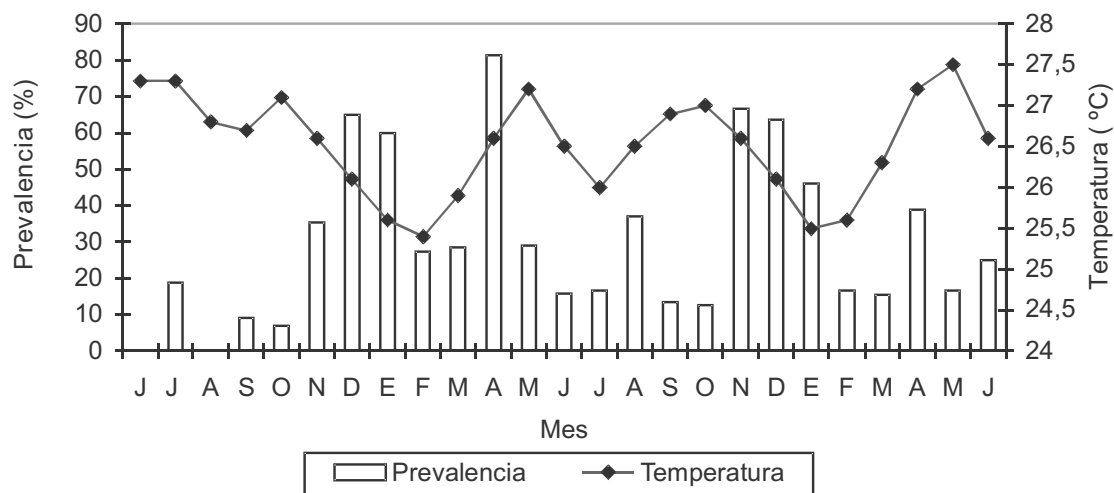


Figura 4. Distribución de la prevalencia mensual de rotavirus en relación a la temperatura media mensual.

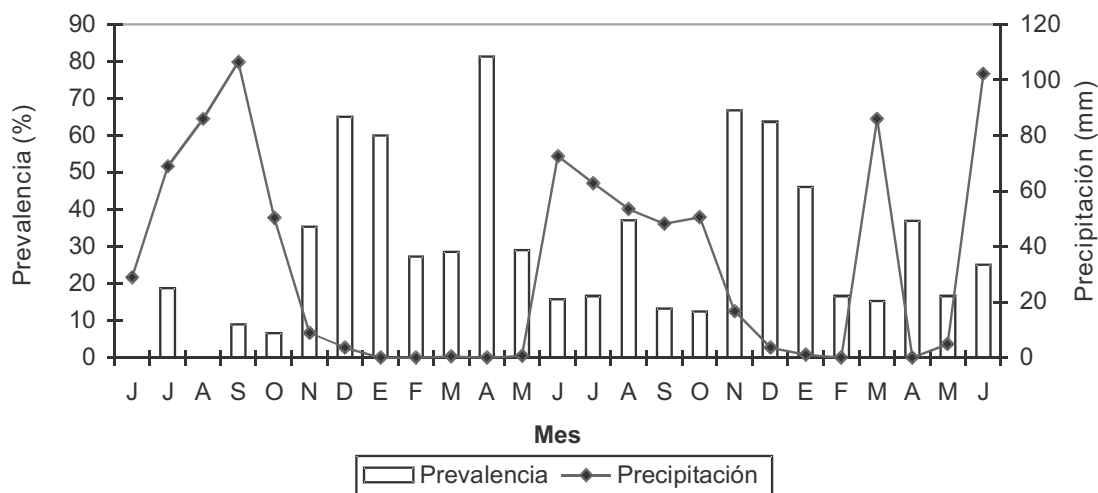


Figura 5. Distribución de la prevalencia mensual de rotavirus en relación a la precipitación media mensual.

de patrones largos sobre los cortos. Se han presentado algunas epidemias donde predomina el patrón corto (1); pero la mayoría de los trabajos realizados reportan un predominio del patrón largo (32, 30, 18, 8, 19).

Se obtuvieron siete patrones electroforéticos distintos, de los cuales cuatro fueron patrones electroforéticos largos (L1, L2, L3 y L4), dos patrones cortos (C1 y C2) y un patrón electroforético mezclado (M). La presencia de mezclas electroforóticas en un mismo paciente sugiere la infección simultánea del

paciente con más de una cepa de rotavirus. Se ha señalado que ambientes altamente contaminados como áreas hospitalarias y altas densidades de población humana pueden facilitar la transmisión de diversas cepas de rotavirus (22). La aparición de siete patrones electroforéticos distintos evidencia la gran variedad de cepas de rotavirus que circulan en la población objeto de estudio. La diversidad de patrones electroforéticos que circulan en una población ha sido demostrada en numerosos estudios (32, 18, 8, 19, 6). No está

claro como se genera la gran diversidad de electroferotipos que circulan en una comunidad en un mismo tiempo, se ha propuesto (9) que la diversidad genética y antigénica de los rotavirus humanos ha evolucionado mediante: mutaciones puntuales del genoma de ARN, formación de reasociación genética, introducción de rotavirus animales en poblaciones humanas, rearreglos del genoma o una combinación de los diversos mecanismos.

Entre los siete patrones electroforéticos distintos encontrados en niños con diarrea, el electroferotipo largo L3 fue detectado con mayor frecuencia seguido por el electroferotipo L4. En los niños sin diarrea se determinaron solamente tres electroferotipos: L3, C1 y C2. Esta observación concuerda con lo reportado por otros investigadores que afirman que 1 ó 2 patrones electroforéticos predominan en una comunidad en un período de tiempo (25, 18, 19).

No se observó diferencias entre los electroferotipos encontrados en niños sin diarrea y niños con diarrea, sin embargo en varios estudios se ha encontrado que las cepas que infectan neonatos asintomáticos generalmente tienen electroferotipos distintos de aquellos que infectan a niños mayores en la misma comunidad y al mismo tiempo (20, 29).

Los patrones L3 y L4 fueron los de mayor frecuencia. En el período entre septiembre de 1994 hasta febrero de 1995 predominaron los patrones cortos C1 y C2 y entre marzo de 1995 y junio de 1995 circuló un sólo patrón electroferotípico L2. Algunos investigadores sugieren que esta variación representa un cambio en la inmunidad de la población en riesgo (32, 31).

Este estudio mostró que la prevalencia mensual de rotavirus está inversamente relacionada con la temperatura media y la precipitación media. En los climas templados se

ha observado una mayor frecuencia de infección por rotavirus durante los meses más fríos y secos del año (2, 17, 7, 3, 15, 16). En trabajos realizados en climas tropicales y subtropicales no ha sido posible definir un patrón de distribución estacional de la infección por rotavirus (12). Sin embargo, en otros estudios, la temperatura ha sido considerada como un factor determinante en la epidemiología de la infección por rotavirus (32, 10, 30, 4, 24, 6, 14). El patrón de distribución temporal y geográfico de la infección por rotavirus humanos ha llevado a sugerir que el aire puede jugar un rol importante en la diseminación del agente infeccioso⁽²⁾. Esto explicaría el aumento de la prevalencia durante la estación seca en los países tropicales, cuando la ausencia de precipitación permitiría la formación de aerosoles que diseminarían el virus.

Las diferencias en los patrones estacionales de distribución de la prevalencia en climas templados y climas tropicales nos llevan a pensar que quizás los factores climáticos no sean los únicos que contribuyen a la distribución estacional de los rotavirus y que factores del huésped como una mayor susceptibilidad, generada por la aparición de nuevos electroferotipos, también contribuya a la distribución estacional de los rotavirus.

Referencias Bibliográficas

- (1) Albert, M., Unicomb, L., & Bishop, R. Cultivation and characterization of human rotavirus with "super short" RNA patterns, *J Clin Microbiol.*, 1987; 25: 183-185.
- (2) Brandt, C., Kim, H., Rodriguez, W., Arrobio, J., Jeffries, B., & Parrott, R. Rotavirus gastroenteritis and weather. *J Clin Microbiol.*, 1982; 16 (3): 478-82.
- (3) Bishop, R. Natural history of human rotavirus infection. *Arch Virol Suppl.*, 1996; 12:119-28.

- (4) Bos, P., Mnisi, Y., & Stee, I. The molecular epidemiology of rotavirus infection in G-Rankuwa, southern Africa. *Cent Afr J Med.*, 1992; 38 (7):286-90.
- (5) Callejas, D., Estevez, J., Blitz-Dorfman, L., & Garcia, D. [Molecular epidemiology of subgroups and serotypes of rotavirus in children less than 4 years of age in the city of Maracaibo with a diarrheal syndrome]. *Invest Clin.*, 1994; 35 (1): 3-17.
- (6) Callejas, D., Estevez, J., Porto-Espinoza, L., Monsalvo, F., Costa-Leon, L., Blitz, L., Atencio, R., & García, M. Effect of climatic factors on the epidemiology of rotavirus infections in children under 5 years of age in the city of Maracaibo, Venezuela. *Invest Clin.*, 1999; 40 (2): 81-94.
- (7) Cook, S., Glass, R., Lebaron, C. & Ho, M. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ.*, 1990; 68 (2): 171-177.
- (8) Chatterjee, B., Hussain, M., Kavita, M., Seth, P. & Broor, S. Diversity of rotavirus strains infecting pediatric patients in New Delhi, India. *J Trop Pediatr.*, 1996; 42: 207-210.
- (9) Desselberger, U. 1988. Molecular epidemiology of rotaviruses. *Immun. Infekt.*, 16 (5): 182-8.
- (10) Gomwalk, N., Umoh, U., Gosham, L. & Ahmad, A. Influence of climatic factors on rotavirus infections among children with acute gastroenteritis in Zaria northern Nigeria. *J Trop Pediatr.*, 1993; 39 (5):293-7.
- (11) Glass, R., Kilgore, P., Holman, R., Jin, S., Smith, J., Woods D., Clarke, M., Ho, M.s., & Gentsch, J. The epidemiology of rotavirus diarrhoea in the United States: Surveillance and estimates of disease burden. *J Infect Dis.*, 1996; 174 (1): S5-11.
- (12) Henry, F., & Bartolomew, R. Epidemiology and Transmission of rotavirus infections and diarrhoea in St. Lucia, West Indies. *West Indies Med J.*, 1990; 39 (5): 205- 12.
- (13) Herring, A., Inglis, N., Ojeh, C., Snodgrass, D., & Menzie, S. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrilamide gels. *J Clin Microbiol.*, 1982; 16: 473-477.
- (14) Kelkar, S., Purohit, S., & Simha, K. Prevalence of rotavirus diarrhoea among hospitalized children in Pune, India. *Indian J Med Res.*, 1999; 109: 131-5.
- (15) Koopmans, M., & Brown, D.: Seasonality and diversity of Group A Rotaviruses in Europe. *Acta Paediatr Suppl.*, 1999; 88 (426): 14-19.
- (16) Koopmans, M., & Van Asperen, I. Epidemiology of rotavirus infections in The Netherlands. *Acta Paediatr Suppl.*, 1999; 88 (426): 31- 7.
- (17) Konno, T., Susuki, H., Katsushima, N., Imai, A., Tazawa, F., Kutsuzawa, T., Kitaoka, S., Sakamoto, M., Yazaki, N., & Ishida, N. Influence of temperature and relative humidity on human rotavirus infection in Japan. *J Infect Dis.*, 1983; 147:125-128.
- (18) Maldonado, A., & Bastardo, J. Epidemiología molecular de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela. *Acta Cient Venez.*, 1992; 43: 368-372.
- (19) Maldonado, A., & Bastardo, J. [Prevalence of subgroups, serotypes, and electrophoretotypes of human rotavirus in Cumaná, Venezuela]. *Invest Clin.*, 1998; 39 (3): 39-51.
- (20) Pérez-Schael, I., Daoud, G., White, L., Urbina, G., Daoud, N., Pérez M., & Flores, J. Rotavirus shedding by newborn children. *J. Med Virol.*, 1984; 14: 127-136
- (21) Pérez-Schael, I. The impact of rotavirus disease in Venezuela. *J. Infect Dis.*, 1996; 174 (1): S19-21.
- (22) Perez-Schael, I, Gonzalez, R., Fernandez, R., Alfonzo, E, Inaty, D, Boher Y., & Sarmiento, L. Epidemiological features of rotavirus infection in Caracas, Venezuela: implications for rotavirus immunization programs. *J Med Virol.*, 1999; 59 (4): 520-6.
- (23) Pipittajan, P., Kasempimolporn, S., Ikegami, N., Akatan, I. Wasi, & Siriarchatanant, C. Molecular epidemiology of rotavirus associated with pediatric diarrhoea in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol.*, 1991; 29 (3): 671-24.
- (24) Purohit, S., Kelgar, S., & Simha, V. Time series analysis of patients with rotavirus diarrhoea in Pune, India. *J Diarrhoeal Dis Res.*, 1998; 16 (2): 74-83.

- (25) Rodger, S., Bishop, R., Birch, C., Mc Lean, B., & Holmes, I. Molecular epidemiology of human rotavirus in Melbourne, Australia from 1973 to 1979 as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J Clin Microbiol.*, 1981; 13: 272-278.
- (26) Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* p. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1989.
- (27) Sokal, R. and Rolf, J. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica.* Editorial H. Blumé. Madrid, España. 1981; 830 pp.
- (28) Svensson, L., Uhnoo, I., Grandien, M., & Wadell, G. Molecular epidemiology of rotavirus infections in Uppsala, Sweden, 1981: disappearance of a predominant electropherotype. *J Med Virol.*, 1986; 18 (2): 101-11.
- (29) Tam, J., Zheng, B.J., L.o., S.K., Yeung, C., Lo, M., & Ng M. Distinct populations of rotaviruses circulating among neonates and older infant. *J Clin Microbiol.*, 1990; 28: 1033-1038.
- (30) Texeira, J., De Figueredo, R., Dos Santo, H.M., Ferreira, M., & Camara, G. Epidemiology of Rotavirus infections in the Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 1991; 24 (4): 223-30.
- (31) Unicomb, L., & Bishop, R. Epidemiology of rotavirus strains infecting children throughout Australia during 1986- 1987, a study of serotype and RNA electropherotype. *Arch Virol.*, 1989; 106:23-24.
- (32) Urquidi., V. Molecular epidemiology of human rotavirus infections in Coro, Venezuela. *Acta Cien. Venez.*, 1989; 40 (1): 33-9.
- (33) Urrestarazu, M., Liprandi, F., Pérez De Suarez, E., González, R., & Pérez-Schael, I. Características etiológicas, clínicas y social-demográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Rev Panam Salud Pública.*, 1999; 6 (3): 149-156.
- (34) WHO: Rotavirus vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.*, 1999; 74:33-38.