

Diversidad genotípica de rotavirus grupo A: correlación entre el tipo G3 y severidad de la infección. Valencia, Venezuela.

Rosabel González y Lisbeth Rivero.

Sección de Enfermedades Entéricas, Instituto de Biomedicina. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: rotavirus, diarrea aguda, tipificación, severidad de la diarrea.

Resumen. La variabilidad genética y antigénica de los rotavirus (RV) parece tener implicaciones en la severidad de la infección, pero los estudios no son concluyentes. Por este motivo, en el presente trabajo se compararon las medias de severidad entre los episodios de diarrea causados por RV tipo G1 y G3, durante el período 2001-2005, en la Ciudad Hospitalaria “Dr. Enrique Tejera” de Valencia, Venezuela. RV se detectó por ELISA, los tipos G y P por RT-PCR. La severidad de la infección se estimó utilizando el sistema de Ruuska-Vesikari, las medias de severidad se compararon mediante la prueba t de Student (2 colas, 95%IC). RV se detectó en 24,5% (3.193/13.026) de los pacientes. G3 fue más frecuente (50,3%), seguido por G1 (39,2%), G9 (6,2%), G2 (0,6%), G4 (0,6%) y 3,1% mixtos (G1+G3). El 87,3% de las muestras resultaron P[8], 10,9% P[4] y 1,8% P[6]. Al comparar los episodios G1 y G3, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos etarios, frecuencia de desnutridos, deshidratación y lactancia materna. Sin embargo, el grupo G3 se caracterizó por presencia significativa ($P < 0,05$) de fiebre, episodios con una duración ≥ 6 días, 6 o más evacuaciones en 24 horas y 3 o más días con vómitos. La media de severidad para los episodios G3 (11,1) fue mayor significativamente ($P < 0,05$) a la G1 (7,8). Estos resultados muestran la asociación de G3 con diarreas severas y apoyan la importancia de conocer la variabilidad y frecuencia de los tipos virales para medir el impacto de las vacunas antirotavirus.

Genetic diversity of rotavirus group A: correlation between G3 type and severity of the infection. Valencia, Venezuela.*Invest Clin 2013; 54(1): 34 - 46*

Abstract. Genetic and antigenic rotavirus (RV) variabilities may have implications in the severity of the infection caused by these agents; however the studies are not conclusive. For that purpose, the mean severity scores of diarrhea episodes caused by RV types G1 and G3 were compared, at Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera" in Valencia, Venezuela, between 2001-2005. RV were identified by ELISA, G and P types by RT-PCR. The severity of infection was determined using the Ruuska-Vesikari system and the mean severity values were compared using the Student's t-test (two-tailed, 95%CI). RV were detected in 24.5% of patients (3193/13026), being G3 the most common (50.3%), followed by G1 (39.2%), G9 (6.2%), G2 (0.6%), G4 (0.6%) and of mixed infection 3.1% (G1+G3). Type P[8] was present in 87.3% of samples, 10.9% P[4] and 1.8% P[6]. There were not statistically significant differences ($P \geq 0.05$) observed between the episodes caused by G1 and G3 when age, breast feeding, and degrees of malnutrition and dehydration were considered. Nevertheless, in the G3 positive group, fever, episodes of more than 6 days, 6 or more evacuations in 24 hours and 3 or more days with vomit, were observed. The mean severity score for the G3 episodes (11.1) was significantly higher ($P < 0.05$) than for G1 (7.8). These results show that G3 was associated with severe diarrhea, supporting the hypothesis that the knowledge of the variability and frequency of viral types is essential to measure the impact of an anti-rotavirus vaccine.

Recibido: 12-09-2012 Aceptado: 24-01-2013

INTRODUCCIÓN

Rotavirus grupo A (RV) es la causa más frecuente de diarrea severa en niños menores de 5 años (1-4). En los países pobres, por razones socioeconómicas y nutricionales, la diarrea por RV es la primera causa de muerte en la población menor de cinco años, estimándose que fallecen alrededor de 450.000 niños anualmente por esta enfermedad (2, 4). En Venezuela, la infección por RV es la primera causa de diarrea en niños menores de 5 años, responsable del 3% de todas las hospitalizaciones y la primera causa de muerte por diarrea en la población menor de 5 años, con un impacto importante (2%) en las muertes por todas las causas (5, 6).

El grupo A de RV, que causa la mayoría de las infecciones en humanos, se ha clasificado en distintos tipos G y P dependiendo de las variaciones antigénicas de las proteínas VP7 y VP4 de la capa externa de la partícula viral (7). Hasta los momentos, se han identificado 27 tipos G y 35 P en mamíferos y aves, de estos se han descrito en humanos 12 tipos G y 15 P (4), siendo las combinaciones G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G2P[4] y G9P[6] las más comunes en el mundo (8, 9). Sin embargo, en África, India y América del Sur la proporción de estas combinaciones comunes es menor (68%-50%), siendo considerables las cepas inusuales y las infecciones mixtas (8-12). Además de las diferencias regionales en la frecuencia de los tipos de RV se ha observado

que la incidencia de un tipo viral en una región cambia con el tiempo (8) y que el incremento en la frecuencia de un tipo viral va acompañado generalmente por la disminución de otro. Sin embargo, no está claro que origina estas fluctuaciones o cual es la presión selectiva que genera el cambio (13).

Una característica de la infección por RV, es la variabilidad en su presentación clínica que va desde infecciones asintomáticas hasta casos con manifestaciones clínicas severas y en ocasiones fatales. Las variaciones genéticas y antigénicas que presentan los RV parecen tener implicaciones clínicas en la severidad de la infección, pero son pocos los estudios realizados y los resultados no son concluyentes. Estos estudios, efectuados en distintas regiones y en tiempos diferentes, lograron determinar que ciertos tipos virales están relacionados con infecciones más severas. Sin embargo, el tipo viral asociado a mayor severidad fue diferente en cada uno de los estudios (10, 14-17).

La inmunización se ha propuesto como una estrategia de salud pública para prevenir la infección por RV y disminuir la carga de la infección. Hasta los momentos, dos vacunas antirotavirus están disponibles en diferentes países del mundo, la monovalente humana Rotarix™ (GlaxoSmithKline, Bélgica) que contiene el serotipo G1P1A[8] y la pentavalente bovina-humana RotaTeq™ (Merck Sharp Dohme, USA) con los tipos G1, G2, G3, G4 y P1A[8]. Ambas vacunas además de mostrar alta eficacia y seguridad contra la diarrea severa por RV, han demostrado inmunidad cruzada contra otros tipos del virus, como por ejemplo el G9 (4, 18, 19). Sin embargo, no se ha estudiado el impacto a largo tiempo de la inmunización sobre las características de la infección y su probable efecto en la evolución temporal de las distintas cepas del virus. Por este motivo, la Organización Panamericana de la Salud y los go-

biernos de las Américas iniciaron la vigilancia hospitalaria de la diarrea por RV. Uno de los objetivos de esta vigilancia en la Américas es comparar en cada región, durante los períodos pre y post vacuna, las características clínicas y epidemiológicas de la infección, así como la variación temporal de los tipos del virus (20, 21).

En tal sentido, con el fin de suministrar datos que permitan profundizar en las características de la infección por RV en la región y que sirvan de apoyo para la evaluación de las vacunas antirotavirus, en el presente trabajo se compararon las características clínicas, epidemiológicas y las medias de severidad entre los episodios de RV grupo A, tipos G1 y G3. Igualmente, se determinó la incidencia y variación temporal de las cepas de RV durante 5 años consecutivos (período prevacuna 2001-2005), en la Ciudad de Valencia, estado Carabobo-Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del estudio y población

En el presente estudio se tomaron los datos clínicos, epidemiológicos y las muestras de heces recolectadas en el sistema de vigilancia de la diarrea aguda en niños menores de 5 años realizado en el Hospital de Niños "Jorge Lizarraga" de la Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera" del estado Carabobo, Venezuela, durante el período 2001-2005 (5). En total se registraron durante este período 13.026 episodios de diarrea aguda en niños menores de 5 años.

Definición de episodio de diarrea aguda

Se definió un episodio de diarrea aguda como la presencia de tres o más evacuaciones, con alteración de la consistencia (líquida o semilíquida) o una evacuación con moco y sangre en 24 horas. Se descartaron los episodios con una duración mayor de 14 días (22).

Datos epidemiológicos y clínicos recolectados

El proyecto de investigación fue aprobado por la Comisión de Bioética del Instituto de Biomedicina, Caracas-Venezuela. Antes de incluir los niños en el estudio, se informó y explicó de forma oral y escrita a los padres o representantes, el alcance del proyecto. El consentimiento informado fue firmado y fechado por el padre o representante del niño y por la persona que describió el proyecto.

Se registraron sistemáticamente las siguientes características epidemiológicas y clínicas de cada niño menor 5 años con un episodio de diarrea aguda: fecha de inicio del episodio, edad, género, estatus socioeconómico (Graffar), estado nutricional, grado de deshidratación, tratamiento (ambulatorio, observación y hospitalizado), duración del episodio (en días), número máximo de evacuaciones en 24 horas, duración del vómito (en días), número máximo de vómitos en 24 horas, presencia de fiebre y resultados del diagnóstico viral para RV. El estado nutricional se determinó de acuerdo a las tablas de crecimiento de peso y talla para la edad (23). El estatus socioeconómico se estableció por la metodología de Graffar modificado (24) y el grado de deshidratación fue determinado según los criterios de la Organización Mundial de la Salud, OMS (22).

Detección de RV en las muestras de heces

RV se detectó mediante la técnica de ensayo Inmunoenzimático (EIA) directa comercial (Fuvesin Productos Biológicos. Caracas-Venezuela). Las muestras de heces se guardaron congeladas a -80°C .

Tipificación de las cepas de RV

La extracción del RNA viral y la determinación de los genotipos G y P por transcripción inversa y reacción en cadena de la po-

limerasa (RT-PCR) se realizaron siguiendo un protocolo ya descrito (25) y las recomendaciones del Manual de Métodos para la Detección y Caracterización de Rotavirus de la OMS (21). El ARN extraído se sometió a RT-PCR utilizando los oligonucleótidos (primers) Beg/End (21, 26) para la generación de un producto de amplificación de 1.062 pares de bases (pb) para el gen VP7 y Con2/Con3 (21, 27) para el gen VP4 porción VP[8] (876 pb). El producto de estas amplificaciones (primera ronda) se utilizó como molde en un PCR múltiplex (segunda ronda).

Santos en el año 2002 (28) demostró que las cepas de rotavirus tipo G9 pueden ser erróneamente tipificadas como G3 debido al alto grado de homología (76,2%) que presenta el primer G3 (aET3) con el sitio de unión del G9 (aFT9). Santos en su artículo recomienda utilizar estos dos primers en mezclas separadas. Por esta razón, en el presente trabajo se utilizaron dos mezclas (N° 1 y 2) para los tipos G.

Parámetros de reacción para la mezcla N° 1: el ADN ($5\ \mu\text{L}$) fue agregado a la mezcla de reacción constituida por buffer 10x (Invitrogen); $1,5\ \text{nM}$ MgCl (Invitrogen); $0,2\ \text{nM}$ DNTP's (Applied Biosystems); $1\ \mu\text{M}$ de cada primers G1(aBT1), G3(aET3), G4(aDT4), G8(aAT8) y el común RVG9 (25, 26); 5U de la enzima Tag ADN polimerasa (Invitrogen) y agua libre de RNasa (GIBCO) hasta completar un volumen final de $50\ \mu\text{L}$. Parámetros para la mezcla de reacción N°2: el ADN ($5\ \mu\text{L}$) fue agregado a la mezcla de reacción constituida por buffer10x (Invitrogen); $1,5\ \text{nM}$ MgCl (Invitrogen); $0,2\ \text{nM}$ DNTP's (Applied Biosystems); $1\ \mu\text{M}$ de cada primers G2 (aCT2), G9 (aFT9) y RVG9 (25, 27); 5U de la enzima Tag ADN polimerasa (Invitrogen) y agua libre de RNasa (GIBCO) hasta completar un volumen final de $50\ \mu\text{L}$.

La identificación de los tipos G y P se realizó según el tamaño molecular de los

productos de la segunda ronda de PCR, fueron corridos en un gel de agarosa (Promega) al 1%, teñidos con bromuro de etidio $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ y a 90 voltios.

Las muestras RV positivas por ELISA en donde no se obtuvo un producto por PCR detectable, luego de la segunda ronda y utilizando los primers para los tipos G y P descritos se consideraron en el presente trabajo como no tipificadas.

Análisis estadístico

Los datos se registraron en Microsoft Access y fueron procesados en SPSS versión 16.0, EpiInfo™ versión 3.5.1 y EXCEL. Los contrastes se realizaron mediante la prueba Chi cuadrado y un intervalo de confianza (IC) del 95%. Para cada caso se evaluó: La fuerza de la asociación, mediante la estimación del OR (Odds Ratio), la precisión del análisis, mediante los intervalos de confianza y la significación estadística del contraste asociada al estadístico.

La severidad de la infección se estimó utilizando el sistema de Ruuska Vesikari, que proporciona un puntaje (con un valor máximo de 20) para valorar la severidad de los episodios de diarrea (29). Las medias de la severidad se compararon mediante la prueba t-student (2 colas) y un 95% IC.

RESULTADOS

Características de la población estudiada

Durante el período de estudio (2001-2005) se registraron en la Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera" 13.026 casos de diarrea aguda en niños menores de 5 años. Predominó significativamente ($p < 0,05$; $\text{OR} = 1,31$; $95\% \text{ IC} = 1,25-1,38$) el género masculino (53,4%; $6.952/13.026$) sobre el femenino (46,6%; $6.074/13.026$) y el 24,1% ($2.890/11.996$) de la población presentó algún grado de desnutrición.

Características epidemiológicas y clínicas de la población RV positiva

RV fue detectado en 24,5% ($3.193/13.026$) de las muestras analizadas (período 2001-2005). La frecuencia de la infección varió ligeramente en los años de estudio: 19,4% ($423/2.179$) año 2001, 25,7% en 2002 ($617/2.400$), 26,3 ($908/3.449$) en el 2003, 22,7% ($602/2.652$) año 2004 y 27,4% ($643/2.346$) en el 2005. La infección fue significativamente más frecuente ($p < 0,05$; $\text{OR} = 2,06$; $95\% \text{ IC} = 1,86-2,27$) en el género masculino (58,9%; $1.881/3.193$) que en el femenino (41,1%; $1.312/3.193$). El mayor porcentaje de los casos se detectó en los menores de un año (55,7%; $1.777/3.193$), bajando a 32,6% ($1.041/3.193$) en la población de 12 a 23 meses y a 11,7% ($375/3.193$) en la población igual o mayor de 24 meses. El 23,9% ($701/2.934$) de la población presentó algún grado de desnutrición, 31,0% ($990/3.193$) de los casos fueron tratados en observación u hospitalización y 27,7% ($861/3.111$) presentó algún grado de deshidratación.

Tipificación de RV

La selección de las muestras para la tipificación se realizó siguiendo las recomendaciones del Manual de Rotavirus de la OMS (21). De esta forma, se eligieron, de forma aleatoria y sistemática 199 muestras RV positivas, distribuidas anualmente de la siguiente forma: 42 muestras para año 2001, los años 2002, 2003, y 2004 con 39 muestras cada uno y 40 muestras para el año 2005. En el 87,5% ($174/199$) de las muestras se observó producto en la primera amplificación VP7 (1062 pb) y en 92,5% ($161/174$) de estas se obtuvo resultado para la tipificación G. El tipo G3 fue el más frecuente (50,3%; $81/161$), seguido por G1 (39,2%; $63/161$), G9 (6,2%; $10/161$), G2 (0,6%; $1/161$), G4 (0,6%; $1/161$) y 3,1% ($5/161$) de infecciones mixtas todas G1 +

G3. El 19,1% (38/199) de las cepas resultaron no tipificadas.

Solo se obtuvo resultado para el tipo P en el 27,6% (55/199) de las muestras. Es decir, 144 (79,9%) muestras no pudieron ser tipificadas. De estas, en 99 (68,8%) no se logró la amplificación del segmento de 879pb del gen VP4 (primera ronda) y en 45 (31,4%) cepas, a pesar de la obtención del segmento de amplificación, no se alcanzó resultados en la tipificación P (segunda ronda).

La distribución de los tipos P investigados en las 55 cepas con resultado fue: 87,3% (48/55) P[8], 10,9% (6/55) P[4] y 1,8% (1/55) P[6]. Las combinaciones G-P halladas fueron G1P[8] (36%), G3P[8] (33%), G9P[8] (11%), G4P[8] (2%), G3P[4] (6%), G1+G3 P[4] (2%), G3P[6] (2%).

Variación temporal de los tipos G de RV

Se observó variación anual en la frecuencia de los distintos tipos G. En los años 2001 y 2002 el tipo G1 fue el más frecuente con 90,1% (27/30) y 85,3% (29/34) respectivamente. Mientras que, el tipo G3 es el

más importante en los años 2003 (85,3%; 29/34) y 2004 (94,1%; 32/34). En el 2005, G3 cae a un 62,1% (18/29) y surge G9 con una frecuencia del 34,5% (10/29). En el año 2001 se detectó una muestra tipo G2 (3,3 %) y una G4 (3%). El porcentaje más alto de cepas no tipificadas se registró en el año 2001 (28,6%; 12/42), y el más bajo en los años 2002, 2003 y 2004 con 12,8% cada uno (Tabla I).

Relación entre el tipo de RV y la severidad del episodio

Para el análisis, se seleccionaron de forma aleatoria y sistemática, 55 episodios G1 y 62 tipos G3. Estos tipos fueron seleccionados debido a que resultaron ser los más frecuentes durante el estudio. Las características epidemiológicas y clínicas de los episodios se muestran y comparan en la Tabla II. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones comparar los grupos etarios, la frecuencia de niños desnutridos ($p>0,05$; OR=1,04; 95% IC= 0,38-2,84), el grado de deshidratación ($p>0,05$; OR=1,86; 95%

TABLA I
VARIACIÓN TEMPORAL DE LOS TIPOS G DE ROTAVIRUS. CIUDAD HOSPITALARIA DR. ENRIQUE TEJERA. VALENCIA-EDO. CARABOBO, VENEZUELA

Año	2001	2002	2003	2004	2005	Total
Nº total de cepas	42	39	39	39	40	199
Nº de cepas tipificadas (%)*	30 (71,4)	34 (87,2)	34 (87,2)	34 (87,2)	29 (72,5)	161 (80,9)
Tipos G	Número (%)**					
G1	27 (90,1)	29 (85,3)	5 (14,7)	2 (5,9)	0	63 (39,2)
G2	1 (3,3)	0	0	0	0	1 (0,6)
G3	0	2 (5,9)	29 (85,3)	32 (94,1)	18 (62,1)	81 (50,3)
G4	1 (3,3)	0	0	0	0	1 (0,6)
G8	0	0	0	0	0	0
G9	0	0	0	0	10 (34,5)	10 (6,2)
Mixtas	1 (3,3)	3 (8,8)	0	0	1 (3,4)	5 (3,1)
No tipificadas*	12 (28,6)	5 (12,8)	5 (12,8)	5 (12,8)	11 (27,5)	38 (19,1)

* Porcentaje referido al número total de cepas. ** Porcentaje referido al número de cepas tipificadas.

TABLA II
COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LOS EPISODIOS DE DIARREA POR ROTAVIRUS TIPOS G1 Y G3

Características	Tipo G1 (N= 55) n (%)	Tipo G3 (N =62) n (%)	OR (95% IC)†
Edad (meses)			
0-6	14 (25,5)	21 (33,9)	0,67 (0,28-1,60)
7-11	21 (38,2)	22 (35,5)	1,12 (0,49-2,55)
≥ 12	20 (36,3)	19 (30,6)	1,29 (0,56-3,00)
Desnutridos	11 (20,0)	12 (19,4)	1,04 (0,38-2,84)
Fiebre ≥ 38,5°C	10 (18,1)*	36 (58,1)*	0,16 (0,06-0,40)
Deshidratación	17 (30,9)	12 (19,4)	1,86 (0,74-4,76)
Duración de la diarrea /días			
1-4	39 (70,9)*	29 (46,8)*	2,77 (1,21-6,44)
5	12 (21,8)	8 (12,9)	1,88 (0,64-5,61)
≥ 6	4 (7,3)*	25 (40,3)*	0,12 (0,03-0,39)
Nº máximo de evacuaciones /24h			
1-3	17 (30,9)*	5 (8,1)*	5,10 (1,59-17,41)
4-5	16 (29,1)	15 (24,2)	1,29 (0,52-3,17)
≥ 6	22 (40,0)*	42 (67,7)*	0,32 (0,14-0,72)
Duración del vómito /días			
0	19 (34,5)*	8 (12,9)*	3,56 (1,30-10,02)
1	26 (47,3)*	14 (22,6)*	3,07 (1,29-7,39)
2	6 (10,9)*	17 (27,4)*	0,32 (0,10-0,98)
≥ 3	4 (7,3)*	23 (37,1)*	0,13 (0,04-0,45)
Nº máximo de vómitos/24h			
0	19 (34,5)*	8 (12,9)	3,56 (1,30-10,02)
1	5 (9,1)	5 (8,0)	1,14 (0,27-4,89)
2-4	20 (36,4)	28 (45,2)	0,69 (0,31-1,56)
≥ 5	11 (20,0)	21 (33,9)	0,49 (0,19-1,22)
Tratamiento			
Ambulatorio	35 (63,6)	44 (71,0)	0,72 (0,60-3,27)
Observación-Hospitalizado	20 (36,4)	18 (29,0)	1,40 (0,31-1,67)
Medias de severidad (Ruuska-Vesikari)	7,8 **	11,1 **	

† Odds Ratio. * P < 0,05 para la comparación entre los episodios G1 y G2, prueba Chi-cuadrado 2 colas (nivel de significancia de $\alpha = 0,05$). ** P < 0,05 y 95% de IC = 2,49-4,18 para la comparación entre las medias de severidad de los episodios G1 y G2, prueba t de Student.

IC=0,74-4,76) y la lactancia materna ($p > 0,05$; OR=1,63; 95% IC= 0,69-3,89). Sin embargo, el grupo infectado con el tipo G3 se caracterizó por presencia significativa de fiebre ($p < 0,05$; OR= 0,16; 95% IC= 0,06-0,40), episodios con una duración ≥ 6 días ($p < 0,05$; OR=0,12; 95% IC= 0,03-0,39), 6 o más evacuaciones en 24 horas ($p < 0,05$; OR=0,32; 95% IC= 0,14 - 0,72) y 3 o más días con vómitos ($p < 0,05$; OR=0,13; 95% IC=0,04-0,45). Mientras que, el número de episodios sin vómitos fue significativamente mayor en el grupo infectado con el tipo G1 ($p < 0,05$; OR=3,56; 95% IC=1,30-10,02). La media de severidad, estimada según la escala de Ruuska y Vesikari, para los episodios G3 (11,1) fue mayor a la G1 (7,8) siendo la diferencia significativa ($p < 0,05$; 95% IC= 2,49-4,18).

DISCUSIÓN

El conocimiento en cada región, de las características clínicas y epidemiológicas de la infección por RV, al igual que el estudio de la frecuencia y cambios temporales de los tipos virales, es primordial para medir el impacto de las vacunas que se aplican actualmente y proporciona información de mucha utilidad para la formulación y pruebas de las nuevas vacunas (30, 31). En el presente trabajo se estudió la posible correlación entre las cepas de RV y la severidad de la infección. Además, se determinó la frecuencia y variación en el tiempo de los tipos virales en la Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera” de la Ciudad de Valencia, estado Carabobo.

La incidencia de RV en el período de estudio fue similar a la reportada por diferentes trabajos realizados en Venezuela (5, 25, 32-36) y en otros países (8, 37-39). Igualmente, la disminución con la edad en la frecuencia de diarreas por RV observada en el presente trabajo es una característica de la infección (5, 14, 40) y refleja un incre-

mento de la inmunidad natural con el tiempo (41, 42).

Este trabajo demuestra, como se ha reportado en los pocos trabajos realizados en el país (36, 43-45), que en Venezuela, al igual que en otras regiones (8), los tipos G de RV presentan variaciones temporales en su frecuencia. Se obtuvo un porcentaje de éxito para la tipificación G utilizando RT-PCR, considerablemente alto y comparable a lo reportado en otros trabajos (8, 43). La incidencia hallada en esta investigación para los tipos G fue comparable a la reportada por dos trabajos realizados en el mismo hospital, en el período 2001-2005 y en el marco de los estudios de campo de la vacuna anti-rotavirus RIX4414 (44, 45). El tipo G1 fue el de mayor incidencia en los años 2001 y 2002, mientras que G3 resultó ser el más importante en los años 2003, 2004 y 2005. Se detectó el tipo G9 en el año 2005 y con una frecuencia del 34%. En los últimos 15 años, G9 se ha constituido en el quinto tipo G más frecuente en el mundo (8-10, 17, 38) siendo en algunas zonas el genotipo predominante (8, 37). Los reportes sobre la circulación de G9 en países latinoamericanos como Brasil (17), Argentina (46), Paraguay (47) y recientemente en Venezuela (36) señalan la importancia de esta cepa en la región y alertan sobre la necesidad de demostrar la eficacia de las nuevas vacunas contra el tipo G9 antes de ser incluidas en los programas de vacunación de los países latinoamericanos (4).

La baja frecuencia del tipo G2 en el presente trabajo contrasta con los resultados obtenidos por otros investigadores, en un trabajo realizado en la Ciudad Hospitalaria “Dr Enrique Tejera”, durante el año 2003 (36). Estos autores reportan una frecuencia para el tipo G2 considerablemente alta (35,6%) durante los primeros meses del año 2003. Sin embargo, los resultados de las investigaciones realizadas en la Ciudad Hospitalaria “Dr. Enrique Tejera” en el

marco de los estudios de campo de la vacuna anti-rotavirus RIX4414, reportan frecuencias muy bajas para el tipo G2 en todos los países Latinoamericanos, incluyendo Venezuela, en los períodos 2001-2003 (44) y 2003-2005 (45). Es importante indicar además, que en los tres estudios (36, 44, 45) la tipificación se realizó mediante RT-PCR y por secuenciación. Estos resultados no dejan claro la real frecuencia del tipo G2 en Venezuela durante el año 2003 y plantean la necesidad de tipificar un mayor número de muestras durante este año y utilizando diferentes estrategias.

En el presente estudio, el porcentaje de éxito para la tipificación P resultó muy bajo. Descartamos la posible degeneración de las cepas o la existencia de inhibidores ya que ambas tipificaciones (G y P) se realizaron al mismo tiempo y bajo condiciones similares. Otros trabajos realizados en diferentes regiones, reportan igualmente bajos rendimientos en la tipificación (8, 48). Uno de estos estudios (48), por ejemplo, reporta fallas del 77% en la amplificación al utilizar los primers Con3/Con2. Además, al realizar la caracterización total del gen VP4 los autores hallaron la presencia de nuevos genotipos y fallas en la unión de los primers (48). Por otro lado, el trabajo realizado en La Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera" durante el año 2003 (36) reportó un alto porcentaje de éxito (97,7%) para la tipificación P. Sin embargo los autores emplearon un juego de primers para la primera ronda de amplificación P, distinto al utilizado en la actual investigación. Por consiguiente, una posible causa de las fallas en la tipificación P obtenida en el presente trabajo, puede ser el juego de primers utilizado (Con3/Con2). Estos resultados obligan, como lo han sugerido otros autores, una revisión constante de las estrategias para la tipificación del RV (48).

El bajo porcentaje obtenido para la tipificación P exige cuidados en la interpreta-

ción de los resultados, sin embargo, es importante indicar que P[8] resultó ser el más frecuente, siendo las combinaciones G1P[8], G3P[8] y G9P[8] las más comunes. Estos resultados corroboran los reportes mundiales que colocan a P[8] como el tipo más importante junto al P[4], y las combinaciones G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8] responsables del 79% de los casos de diarrea por RV (8).

La diversidad genética de los RV y la variabilidad en su presentación clínica, ha llevado a la búsqueda de una posible asociación entre los tipos del virus y la severidad de la infección. Los resultados hasta los momentos no son concluyentes: algunos trabajos no hallan asociación entre la severidad y las cepas (9, 14, 38, 49, 50), otros estudios reportan asociación entre los tipos G1 y G3 con diarreas más prolongadas (51) o asocian a los tipos G2 (14, 15), G9 (17), G1 (10) y P[4] (16) con diarreas severas. En el presente estudio, los episodios G3 se caracterizaron por ser más prolongados en el tiempo, presentar fiebre, más días con vómitos y una media de severidad, según la escala de Ruuska Vesikari, estadísticamente mayor. Es importante indicar que no se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto a la edad ni al estado nutricional.

La severidad de la infección por RV es multifactorial, además del tipo viral, juegan un papel importante la edad, el estado nutricional del niño y las variaciones temporales en la frecuencia de las distintas cepas (17). En el estudio, no se encontraron diferencias significativas entre los tipos G1 y G3 respecto a la edad o al estado nutricional y por esta razón es poco probable que estas variables sean responsables de las diferencias observadas en la severidad. Sin embargo, las variaciones temporales de los tipos virales en la región donde se realizó el estudio podrían explicar en parte la diferencia observada. Se ha sugerido que la intro-

ducción de una nueva cepa en la comunidad puede generar casos más severos, debido a la ausencia de anticuerpos maternos y a la falta de exposición de la población al nuevo tipo viral (17). Como ejemplos: G9 se asoció a diarreas neonatales severas en Holanda (52) y la aparición del nuevo tipo G3P[4] en una comunidad de Brazil se relacionó con cuadros diarreicos más severos (53). En el presente estudio, G1 circuló con una alta frecuencia durante los dos primeros años del estudio (2001, 2002) y fue el tipo más importante en un trabajo realizado por nuestro grupo durante el período 1997-2000 en el mismo Hospital (datos no publicados). Es decir, G1 circuló casi exclusivamente en esta población por un período de cinco años (1998-2002). De esta forma, el surgimiento del G3 en la población expuesta por 5 años al tipo G1 podría explicar la severidad asociada al nuevo tipo emergente.

La diversidad genética de las cepas de RV, debido a la acumulación de mutaciones y rearrreglos genéticos, junto a la evidencia de variaciones geográficas y temporales en la frecuencia de los distintos tipos del virus, representan un reto para la eficacia de las vacunas. Por esta razón, es importante mantener sistemas de vigilancia en las distintas regiones que permitan detectar los tipos no comunes, el surgimiento de nuevas cepas y los posibles cambios en la epidemiología de la infección. Nuestro estudio, realizado durante el período prevacuna, suministra datos valiosos que servirán como punto de referencia para medir el impacto de la vacuna anti-rotavirus que se aplica en el país desde el año 2006 (54) y evaluar la posible presión selectiva que esta ejerza la inmunización sobre los distintos tipos virales.

REFERENCIAS

1. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by RV disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:565-572.
2. Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D, Birmingham M, Glass RI. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis* 2009; 200(Suppl 1):S9-S15.
3. Cunliffe NA, Booth JA, Elliot C, Lowe SJ, Sopwith L, Kitchin N, Nakagomi O, Nakagomi T, Hart A, Reġan M. Health-care-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:55-62.
4. Justino MC, Araújo EC, van Doorn LeenJan, Oliveira CS, Gabbay JB, Mascarenhas J, Miranda YS, Guerra S de Fátima, da Silva VB, Linhares A. Oral live attenuated human rotavirus vaccine (Rotarix™) offers sustained high protection against severe G9P[8] rotavirus gastroenteritis during the first two years of life in Brazilian children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107: 846-853.
5. Salinas B, González G, González R, Escalona M, Materán M, Pérez Schael I. Epidemiologic and clinical characteristics of RV disease during five years of surveillance in Venezuela. *Pediatr Infec Dis J* 2004; 23 (Suppl): S161-167.
6. Pérez-Schael I, Salinas B, González R, Salas H, Ludert JE, Escalona M, Alcalá A, Rosas MA, Materán M. Rotavirus mortality confirmed by etiologic identification in Venezuelan children with diarrhea. *Pediatr Infec Dis* 2007; 26: 393-397.
7. Estes MK, Kapiquian AZ. Rotaviruses. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editores. *Fields Virology*, 5ta ed. Philadelphia: Kluwer Health/Lippincott, Williams and Wilkins. 2007. pp 1917-1974.
8. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of RV serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective RV vaccine. *Rev Med Virol* 2005; 15: 29-56.
9. Nokes DJ, Peenze I, Netshifhephe L, Abwao J, De Beer MC, Seheri LM, Williams TN, Page N, Steele D. Rotavirus ge-

- netic diversity, disease association and temporal change in hospitalized rural Kenyan children. *J Infect Dis* 2010; 1: S180-S186.
10. **Bahl R, Ray P, Subodh S, Shambharkar P, Saxena M, Parashar U, Gentsch J, Glass R, Bhan MK.** Incidence of severe rotavirus diarrhea in New Delhi, India, and G and P types of the infecting rotavirus strains. *J Infect Dis* 2005; 192: S114-S119.
 11. **Castello AA, Arguelles MH, Rota RP, Olthoff A, Jiang B, Glass RI, Gentsch JR, Glikmann G.** Molecular epidemiology of group A RV diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2046-2050.
 12. **Armah G, Hoshino Y, Santos N, Binka F, Damanka S, Adjei R, Honma S, Tatsumi M, Manful T, Anto F.** The global spread of rotavirus G10 strains. Detection in Ghanaian children hospitalized with diarrhea. *J Infect Dis* 2010; 1: S231-S238.
 13. **McDonald SM, Matthijnssens J, McAllen JK, Hine E, Overton L, Wang S, Lemey P, Zeller M, Van Ranst M, Spiro DJ, Patton JT.** Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000634 [acceso Ene 2011].
 14. **Bern C, Unicomb L, Gentsch J, Banul N, Yunus M, Sack RB, Glass RI.** RV diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3234-3238.
 15. **Cascio A, Vizzi E, Alaimo C, Arista S.** RV gastroenteritis in Italian children: can severity of symptoms be related to the infecting virus? *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1126-1132.
 16. **Mota-Hernández F, Calva JJ, Gutierrez-Camacho C, Contreras-Villa S, Arias CF, Padilla-Noriega L, Guiscafré-Gallardo, Guerrero ML, López S, Muñoz O, Contreras JF, Cedillo R, Herrera I, Puerto IF.** RV diarrhea severity is related to the VP4 type in Mexican Children. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3158-3162.
 17. **Linhares AC, Verstraeten T, Wolleswinkel-van den Bosch J, Clemens R, Breuer T.** Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. *Clin Infect Dis* 2006; 43:312-314.
 18. **Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Chevart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, Lopez P, Macias-Parra M, Ortega-Barria E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavia-Ruz N, Salmeron J, Ruttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nunez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Saez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckennooghe A, Clemens R, De Vos B, O'Ryan M, Human Rotavirus Vaccine Study Group.** Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006; 354:11-22.
 19. **Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham Rodriguez Z, Dallas MJ, Heyse JF, Goveia MG, Black SB, Shinefield HR, Christie CD, Ylitalo S, Itzler RF, Coia ML, Onorato MT, Adeyi BA, Marshall GS, Gothefors L, Campens D, Karvonen A, Watt JP, O'Brien KL, DiNubile MJ, Clark HF, Boslego JW, Offit PA, Heaton PM.** Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 2006; 354:23-33.
 20. **Gentsch JR, Parashar UD, Glass RI.** Impact of rotavirus vaccination: the importance of monitoring strains. *Future Microbiol* 2009; 4: 1231-1234.
 21. **World Health Organization.** Manual of rotavirus detection and characterization methods. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2009.
 22. **World Health Organization (WHO).** A Manual for the treatment of diarrhea: for use by physicians and other senior health workers. Geneva: World Health Organization; 1990.
 23. **World Health Organization (WHO).** WHO child growth standards 2006. Available on: www.who.int/chilgrowth/en. Acceso Dic. 2009.

24. Méndez-Castellano H, De Méndez MC. Estratificación social y biología humana: método Graffar modificado. *Arch Venez Puere Pediatr* 1986; 49:93-104.
25. González R, Salas-Maronsky H, Balebona E, Martínez JR, Serrano N, Pérez-Schael I. Estudio epidemiológico de las diarreas por rotavirus en niños menores de 5 años atendidos en centros asistenciales del estado Miranda-Venezuela. *Invest Clin* 2008; 49: 499-510.
26. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang Zhao-Yin. Polymerase chain reaction amplification and typing of RV nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28:276-282.
27. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A RV gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1365-1373.
28. Santos N, Volotao EM, Soares CC, Albuquerque MC, da Silva FM, Chizhikov V, Hoshino Y. VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. *Virus Res* 2003; 93: 127-138.
29. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* 1990; 22: 259-267.
30. Glass RI, Bhan MK, Ray P, Bahl R, Parashar UD, Greenberg H, Rao CD, Bhandari N, Maldonado Y, Ward RL, Bernstein DI, Gentsch JR. Development of candidate rotavirus vaccines derived from neonatal strains in India. *J Infect Dis* 2005; 192: S30-S35.
31. Bhandari N, Sharma P, Glass RI. Safety and immunogenicity of two live attenuated human rotavirus vaccine candidates, 116E and I321, in infants: results of a randomized controlled trial. *Vaccine* 2006; 24: 5817-5823.
32. Maldonado AJ, Bastardo JW. Epidemiología molecular de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela. *Act Cient Venez* 1992; 43:368-372.
33. Pérez-Schael I, González R, Fernández R, Alfonso E, Inaty D, Boher Y, Sarmiento L. Epidemiological features of RV infection in Caracas, Venezuela: Implications for RV immunization programs. *J Med Virol* 1999; 59:520-526
34. Urrestarazu M, Liprandi F, Pérez de Suarez E, González R, Pérez-Schael I. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Pan Am J Public Health* 1999; 6: 149-156.
35. Rojas Y, Bastardo J, Sulbarán M. Prevalencia de rotavirus y su relación con factores climáticos en Cumaná, Venezuela. *Kasmera* 2003; 31: 20-28.
36. Vizzi E, Piñeros O, González GG, Zambrano JL, Ludert JE, Liprandi F. Genotyping of human rotaviruses circulating among children with diarrhea in Valencia, Venezuela. *J Med Virol* 2011; 83: 2225-2232.
37. Munford V, Gilio AE, Correa de Souza E, Morais Cardoso D, das Dores de Paula Cardoso D, Tavares Borges AM, Sucasas de Costa PS, Melo Melgaco IA, Rosa H, Antonacci Carvalho PR, Zubaran Goldani M, Duarte Moreira E, Santana C, El Khoury A, Ikedo F, Rácz ML. Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study. *J Infect Dis* 2009; 1: S106-S113.
38. Zuccotti G, Meneghin F, Dilillo D, Romano L, Bottone R, Mantegazza C, Giacchino R, Besana R, Ricciardi G, Sterpa A, Altamira N, Andreotti M, Montrasio G, Macchi L, Pavan A, Paladín S, Zanetti A, Radaelli G. Epidemiological and clinical features of rotavirus among children younger than 5 years of age hospitalized with acute gastroenteritis in northern Italy. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 218-215.
39. Nozawa CM, Kerntopf GF, da Silva Czernisz E, Albuquerque D, Romani P, Freitas JF, Santos N, Benati FJ, Pietruchinski E, Cavalho Linhares RE. Detection and characterization of human rotavirus in hospitalized patients in the cities of Ponta Grossa, Londrina and Assai-Pr, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2010; 14(6):553-557.
40. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero ML, Morrow AL, Carter-Camp-

- bell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios M. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med* 1996; 335:1022-1028.
41. Franco M, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 2006; 24: 2718-2731.
 42. Velázquez FR. Protective effects of natural rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28: 554-556.
 43. White L, García D, Boher Y, Blanco M, Pérez M, Romer H, Flores J, Pérez-Schael I. Temporal distribution of human rotavirus serotypes 1,2,3 and 4 in venezuelan children with gastroenteritis during 1979-1989. *J Med Virol* 1991; 34: 79-84.
 44. Salinas B, Pérez-Schael I, Linhares AC, Ruiz-Palacios G, Guerrero L, Yarzabal JP, Cervantes Y, Costa S, Damasco S, Hardt K, De Vos B. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414. *Pediatr Infect Dis* 2005; 24: 807-816.
 45. Linhares AC, Velázquez RF, Pérez-Schael I, Llrens-Sáez X, Abate E, Espinosa F, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barrios E, Rivera-Medina DM, Rivera L, Pavía-Ruz N, Nuñez E, Damasco S, Ruíz-Palacios GM, De Vos B, O'Ryan M, Gillar P, Bouckennooghe A, and the Human Rotavirus Vaccine Study Group. Efficacy and safety an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of live in Latin American infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet* 2008; 371: 1181-1189.
 46. Bok K, Palacios G, Sijvarger K, Matson D, Gomez J. Emergence of G9P[6]human rotavirus in Argentina: phylogenetic relationships among G9 strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4020-4025.
 47. Coluchi N, Munford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M, Weber E, Mármol P, Racz ML. Detection subgroup specificity and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1709-1714.
 48. Solberg O, Hasing ME, Trueba G, Eisenberg J. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology* 2009; 385: 58-67.
 49. Martella V, Terio V, Arista S, Elia G, Corrente M, Madio A, Pratelli A, Tempesta M, Cirani A, Buonavoglia C. Nucleotide variation in the VP7 gene affects PCR genotyping of G9 rotaviruses identified in Italy. *J Med Virol* 2004; 72: 143-148.
 50. Iturriza-Gomara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 2004; 31: 259-265.
 51. Polanco G, Gozález M, Rodríguez E, Manzano L, Cámara J, Puerto M. Clinical manifestation of the rotavirus infection and his relation with the electropherotypes and serotypes detected during 1998 and 1999 in Merida, Yucatán, Mexico. *J Clin Virol* 2003; 27: 242-246.
 52. Widdowson MA, van Doornum GJJ, van der Poel WHM, de Boer AS, Mahdi U, Koopmans M. Emerging group-A rotavirus and nosocomial outbreak of diarrhea. *Lancet* 2000; 356: 1161-1162.
 53. Rosa e Silva ML, Pires de Carvalho I, Gouvea V. 1998-1999 rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of unusual G3P[4] epidemic strain. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2837-2842.
 54. Pérez-Schael I. Vacuna de rotavirus: un recorrido exitoso en Venezuela. Clemente Heimerdinger A, Briceño-Iragorry L, editores. Colección Razzetti. Volumen VIII. Caracas: Editorial Ateproca; 2009; 63-88.