

29 Agentes virales de gastroenteritis

Rotavirus

A. Sirok, V. Le Pera, D. Sandín

Rotavirus

INTRODUCCIÓN

Rotavirus es una de las causas más frecuentes de enfermedad diarreica en humanos, otros mamíferos y aves, en todo el mundo. Fueron descubiertos observando al microscopio electrónico biopsias de duodeno en niños con diarrea aguda. Subsecuentemente fueron detectados en heces por microscopía electrónica.

En países en vías de desarrollo contribuye a una considerable morbilidad y mortalidad entre los niños pequeños. Son también causantes de brotes y epidemias de diarrea intrahospitalaria.

MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA

Pertencen a la familia *Reoviridae*, junto con los reovirus. El término rotavirus deriva de la palabra del latín *rota* que significa rueda, por su aspecto de doble rueda al microscopio electrónico.

El genoma viral consiste en 11 segmentos de ARN doble cadena, codificando cada uno de ellos para una única proteína, ya sea estructural o no estructural (salvo el segmento 11 que codifica para 2 proteínas no estructurales). Las proteínas estructurales (VPs) forman parte de la partícula viral mientras que las proteínas no estructurales (NSPs) colaboran en la replicación viral, morfogénesis, restricción del hospedero, secuestro de la maquinaria biosintética celular y en la patogenicidad.

Rotavirus porta su propia ARN polimerasa ARN dirigida, la cual es codificada en el segmento 1 (proteína VP1).

El virión intacto mide aproximadamente 100 nm de diámetro y se caracteriza por presentar una triple cápside proteica. La cápside externa se halla conformada por las proteínas que conforman las espículas VP4 y por la proteína mayoritaria de la cubierta VP7. Dichas proteínas de la cápside externa son inductoras de la producción de anticuerpos neutralizantes fundamentales en la protección inmune ante infecciones por rotavirus.

La cápside intermedia se encuentra constituida en su totalidad por VP6, donde se encuentran los epítopes específicos de grupo y subgrupo antigénico. Finalmente la cápside interna, denominada también con el nombre de *core*, se halla constituida por la proteína VP2 y en sus vértices los complejos VP1-VP3 de transcripción/replicación. Dicha cápside es la que

contiene en su interior el genoma viral.

De acuerdo a esto los viriones podrían presentarse en tres configuraciones distintas: las partículas de triple envoltura (TLPs), con o sin espículas; de doble envoltura (DLPs); y de envoltura única (SLPs).

Las TLPs son las partículas completas infectivas; poseen la cápside externa constituida por VP4 y VP7.

Las DLPs carecen de VP7 y VP4, siendo las partículas con capacidad de replicarse y transcribirse, aunque no son infectivas. Poseen 780 moléculas de VP6 dispuestas en 260 trímeros formando una especie de malla icosaédrica perforada por 3 tipos de canales, los cuales se ubican siguiendo la simetría de la partícula, a nivel de los vértices. Por ellos se transportan nucleótidos, ATP, etc. hacia adentro de la partícula y, a su vez, se exportan los mARN virales hacia el citoplasma. La cápside de VP7 obstruye los canales por lo que los mensajeros no podrían emerger de la partícula. Por otro lado, para que se dé una replicación y transcripción activas VP6 debe adoptar una conformación particular, dada a nivel de las DLPs. La conformación activa de la polimerasa depende de contactos apropiados con VP2, los cuales dependen de su interacción con VP6 en las DLPs.

Las SLPs se corresponden con partículas que solo presentan la cápside de VP2. La misma esta constituida por 60 dímeros de dicha proteína, presentando también perforaciones o canales que se contactan con los de la cápside intermedia. En su interior contiene al genoma viral compactado, junto a los complejos VP1–VP3 (de replicación/transcripción) presentes en los vértices internos del icosaedro. No es capaz de replicarse debido a que la polimerasa (VP1) para activarse, necesita interactuar con la VP2 en una conformación apropiada dada por la VP6. Tampoco son infectivas, debido a que carecen de VP4 y VP7.

CLASIFICACIÓN

La proteína VP6 presenta los epítopes específicos de grupo en base a los cuales se han definido siete variantes: A, B, C, D, E, F y G. Las variantes A, B, y C se asocian a infecciones en humanos y D, E, F y G se asocian con infecciones en animales.

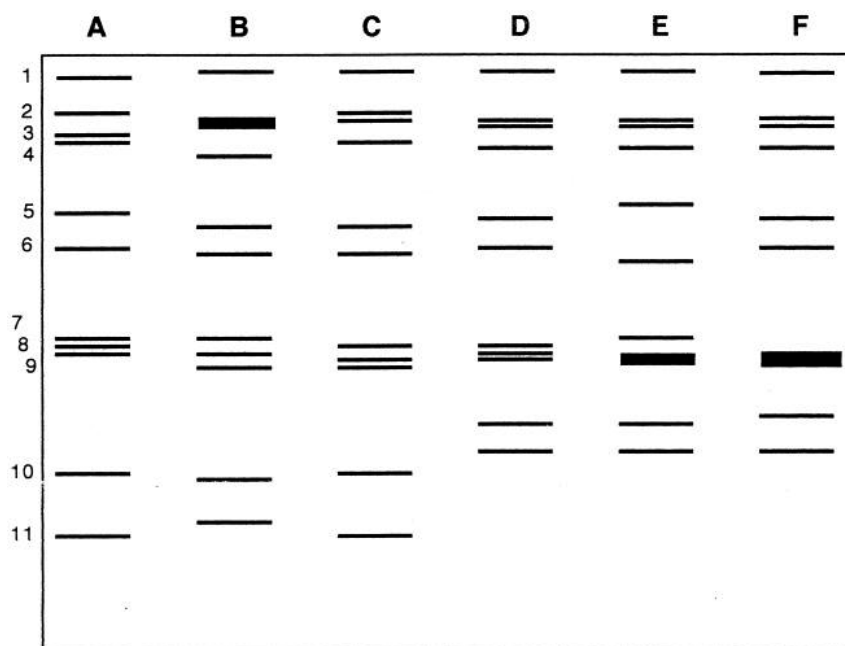
Para rotavirus del grupo A, los serotipos quedan determinados por la presencia de epítopes específicos presentes a nivel de proteínas de la cápside externa VP4 y VP7 definiéndose 14 serotipos G – glicoproteína (en base a epítopes reconocidos en VP7) y 13 serotipos P – proteasa sensible (según epítopes en VP4).

Existe también una clasificación basada en los perfiles de bandas correspondientes a los segmentos de genoma viral obtenidos tras un ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante teñido con nitrato de plata, definiéndose de esta manera lo que se ha denominado electroferotipos. Es posible así distinguir 2 grandes grupos de electroferotipos (figura 1): el largo y el corto dependiendo de que los segmentos 10 y 11 migren más o menos en el gel respectivamente. Particularmente en los rotavirus del grupo A los 11 segmentos genómicos migran agrupados en 4 *clusters* o grupos de bandas con la conformación 4-2-3-2.

Los rotavirus del grupo A también se pueden clasificar en: 1) subgrupos I y II en base a anticuerpos monoclonales contra epítopes específicos de subgrupo en la proteína VP6, las cepas que no reaccionan con ningún monoclonal se dicen que son no I, no II; 2) en genotipos NSP4, que se determinan secuenciando parte del segmento 10, identificándose hasta la fecha 6 genotipos, de la A a la F. Las cepas humanas se corresponden a los genotipos A, B, C, con igual distribución.

Los rotavirus no A se diferencian sobre todo mediante el perfil genómico obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida, (PAGE), teñido con nitrato de plata (electroferotipos).

Figura 1. Representación esquemática de una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante teñido con nitrato de plata, mostrando los grupos de bandas correspondientes a cada segmento de genoma para cada uno de los grupos de rotavirus. Se observa la conformación 4:2:3:2 característica de cepas correspondientes a rotavirus del grupo A



CICLO DE REPLICACIÓN

Adsorción- posible receptor

La naturaleza del receptor o receptores celulares para rotavirus aún permanece en investigación. Se sabe que existe un dominio de unión al ácido siálico a nivel de la fracción VP8 y un posible dominio de unión para proteínas de tipo integrinas en la fracción VP5, a nivel de de las espículas VP4. Recientemente se determinó la presencia de dominios de unidad a alpha-beta integrinas a nivel, tanto de VP7 como VP4.

VP5 y VP8 resultan del clivaje de VP4 por proteasas. VP8 tendría la función de acercar al virión al receptor por su interacción con dicho carbohidrato, permitiendo una interacción posterior más íntima entre VP5 y el receptor definitivo.

Penetración

Una vez unido a la célula, el virus se internaliza posiblemente con participación de VP4 y VP7. Se sabe que la exposición de las nuevas partículas a un ambiente rico en proteasas, como el intestino delgado (en especial a la tripsina) incrementa notablemente la infectividad de las mismas, haciéndolas más competentes tanto para la adsorción como para la penetración. VP7 también es modificada en su conformación luego del tratamiento con tripsina, aunque su rol en la penetración aún permanece oscuro.

Una vez dentro de la célula, la partícula no posee VP4 ni VP7, pudiendo perderlas fuera de la célula durante la penetración o dentro de la misma, en un proceso dependiente del pH

citoplasmático.

Se han descrito dos modelos de penetración para rotavirus. Uno de ellos es el modelo de penetración directa o de translocación a través de la bicapa lipídica mediada por VP5, el otro modelo es el de entrada por endocitosis.

Transcripción-replicación

Una vez en el citosol, las partículas sin VP7 ni VP4 comienzan a transcribir los ARN mensajeros virales. Durante la fase temprana (las primeras 3 h) se sintetizan primero los mensajeros que darán lugar a proteínas no estructurales (NSP) fundamentales para el ciclo productivo, como la NSP1 (que especifica el rango de huésped -posiblemente un factor transcripcional-), la NSP2 (helicasa viral -fundamental para el inicio de la transcripción-), la NSP3 (la cual desplaza a la Poli-A *binding protein* de los mensajeros celulares llevándolos a su degradación -permitiendo el secuestro de la maquinaria traduccional del huésped-), la NSP4 (enterotoxina viral), entre otras. Algunas de estas cumplen roles durante la morfogénesis de las nuevas partículas.

Los mensajeros virales emergen hacia el citosol por los canales a través de la cápside de VP2 y VP6. De esto queda claro entonces, que para la emergencia de los mensajeros virales es necesario que se elimine la cápside de VP7, puesto que esta obstruye los canales.

Poco después (o en forma solapada) comienzan a expresarse los mARNs para las proteínas estructurales. A medida que se van sintetizando las proteínas estructurales en el citosol (VP1, VP3, VP2, VP6 y VP4) comienzan a formarse los primeros intermediarios de morfogénesis, los que se van acumulando en inclusiones conocidas con el nombre de viroplasmata. Tanto la NSP2 como otras proteínas no estructurales tales como la NSP5 y NSP6 intervienen en la formación de dichos viroplasmata y por tanto, en el ensamblaje de las nuevas partículas.

Se sabe que la NSP2 es también necesaria para el empaquetamiento de los nuevos segmentos de genoma en las partículas progenie (debido a que se une al ARN viral monocatenario). Posiblemente a altos niveles, la proteína se une a los mARNs virales y los introduce dentro de la subpartícula (actuando como señal de empaquetamiento), propiciando además su replicación (interactuando posiblemente de forma específica con VP1-VP3 y VP2). Entonces, una vez que las moléculas de mARN viral están en el interior de la partícula se asocian con los complejos VP1-VP3, siendo transcriptas, una vez y solo una vez, en cadenas negativas, las cuales permanecen asociadas a su complementaria formando las moléculas de dsARN progenie para cada segmento.

Por otro lado, partículas virales hijas inmaduras con ARN bicatenario transcriben más moléculas de ARN de polaridad positiva las cuales son traducidas en más proteínas, repitiéndose la secuencia de reacciones (multiplicación del ciclo de replicación).

Ensamblaje y emergencia

Las primeras partículas en ensamblarse contienen solo la cápside de VP2 y los complejos VP1-VP3, siendo a nivel de estas donde se incorpora el genoma. Luego se ensambla la cápside de VP6 y se incorpora la VP4. La VP7 es una glucoproteína y como tal se sintetiza a nivel del retículo endoplásmico rugoso (al igual que la NSP4); por lo cual el ensamblaje de las partículas completas requiere de la entrada a dicho organelo. La NSP4 actúa como señal de entrada al RER para las partículas inmaduras, sirviendo como receptor intracelular para la VP6 y como agente nucleador para la incorporación de VP7. Una vez dentro del RER, las partículas adquieren triple envoltura, permaneciendo en el interior de vesículas en donde posiblemente se da la maduración final de VP7 y quizá la exposición temprana de las partículas hijas a proteasas (tripsina), estabilizando y llevando a su conformación nativa apropiada tanto

a VP7 como (y fundamentalmente) a VP4.

Los virus salen de la célula por brotamiento (gemación), a pesar de no ser virus envueltos. Es posible que lo hagan a través de vesículas que emergen del RER. El brotamiento se da exclusivamente a nivel de la superficie apical del enterocito. También se da la emergencia por lisis, cuando se acumulan numerosas partículas a nivel de la célula infectada.

PATOGENIA

Rotavirus infecta enterocitos maduros a nivel del intestino delgado; pero también puede extenderse al íleon distal y colon. Una vez infectado, el enterocito experimenta vacuolización, distensión del retículo endoplásmico y de las mitocondrias, determinando la alteración de la arquitectura de la mucosa, con el consiguiente borramiento de las microvellosidades.

La diarrea posiblemente sea el resultado, sobre todo, de una menor superficie de absorción y de una interrupción del epitelio. Por otro lado, la NSP4 posee actividad enterotoxina y su rol al parecer sería importante al comienzo de la enfermedad. Un producto de clivaje de dicha proteína es liberado desde las células infectadas por un mecanismo independiente del aparato de Golgi, siendo este producto el que ejerce efecto enterotoxina durante fases tempranas de la enfermedad, vía inducción de un aumento en los niveles de calcio intracitoplasmático. Una vez formado el complejo NSP4-receptor se inducen señales que llevan a la activación de una proteína G asociada a este último, la cual activa una fosfolipasa C de membrana. Esta última cliva residuos de fosfatidil inositol desatando la vía del inositol trifosfato. Este segundo mensajero promueve la liberación de calcio desde compartimientos secuestrantes hacia el citosol y la posterior activación y apertura de un canal de cloro específico. Por lo tanto, se da una masiva liberación de Cl⁻ y agua hacia la luz intestinal, dando lugar a la diarrea. La activación de dicho canal de cloro es un evento dependiente de la edad, por lo cual el efecto ejercido por NSP4 se da solamente en individuos jóvenes. Se comprobó también que dicha fracción de NSP4 puede disminuir las uniones intercelulares, destruyéndolas, y producir alteraciones en el citoesqueleto del enterocito.

Aunque la replicación puede darse a toda edad, la aparición de los síntomas de la enfermedad depende de la edad del huésped infectado. La cantidad de receptores para el virus a nivel de los enterocitos en el adulto podría disminuir, siendo quizá esto (al menos en parte) responsable del desarrollo de infecciones asintomáticas. Que los lactantes sean los más propensos a desarrollar la enfermedad puede depender, entre otras cosas, de un nivel reducido de proteasas a nivel del intestino, el cual favorece la infección, de una menor absorción a nivel del colon, de la dieta, de la inmadurez de la respuesta inmune, etc.

EPIDEMIOLOGÍA

Rotavirus es la causa más importante de gastroenteritis aguda en niños pequeños a nivel mundial. La infección por rotavirus es típicamente más común durante el otoño e invierno, son menos frecuentes durante el verano. La diarrea por rotavirus se da generalmente entre los 6 - 24 meses de edad, sin embargo, también puede presentarse en niños mayores. Durante la temprana lactancia, la madre puede transferirle al recién nacido anticuerpos protectores (por lo general del isotipo IgA) a través de la leche y calostro, pero a medida que el niño deja de ser amamantado, aumenta la susceptibilidad.

El adulto suele infectarse pero no se enferma, porque ya posee una respuesta de anticuerpos específicos efectiva ya montada contra todas las variantes posibles de rotavirus, ya sea en forma directa como cruzada, siendo las infecciones de tipo asintomáticas o con síntomas muy leves. La inmunidad natural va lográndose con las sucesivas reinfecciones en la infancia.

Se transmite fundamentalmente vía aguas, alimentos y objetos contaminados con heces; se da también por contacto directo y se ha postulado, aunque en mucho menor grado, que podría darse la transmisión por aerosoles respiratorios.

Las cepas de rotavirus del grupo A son las más importantes desde el punto de vista epidemiológico, asociadas a enfermedad diarreica aguda, tanto en lactantes humanos como en variados animales; siendo responsable de enfermedad esporádica como de brotes epidémicos. Muchas de las infecciones en lactantes terminan en diarrea grave, especialmente cuando se asocian a desnutrición, requiriendo hospitalización.

En Uruguay, conjuntamente con *Escherichia coli* en todas sus variantes patógenas intestinales, rotavirus del grupo A es el agente más frecuentemente asociado a gastroenteritis infantil (aproximadamente el 30 % de los casos). En los últimos años, se vino registrando un aumento de los casos de gastroenteritis por rotavirus y un descenso en aquellos debido a *E. coli* patógeno entérico, lo cual hace suponer que, al igual que en la mayor parte del mundo, rotavirus se ha convertido en el agente de gastroenteritis infantil de mayor prevalencia a nivel local.

Nuevos estudios nacionales han demostrado que rotavirus es responsable del 40% de las diarreas intrahospitalarias en el Hospital Pereira Rossell.

Estudios epidemiológicos demuestran que la cocirculación de diferentes electroferotipos, el predominio de una o pocas variantes durante un determinado período de tiempo y la aparición secuencial de las mismas, son rasgos comunes en estos virus.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los pacientes con infección por rotavirus se presentan con deposiciones líquidas abundantes, que pueden llevar a la deshidratación, vómitos y fiebre leve en la mitad de los casos.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico etiológico de rotavirus se realiza directamente a partir de la materia fecal, fundamentalmente buscando antígenos específicos de grupo A (VP6) mediante técnicas de ELISA directo, siendo una técnica sensible y específica. También es posible extraer el ARN genómico viral directamente de la muestra, y llevar a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con plata, para evidenciar los electroferotipos característicos de cepas de rotavirus del grupo A o de cepas pertenecientes a otros grupos (esta técnica presenta una altísima especificidad siendo su sensibilidad menor, dependiendo de la presencia de un altísimo recuento de viriones en la materia fecal). Suele utilizarse para confirmar los resultados del ELISA directo.

A partir del ARN viral extraído de la muestra es posible llevar a cabo ensayos de RT-PCR multiplex, en los cuales se utilizan varios *primers* anti-serotipos G específicos (PCR múltiple para el gen que codifica para VP7) o anti-múltiples genotipos asociados a los serotipos P más prevalentes (PCR múltiple para el segmento 4). La RT-PCR ha mostrado una alta especificidad y sensibilidad, sirviendo además para estudios de tipo epidemiológico ya que permite identificar a que tipo pertenece un aislamiento dado, sin recurrir a técnicas de secuenciación o de identificación en base a anticuerpos monoclonales de tipo neutralizantes, las cuales son muy costosas.

Para estudios de tipo epidemiológico (seroprevalencia), suelen utilizarse técnicas de tipo serológicas tales como ELISA de captura para Ac de tipo neutralizantes anti VP4 y VP7 presentes en el suero del paciente y estudios de seroconversión; detección de coproanticuerpos (IgM e IgA) mediante ELISA en muestras pareadas de materia fecal; etc.

INMUNIDAD Y VACUNAS

La infección natural repetida por rotavirus protege al huésped contra una subsecuente infección por dicho agente, estando asociada a la producción de anticuerpos antirotavirus séricos y en la mucosa, de tipo IgM, IgG e IgA; esta protección es a largo plazo. Por otro lado, tiene lugar una respuesta de tipo celular mediada fundamentalmente por linfocitos TCD8 citotóxicos, a corto plazo.

La proteína más inmunogénica sería VP6. Anticuerpos dirigidos contra esta proteína generarán protección. También se ha visto que anticuerpos dirigidos contra VP4 y VP7 neutralizan el virus y proveen de protección. Muchas de las respuestas producidas por VP7 son de tipo específica.

Se han propuesto vacunas, las cuales apuntan, no a erradicar la infección, sino a eliminar los síntomas de la diarrea severa en lactantes, y por tanto, el número de niños hospitalizados. Para el desarrollo de vacunas, los datos obtenidos de estudios de epidemiología molecular son de vital importancia para establecer las cepas circulantes de una región dada, y por tanto, los posibles candidatos para ser usados como inmunógenos.

Hasta la fecha existen dos vacunas contra rotavirus, pero con poco éxito relativo:

- La vacuna recombinante humano – rhesus, la cual contiene una cepa de rotavirus simiesca (mono rhesus) específica para el serotipo 3 de VP7, y 3 cepas recombinantes humano – rhesus con 10 genes de la cepa simiesca y un único gen de rotavirus humano que codifica para VP7 específica de los serotipos 1, 2 o 4.
- Esta vacuna indujo una buena respuesta frente a las 4 cepas de rotavirus más importantes en términos clínicos a nivel mundial (80% de efectividad); aunque se asocia a un cuadro febril leve transitorio en un tercio de los vacunados. En una cierta proporción de los lactantes vacunados indujo trastornos intestinales graves (intususcepción) una a dos semanas después a la administración de la primera dosis, por lo que fue retirada del mercado.
- La vacuna tetravalente recombinante humano – bovino fue desarrollada utilizando cepas de rotavirus humano correspondientes a cada uno de los 4 serotipos más prevalentes a nivel mundial (G1 – 4) como donantes del gen que codifica para VP7, y la cepa bovina UK Compton como donante de los 10 genes restantes. Primero se evaluó la eficacia de las cepas recombinantes monovalentes por separado y luego del preparado tetravalente, demostrándose que resultaban seguros y capaces de inducir una buena respuesta inmune en niños menores de 6 meses (80%). Las reacciones febriles fueron menos frecuentes durante la fase de ensayos con voluntarios. Aún no se encuentra disponible.

La inmunidad completa en niños requiere de múltiples dosis vacunales en el transcurso del tiempo (o múltiples reinfecciones naturales).

Otros virus entéricos

Si bien rotavirus es el agente de gastroenteritis viral más difundido en el mundo entero, existen varias familias de virus asociadas a este cuadro. Se han identificado como agentes importantes de enfermedad diarreica tanto en niños pequeños como en adultos, en pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos (sobre todo HIV-positivos), asociados a brotes por ingesta de alimentos y agua contaminada, pueden causar infecciones en la comunidad o en el hospital, o presentarse como casos esporádicos. Entre estos, podemos destacar a las familias *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae* y *Picobimaviridae* (*Picotrimeriviridae*).

Algunas de estas familias se caracterizan sobre todo, por incluir variantes con tropismo

por otros tejidos o que afectan en forma preferencial otras superficies mucosas, no siendo patógenos estrictos del tracto gastrointestinal. Tal es el ejemplo de *Adenoviridae* (agentes de procesos respiratorios) y *Caliciviridae* (virus de la hepatitis E). Hasta el momento, los aislamientos humanos pertenecientes a las familias *Astroviridae* y *Picobirnaviridae* se han asociado enteramente a casos de gastroenteritis bajo diferente contexto. A pesar de no ser catalogado como agente de gastroenteritis, se ha postulado que en pacientes HIV-positivos en estadio SIDA, el propio virus de inmunodeficiencia humana podría infectar al enterocito produciendo un cuadro de diarrea, sin que este sea el sitio blanco definitivo de infección.

Los miembros de la familia *Picornaviridae*, subfamilia *Enterovirinae* (virus de la polio, Echovirus, Coxsackie), el virus de la Hepatitis A, entre otros que utilizan la ruta de transmisión fecal-oral, tienen como sitio primario de infección la mucosa gastrointestinal, sin estar implicados como agentes de gastroenteritis.

En esta sección nos dedicaremos exclusivamente a las familias *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae* y *Picobirnaviridae*, las otras familias o agentes virales serán analizados en sus correspondientes capítulos.

ADENOVIRUS ENTÉRICOS

Morfología y estructura

Los adenovirus entéricos, al igual que las variantes asociadas de forma exclusiva a infecciones del tracto respiratorio, pertenecen al género *Mastadenovirus*. Son virus no envueltos de simetría icosaédrica, miden aproximadamente 70-90 nm. Los 252 capsómeros (unidades estructurales de la partícula) que forman la cápside se organizan en 240 hexámeros y 12 pentámeros, en las caras y vértices del icosaedro, respectivamente. Se caracterizan sobre todo por presentar en cada uno de sus 12 vértices (pentámeros) un apéndice proteico con forma de antena, al cual se le denomina fibra fusógena o fibra del pentón, de utilidad durante la adsorción de la partícula a sus receptores específicos a nivel de la membrana plasmática de la célula permisiva. Por otro lado, la fibra y la base del pentón intervienen en la liberación de la partícula viral desde el endosoma al citosol y en el desensamblaje.

Presentan un genoma de ADN doble hebra, lineal con un tamaño que oscila entre 33 – 45 Kb. Se replican en el núcleo de la célula infectada, utilizando la ARN-polimerasa II celular para transcribir sus genes. Los genes virales se organizan en cinco unidades transcripcionales, de las cuales cuatro se corresponden a los genes de la fase muy temprana y temprana (E1-AB, E-2, E-3 y E-4), la quinta unidad comprende a los genes tardíos (E-5). Cada unidad presenta un conjunto de genes y su propio conjunto de promotores y secuencias líderes, pudiendo ser transcrita en uno o varios transcritos, los que a su vez, son procesados en las diferentes especies de mRNA por mecanismos de *splicing* alternativo. Por otro lado, los mensajeros individualmente pueden codificar distintas proteínas a partir de marcos de lectura superpuestos, codones de iniciación alternativos, etc.

Sintetizan su propia ADN-polimerasa y una proteína terminal (PT) de unión al extremo 3' de cada hebra del ADN viral, la cual une una molécula de dCTP, actuando como cebador (*primer*) para la replicación (ambos, junto a la proteína de 72 KDa intensamente fosforilada, productos de la unidad E-2).

La regulación de la expresión de las diversas unidades transcripcionales se da por un efecto combinatorio en cascada de varios de los productos de los genes muy tempranos y tempranos (productos de los genes E1A y E1B; E-2; E-3 y E-4), la mayoría, son fosfoproteínas activadoras en *trans* de la transcripción de los genes virales, en colaboración con factores transcripcionales celulares. Algunas de estas también se encargan de promover la replicación

viral y en ciertos casos, la activación de replicones en la célula huésped, siendo efectoras de transformación celular.

Algunas proteínas codificadas en las unidades E-3 y E-4 se encargan de interferir con los mecanismos de defensa del huésped (bloqueo de la presentación de antígenos virales bajo la forma de péptidos en el contexto de moléculas de HLA-1, inhibición de la lisis inducida por el factor de necrosis tumoral alfa - TNF- α -, etc.) y del secuestro de la maquinaria biosintética de la célula, entre otras funciones.

Clasificación

Las cepas de adenovirus pueden clasificarse en seis subgéneros (A – F) en base a diferencias en la capacidad hemaglutinante, propiedades oncogénicas, al tipo y tamaño de las proteínas estructurales (SDS-PAGE y Western blot) y al grado de homología a nivel de la secuencia de nucleótidos en el ADN genómico (perfiles de digestión con enzimas de restricción; RFLP; etc).

Mediante ensayos de neutralización, se sabe de la existencia de unos 47 serotipos distintos de adenovirus asociados a enfermedad en humanos. El término adenovirus entéricos se refiere sobre todo a las cepas pertenecientes a los serotipos 40 y 41 en el subgénero F. También, aunque en menor número, pueden darse aislamientos asociados a enterocolitis pertenecientes al subgénero A, de los serotipos 12, 18 y 31. Los serotipos 40 y 41 del subgénero F son causa importante de gastroenteritis a nivel mundial sobre todo en niños, aunque también se dan brotes que involucran individuos adultos inmunocompetentes.

Patogenia

Existe muy poca información acerca de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en las infecciones por adenovirus entéricos. De algunos estudios *in vitro* e *in vivo* se vio que dichas cepas del virus tenían predilección por células epiteliales con microvellosidades, concentrándose a nivel de las mismas, produciendo una alteración en el borde en cepillo. Sin embargo, aun no se conoce cómo la infección afecta decididamente la función intestinal.

El período de incubación es de 3 a 10 días. La diarrea no se acompaña de deshidratación ni de fiebre alta aunque, a diferencia de rotavirus, suele ser de mayor duración. En promedio, los síntomas se extienden por 6 a 9 días, existiendo un rango de duración que oscila entre los 4 a los 23 días. Muchas veces, la fiebre y los vómitos preceden o acompañan a la diarrea.

Epidemiología

El 2 a 22% de las diarreas virales en todo el mundo son causadas por adenovirus, aunque esta cifra puede ser subestimada debido a inadecuados métodos de estudio. No presenta un patrón estacional de aparición como rotavirus. Infecta más frecuentemente a niños de entre tres o cuatro años, y menos frecuentemente a adultos. Se transmite por vía fecal-oral.

Diagnóstico

La microscopía electrónica fue el método de detección inicial pero actualmente se dispone de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) comerciales, a los cuales se les ha incorporado anticuerpos monoclonales, presentando una buena sensibilidad. También se dispone de técnicas de hibridación pero tienen una muy baja sensibilidad. El análisis del ADN con enzimas de restricción es el método utilizado para clasificar las distintas cepas aisladas.

ASTROVIRUS

Los miembros de la familia *Astroviridae* se identificaron por primera vez en 1975 a través de microfotografías electrónicas de muestras procesadas de materia fecal provenientes de niños con diarrea aguda.

Los astrovirus han sido clasificados en ocho serotipos (HAstV-1 a HAstV-8) de acuerdo a diferencias en los epítopes presentes a nivel de la proteína de la cápside. La serotipificación se basa sobre todo en inmunofluorescencia directa (IF) sobre cultivo de células infectadas, utilizando antisueros de referencia hechos en conejo contra los distintos serotipos. Estos grupos antigénicos se correlacionan perfectamente con 8 genotipos diferentes, los cuales se determinan secuenciando una región de 348 pb a nivel de la secuencia nucleotídica del ORF-2. La mayoría de los estudios llevados a cabo en el mundo indican que el serotipo mayoritariamente implicado a casos de gastroenteritis es el HAstV-1. Por otro lado, HAstV-6/7/8 se aíslan rara vez.

Morfología y estructura

Astrovirus es un virus desnudo de simetría icosaédrica, mide 28-30 nm de diámetro, cuya cápside al microscopio electrónico recuerda a una estrella de 5 o 6 puntas (por ello el nombre de astrovirus). Poseen un genoma de ARN monocatenario lineal, de polaridad positiva, de aproximadamente 6,8 Kb.

El genoma está constituido por una región no codificante en el extremo 5' (UTR-5' o NCR-5'); 3 marcos de lectura abiertos (ORFs), ORF-1a y ORF-1b, codifican proteínas no estructurales (una proteasa viral y una ARN-polimerasa ARN dependiente) y ORF-2 codifica proteínas precursoras de la cápside y finalmente, una región UTR-3' corta (por lo general de 8 nucleótidos), seguida de una cola poli-A de aproximadamente 30 nucleótidos. La porción C-terminal de la proteína de la cápside presenta mayor variabilidad de secuencia que la N-terminal. Esta variabilidad es la que define los distintos genotipos asociados a los virus aislados hasta el momento.

Recientemente, se ha detectado en el citoplasma de células infectadas por astrovirus la presencia de un ARN subgenómico que contendría solo a ORF-2; lo cual implicaría algún tipo de procesamiento postranscripcional o la síntesis de ARNs menores durante la replicación del genoma viral, como mecanismo de amplificación de la síntesis de la proteína de la cápside.

Ciclo de replicación

Como para otras familias de virus ARN monocatenario (por ej. *Picomaviridae*) de polaridad positiva, el virus se adsorbe a receptores específicos en la superficie celular por medio de un dominio de unión en la proteína de la cápside, siendo luego transportado al citoplasma donde sufre un proceso de decapsidación liberando el genoma al citosol. Una vez allí, el genoma procede inmediatamente al secuestro de la maquinaria de traducción celular, sintetizándose una gran poliproteína viral (aproximadamente 2250 aminoácidos) conteniendo a la proteasa, la ARN-polimerasa y al precursor de la cápside. Ésta primero es autoprocesada dando como producto a la proteasa viral en su forma nativa, la cual culmina el procesamiento de las restantes proteínas virales. Una vez sintetizada la ARN-polimerasa viral, el genoma parental puede empezar a replicarse, sucediendo este proceso en el citoplasma. El ensamblaje de las nuevas partículas, la maduración de las proteínas virales y la replicación son procesos que ocurren casi simultáneamente. Existe todo un conjunto de intermediarios de morfogénesis conformado por partículas inmaduras en distintos estadios. Posiblemente, el genoma sea

incorporado dentro de la partícula a nivel de algunos de dichos intermediarios. La salida del virus se realiza por lisis celular.

Patogenia

Astrovirus ha sido detectado en la superficie epitelial del intestino delgado y en macrófagos de la lámina propia. En animales, astrovirus produce la vacuolización, seguida de la degeneración y posterior muerte de la célula, lo que determina la atrofia vellositaria.

Epidemiología

Las variantes humanas astrovirus conocidas hasta el momento, son patógenas exclusivas del tracto gastrointestinal, siendo agentes importantes de enfermedad diarreica en el mundo entero, sobre todo en niños y ancianos (aunque también puede darse en otros grupos etáreos). También se han asociado de manera importante con diarrea en el paciente HIV-positivo o con otros factores responsables de inmuno compromiso.

Algunos estudios lo colocan como el primer agente etiológico de gastroenteritis en pacientes HIV-positivos, por encima de los agentes bacterianos implicados; siendo sí, el primer agente viral asociado a casos de diarrea en este grupo (por encima de calicivirus y adenovirus del grupo F, serotipo 40 y 41).

Los brotes de diarrea por astrovirus son bastante frecuentes, pudiendo ocurrir tanto en comunidad como en el hospital. La incidencia de la diarrea por astrovirus en niños a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, es del orden del 2 al 9 %; aunque algunos estudios reportan una prevalencia superior al 26%.

La transmisión en niños es usualmente de persona a persona. En base a estudios de seroprevalencia en diferentes comunidades del mundo se ha visto que la mayoría de los niños generan respuestas de anticuerpos contra las diversas variantes de astrovirus durante el primer año de vida. Por lo que se ha reformulado la importancia de tales virus como agentes de enfermedad diarreica, siendo en muchos casos considerados como la segunda causa más común de gastroenteritis viral en niños (luego de rotavirus).

Manifestaciones clínicas

El período de incubación es de uno a cuatro días después de la exposición, la enfermedad se manifiesta aproximadamente al cuarto día causando deposiciones líquidas, vómitos, distensión abdominal y deshidratación, la severidad de la enfermedad es menor que rotavirus. Hay un aumento de la incidencia en el invierno.

Diagnóstico

El diagnóstico y los estudios de tipo epidemiológico se basaban fundamentalmente en microscopía electrónica de las muestras (debido a la forma peculiar del virión y al alto recuento alcanzado en heces) o técnicas inmunoenzimáticas (ELISA directo).

En los últimos años, se ha desarrollado e incrementado el uso de la reacción en cadena de la polimerasa con previa retrotranscripción (RT-PCR), lo cual ha incrementado el número de casos positivos para astrovirus debido a una mayor sensibilidad respecto a las técnicas anteriormente mencionadas, las cuales dependían de un alto título de viriones en materia fecal. Por otro lado, la RT-PCR para regiones dentro de los marcos de lectura ORF1a, ORF1b y ORF2 permite genotipificar los aislamientos y analizarlos del punto de vista filogenético (tras la secuenciación).

PICOBIRNAVIRUS

Son virus relativamente pequeños, miden aproximadamente 35 nm de diámetro, desnudos, presentan una cápside de simetría icosaédrica cuya superficie podría ser característica exclusiva de tales virus, a juzgar por el método de montaje de microfotografías electrónicas en frío. Presentan un genoma de ARN bicatenario (dsARN), doblemente segmentado, cada segmento presenta un tamaño diferente, según los diferentes aislamientos. De forma menos común, se han obtenido aislamientos trisegmentados, conteniendo un fragmento adicional de dsARN con un tamaño promedio de 2,92 kb. A estos se los ha denominado *Picotrimavirus*, aunque presentan mucha similitud, no solo estructural y genética, sino también en su ciclo de vida, rango de huéspedes y procesos asociados con los picobirnavirus.

Fueron descritos por primera vez en 1988, al ser descubiertos por accidente en ensayos de electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con plata de extractos de ARN viral obtenidos a partir de muestras de materia fecal proveniente de pacientes (niños) con clara sospecha de infección por rotavirus. Junto al perfil de bandas característico de estos últimos, se evidenciaron bandas adicionales de tamaño semejante al reportado, lo cual hizo sospechar de inmediato en la presencia de un nuevo tipo de virus. Más adelante, a partir de muy pocos casos, pudo evidenciarse ambas bandas en PAGE solas, lo cual, junto a la microscopía electrónica permitió poner en evidencia al nuevo tipo de virus entérico.

El rol de los picobirnavirus en la generación de los síntomas que hacen a una gastroenteritis en seres humanos aún no queda bien establecido. La frecuencia de detección de tales virus en materia fecal de individuos con diarrea ha mostrado cierta variabilidad para diferentes investigaciones llevadas a cabo en diferentes sitios a nivel mundial. Lo coincidente es que se han encontrado en proporciones bastante similares en pacientes sintomáticos como asintomáticos.

Lo más característico de picobirnavirus del punto de vista epidemiológico es su mayor asociación a casos de gastroenteritis en pacientes portadores del virus de inmunodeficiencia humana (HIV-positivos). En muchos casos, asociado a diarreas de tipo persistente o crónicas, caracterizadas por la presencia del virus en excretas hasta 45 días de iniciados los síntomas. Se han detectado en aproximadamente el 9 % de los casos de gastroenteritis en pacientes HIV-positivos (sobre todo en el estadio SIDA), así como en el 2 % de los pacientes asintomáticos, portadores del virus HIV. Por lo tanto, son el segundo agente viral de gastroenteritis más frecuente en pacientes HIV-positivos después de astrovirus, a nivel mundial.

Todos estos estudios se basan en los resultados obtenidos mediante la búsqueda de dsARN viral en muestras de materia fecal por PAGE y tinción con nitrato de plata (con protocolos de extracción adecuados), o por microscopía electrónica directa; ambos métodos de baja sensibilidad, los cuales dependen de un alto recuento de partículas virales en la muestra. Por otro lado, se sabe que muchas veces la infección transcurre con bajos títulos de partículas en materia fecal o que no en todo momento son secretadas altas cantidades del virus. Esto, junto a lo citado anteriormente, puede llevar a subestimar la verdadera incidencia de la diarrea por picobirnavirus.

Recientemente se han propuesto ensayos de RT-PCR específicos para picobirnavirus utilizando como molde el dsARN extraído de la muestra de materia fecal, los cuales pretenden solucionar los problemas de sensibilidad.

CALICIVIRUS

Los calicivirus humanos son la causa más común de brotes de diarrea de origen no bacteriano en adultos y en niños mayores en todo el mundo. Se estima que son responsables de

aproximadamente el 95 % de los brotes de gastroenteritis viral (por lo general, acompañada de vómitos) en dichos grupos etarios, sobre todo en Estados Unidos. Se conoce poco de su frecuencia en casos de diarrea de tipo aguda en niños, aunque se estima que la incidencia sería tan solo inferior a la de los casos de gastroenteritis por rotavirus.

Morfología y estructura

Los calicivirus son virus pequeños, miden 30-35 nm de diámetro, desnudos, vistos al microscopio electrónico presentan una morfología típica en forma de cáliz o “estrella de David”. Su genoma está constituido por una única cadena de ARN, de polaridad positiva.

Clasificación

Existen cinco grupos o géneros de calicivirus basados en homología de secuencia y organización del genoma. Cuatro de estos cinco grupos son patógenos humanos: los virus del tipo Sapporo, los virus circulares pequeños tipo Norwalk, los calicivirus marinos y el virus de la hepatitis tipo-E (HEV). Siendo los tres primeros agentes de gastroenteritis en humanos. El virus de la hepatitis-E, si bien se transmite por vía fecal-oral, no tiene como órgano blanco definitivo al intestino sino al hígado, siendo agentes de hepatitis aguda autolimitada sin mayor riesgo, aunque (por razones aún no muy claras) suele ser fatal para el 25% de las mujeres embarazadas infectadas, sobre todo en países subdesarrollados.

Los virus de tipo Norwalk (NLVs) muestran una considerable diversidad genética, pudiendo ser clasificados del punto de vista filogenético en dos grandes genogrupos: el genogrupo I incluye al virus Norwalk propiamente dicho, mientras que el genogrupo II incluye variantes como el virus de Lordsdale y el virus de las Montañas Nevadas.

En base a estudios de homología y organización del genoma, se vio que los virus tipo Sapporo (SLVs) se encuentran más relacionados a los calicivirus marinos que a otros grupos de calicivirus causantes de diarrea en humanos.

Patogenia

Hay poca información sobre la patogenia de calicivirus, se ha visto que la mucosa del intestino delgado proximal se encuentra inflamada, las células absortivas son anormales, las vellosidades están disminuidas, hay hipertrofia de las criptas además de un incremento de las células epiteliales. La mucosa gástrica y colónica es normal.

Epidemiología

Los virus similares al Norwalk y los calicivirus marinos son los mayoritariamente asociados a brotes como a casos esporádicos de gastroenteritis en adultos. Los SLVs se asocian tan solo a pocos casos comunitarios de gastroenteritis infantil.

El cultivo en líneas celulares *in vitro* de estos virus indica que han estado emergiendo periódicamente desde fuentes oceánicas desde hace por lo menos 65 años. Por lo tanto, resulta frecuente que los brotes de gastroenteritis asociada a calicivirus humanos, en especial a las cepas de calicivirus marinos, se deban al consumo de mariscos u otros productos del mar con mala preparación. Se ha propuesto un reservorio oceánico para tal familia de virus. En el océano los virus son expuestos a un rango amplio de animales, en donde se multiplican y surgen nuevas variantes por ciclo replicativo; algunas de ellas capaces de infectar y causar enfermedad en el hombre. Por esto mismo, las enfermedades por calicivirus son casi imposibles de contener o erradicar. Se ha visto que algunas variantes de calicivirus pueden permanecer viables por más de 14 días a 15 °C, en el agua de mar.

El mecanismo de transmisión es fecal-oral y son más comunes las infecciones en el invierno.

Manifestaciones clínicas

Produce diarrea aguda y presenta deposiciones líquidas, vómitos, náuseas, cólicos y fiebre. La infección se resuelve en general espontáneamente a las 24-48 horas.

Diagnóstico

Como estos agentes no han podido ser cultivados *in vitro* ni se dispone de modelos animales para su estudio, su diagnóstico depende de métodos directos de visualización (microscopía electrónica), de técnicas inmunológicas (ELISA) y de la amplificación genómica. La microscopía electrónica fue el método usado originalmente para identificar estos virus. Su sensibilidad es baja para los calicivirus debido a que estos se excretan en bajas concentraciones en las heces.

RT-PCR, actualmente es el método diagnóstico más sensible utilizado tanto para el diagnóstico como para estudios epidemiológicos. Se utiliza para detectar la presencia del virus en el medio ambiente, incluyendo agua y comida contaminada.

Bibliografía

- Max Ciarlet, Juan E. Ludert, Miren Iturriza-Gómara, Ferdinando Liprandi, James J. Gray, Ulrich Desselberger, and Mary K. Estes. Initial Interaction of Rotavirus Strains with N-Acetylneuraminic (Sialic) Acid Residues on the Cell Surface Correlates with VP4 Genotype, Not Species of Origin. *J. Virol.*, Apr 2002; 76: 4087 - 4095.
- Max Ciarlet, Sue E. Crawford, Elly Cheng, Sarah E. Blutt, Daren A. Rice, Jeffrey M. Bergelson, and Mary K. Estes. VLA-2 (2B1) Integrin Promotes Rotavirus Entry into Cells but Is Not Necessary for Rotavirus Attachment. *J. Virol.*, Feb 2002; 76: 1109 - 1123.
- Max Ciarlet, Sue E. Crawford, and Mary K. Estes. Differential Infection of Polarized Epithelial Cell Lines by Sialic Acid-Dependent and Sialic Acid-Independent Rotavirus Strains. *J. Virol.*, Dec 2001; 75: 11834 - 11850.
- M Ciarlet and MK Estes. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.*, Apr 1999; 80: 943 - 948.
- D. I. Bernstein, R. I. Glass, G. Rodgers, B. L. Davidson, and D. A. Sack. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *JAMA*, Apr 1995; 273: 1191 - 1196.
- DI Ginn, RL Ward, VV Hamparian, and JH Hughes. Inhibition of rotavirus *in vitro* transcription by optimal concentrations of monoclonal antibodies specific for rotavirus VP6. *J. Gen. Virol.*, Nov 1992; 73: 3017 - 3022.
- María C. Jaimes, Olga Lucía Rojas, Ana María González, Isabela Cajiao, Annie Charpilienne, Pierre Pothier, Evelyn Kohli, Harry B. Greenberg, Manuel A. Franco, and Juana Angel. Frequencies of Virus-Specific CD4+ and CD8+ T Lymphocytes Secreting Gamma Interferon after Acute Natural Rotavirus Infection in Children and Adults. *J. Virol.*, May 2002; 76: 4741 - 4749.
- Mingdong Zhang, Carl Q.-Y. Zeng, Andrew P. Morris, and Mary K. Estes. A Functional NSP4 Enterotoxin Peptide Secreted from Rotavirus-Infected Cells. *J. Virol.*, Dec 2000; 74: 11663 - 11670.
- Yanjie Dong, Carl Q.-Y. Zeng, Judith M. Ball, Mary K. Estes, and Andrew P. Morris. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *PNAS*, Apr 1997; 94: 3960 - 3965.

- D. M. Bass and Shiqiang Qiu. Proteolytic Processing of the Astrovirus Capsid. *J. Virol.*, Feb 2000; 74: 1810 - 1814.
- Matthew D. Koci, Lindsey A. Moser, Laura A. Kelley, Diane Larsen, Corrie C. Brown, and Stacey Schultz-Cherry. Astrovirus Induces Diarrhea in the Absence of Inflammation and Cell Death. *J. Virol.*, Nov 2003; 77: 11798 - 11808.
- Aldo Gaggero, Miguel O'Ryan, Jacqueline S. Noel, Roger I. Glass, Stephan S. Monroe, Nora Mamani, Valeria Prado, and Luis F. Avendaño. Prevalence of Astrovirus Infection among Chilean Children with Acute Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, Dec 1998; 36: 3691 - 3693.
- Mikael Nilsson, Kjell-Olof Hedlund, Margareta Thorhagen, Göran Larson, Kari Johansen, Anders Ekspång, and Lennart Svensson. Evolution of Human Calicivirus RNA In Vivo: Accumulation of Mutations in the Protruding P2 Domain of the Capsid Leads to Structural Changes and Possibly a New Phenotype. *J. Virol.*, Dec 2003; 77: 13117 - 13124.
- E. Roman, A. Negredo, R. M. Dalton, I. Wilhelmi, and A. Sánchez-Fauquier. Molecular Detection of Human Calicivirus among Spanish Children with Acute Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, Oct 2002; 40: 3857 - 3859.
- Murray, P.; Kobayashi, G. S.; Pfaller, M. A.; Rosenthal, K. *Microbiología Médica*, 2ª Edición; Edit. Harcourt Brace, Madrid 1997.
- Fields, B.N.; Knipe, D.M. *Virology*. 2nd. Edition. Raven Press, S. Francisco, 1990.

