

# Caracterización molecular de calicivirus aislados de brotes de gastroenteritis ocurridos en la Argentina durante los años 2005 y 2006

K. A. GOMES<sup>1\*</sup>, J. A. STUPKA<sup>1</sup>, A. DIANA<sup>2</sup>, G. I. PARRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Gastroenteritis Virales, Departamento de Virología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Ciudad Autónoma de Buenos Aires; <sup>2</sup>Área de Epidemiología de la Región Sanitaria II, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; <sup>3</sup>Lerner Research Institute, The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, USA.

\*Correspondencia. E-mail: kgomes@anlis.gov.ar

## RESUMEN

Con el objetivo de determinar la incidencia de calicivirus, rotavirus y astrovirus en brotes de gastroenteritis ocurridos en diversas regiones de la Argentina durante los años 2005 y 2006, se analizaron muestras de materia fecal provenientes de 7 brotes con resultado de coprocultivo negativo. Para el diagnóstico de rotavirus se utilizó un ELISA comercial, mientras que para el diagnóstico de calicivirus y astrovirus se utilizó el método de RT-PCR. De las 74 muestras analizadas, 20 fueron positivas para calicivirus, 17 para rotavirus y una para astrovirus. No se identificaron infecciones virales mixtas. En 5 muestras positivas para calicivirus se secuenció una región del gen de la polimerasa; 4 de ellas correspondieron al género *Norovirus* y una al género *Sapovirus*. El análisis filogenético de las muestras secuenciadas determinó la presencia de norovirus de los genogrupos GI y GII; dentro de este último, se identificaron los genotipos GII-4, GII-b y GII-17. El análisis de la muestra en la cual se identificó sapovirus reveló la presencia del genotipo GI-1. Este estudio representa una continuación del análisis epidemiológico molecular de calicivirus asociados a brotes de gastroenteritis iniciado en 2004 y constituye la primera comunicación de la circulación de norovirus del genotipo GII-17 en la Argentina.

**Palabras clave:** calicivirus, norovirus, caracterización molecular

## ABSTRACT

**Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis occurring in Argentina during 2005 and 2006.** In order to determine the incidence of calicivirus, rotavirus and astrovirus in outbreaks of gastroenteritis occurring in different regions of Argentina during 2005 and 2006, fecal samples from seven nonbacterial outbreaks were analyzed. A commercial ELISA was used for rotavirus detection, while RT-PCRs were used for calicivirus and astrovirus. Of the 74 samples analyzed, 20 were calicivirus positive, 17 were rotavirus positive and one was astrovirus positive. No mixed infections were detected. A partial region of the RdRp gene was sequenced in five calicivirus positive-samples; 4 of them belonged to *Norovirus* genus and one to *Sapovirus* genus. The phylogenetic analysis of norovirus-positive-samples revealed the presence of strains from genogroups GI and GII; genotypes GII-4, GII-b and GII-17 were identified within the latter. Phylogenetic the sapovirus-positive-sample revealed the presence of genotype GI-1. This study represents a follow-up of the of molecular epidemiology analysis of calicivirus associated to gastroenteritis outbreaks that have been carried out by our group since 2004, and constitutes the first report of the circulation of genotype GII-17 in Argentina.

**Key words:** calicivirus, norovirus, molecular characterization

## INTRODUCCIÓN

Los géneros *Norovirus* (NV) y *Sapovirus* (SV) pertenecen a la familia *Caliciviridae*; y se los suele llamar con el nombre general de "calicivirus" (21, 25).

Son virus pequeños, no envueltos, con un genoma ARN de simple cadena positivo cuyo tamaño es de 7,5 kb. Este se encuentra dividido en tres marcos de lectura u ORF (*open reading frames*). El ORF 1 codifica para una poliproteína no estructural que contiene una región para la ARN polimerasa ARN dependiente (RpRd); el ORF 2 codifica para la cápside viral y el ORF 3 para una pro-

teína básica menor asociada con la estabilidad de la cápside (3, 30).

En base a estudios de diversidad genética, se han descrito siete genogrupos para NV y seis para SV; de los cuales cinco (GI, GII, GIV, GVI y GVII) y cuatro (GI, GII, GIV y GV), respectivamente, son los que infectan al hombre (9, 40, 41).

Debido a su variabilidad genética y a que no producen inmunidad a largo plazo, un individuo puede sufrir varias infecciones por calicivirus durante su vida, sobre todo por NV. Así, estos últimos afectan a personas de cualquier edad y causan principalmente brotes de

gastroenteritis, mientras que los SV suelen estar asociados a gastroenteritis esporádicas en niños menores de 5 años (13, 15, 25).

Los brotes de gastroenteritis asociados a NV ocurren por lo general en comunidades cerradas (hoteles y cruceros, escuelas, geriátricos, bases militares, entre otros). Su sintomatología está caracterizada por la presencia de vómitos abundantes y explosivos, diarrea acuosa y cólicos abdominales. La vía de transmisión es a través del consumo de alimentos o agua contaminados (transmisión primaria) y por medio del contacto persona a persona o fomites (transmisión secundaria)(11).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son cada vez más comunes en el mundo entero. Tradicionalmente, las ETA se han atribuido a patógenos bacterianos; sin embargo, el avance en los métodos de diagnóstico basados en la biología molecular permitió asociar a los calicivirus, sobre todo al género NV, a este tipo de infecciones (8, 15, 28).

En la Argentina, la información acerca de la incidencia de agentes virales como productores de ETA es escasa. Hasta lo que conocemos, sólo un trabajo realizado por nuestro grupo ha comunicado la incidencia de calicivirus en brotes de gastroenteritis ocurridos en nuestro país (19).

El objetivo del presente trabajo es el estudio de los agentes etiológicos de origen viral en brotes de gastroenteritis ocurridos en la Argentina durante los años 2005 y 2006, como así también el análisis molecular de las cepas de calicivirus aisladas, a modo de continuación del trabajo antes mencionado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción epidemiológica de los brotes

Brote en Carlos Pellegrini, provincia de Buenos Aires: en abril de 2005 se comunicó un aumento de casos de diarreas en el período comprendido entre la semana epidemiológica 13 y la semana 24 de dicho año, con una tasa de ataque en menores de 15 años de 85 casos/1000 habitantes. Los casos presentaron, en su mayoría, diarrea acuosa, vómitos y fiebre, con un período de incubación de 24-48 h. El total de muestras de materia fecal analizadas en nuestro laboratorio fue de 12 (Tabla 1).

Brote en Carlos Casares, provincia de Buenos Aires: en mayo de 2005 se informó un aumento de casos de diarreas en el período comprendido entre la semana epidemiológica 14 y la semana 26 de dicho año, con un ascenso que llegó a los 83 casos en la semana epidemiológica 19. Hasta la semana 26, la tasa de ataque en menores de 15 años fue de 122 casos/1000 habitantes. En el mapeo de casos para este brote, no se ubican agrupamientos con posibles focos, sino que los casos se distribuyen tanto en el área urbana como en localidades rurales del partido. Nueve muestras de materia fecal fueron enviadas a nuestro laboratorio para su análisis (Tabla 1).

En ninguno de estos brotes ha sido posible identificar un origen físico particular, sino que se detectaron por el aumento de casos notificados, que superaron al previsto por el corredor endémico (14).

Brote en San Luis (capital), provincia de San Luis: aconteció durante mayo de 2005, no se conoce el número total de individuos afectados. La mayoría correspondió a menores de un año.

La duración de la enfermedad fue entre 5 y 7 días, con un período de incubación promedio de 48 h. No se conocen otros datos epidemiológicos de este brote. Para su análisis, 10 muestras de materia fecal fueron enviadas a nuestro laboratorio (Tabla 1).

Brote en Florentino Ameghino, provincia de Buenos Aires: ocurrió durante mayo de 2005. La edad de estos pacientes osciló entre 1 año y 50 años. No se conocen otros datos epidemiológicos de este brote. Seis muestras de materia fecal fueron enviadas a nuestro laboratorio para su análisis (Tabla 1).

Brote en Villa Mercedes, provincia de San Luis: aconteció durante setiembre de 2005, tuvo como escenario principal una escuela de enseñanza primaria. Del total de afectados, el 60% correspondió a niños de entre 5 y 12 años, el 30% a adolescentes y el 10% a adultos, estos últimos representados por maestras. Doce muestras de materia fecal fueron enviadas a nuestro laboratorio para su análisis (Tabla 1).

Brote en Ushuaia, provincia de Tierra del Fuego: ocurrió durante mayo de 2006. Este brote afectó a niños, adolescentes y adultos. No se conocen otros datos epidemiológicos. Para su análisis, 19 muestras de materia fecal fueron enviadas a nuestro laboratorio (Tabla 1).

Brote en Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires: ocurrió durante noviembre de 2006, en un geriátrico, donde el 80% (16/20) de la población geronte resultó afectada. El principal síntoma fue la aparición de vómitos, seguidos de diarrea acuosa sin fiebre. Se desconoce la fuente de la infección. Seis muestras de materia fecal fueron enviadas a nuestro laboratorio para su análisis (Tabla 1).

### Muestras

En total se analizaron 74 muestras de materia fecal provenientes de los 7 brotes descritos (Tabla 1). Todas las muestras fueron remitidas con resultado negativo para patógenos bacterianos.

### Detección de rotavirus

La búsqueda de rotavirus se realizó por un ensayo inmunoenzimático comercial (Pathfinder Rotavirus-BioRad) (24, 34), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### Detección de calicivirus y astrovirus

La presencia de calicivirus y astrovirus se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa, previa retrotranscripción (RT-PCR), como se describe a continuación:

### Extracción de ARN

De cada muestra de materia fecal se realizó una suspensión 10% v/v utilizando buffer TNC 1X (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2mM, pH 7,5); estas se conservaron a -80 °C para su posterior análisis. El ARN se extrajo utilizando el método de sílica descrito por Boom *et al.* (7).

### Detección molecular de virus

Calicivirus: debido a la alta variabilidad que presentan estos virus, los ARN extraídos fueron ensayados por más de una RT-PCR independiente utilizando los siguientes iniciadores: 289/290, 289hi/290hijk, JV12/JV13 y SR33/SR46/SR48/SR50/SR52; estos últimos permiten diferenciar los genogrupos GI y GII de NV. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo siguiendo las condiciones descritas previamente (2, 23, 39, 41).

Astrovirus: la búsqueda de astrovirus se realizó por RT-PCR usando los iniciadores MON340/MON348 (4).

Todas las técnicas de RT-PCR se llevaron a cabo utilizando la MMLV retrotranscriptasa y la Taq ADN polimerasa de Invitrogen, Inc. (Carlsbad, CA, USA). El termociclado se realizó en el ciclador Personal de Biometra (Gottingen, Alemania) y los amplicones obtenidos se analizaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa con etidobromuro.

**Tabla 1.** Virus identificados en siete brotes de gastroenteritis ocurridos en la Argentina durante los años 2005 y 2006.

Ciudad, Provincia	Fecha	Nº Positivas/ total de muestras	Calicivirus		Rotavirus/ total positivas	Astrovirus/ total positivas
			Norovirus <sup>(1)</sup> / total positivas	Sapovirus <sup>(2)</sup> / total positivas		
1) Pellegrini, Buenos Aires	Abril 05	4/12	3/4	0/4	1/4	0/4
2) Carlos Casares, Buenos Aires	Mayo 05	8/9	1/8	0/8	6/8	1/8
3) San Luis Capital, San Luis	Mayo 05	8/10	3/8	0/8	5/8	0/8
4) Florentino Ameghino, Buenos Aires	Mayo 05	3/6	2/3	0/3	1/3	0/3
5) Villa Mercedes, San Luis	Setiembre 05	6/12	2/6	0/6	4/6	0/6
6) Ushuaia, Tierra del Fuego	Mayo 06	5/19	4/5	1/5	0/5	0/5
7) Trenque Lauquen, Buenos Aires	Noviembre 06	4/6	4/4	0/4	0/4	0/4
		<b>38/74</b>	<b>19/38</b>	<b>1/38</b>	<b>17/38</b>	<b>1/38</b>

<sup>(1)</sup> Norovirus fue detectado por técnicas de RT-PCR según Ando *et al.* (1995) y por Vinjé y Koopmans (1996) y/o por análisis de secuencias.

<sup>(2)</sup> Sapovirus fue detectado por análisis de secuencias.

muestra positiva para calicivirus a aquella en la que se obtuvo el amplicón del tamaño esperado en, al menos, una RT-PCR independiente.

#### Secuenciación nucleotídica y análisis filogenético

Los amplicones obtenidos de las RT-PCR fueron purificados directamente del gel de agarosa utilizando el equipo de extracción de ADN a partir de geles QIAquick (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). Para la secuenciación de nucleótidos se utilizó el equipo ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.0 y un secuenciador automático ABI PRISM (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Debido a la variabilidad de este virus, las muestras fueron secuenciadas en ambos sentidos. Las secuencias nucleotídicas descritas en este trabajo se encuentran en la base de datos GenBank, con los números de acceso EU531570-EU531574.

Las secuencias fueron alineadas usando el programa Clustal W y fueron comparadas con secuencias prototipo obtenidas del GenBank mediante la búsqueda por BLAST (1). El análisis filogenético se llevó a cabo usando como modelo de sustitución nucleotídica el Kimura 2-parámetros, y el árbol filogenético fue construido por el método Neighbor-joining usando el programa MEGA, versión 3.1 (22, 27). La significancia estadística de los árboles se obtuvo por medio de *bootstrapping* (1000 pseudorreplacas). La construcción de los árboles filogenéticos estuvo basada en una región del gen de la RdRp comprendida entre los nt 4591-4823 de la cepa Norwalk (número de acceso al GenBank M87661).

## RESULTADOS

#### Detección viral

De las 74 muestras analizadas, el 51,3% (38/74) resultaron positivas para algún enteropatógeno viral. Sobre el total de muestras positivas, se detectó calicivirus en un 53% (20/38), rotavirus en un 44% (17/38) y astrovirus en un 3% (1/38) (Tabla 1). Diecinueve de las 20 muestras de calicivirus fueron identificadas por secuenciación y/o RT-PCR como pertenecientes al género NV según la estrategia de Ando *et al.* (2); mientras que la muestra restante fue identificada por secuenciación como SV. En 12 muestras NV-positivas se pudo determinar el genotipo; 11 de ellas pertenecieron al GII y una al GI.

#### Análisis filogenético

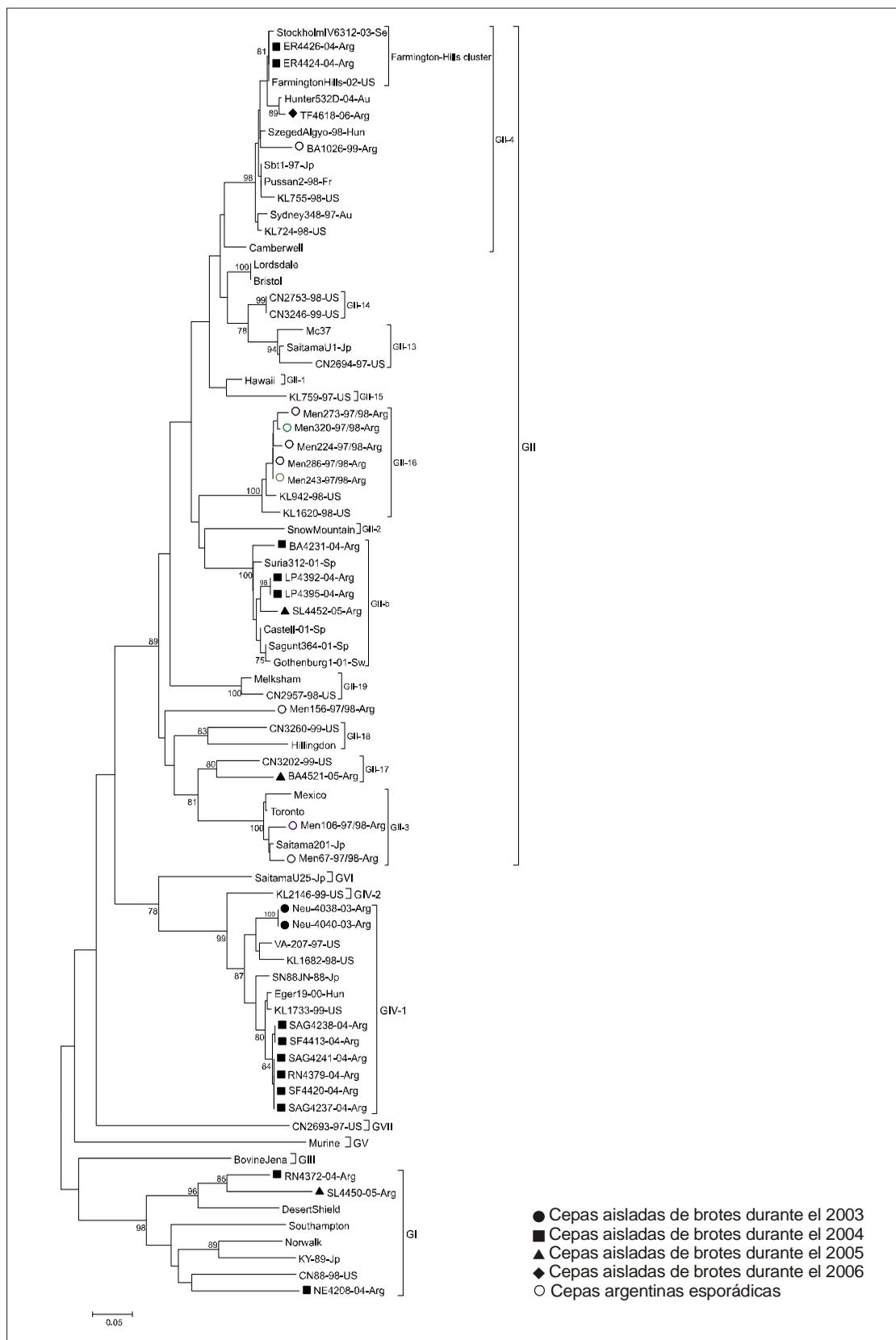
Las cepas de NV argentinas de los años 2005 y 2006 comunicadas en este trabajo se agruparon en dos genogrupos distintos, GI y GII.

Una de las cepas provenientes del brote de San Luis se agrupó en el *cluster* de Desert Shield del GI, mientras que la otra lo hizo en el *cluster* GII-b, junto a cepas argentinas previamente detectadas en brotes ocurridos en 2004. La cepa proveniente del brote de Ushuaia se agrupó dentro del *cluster* GII-4, y la proveniente de Florentino Ameghino en el *cluster* GII-17 (Figura 1). La cepa de SV proveniente del brote de Ushuaia se agrupó en el genotipo 1 del GI de los SV (Figura 2).

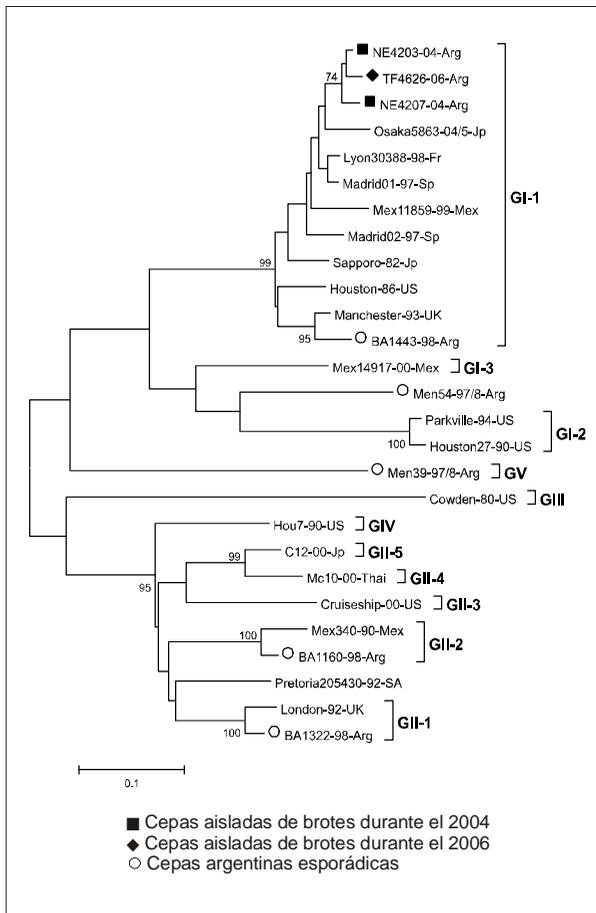
## DISCUSIÓN

Se han realizado diversos estudios epidemiológicos para conocer la incidencia de virus productores de diarreas en niños hospitalizados y ambulatorios en la Argentina (5, 6, 17, 18, 20); pero es escasa la información con la que se cuenta acerca del papel de estos virus como agentes causales de brotes de gastroenteritis aguda (19). Este trabajo representa la continuación del estudio de los agentes virales identificados en brotes de gastroenteritis iniciado en el año 2004.

El porcentaje de detección de calicivirus en los brotes analizados fue del 53%; valor inferior al del 2004, cuando más del 85% de las infecciones fueron atribuidas a calicivirus. Cabe destacar un alto porcentaje de infecciones asociadas a rotavirus (44,7%), principalmente en los brotes ocurridos en Carlos Casares, San Luis (capital) y Villa Mercedes. Como en dichos brotes también se detectó calicivirus, no fue posible asignar un único agente etiológico viral como responsable de aquellos (Tabla 1). Esto último puede atribuirse a la ocurrencia de brotes de origen mixto o a sesgos durante el muestreo; ya que tanto calicivirus como rotavirus tienen la misma estacio-



**Figura 1.** Árbol filogenético basado en una región parcial del gen de la ARN polimerasa ARN dependiente que muestra las relaciones filogenéticas entre cepas de NV argentinas detectadas en brotes del 2003, 2004, 2005 y 2006. Las abreviaturas para los países son las siguientes: Arg, Argentina; Fr, Francia; Jp, Japón; Mex, Méjico; SA, Sudáfrica; Sp, España; Thai, Tailandia; UK, Reino Unido; US, Estados Unidos. Los valores de *bootstrap* mayores a 75 se hallan en los nodos del árbol, mientras que los genogrupos y genotipos se hallan a la derecha.



**Figura 2.** Árbol filogenético basado en una región parcial del gen de la ARN polimerasa ARN dependiente que muestra las relaciones filogenéticas entre cepas de SV argentinas aisladas de brotes durante el 2004 y 2006. Las abreviaturas para los países son las siguientes: Arg, Argentina; Fr, Francia; Jp, Japón; Mex, México; SA, Sudáfrica; Sp, España; Thai, Tailandia; UK, Reino Unido; US, Estados Unidos. Los valores de *bootstrap* mayores a 75 se hallan en los nodos del árbol, mientras que los genogrupos y genotipos se hallan a la derecha.

nalidad (otoño-invierno) (20, 21), y pudo haber existido superposición de casos de brotes con casos endémicos.

Pese a que en los brotes de Florentino Ameghino y Carlos Pellegrini se encontraron más muestras positivas para NV (2/3 y 3/4, respectivamente) que para rotavirus (1/3 y 1/4, respectivamente), el bajo número de muestras analizadas no permitió definir un único agente viral como el causal de los brotes; sin embargo, cabe destacar que tanto los síntomas clínicos como el amplio rango etario de los afectados en ambos brotes son característicos de brotes de NV.

En las muestras provenientes de los brotes ocurridos en Ushuaia y Trenque Lauquen se encontró calicivirus como único agente viral. En esta última localidad, el brote se produjo en un geriátrico, donde las condiciones de hacinamiento favorecieron el contacto persona a persona, principal mecanismo de transmisión de estos virus.

Es preciso resaltar que de las 74 muestras analizadas, el 48,7% (36/74) resultaron negativas. Esto pudo deberse a una serie de factores: i) las muestras fueron colectadas luego de la fase aguda de la enfermedad, cuando la excreción viral es mínima; ii) los virus y/o el ARN presentes en las muestras pudieron haberse deteriorado por un incorrecto almacenamiento y/o transporte al laboratorio; iii) el título viral en las muestras fue menor al límite de detección de las RT-PCR utilizadas para el diagnóstico de calicivirus; iv) la menor sensibilidad del ELISA con respecto a una RT-PCR diagnóstica para rotavirus; y v) mutaciones puntuales presentes en el sitio de unión de los iniciadores.

Con respecto a la sensibilidad del ELISA, el usado en este trabajo tiene un límite de detección de  $7,8 \cdot 10^5$  partículas/ml. Si bien se han descrito técnicas de RT-PCR con mayor sensibilidad diagnóstica, para rotavirus el ELISA continúa siendo el método recomendado en el protocolo de la Organización Panamericana de la Salud (34). Así, Stockman *et al.* (13) demostraron que su menor sensibilidad con respecto a la RT-PCR en la detección de rotavirus permitiría diferenciar el nivel elevado de eliminación de virus en la materia fecal de pacientes con diarrea aguda, de los bajos niveles eliminados en la infección asintomática o en una infección resuelta. Esto hace que el ELISA facilite la interpretación en términos de la significancia clínica de la enfermedad (38). En relación con las mutaciones puntuales que se pueden presentar en el sitio de unión de los iniciadores, se aplicaron cuatro estrategias distintas de RT-PCR con distintos iniciadores, para de esta forma aumentar la probabilidad de detección de calicivirus y evitar la falta de hibridización (2, 23, 39, 41). Por lo tanto, los factores asociados al muestreo parecen ser las principales causales del alto porcentaje de muestras negativas. Esto sugiere la necesidad de fortalecer el sistema de vigilancia de brotes de gastroenteritis en nuestro país.

El árbol filogenético de SV no muestra cambios en el agrupamiento de las cepas aisladas durante los años 2004 y 2006 (Figura 2). En él se puede visualizar que cepas de estos años agrupan juntas en el genogrupo I, genotipo 1; sin embargo, estas se encuentran topológicamente alejadas de cepas aisladas de casos esporádicos ocurridos en la Argentina en 1998 (5, 32).

Los datos obtenidos, tanto por la estrategia de Ando *et al.* (2) como por el secuenciamiento de la RdRp, indican que dentro de los NV, el GII fue el genogrupo que predominó en los años 2005 y 2006 (Figura 1). Estos resultados coinciden con trabajos publicados anteriormente, donde describen al genotipo GII como el predominante a nivel mundial (8-10, 15, 18, 19, 21). Si bien no se ha podido establecer la causa de este hecho, está demostrado que la excreción viral para el GII es 100 veces mayor que para el GI, lo que facilitaría su diseminación en el ambiente (12).

El análisis filogenético de los NV mostró la presencia de cepas de los *clusters* Desert Shield del GI, GII-4, GII-b y, por primera vez en la Argentina, cepas del GII-17.

El genotipo GII-4 fue informado en numerosos trabajos donde se demostró que fue el causante de brotes de gastroenteritis, tanto en países europeos como americanos (Estados Unidos, Brasil y Argentina) (5, 9, 10, 16, 19, 26, 28, 31, 37). La cepa de NV detectada durante el 2006 se agrupó junto a cepas aisladas en el 2004 dentro de este genotipo, específicamente en el *cluster* Hunter, el cual se lo considera un derivado evolutivo del *cluster* Farmington Hills (29). Mediante análisis filogenéticos de una porción del gen de la cápside de cepas de NV GII-4, Lindesmith *et al.* (29), postulan que este genotipo ha evolucionado en forma lineal durante los últimos 20 años y de manera similar al virus influenza. Así, la evolución de este genotipo se caracteriza por cambios moleculares en el sitio de unión a su receptor, como así también por cambios en sitios antigénicos (por presión positiva), los que lo ayudan a mantenerse en circulación en la población.

El genotipo GII-b fue primeramente descrito en países europeos en el año 2000 y luego en países asiáticos (8, 28, 33, 35, 36). En la Argentina fue descrito por primera vez en el análisis de las cepas aisladas de brotes de gastroenteritis en el 2004 (19). Estos antecedentes, junto con los datos obtenidos en los años 2005 y 2006, permiten sugerir que los NV GII-b son lo suficientemente estables como para poder circular y mantenerse en la población.

Respecto del genotipo GII-17, este fue descrito por primera vez en una cepa que circulaba en 1999 en los Estados Unidos (41); y desde entonces no han habido nuevos informes de la presencia de este genotipo, por lo que este trabajo constituye la primera comunicación de GII-17 en la Argentina y la segunda en el mundo.

Desde el punto de vista epidemiológico, la aparición de nuevos genotipos, como en este caso el GII-17, aumentaría el abanico de huéspedes susceptibles, lo que facilitaría su permanencia en la población. Por esta razón sería importante continuar con la vigilancia de los NV, tanto de muestras esporádicas como de brotes, con el fin de determinar las variaciones en la incidencia de dicho genotipo en la población argentina.

A diferencia de lo ocurrido en 2004, año en que se comprobó la circulación del genogrupo IV en la Argentina (19), en el presente trabajo no se han encontrado cepas pertenecientes a este genogrupo. Sin embargo, la presencia de dos cepas GIV-1 aisladas en un brote ocurrido en la provincia del Neuquén en el año 2003 apoya la idea de la continua circulación de estas cepas en el país (19); por lo que habría que secuenciar un mayor número de muestras para confirmar la desaparición de este genogrupo de la población argentina.

Existen hipótesis que afirman que la infección por NV otorga inmunidad protectora cepa-específica, lo que po-

sibilitaría la formulación de una vacuna capaz de proteger contra las cepas circulantes.

Debido a su gran variabilidad genética, y al igual de lo que ocurre con el virus influenza, sería esencial disponer de un sistema de vigilancia confiable de NV para evaluar la necesidad y efectividad de una posible vacuna, así como de drogas terapéuticas (29).

La continua circulación de cepas emergentes destaca la importancia del análisis filogenético en el estudio de NV. Además, los datos presentados resaltan la necesidad de contar con un sistema eficiente de notificación de brotes, ya que en la Argentina estos suelen ser subnotificados. De esta manera, se subestima el impacto real del problema.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.
2. Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 64-71.
3. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 2: S336-S48.
4. Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol* 1997; 142: 1323-34.
5. Bereciartu A, Bok K, Gomez J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Virol* 2002; 25: 197-203.
6. Bok K, Castagnaro N, Borsari A, Nates S, Espul C, Fay O, *et al.* Surveillance for rotavirus in Argentina. *J Med Virol* 2001; 65: 190-8.
7. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.
8. Buesa J, Collado B, López-Andujar P, Abu-Mallouh R, Rodríguez Díaz J, García Díaz A, *et al.* Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2854-9.
9. Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 327-33.
10. Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinje J, Racz ML. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in Sao Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3947-53.
11. CDC. "Norwalk like viruses". Public health consequences and outbreak management. *MMWR* 2001; 50: 1-10.
12. Chan MC, Sung JJ, Lam RK, Chan PK, Lee NL, Lai RW, *et al.* Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1278-80.
13. Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S. Sapporovirus: History and recent findings. *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 2: S303-S08.
14. Diana A, López Seco M, Stupka J, Gomes K, Benítez F, Cousté N, *et al.* Informe sobre brotes de gastroenteritis virales. *Boletín Epidemiológico Periódico. Ministerio de Salud de la República Argentina* 2005; 24: 4-7.
15. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD,

- Bresee JS, Parashar UD, *et al.* Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002; 186: 1-7.
16. Gallimore CI, Green J, Lewis D, Richards AF, Lopman BA, Hale AD, *et al.* Diversity of noroviruses cocirculating in the north of England from 1998 to 2001. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1396-401.
  17. Giordano M, Ferreyra L, Isa M, Martínez L, Yudowsky S, Nates S. The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Córdoba city, Argentina: an insight of disease burden. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001; 43: 1396-401.
  18. Giordano M, Martínez L, Isa M, Ferreyra L, Canna F, Pavan J. Twenty year study of the occurrence of reovirus infection in hospitalized children with acute gastroenteritis in Argentina. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 880-2.
  19. Gomes KA, Stupka JA, Gómez J, Parra GI. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol* 2007; 79: 1703-9.
  20. Gómez J, Sordo M, Gentile A. Epidemiologic patterns of diarrheal disease in Argentina: estimation of rotavirus disease burden. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 843-50.
  21. Hale A, Mattick K, Lewis D, Estes M, Jiang X, Green J, *et al.* Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection. *J Med Virol* 2000; 62: 99-103.
  22. Hall T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ST. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; 41: 95-8.
  23. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 1999; 83: 145-54.
  24. Kane EM, Turcios RM, Arvay ML, García S, Bresee JS, Glass RI. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. *Rev Panam Salud Pública* 2004; 6: 371-7.
  25. Kapikian A, Estes M. Norwalk Group of Viruses. En: Fields B, Knipe D, Howley P, Chanock R, Melnick J, Monath T, Roizman B, Straus S, editors. *Fields Virology*. Philadelphia, PA. Lippincott-Raven, 1996, p. 783-810.
  26. Kearney D, Menton J, Morgan J. Carlow virus, a 2002 GII.4 variant Norovirus strain from Ireland. *Virology* 2007; 4: 61-9.
  27. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004; 5: 150-63.
  28. Lindell AT, Grillner L, Svensson L, Wirgart BZ. Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000 to 2003: association of the GGIIb genetic cluster with infection in children. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1086-92.
  29. Lindesmith L, Donaldson E, LoBue AD, Cannon JL, Zheng D, Vinje J, *et al.* Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 2008; 5: 269-90.
  30. Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human caliciviruses in Europe. *J Clin Virol* 2002; 24: 137-60.
  31. Lopman BA, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez-Fauquier A, Negredo A. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 2004; 363: 682-8.
  32. Martínez N, Espul C, Cuello H, Zhong W, Jiang X, Matson DO, *et al.* Sequence diversity of human caliciviruses recovered from children with diarrhea in Mendoza, Argentina, 1995-1998. *J Med Virol* 2002; 67: 289-98.
  33. Nygard K, Torven M, Ancker C, Knauth S, Hedlund K, Giesecke J. Emerging genotype (GGIIb) of norovirus in drinking water, Sweden. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1548-52.
  34. Organización Panamericana de la Salud. Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus. Guía Práctica. Washington D.C., USA, 2007, p. 1-43.
  35. Phan T, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, *et al.* Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIb among infants and children with diarrhea in Japan. *J Med Virol* 2006; 78: 971-8.
  36. Ramirez S, De Grazia S, Giammanco G, Milici M, Colomba C, Ruggeri F. Detection of the norovirus variants GGII.4 hunter and GGIIb/hilversum in Italian children with gastroenteritis. *J Med Virol* 2006; 78: 1656-62.
  37. Siebenga K, Vennema H, Duizer E, Koopmans M. Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, The Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1389-94.
  38. Stockman LJ, Staat MA, Holloway M, Bernstein DI, Kerin T, Hull J, *et al.* Optimum diagnostic assay and clinical specimen for routine rotavirus surveillance. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1842-3.
  39. Vinje J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996; 174: 610-5.
  40. Wang G, Han M, Cheetham S, Souza M, Funk J, Saif L. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1874-81.
  41. Zintz C, Bok K, Parada E, Barnes-Eley M, Berke T, Staat MA, *et al.* Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Infect Genet Evol* 2005; 5: 281-90.