

Virus transmitidos por alimentos: primer reporte en ostras (*Crassostrea gigas*), provincia de Buenos Aires

Mozgovoj M.^{1,2}, Barbieri E.S.^{3,2}, Gonzalez C.¹, Victoria M.⁴, Cap, M.¹, Vega C.^{5, 2}, Barón P.³, Miño, S.⁵, Lopez F.⁴, Parreño V.^{5, 2}.

¹ Instituto Tecnología de Alimentos, CIA, INTA Castelar, Argentina, ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ³ Universidad de la República, Salto, Uruguay, ⁴ CEMPAT, CESIMAR, CONICET, ⁵ Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas, INTA-CONICET, Castelar, Argentina. mozgovoj.marina@inta.gov.ar

Introducción

Los norovirus (NoV), junto con los rotavirus (RVA) humanos, son los principales agentes virales causantes de brotes de gastroenteritis en todo el mundo. En Argentina, alrededor de 1.200.000 de casos de diarrea aguda se reportan anualmente y la mitad de estos ocurre en niños menores de 5 años. Los moluscos bivalvos son alimentos especialmente peligrosos porque concentran activamente los virus al filtrar grandes volúmenes de agua y, con frecuencia, se consumen crudos o escasamente cocidos. La gastroenteritis asociada al consumo de moluscos bivalvos ha sido ampliamente documentada. En Argentina, desde la introducción de especímenes de ostras para su producción en el año 1982, se ha expandido su distribución desde el estuario de Bahía Blanca hasta la provincia de Río Negro. Toda la zona se caracteriza por su cercanía a ciudades importantes y balnearios con afluencia turística, siendo susceptibles de concentrar contaminantes de efluentes cloacales. Estudios previos demuestran que la ostra *Crassostrea gigas* es capaz de bioacumular una variedad de virus. Los virus entéricos pueden persistir en los sedimentos marinos y mariscos durante varias semanas o meses, no pudiéndose lograr la inactivación viral completa luego de los procesos normales de depuración. En este trabajo se propone estudiar la presencia de NoV y RVA en ostras (*Crassostrea gigas*) del sur de la provincia de Buenos Aires.

Materiales y métodos

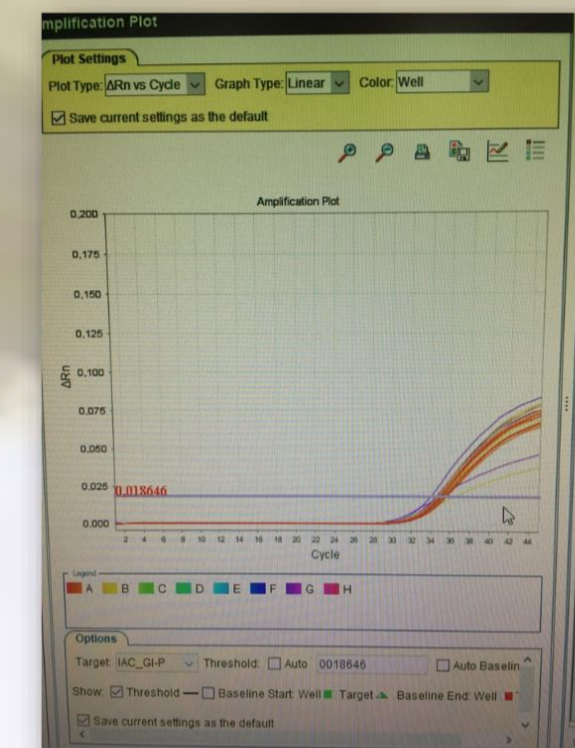
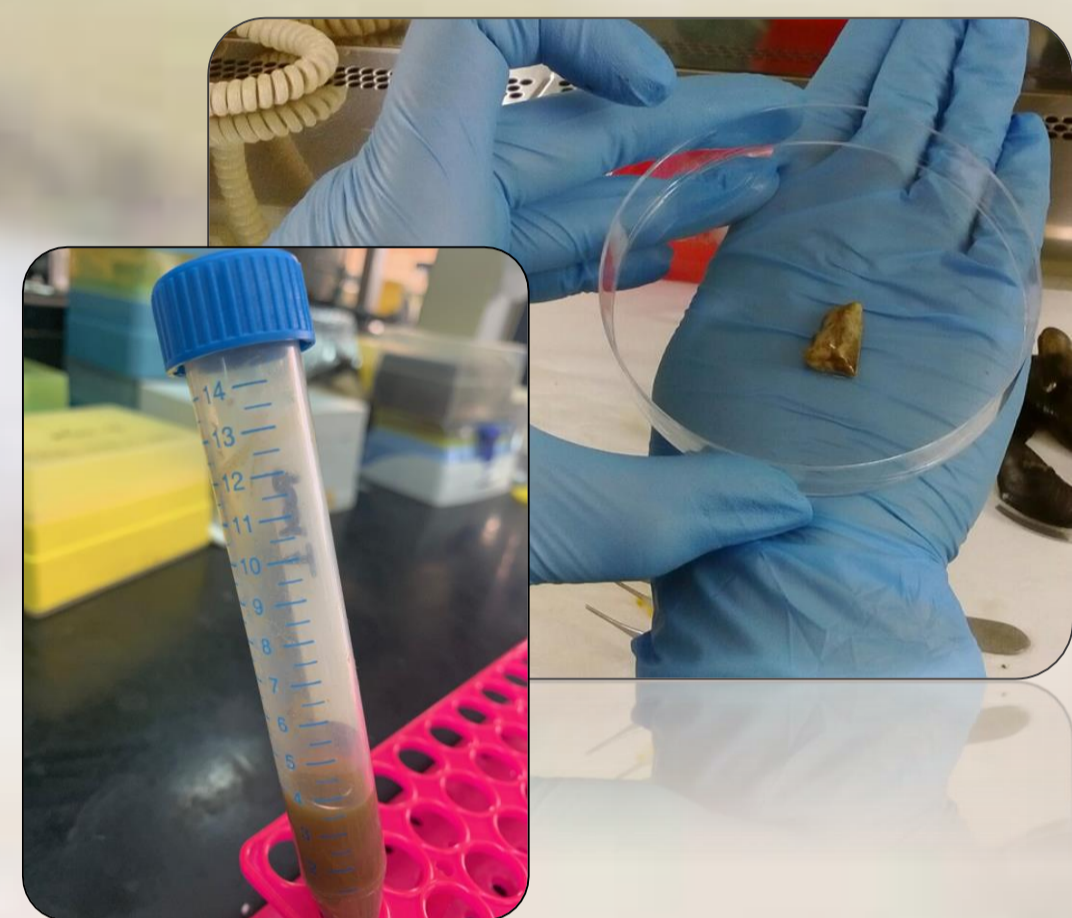
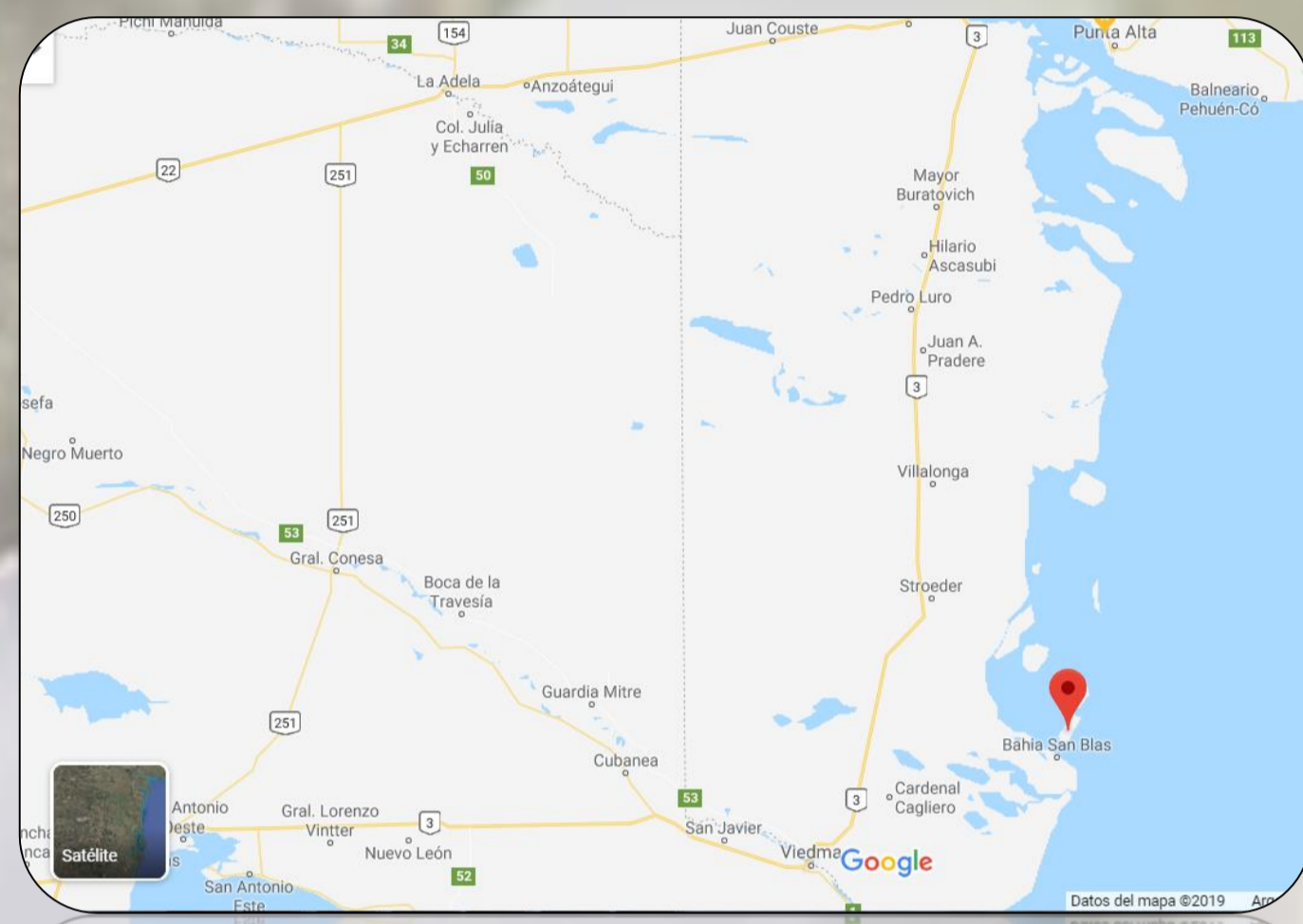
Obtención de muestras de ostras de las zonas noreste y sureste de Isla Gama.

Preparación de homogenatos según norma ISO/TS 15216-2:2013.

Extracción de ARN y detección de NoV y RVA por RT-PCR en tiempo real. Para ello se amplificaron las regiones correspondientes a ORF1 /ORF2 y NSP3, respectivamente.

Amplificación por RT-PCR de punto final, secuenciación y análisis filogenético.

RVA: aislamiento viral en cultivo celular (MA104) y detección por inmunofluorescencia directa (IF), utilizando un nanoanticuerpo VHH específico contra la proteína VP6 de RVA (2KD1), marcado con ALEXA-fluor 488.



Resultados

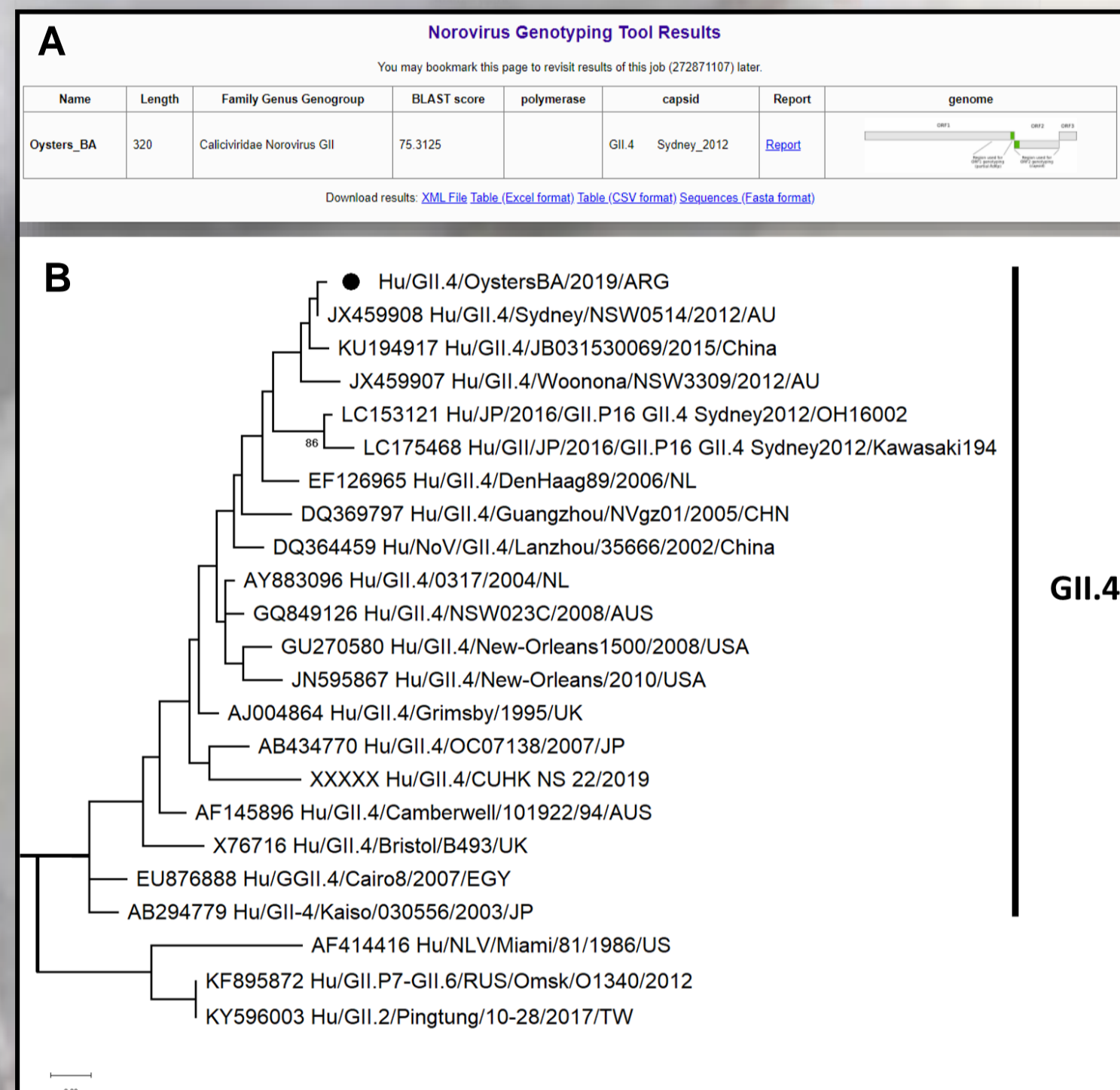


Fig.1: A. La cepa OystersBA/2019 (●) pertenece al genogrupo II, genotipo 4 (GII.4) (Norovirus Genotyping Tool). B. El árbol filogenético muestra que la cepa Argentina agrupa con GII.4/Sidney/2012 y comparte la rama con cepas de China y Australia.



Fig.2: Análisis filogenético realizado a partir de secuencias parciales de los genes VP4, VP7, VP6 y NSP4. Referencias de las figuras: cepa identificada en este estudio (●), cepas vacunales (▲), cepas argentinas humanas y animales previamente reportadas (■). Se muestran los números de acceso de cada una de las cepas utilizadas para los análisis. Los números en los nodos indican los valores de soporte estadístico obtenidos (>75%). La barra de escala que se observa en el la parte inferior del árbol representan la distancia nucleotídica entre las cepas (sustituciones por posición nucleotídica).

- A. El gen de VP4 agrupa con cepas bovinas y humanas genotipo P[1]. Las cepas vacunales (P[8]) y las demás cepas Argentinas no se relacionan con la cepa detectada.
- B. El gen de VP7 agrupa en una rama propia dentro del genotipo G8, no relacionada directamente con otras cepas. La rama próxima contiene cepas humanas y animales. Las cepas vacunales (genotipo G1) no se relacionan con la cepa estudiada.
- C. El gen de NSP4 agrupa dentro del genotipo E2 relacionado con cepas de bovinos de Brasil y cepas humanas de Japón, India, Turquía y USA. Las cepas vacunales agrupan en una rama relacionada al gen detectado.
- D. El gen de VP6 agrupa junto a una cepa canina de Turquía y en la rama próxima una cepa bovina de Brasil. En las ramas relacionadas se observan nuevamente las cepas de Asia. Las cepas vacunales y las cepas Argentinas no se relacionan con la cepa estudiada.



Fig.3: Viabilidad de RVA detectado en ostras. La infectividad del virus se confirmó mediante inmunofluorescencia utilizando un nanoanticuerpo específico para la proteína VP6 de RVA marcado con ALEXA-fluor 488. Los puntos verdes corresponden a células infectadas con el virus aislado.

Conclusiones

- ✓ Se detectó Rotavirus G8P[1] y Norovirus GII.4 en muestras de ostras de Argentina.
- ✓ El genotipo de la cepa RVA/ Oysters-tc/ARG/ Crassostrea-gigas-BA/2019 es G8P[1]-I2-E2, cuyo agrupamiento sugiere un origen animal del orden Artiodactilia aunque no se descarta una reasociación de genes con cepas humanas.

- ✓ Es probable que en la muestra original, dado que es un pool de ostras, contenga mas de una cepa de RVA. Estudios de secuenciación profunda están en proceso para confirmar esta hipótesis.
- ✓ El rotavirus detectado es infeccioso y fue aislado en cultivo celular.

Este trabajo constituye la primera detección de Norovirus GII.4 y Rotavirus G8P[1] en alimentos en Argentina.