

**DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE POLIOMAVIRUS BK EN MUESTRAS
CLOACALES DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA, ARGENTINA.**

Autores: Julieta Sosa, Leonardo Ferreyra, Miguel Giordano, Patricia Barril, Gisela Masachessi, Maria B. Isa, Laura Martinez, Patricia Biganzoli, Silvia Nates, Jorge Pavan.

Institución: Instituto de Virología (INVIV). Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Dirección postal: Enfermera Gordillo Gómez S/N. Ciudad Universitaria. Córdoba.

Dirección electrónica: mjulisosa@gmail.com

Teléfono: 4334022

RESUMEN

El virus BK (VBK) es un *poliomavirus* que es excretado en la orina por muchos individuos de la población humana y fue sugerido en otras partes del mundo como potencial marcador de contaminación con desechos humanos en muestras de aguas residuales. En este trabajo analizamos la prevalencia del VBK y sus genotipos en muestras de cloacas de la ciudad de Córdoba, Argentina. A lo largo de 2 años y medio se recolectaron 60 muestras cloacales en las cuales se detectó la presencia del virus por PCR. El 87% de las muestras resultaron positivas para VBK. De las muestras positivas, 19 fueron secuenciadas y genotipificadas, obteniendo trece genotipo I/b-1, cuatro genotipo I/a, uno genotipo II y el restante resultó genotipo IV. Se concluye que el VBK es altamente prevalente en muestras provenientes de las cloacas de la ciudad de Córdoba y el genotipo predominante es el I/b-1.

PLABRAS CLAVE: Virus BK, genotipos, cloacas, Córdoba

INTRODUCCIÓN

El poliomavirus humano BK (VBK) pertenece al género *Poliomavirus* de la familia *Poliomaviridae*^{1,2,3}. El virión de VBK tiene aproximadamente 45 nm de diámetro, no presenta envoltura y está formado por tres proteínas estructurales denominadas VP1, VP2 y VP3; las cuales se ensamblan en una cápside de simetría icosaédrica que protege a un genoma de ADN de doble cadena de unos 5100 pares de bases^{4,5,6}. La proteína VP1 es la más abundante y externa de la cápside y es la responsable de conferir variabilidad

antigénica al virus, la cual se expresa en cuatro serotipos distintos de VBK (I-IV). Estos cuatro serotipos se correlacionan con la división en cuatro genotipos (I-IV) cuando se secuencian y analizan algunas regiones del ADN viral. Una de las regiones más usadas a tal fin es un fragmento de 287 pares de bases comprendido dentro de la región genómica que codifica para la proteína VP1. El secuenciamiento y análisis filogenético de este fragmento permite además la clasificación de algunos subgenotipos. Así, al genotipo I se lo puede subdividir en cuatro: I/a, I/b-1, I/b-2 y I/c^{7,8,9,10}.

Los *poliomavirus* son específicos de especie y dentro de éstos el VBK está adaptado a la especie humana. La primoinfección ocurre en la infancia durante la primera década de vida, pudiendo el virus ingresar al organismo humano a través de distintas vías: respiratoria, fecal-oral y uro-oral^{5,11,12,13,14}. Luego de la primoinfección, que en el individuo inmunocompetente es principalmente subclínica, el virus queda en estado de latencia en el epitelio tubular renal y el tracto urogenital. Epidemiológicamente, se estima que alrededor del 90% de la población mundial posee anticuerpos específicos o está infectada^{15,16,17,18}. Distintos trabajos han descripto que los genotipos de VBK presentan distribuciones geográficas según el origen étnico de la población. Así, el genotipo I se encuentra muy extendido en todo el mundo, el genotipo IV muestra predominio en países de Asia Oriental y los genotipos II y III son poco frecuentes en todo el mundo. A su vez, el subgenotipo Ia es prevalente en África, el I/b-1 en el sudeste de Asia, el I/b-2 en Europa y el I/c en el noreste de Asia^{7,8,9,10}.

La infección latente que establece el VBK puede, en algún momento de la vida del individuo infectado, reactivarse y el virus comenzar a producir una infección productiva. Esta reactivación puede ocurrir en individuos inmunodeprimidos tales como transplantados renales y de médula ósea o personas con SIDA. En estos individuos la reactivación de VBK

puede estar asociada a enfermedades como cistitis hemorrágica, pancreatitis, obstrucción renal, uretritis y nefropatías¹³. Pero también el virus puede reactivarse asintóticamente en un porcentaje que puede llegar al 20 % de individuos sanos o inmunocompetentes^{15,21}.

La eliminación en la orina de VBK por muchos individuos de una población permite que el virus pueda ser encontrado en aguas residuales o cloacales, siendo éstas un vehículo para su diseminación en la población humana. Estudios realizados en distintos países han detectado y cuantificado la presencia de VBK en muestras de aguas residuales. De esto se desprende que el virus está presente en altas concentraciones y es un contaminante ambiental. Así, algunos investigadores propusieron al virus BK como un posible marcador viral de polución con desechos humanos en aguas ambientales^{19,20,21,22}.

En nuestro medio se desconoce la magnitud de la circulación ambiental de este virus así como los genotipos que infectan a la población local. El presente estudio fue diseñado para obtener datos acerca de la circulación ambiental de VBK en nuestro medio así como sus genotipos. Por tal motivo se plantearon los objetivos de determinar la prevalencia de VBK en muestras de aguas residuales obtenidas en la ciudad de Córdoba (Argentina) y proveer información acerca de los genotipos circulantes en la población local.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se tomaron 60 muestras de aguas cloacales en la entrada de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales de Bajo Grande, ubicada a 5 kilómetros del acceso este de la ciudad de Córdoba, Argentina. El sistema de aguas residuales tiene una cobertura poblacional del 61%. Las muestras fueron recogidas entre las 9 y 11 am para minimizar los

efectos de variación diurnas y fueron transportadas dentro de 12 horas a 4-8°C al Instituto de Virología de la Universidad Nacional de Córdoba, para su posterior procesamiento y análisis. Un total de 60 muestras fueron obtenidas desde febrero del 2009 hasta julio del 2011 a razón de dos muestras por mes.

Concentración de partículas virales

Se procedió a la concentración del virus en las muestras de aguas residuales utilizando el método descrito por Lewis y Metcalf (1988) y Greening y col. (2002), modificado por Huang y col. (2005). Partiendo de 1,5 litros de agua residual las muestras se concentraron 100 veces. En primer lugar, se realizó una centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes se conservaron a 4°C para su posterior uso y los precipitados fueron resuspendidos en una solución de extracto de carne al 3% y nitrato de sodio 2M (pH 5.5). Después, se incubó por una hora a 4°C con mezclado continuo en *shaker* a 180 rpm. Luego del tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 8300 rpm por 20 minutos y el sobrenadante se adicionó al primer sobrenadante obtenido. Se ajustó el pH a 6,5-7,2 y después se precipitó el virus con el agregado de PEG 6000 10% (peso/volumen) y NaCl 2% (peso/volumen) incubando con agitación (aproximadamente 120 rpm) durante al menos 2 horas a 4°C. Nuevamente se realizó una centrifugación a 8300 rpm, por 25 minutos y a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en buffer PBS pH 7,2 (1/100 volumen/volumen). Luego se ajustó el pH a 8,0 mediante el agregado de NaOH 0,1N y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 8300 rpm por 20 minutos y los sobrenadantes resultantes (concentrados 100X) se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Extracción de ácidos nucleicos

El ADN fue extraído a partir de las aguas residuales concentradas, utilizando el método de fenol-cloroformo y la posterior precipitación con alcohol isopropílico. El precipitado se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de H₂O destilada y estéril.

PCR para la detección de VBK

Un segmento de 287 pares de bases, correspondiente a la región que codifica para la proteína VP1 del genoma viral, se amplificó por PCR utilizando los cebadores 327-1PST (5'-GCCTGCAGCAAGTGCCAAAATACTAAT-3') y 327-2HIN (5'-GCAAGCTTGCATGAAGGTTAAGCATGC-3') descritos por Takasaka y col. (2004). Cada amplificación se llevó a cabo en un volumen de reacción de 50 µl que contenía 3mM MgCl₂, 0,1 µM de dNTPS, 0,2 µM de cada uno de los cebadores (327-1PST y 327-2HIN) y 2 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). La amplificación constó de 35 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, *annealing* a 56°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto y extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos de PCR se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio utilizando luz UV en un transiluminador.

Secuenciamiento y análisis de los amplicones

Un total de 19 productos amplificados fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc. (Seoul, Korea) usando el analizador ABI3730 XL. Las secuencias obtenidas fueron

alineadas y comparadas para su genotipificación con secuencias análogas patrones de los cuatro genotipos de VBK disponibles en *GenBank* utilizando el programa informático *clustal X*. La relación filogenética fue inferida desde el alineamiento usando el método de *neighbor joining* con un valor de *bootstrap* de 1000 mediante el programa informático *Mega 4*. Los nombres de las cepas y sus respectivos números de acceso al *GenBank* utilizados para la genotipificación y construcción del árbol filogenético fueron: Para el genotipo Ia las cepas KEN-1 (AB276229), IRL012T (FJ639175) y KT16 (JN94032). Para el genotipo Ib1 las cepas HSCT10 (JN794036), SJH-LG-168 (JN192433), FUJ-3 (AB213282), A-21L (AB369217) y FUJ-35 (AB 213314). Para el genotipo Ib2 las cepas A-41H (AB369230), A-52L (AB369236), A-44H (AB369232) y A-26H (AB369220). Para el genotipo Ic las cepas FUJ-7 (AB213286), FUJ-9 (AB213288) y FUJ-20 (AB213299). Para el genotipo II las cepas A-49H (AB369235), ETH-3 (AB276236) y KT40 (JN93996). Para el genotipo III la cepa SJH-LG-310 (JN192440) y para el genotipo IV las cepas FUJ-12 (AB213291), FUJ-24 (AB213303), A-22L (AB369218) y FUJ-23 (AB213302). Como *outgroup* se usó la secuencia análoga del Poliomavirus simiano 12 (SA12, NC007611).

RESULTADOS

De las 60 muestras obtenidas en la planta de tratamiento de aguas residuales, 49 resultaron positivas (81,67%) para el VBK, detectándose a lo largo de todo el año (tabla 1). Del total de muestras positivas, 19 fueron seleccionadas a lo largo de los meses de todo el año para ser analizadas mediante secuenciamiento nucleotídico. Las secuencias obtenidas confirmaron la especificidad de la amplificación por PCR, ya que todas las secuencias fueron identificadas como pertenecientes al VBK. De las 19 muestras analizadas el 68,42% (13/19) mostraron pertenecer al genotipo I/b-1, el 21,06% (4/19) al genotipo I/a, el 5,26%

(1/19) al genotipo II y el restante 5,26% (1/19) al genotipo IV. En la figura 1 se muestra la relación filogenética entre las cepas secuenciadas y las secuencias de VBK obtenidas desde el *GenBank*.

Tabla 1. Resultados mensuales de la PCR para detectar ADN de VBK en las muestras del estudio

Muestra	Resultado de PCR	
	Muestra 1	Muestra 2
2009		
Febrero	+	+
Marzo	+	+
Abril	+	+
Mayo	-	+
Junio	+	-
Julio	+	+
Agosto	+	+
Septiembre	+	+
Octubere	+	+
Noviembre	+	-
Diciembre	+	-
2010		
Enero	-	-
Febrero	+	-
Marzo	+	+
Abril	+	+
Mayo	+	+
Junio	+	+
Julio	+	+
Agosto	+	+
Septiembre	-	+
Octubre	+	+
Noviembre	+	+
Dicimbre	+	+
2011		
Enero	-	-
Febrero	+	-
Marzo	+	+
Abril	-	+
Mayo	+	+
Junio	+	+
Julio	+	+

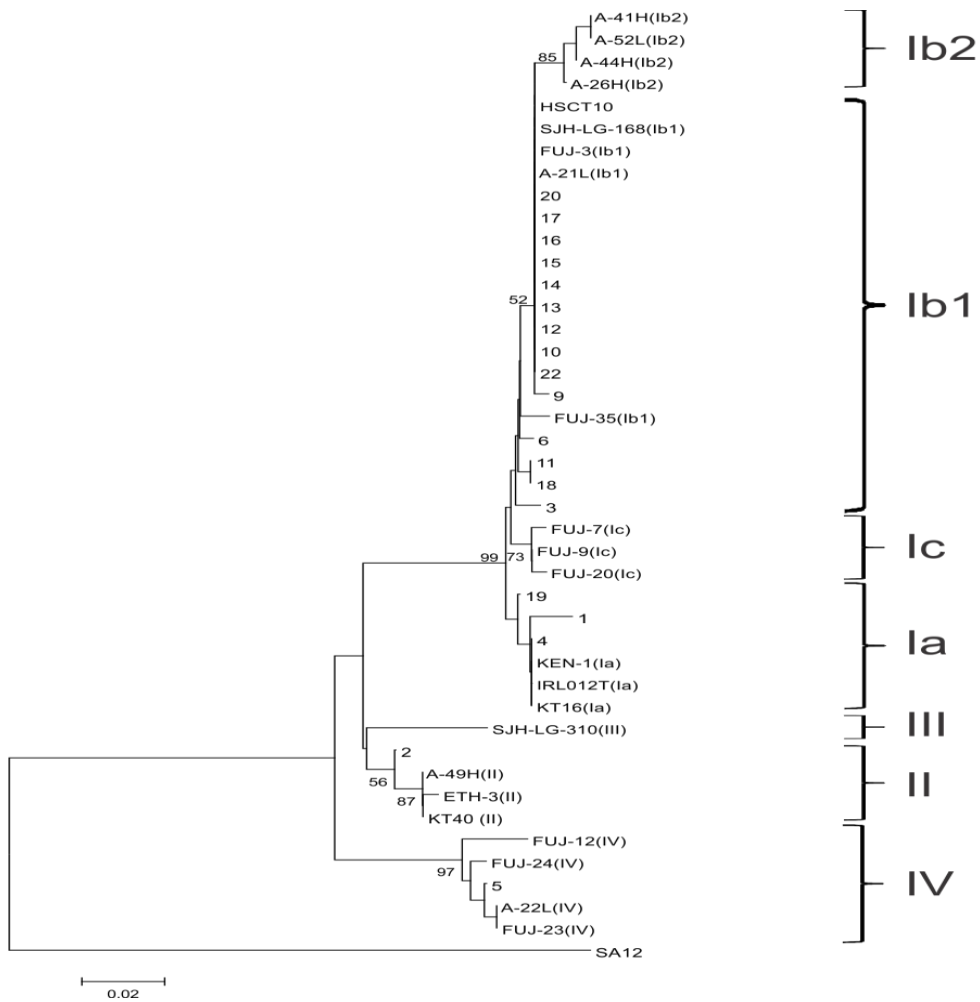


Fig 1. Árbol filogenético construido mediante el método de Neighbor-Joining usando las secuencias obtenidas de los amplicones. Los amplicones obtenidos desde las muestras se indican con números (1-6, 9-20 y 22). Están incluidas secuencias análogas de cepas de VBK obtenidas desde *GenBank*. El genotipo de éstas se indica entre paréntesis al lado del nombre con un número romano. Los distintos *clusters* están señalados por llaves. Los valores de *bootstrap* se muestran como porcentaje en los brazos del árbol. La secuencia denominada SA12 fue incluida como *outgroup*. La escala debajo del árbol indica sustituciones nucleotídicas por sitio.

DISCUSIÓN

El presente estudio examinó la situación epidemiológica del VBK en muestras de aguas residuales de la ciudad de Córdoba. Como resultado el VBK exhibió una prevalencia alta, mostrando que el virus está presente en cantidades detectables en estas muestras en todos los meses del año. Estos resultados podrían ser útiles al tiempo de evaluar al virus BK como un posible marcador viral de contaminación de aguas con desechos cloacales en nuestro medio.

Los resultados positivos de este estudio indican que la metodología empleada para concentrar las muestras y detectar el virus fue efectiva. La técnica de PCR aplicada para la detección de VBK no da información sobre infectividad debido a que sólo detecta presencia de ADN. Otros estudios son necesarios para determinar la infectividad o estabilidad del virus en el medio ambiente, por ejemplo: inoculación de las muestras en cultivos celulares. Esto último podría ser importante de estudiar, por ejemplo, debido a que es discutida la vía principal de infección de este virus, ya que en los años recientes los resultados de diferentes estudios han sugerido a la vía respiratoria, y no tanto la vía fecal-oral, como la fuente principal de adquisición de la infección^{5,26}. Entonces, estudiar la carga de virus viable en muestras de aguas ambientales podría ayudar a dar una magnitud de las posibilidades de contraer la infección por vía oral.

El servicio de la planta de tratamiento de aguas residuales de Bajo Grande de Córdoba recibe aproximadamente el 61% de los desechos de la población local²³, por lo tanto es razonable suponer que los genotipos de VBK detectados en las aguas residuales de este

estudio reflejan los genotipos de circulación local. De los diecinueve amplicones secuenciados, diecisiete fueron pertenecientes al genotipo I, por lo que podría inferirse como el genotipo prevalente en la población humana local. Dentro de los amplicones obtenidos para el genotipo I, trece pertenecieron al subgenotipo I/b-1 y cuatro al I/a, por lo que, además, podría inferirse al subgenotipo I/b-1 como predominante. Estos datos concuerdan con los de muchos otros países en donde el genotipo I es el predominante^{7, 8, 9, 10}. El virus BK puede producir cáncer en animales de laboratorio y su impacto en la salud humana está siendo investigado y discutido en la actualidad por muchos investigadores^{24, 25}. Desde este desconocimiento se vuelve importante recabar datos acerca de las cepas de VBK circulantes en la población. Este estudio describe la incidencia y diversidad de VBK en las cloacas de la ciudad de Córdoba, Argentina, proveyendo importantes datos epidemiológicos.

CONCLUSIONES

El virus BK está presente en cantidades detectables en las muestras cloacales de la ciudad de Córdoba, en donde muestra además una alta prevalencia. Los resultados sugieren que el genotipo I pero particularmente el I/b-1 es el más prevalente en la población local.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V, Hulme, B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*, 1971. 1: 1253-1257.

- 2) Krumbholz A., Bininda-Emonds O.R.P., Wutzler P. Evolution of four BK virus subtypes. *Infect Genet Evol*, 2008. 8: 632-643.
- 3) Bofill-Mas A., Rodriguez-Manzano J., Calgua B., Carratala A., Girones R. Newly described human polyomaviruses Merkel Cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. *Virology Journal*, 2010. 7:141.
- 4) McQuaig S.M., Scott T.M., Lukasik J.O., Paul J.H., and Harwood V.J. Quantification of Human Polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan Quantitative PCR and Comparison to Other Water Quality Indicators in Water and Fecal Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009. 75: 3379-3388.
- 5) Bofill-Mas S., Formiga-Cruz M., Clemente-Casares P., Calafell F., and Girones R. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *Journal of Virology*, 2001. 75: 10290-10299.
- 6) Cavallo R., Bergallo M., Sidoti F., Astegiano S., Terlizzi M. E., Costa C. Polyomavirus-associated nephropathy: critical issues in virological monitoring. *New Microbiologica*, 2009. 32: 235-243.
- 7) Takasaka T., Goya N., Tokumoto T., Tanabe K., Toma H., Ogawa Y., Hokama S., Momose A., Funyu T., Fujioka T., Omori S., Akiyama H., Chen O., Zheng H-Y., Ohta N., Kitamura T. and Yogo Y. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *Journal Gen Virology*, 2004. 85: 2821-2827.

- 8) Sharma P. M., Gupta G., Vats A., Shapiro R. and Randhawa P. Phylogenetic analysis of polyomavirus BK sequences. *Journal of Virology*, 2006. 80: 8869-8879.
- 9) Zhong S., Randhawa P. S., Ikegaya H., Chen O., Zheng H-Y., Suzuki M., Takeuchi T., Shibuya A., Kitamura T., Yogo Y. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. *Journal of General Virology*, 2009. 90: 144-142.
- 10) Luo C., Bueno M., Kant J., Martinson J., and Randhawa P. Genotyping Schemes for Polyomavirus BK, Using Gene-Specific Phylogenetic Trees and Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Journal of Virology*, 2009. 83 (5): 2285–2297.
- 11) Garces J. C., MD. BK Virus–Associated Nephropathy in Kidney Transplant Recipients. *The Ochsner Journal*, 2010. 10:245–249.
- 12) Thomas L. D., Milstone A. P., Vilchez R. A., Zanwar P., Butel J. S., and Dummer J. S. Polyomavirus Infection and Its Impact on Renal Function and Long-Term Outcomes after Lung Transplantation. *Transplantation*, 2009. 15; 88 (3): 360-366.
- 13) Stolt A., Sasnauskas K., Koskela P., Lehtinen M. and Dillner J. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *Journal of General Virology*, 2003. 84, 1499–1504.
- 14) Abend J. R., Low J. A., Imperiale M. J. Global effects of BKV infection on gene expression in human primary kidney epithelial cells. *Virology*, 2010. 397: 73–79.
- 15) Eash S., Querbes W. and Atwood W. J. Infection of Vero Cells by BK Virus is dependent on Caveolae. *Journal of Virology*, 2004. 78: 11583-11590.

16) Acott P.D., O'Regan P.A., Lee S.H., and Crocker J.F. Utilization of Vero Cells for primary and chronic BK virus infection. Transplantation Proceedings, 2006. 38: 3502-3505.

17) Hirsch H., Knowles W., Dickenmann M., Passweg J., Klimkait T., Mihatsch M., and Steiger J. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal transplant recipients. The New England Journal of Medicine, 2002. vol. 347, N° 7.

18) Hirsch H. Bk Virus: Opportunity Makes a Pathogen. CID, 2005. 41:354-60.

19) **Weinreb DB, Desman GT, Amolat-**

Apiado MJ, Burstein DE, Godbold JH

Jr, Johnson EM. Polyoma virus infection is a prominent risk factor

for bladder carcinoma in immunocompetent individuals. **Diag**

Cytopathol, 2006. 34 (3):201-3.

20) Pastrana D. V., Brennan D. C., Cuburu N. C., Storch G. A., Viscidi R. P., Randhawa P. S., Buck C. B. Neutralization Serotyping of BK Polyomavirus Infection in Kidney Transplant Recipients. PLoS Pathogens, 2012. 8(4):e1002650.

21) Wong ASY, Chan KH, Cheng VCC, KY Yuen, Kwong YL, Leung AYH. Relationship of pretransplantation polyoma BK virus serologic findings and BK

viral reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 2007. 44 (6):830–837.

- 22) [Randhawa PS](#), [Khaleel-Ur-Rehman K](#), [Swalsky PA](#), [Vats A](#), [Scantlebury V](#), [Shapiro R](#), [Finkelstein S](#). DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. [Transplantation, 2002.](#) 15; 73(7):1090-4.
- 23) Barril P.A., Giordano M.O., Isa M.B., Masachessi G., Ferreyra L.J.,. Castello A.A, Glikmann G., and Nates S.V. Correlation Between Rotavirus A Genotypes Detected in Hospitalized Children and Sewage Samples in 2006, Córdoba, Argentina. *Journal of Medical Virology*, 2010. 82:1277–1281.
- 24) Hirsch H. H, and Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*, 2003. 3: 611–23.
- 25) Montagne J.; Michelo T.; Fontanell B.; Oliveir A.; Silveir J.; Schroede R.; Neuman J.; Keite E.; Pereira Alexandre C. O. BKV-infection in kidney graft dysfunction. *J Infect Dis*, 2010. vol.14 no.2.
- 26) Jiang M., Abend J.R., Johnson S.F., Imperiale M.J. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*, 2009. 384: 266–273.

