



Programa de Vinculación Científica y Tecnológica- CONACYT

Cuantificación del riesgo de infección por Rotavirus en aguas superficiales en Asunción, Paraguay

Nathalia Zarza



Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella"

Dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas

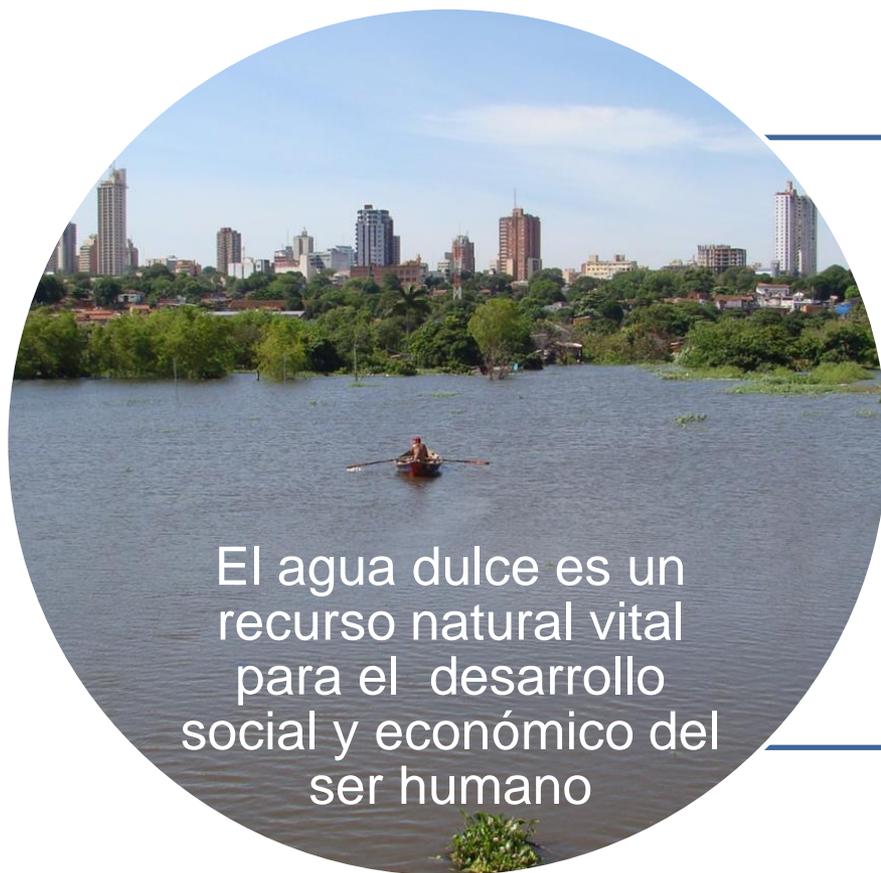
Director/Responsables: Prof. Dra. Silvia Nates

Dirección: Calle Enfermera Gordillo s/n, Ciudad Universitaria. CP 5016, Córdoba.



Universidad
Nacional
de Córdoba

Introducción



Contaminación fecal



Gastroenteritis Virales



Rotavirus
Norovirus
Adenovirus
y Astrovirus

- Identificar un agente microbiano como patógeno asociado a una determinada enfermedad y con impacto en salud.
- Identificar posibles vías de transmisión.
- Evaluar el nivel de inmunidad poblacional y la disponibilidad de vacunas.

Objetivo Principal de la Estadía

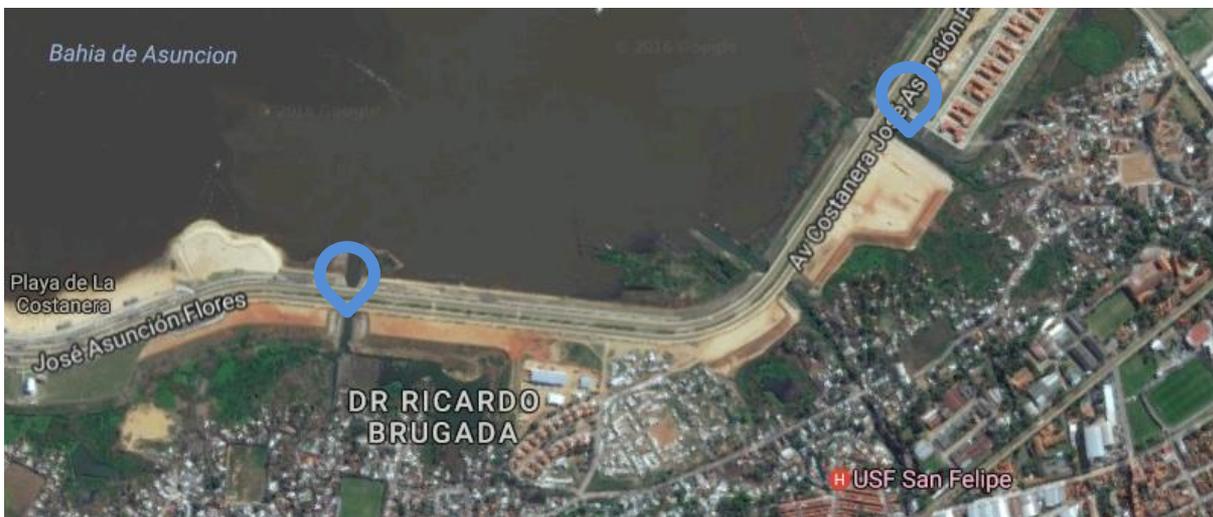
- Aprender una metodología para evaluar el riesgo de infección por exposición humana a rotavirus, presentes en aguas superficiales

Evaluación Cuantitativa de Riesgo Microbiológico (QMRA).

Una estimación matemática de la relación entre la dosis administrada y la probabilidad de infección.

Colectas

Antequera (**CA**, Arroyo Ycuasati) & Las Mercedes (**CLM**, Arroyo Las Mercedes).



En un periodo de 2015 a 2016 (una colecta por mes por punto) $N=24$ muestras de aguas superficiales

Actividades

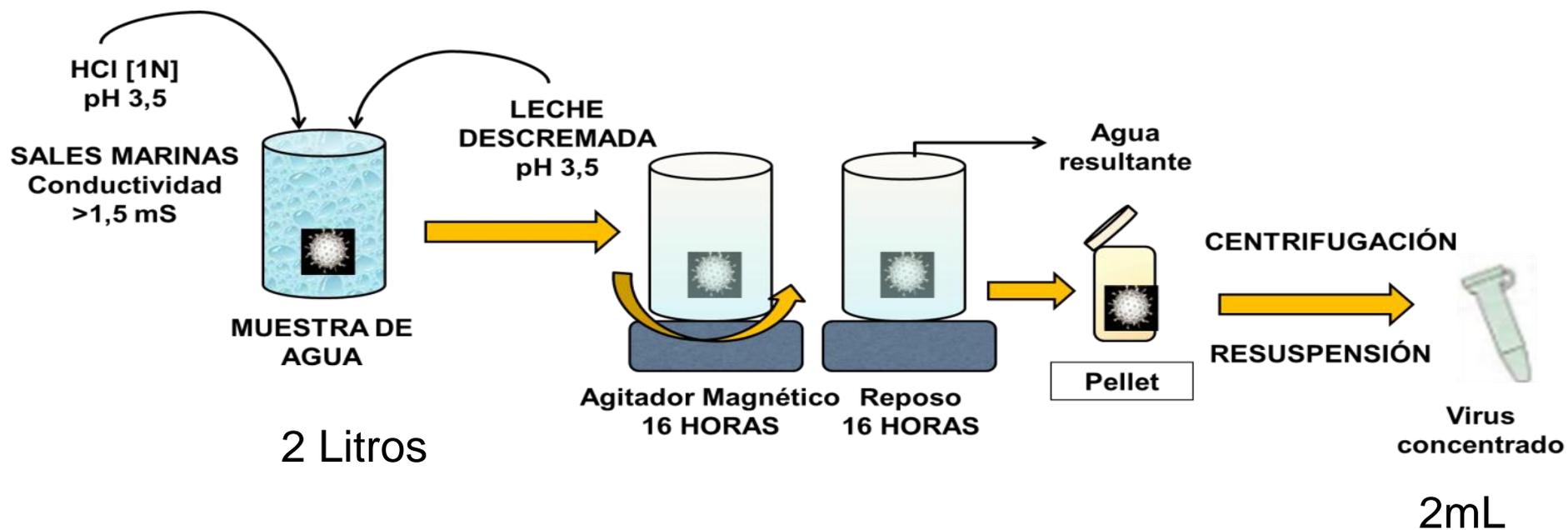
1. Concentración de partículas virales
2. RT-PCR para la detección de Rotavirus, Norovirus y Astrovirus
3. Cuantificación del genoma de Rotavirus por PCR en Tiempo Real
4. Evaluación de riesgo de infección por exposición humana a rotavirus, presentes en aguas superficiales (QMRA)



ACTIVIDAD #1

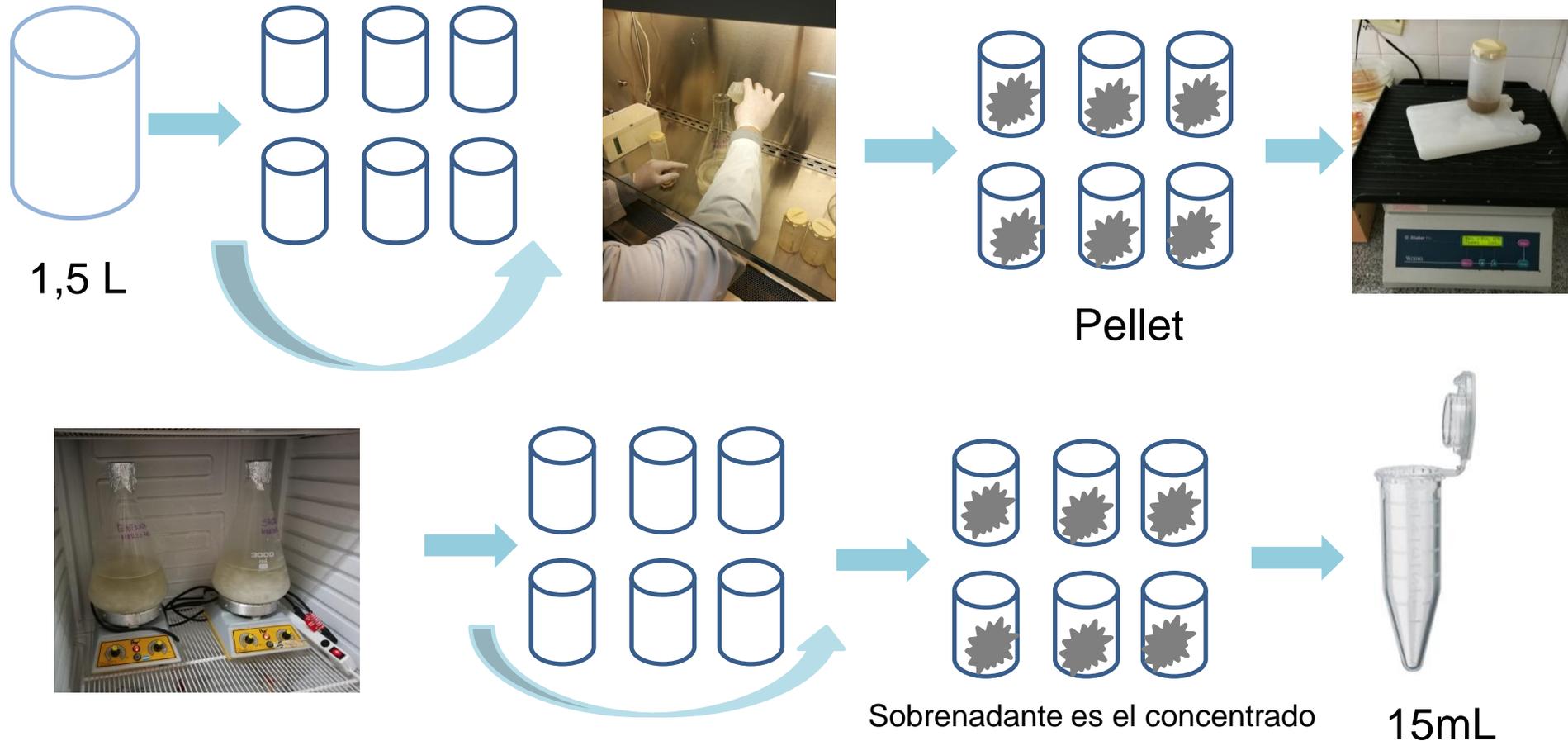
Concentración de partículas virales

Método de la Floculación



EFICACIA DE RECUPERACIÓN DEL 49%

Método PEG (Polietilenglicol)



EFICACIA DE RECUPERACIÓN DEL 25%



ACTIVIDAD #2

RT-PCR para la detección de Rotavirus,
Norovirus y Astrovirus en matrices
acuosas superficiales

RT-PCR para la detección viral

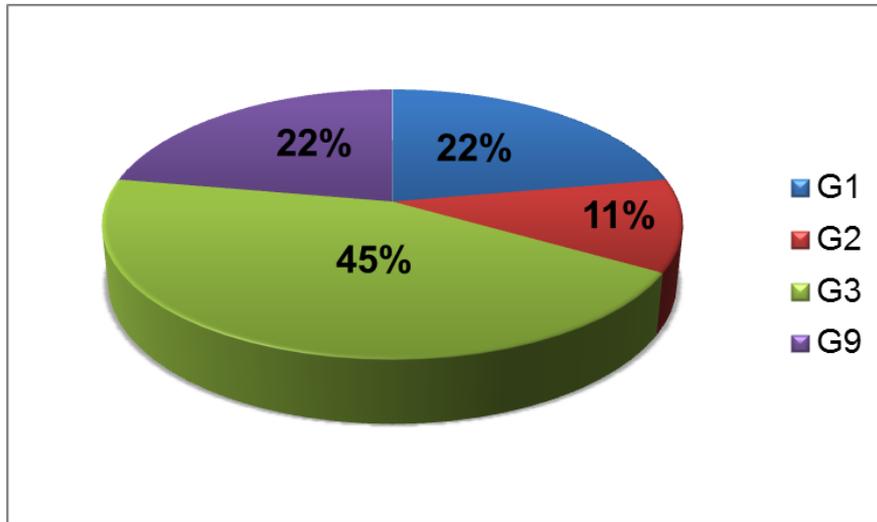
	Región	Referencias
Rotavirus	Gen de la VP7	Gouvea <i>et al</i> 1990
Norovirus	Entre la región RdRp-VP1	Monroe <i>et al</i> 2004
Astrovirus	Gen VP34	Sakamoto <i>et al</i> 2000

Cauce Antequera Resultados

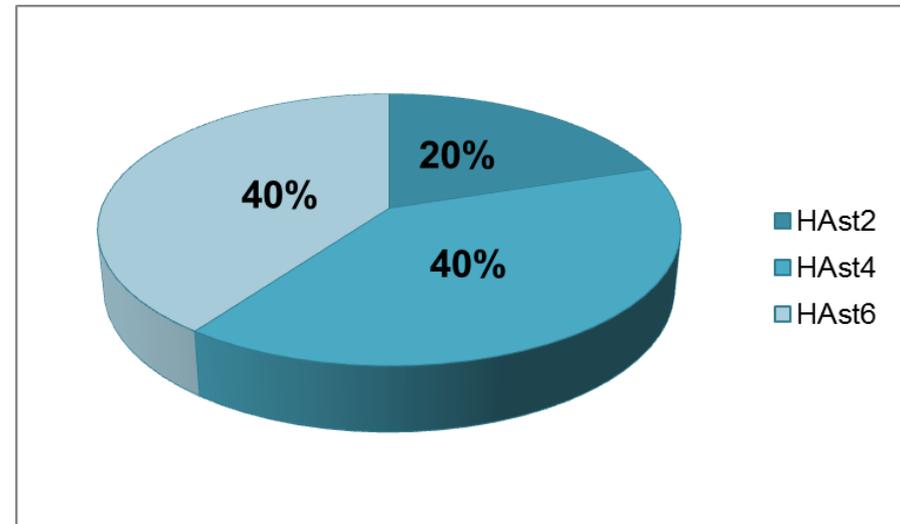
	Cauce Antequera (CA)			
	Rotavirus	Norovirus		Astrovirus
Colecta	VP7	GII	GI	región cápside
CA 1	X	+	+	+
CA 2	X	X	X	+
CA 3	X	X	+	+
CA 4	X	X	X	X
CA 5	X	X	X	+
CA 6	+	X	X	X
CA 7	+	+	X	X
CA 8	X	ND	X	X
CA 9	+	+	+	X
CA 10	X	+	X	X
CA 11	+	+	+	X
CA 12	+	+	+	+

Genotipos circulantes. Resultados

Arroyo *Ycuasati* Rotavirus

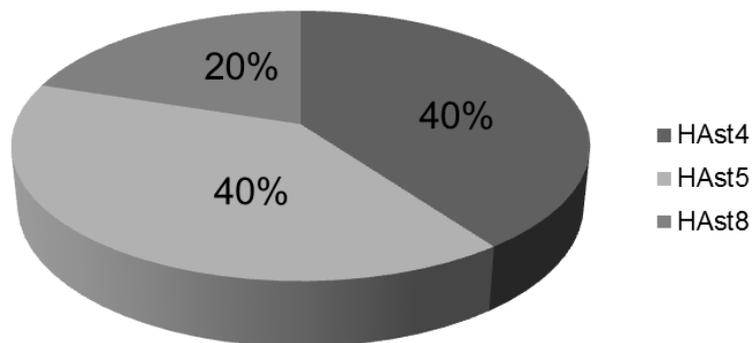


Astrovirus



Cauce Las Mercedes Resultados

	Cauce Las Mercedes			
	Rotavirus	Norovirus		Astrovirus
	VP7	GII	GI	region capside
Colecta				
CLM1	X	X	X	+
CLM 2	X	X	X	+
CLM 3	X	X	X	X
CLM 4	X	X	X	X
CLM5	X	X	X	+
CLM6	X	+	X	X
CLM 7	X	+	ND	+
CLM8	X	X	X	+
CLM9	X	+	+	X
CLM10	X	+	+	X
CLM11	X	+	+	X
CLM12	X	+	+	X



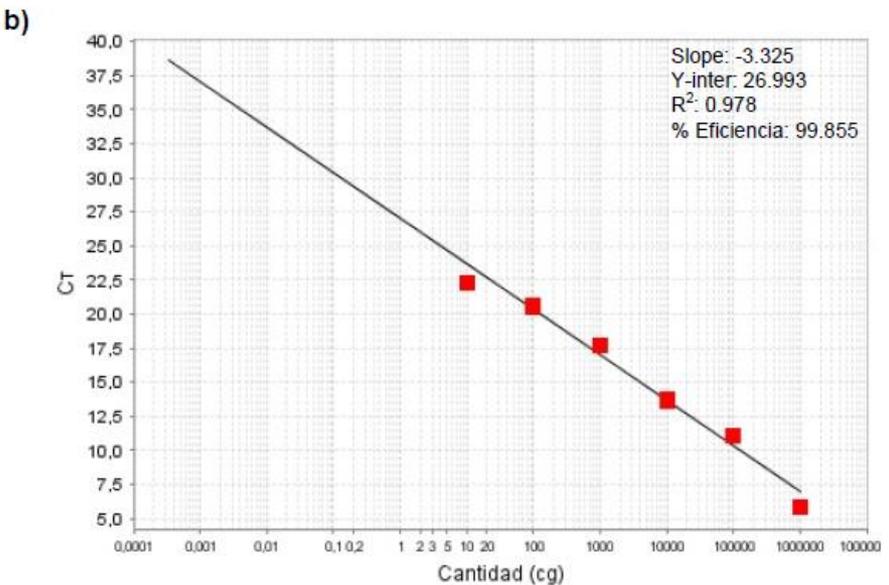
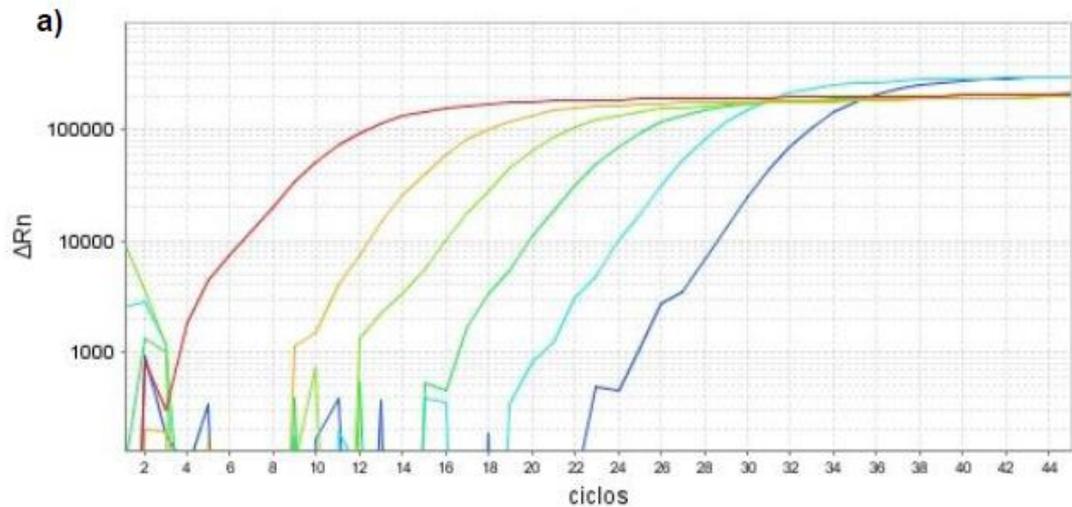
Genotipos circulantes de Astrovirus



ACTIVIDAD #3

Cuantificación del genoma de Rotavirus
por PCR en Tiempo Real de las
muestras de aguas

Cuantificación del genoma de Rotavirus mediante q-PCR con sondas Taqman® para el gen NSP3

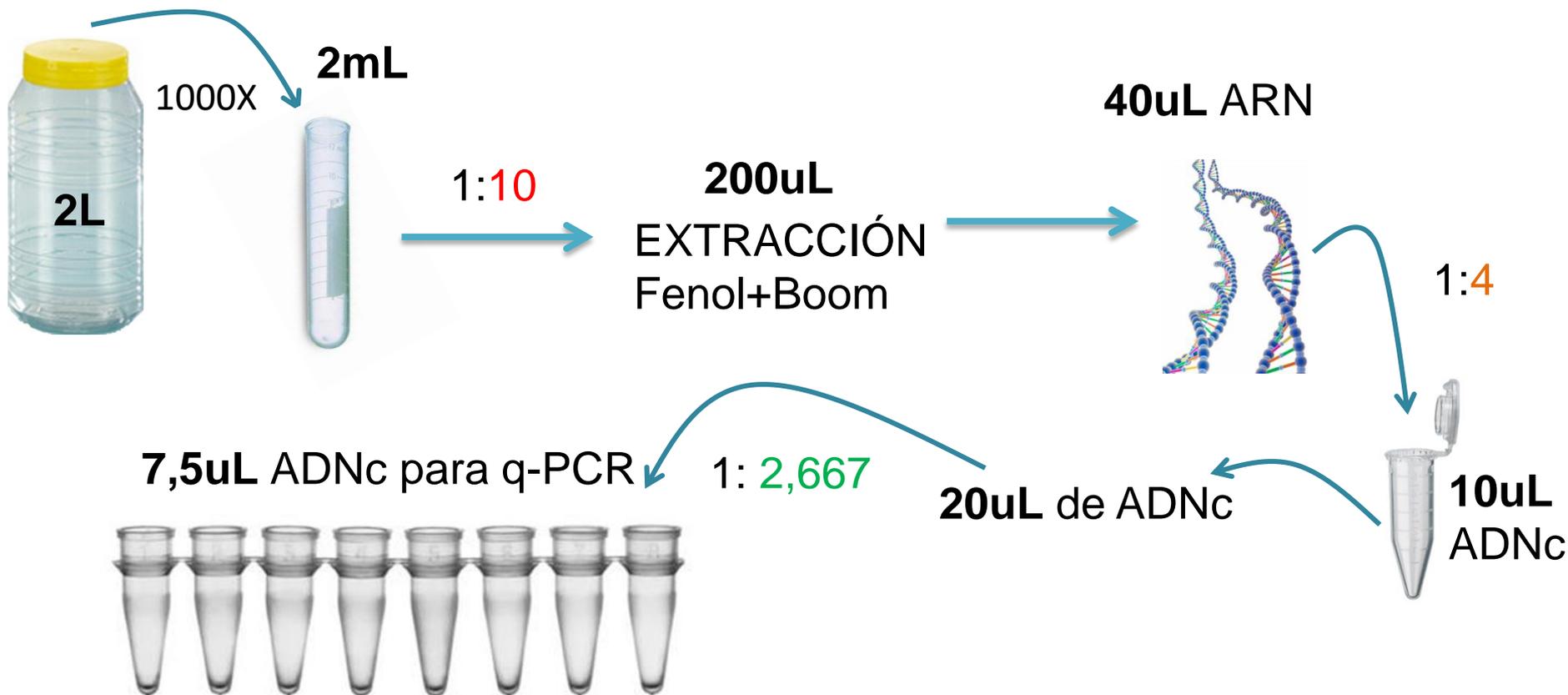


a) Curva estándar de la qPCR de RV utilizando las siguientes diluciones del plásmido PP7 + NSP3: 10E6, 10E5, 10E4, 10E3, 10E2 y 10 copias genómicas (cg).

b) Recta patrón utilizada para interpolar el número de copias genómicas iniciales a partir del valor umbral (*threshold*, Ct).

Cuantificación del Rotavirus por q-PCR. Resultados

$$[\text{RoV}] = \frac{\text{copias genómicas (q-PCR)} \times 10 \times 4 \times 2,667}{(2 \times 0,49)}$$



Cuantificación del Rotavirus por q-PCR. Resultados

$$CA6 = \frac{2,03 + 2,63}{2} = 2,33$$

$$[CA6] = \frac{2,33 \times 10 \times 4 \times 2,667}{(2 \times 0,49)} = 252,09 \text{ copias genómicas/L}$$

Proporción de partículas infectivas por copias genómicas*

$$252,09 \times 10/100 = 25,209 \text{ partículas infectivas/L}$$

*Chigor *et al.* 2014

ACTIVIDAD #4

Cálculo del riesgo de infección humana por exposición a rotavirus presentes en las aguas en estudio (QMRA)

Enfoques para evaluar la QMRA

- ❖ Identificación del riesgo. **Qué patógeno? Qué enfermedad?**
- ❖ Evaluación de la exposición. **Número de microorganismos que corresponden a una única dosis** (q-PCR y cálculo de dosis)
- ❖ Modelo Dosis-Respuesta. **Relación entre la dosis viral y las consecuencias en salud humana** (Probabilidad de infección y desarrollo de la enfermedad)
- ❖ Caracterización del riesgo.
- ❖ Manejo del riesgo

$$P_{I(A)}(d) = 1 - [1 - P_I(d)]^n$$

Probabilidad o el riesgo de una infección por n exposiciones debido a una dosis d única de patógenos

Estimación del riesgo

- ✓ Según **reportes*** en una exposición por contacto directo, la ingestión involuntaria de agua es de aprox. 10 mL por cada evento y que por año se estima la ocurrencia de aprox. 6 eventos. *
- ✓ Se estima que 10% de las copias genómicas son partículas infectivas. **

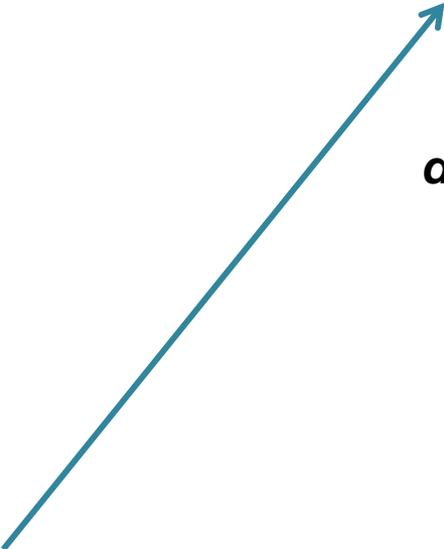
$$\text{dosis} = \text{partículas infectivas} * 10\text{ml}$$

Mes	[RoV] Copias genómicas/L	Dosis en 10mL
Diciembre	252,09	0,252
Febrero	220,17	0,220
Abril	202,32	0,202
Julio	8232,22	8,232
Setiembre	290,33	0,290

* Steyn et al, 2004; Westrell et al, 2004; Labite et al, 2010; Schets et al, 2011

Estimación del riesgo en el año. Resultados

	NSP3
CA 1	0
CA 2	0
CA 3	0
CA 4	0
CA 5	0
CA 6	252.09
CA 7	220.17
CA 8	0
CA 9	202.32
CA 10	0
CA 11	8232.22
CA 12	290.33
	766.4275



$$766,4275 \text{-----} 100\%$$

$$X \text{-----} 10\%$$

$$X = 76,64 \text{ partículas infectivas/L}$$



$$\text{dosis} = \text{partículas infectivas} * 10\text{ml}$$

$$\text{DOSIS} = 0,766$$

Estimación del riesgo en el año. Resultados

$$P_I(d) = 1 - \left[1 + \left(\frac{d}{N_{50}} \right) \left(2^{1/\alpha} - 1 \right) \right]^{-\alpha}$$

$$P_{I(A)}(d) = 1 - [1 - P_I(d)]^n$$

Modelo Dosis-Respuesta

β -Poisson. Constantes

- $\alpha = 0,2531$
 - $N_{50} = 6,17$
- ➔ Dosis en 10 mL = 0,766

PI (A) = 0,23

En otras palabras...

- Existe **23%** de riesgo de infectarse con rotavirus viable por contacto directo con el agua en cualquier momento a lo largo de un año, según los datos analizados.

Agradecimientos



Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella"

Dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas

Director/Responsables: Prof. Dra. Silvia Nates

Dirección: Calle Enfermera Gordillo s/n, Ciudad Universitaria. CP 5016, Córdoba.





GRACIAS

Modelos y parámetros que mejor se ajustan según el microorganismo

Bacteria Viruses Protozoa Prions Criteria for Model Selection Back to Dose Response Home Page [edit]										
	Best fit model*	Optimized parameter(s)		Host type			# of doses	Dose units		
Adenovirus: Dose Response Models	exponential	$k = 6.07E-01$	$1.14E+00$	human	type 4	inhalation	4	TCID ₅₀	infection	Couch, Cate et al. 1966
Echovirus: Dose Response Models	beta-Poisson	$\alpha = 1.06E+00$, $N_{50} = 9.22E+02$	$9.22E+02$	human	strain 12	oral	4	PFU	infection	Schiff et al., 1984
Enteroviruses: Dose Response Models	exponential	$k = 3.74E-03$	$1.85E+02$	pig	porcine, PE7-05i	oral	3	PFU	infection	Cliver, 1981
Influenza: Dose Response Models	beta-Poisson	$\alpha = 5.81E-01$, $N_{50} = 9.45E+05$	$9.45E+05$	human	H1N1,A/California/10/78 attenuated strain, H3N2,A/Washington/897/80 attenuated strain	intranasal	9	TCID ₅₀	infection	Murphy et al., 1984 & Murphy et al., 1985
Lassa virus: Dose Response Models	exponential	$k = 2.95E+00$	$2.35E-01$	guinea pig	Josiah strain	subcutaneous	6	PFU	death	Jahrling et al., 1982
Poliovirus: Dose Response Models	exponential	$k = 4.91E-01$	$1.41E+00$	human	type 1,attenuated	oral (capsule)	3	PD50 (mouse paralytic doses)	alimentary infection	Koprowski
Rhinovirus: Dose Response Models	beta-Poisson	$\alpha = 2.21E-01$, $N_{50} = 1.81E+00$	$1.81E+00$	human	type 39	intranasal	6	TCID ₅₀	infection	Hendley et al., 1972
Rotavirus: Dose Response Models	beta-Poisson	$\alpha = 2.53E-01$, $N_{50} = 6.17E+00$	$6.17E+00$	human	CJN strain (unpassaged)	oral	8	FFU	infection	Ward et al, 1986
SARS: Dose Response Models	exponential	$k = 2.46E-03$	$2.82E+02$	mice hACE-2 and AJ	rSARS-CoV	intranasal	8	PFU	death	DeDiego et al., 2008 & De Albuquerque et al., 2006

*These models are preferred in most circumstances. However, consider all available models to decide which one is most appropriate for your analysis.

Modelo dosis-respuesta

Exponencial

$$P_I(d) = 1 - \exp(-rd)$$

- ❖ **$P_I(d)$** : Es la probabilidad o riesgo de infección en una exposición individual a la dosis estimada
- ❖ **r** : fracción de virus que sobreviven y son capaces de infectar al huésped

β -Poisson

$$P_I(d) = 1 - \left[1 + \left(\frac{d}{N_{50}} \right) \left(2^{1/\alpha} - 1 \right) \right]^{-\alpha}$$

$$N_{50} = \beta \left(2^{1/\alpha} - 1 \right)$$

α y β : Constantes de infectividad del patógeno que caracteriza la relación dosis-respuesta

N_{50} : El número de patógenos requeridos para causar una infección en el 50% de la población expuesta