UNIVERSIDAD TECNICA DE MANABI

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE MEDICINA

TITULO:

"INCIDENCIA DE SINDROME DIARREICO AGUDO POR ROTAVIRUS EN MENORES DE 3 AÑOS INGRESADOS EN EL HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA. ENERO-JUNIO 2005"

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCION
DEL TITULO DE DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA

INTEGRANTES

MACÍAS FERNÁNDEZ JUAN PABLO

DELGADO MANTUANO YANDRI ALEXANDER

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MELANIA ALCIVAR GARCIA

PORTOVIEJO, NOVIEMBRE DEL 2005

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a todas y cada uno de los individuos de las nuevas generaciones que directa o indirectamente deseen conocer esta investigación para fundamentar y ajustarlos a sus propios estudios, de esa manera estaremos satisfechos del esfuerzo hecho, así como también deseamos que vuestros trabajos sirvan a otros a lo largo de la linea del tiempo y ello siga contribuyendo en un sin fin de avance y tecnología para nunca extinguir el progreso de nuestra humanidad. Nuestra dedicatoria especial a nuestro Padre Dios, nuestros padres que con tanto amor y esmero estimularon nuestro crecimiento como personas tanto de forma física, espiritual y moral; a nuestra segunda casa, la Escuela de Medicina de la Universidad Técnica de Manabí, que sin ella no hubiésemos tenido las direcciones y guías que con esmero y dedicación terminaron en la culminación de nuestra carrera y a nuestra tercera casa El Hospital Dr. Verdi Cevallos Balda de nuestra ciudad Portoviejo, Institución de Salud que contribuyó a pulir nuestras enseñanzas para aplicar nuestros conocimientos en salud y transmitirlos y utilizarlos de forma adecuada, cuidadosa y correcta en la curación de nuestros hermanos y hermanas de nuestra población Manabita.

Los Autores.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

AGRADECIMIENTO

A Dios.

A Nuestros Padres, Hermanos y demás familiares.

A la Universidad Técnica de Manabí.

A las personas que nos apoyaron e incentivaron a continuar con nuestro trabajo.

A todos y cada uno de nuestros profesores y Doctores que han contribuido para nuestros conocimientos y actitudes.

Al Hospital Dr. Verdi Cevallos Balda de Portoviejo quien nos abrió sus puertas para nuestro aprendizaje.

A los Señores médicos tratantes del área de Hospitalización pediátrica del Hospital Verdi Cevallos Balda de Portoviejo.

Al Personal del Departamento de Estadística del Hospital Verdi Cevallos Balda de Portoviejo.

A los Señores Miembros del Tribunal de Tesis.

Los Autores.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Certifico que este trabajo de Tesis titulado **INCIDENCIA DE SÍNDROME DIARREICO AGUDO POR ROTAVIRUS EN MENORES DE 3 AÑOS INGRESADOS EN EL HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA DURANTE ENERO - JUNIO 2005,** ha sido dirigido, asesorado supervisado y realizado bajo mi dirección en todo su desarrollo, y dejo constancia de que es original de los autores Juan Pablo Macias Fernández y Yandri Delgado Mantuano.

_____

Dra. Melania Alcívar
DIRECTORA DE TESIS

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE REVISIÓN Y EVALUACIÓN

Nosotros los miembros del tribunal de Revisión y Evaluación indicamos y certificamos que el trabajo de tesis Titulado: **INCIDENCIA DE SÍNDROME DIARREICO AGUDO POR ROTAVIRUS EN MENORES DE 3 AÑOS INGRESADOS EN EL HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA DURANTE ENERO - JUNIO 2005** se realizó con el cumplimiento de todos los requisitos estipulados por el reglamento General de Graduación de la Universidad Técnica de Manabí.

Dr. Manuel Cabrera PRESIDENTE DE TESIS	Dra. Betsabhé Pico MIEMBRO DE TRIBUNAL

Lcda. Julia Espinel
ASESORA METODOLÓGICA

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

DECLARACIÓN DE AUDITORIA

Juan Pablo Macias Fernández y Yandri Alexander Delgado mantuano, Egresados de la Escuela de Medicina perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Manabí, declaramos que el presente trabajo de investigación titulado“INCIDENCIA DE SINDROME DIARREICO AGUDO POR ROTAVIRUS EN MENORES DE 3 AÑOS INGRESADOS EN EL HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA. ENERO-JUNIO 2005”, es de auditoria propia y como tal será protegido por las leyes establecidas en el Estado Ecuatoriano de derecho tal como se establece en los Artículos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de la Ley de Propiedad Intelectual, por lo tanto la falta de los permisos correspondientes o su mal uso será penalizado por la ley; así mismo se asume todas las consideraciones y responsabilidades que correspondan al mismo.

Portoviejo, Noviembre del 2005

_____ _____

Juan P. Macías Fernández Yandri A. Delgado Mantuano

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

INDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN…….……..pag. 2

JUSTIFICACIÓN…….……...pag. 4

CAPITULO 2

2.1 EL PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA…….…...pag. 5

2.2 OBJETIVOS…….…….pag. 6

****** Objetivo General…….…….pag. 6

** Objetivo Específicos…….……....pag. 6

CAPITULO 3

MARCO TEÓRICO

SÍNDROME DIARREICO AGUDO POR ROTAVIRUS

3.1 Generalidades…….....pag. 7

3.2 historia y etimología…….pag. 8

3.3 Epidemiología…….……..pag. 9

3.4 Agente etiológico…….pag. 12

3.5 Estructura de la partícula viral…….pag. 13

3.5-a Estructura molecular constitucional……...pag. 13

3.5-b Estructura proteica…….…….pag. 15

** Proteínas de la nucleocápside……pag. 15

** Proteínas de la capa intermedia…….pag. 18

** Proteínas de la capa externa…….……..pag. 20

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

** Proteínas no estructurales…….pag. 22

3.5-c Resumen de la estructura viral……..pag. 23

3.6 Características Físico-químicas y funcionales de la partícula viral…….pag. 25

3.7 GENETICA DEL ROTAVIRUS…….pag. 26

3.7- a GENOMA……..…….pag. 26

3.7- b ASIGNAMIENTO GÉNICO……....pag. 28

3.8 Transmisión del rotavirus…….pag. 29

3.9 Inmunidad…….pag. 30

** Lactancia materna: protección contra rotavirus……..pag. 32

3.10 Patogenia……pag. 32

3.11 Fisiopatología…….pag. 35

3.12 Interacción Inicial del virus con la célula huésped……...…….pag. 37

*** 3.12-a Adsorción……...……...pag. 37

*** 3.12-b Penetración…….…….pag. 39

*** 3.12-c Desnudamiento…….……pag. 40

3.13 Cuadro Clínico...…….…..pag. 45

3.14 diagnóstico viral…….…...pag. 47

3.14- a Introducción al diagnóstico viral…….. pag. 47

3.14-b Diagnóstico clínico……....pag. 49

3.14-c Diagnóstico de laboratorio……..…...pag. 50

** Microscopia Electrónica……pag. 50

** Inmunoelectromicroscopia……pag. 51

**Inmunoensayos……....pag. 52

** ELISA, técnica……....pag. 52

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

** Radioinmunoensayo……pag. 54

** Aglutinación con látex……pag. 55

** Inmunofluorescencia……...pag. 55

**Coprocultivo……..…….…….pag. 56

** Técnicas Moleculares: ensayos de

Hibridación y Amplificación de

Ácidos Nucleicos…..…….……..pag. 58

CAPITULO 4

Operacionalización de Variables….…….…….pag. 61

CAPITULO 5

Diseño metodológico……pag. 63

5. 1 Tipo de estudio.....…….....pag. 63

5.2 Área de estudio……..pag. 63

5.3 Criterios de inclusión…….……pag. 63

5.4 Criterios de exclusión……....pag. 64

5.5 Población o universo……pag. 64

5.6 Técnica para la recolección de datos……pag. 64

5.7 Procesamiento de datos……pag. 65

** El Encabezado…..……pag. 65

** Datos de Afiliación……...pag. 65

** Datos Clínicos del SDA por Rotavirus…….……....pag. 66

** Técnicas y Datos de Laboratorio…….…….…pag. 68

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

5.8 Análisis de Datos…….pag. 69

5.9 Tabulación de Datos…….…...…pag. 70

5.10 Presentación de Resultados……..……...pag. 70

CAPITULO 6

Presentación de los resultados…….….pag. 71

CAPITULO 7

Análisis e Interpretación de resultados.....……..pag. 85

CAPITULO 8

Conclusiones……...pag. 95

CAPITULO 9

Recomendaciones……..pag. 98

CAPITULO 10

Recursos...…….…….....pag. 100

Presupuesto……pag. 102

Cronograma de Actividades…….…….…pag. 103

Bibliografía……pag. 105

CAPITULO 11

Anexos……..…….pag. 109

** Ficha bibliográfíca……...pag. 109

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

INDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

DE RESULTADOS

Tabla y gráfico 1…….pag. 71

Tabla y gráfico 2…….pag 72

Tabla y gráfico 3…….pag. 73

Tabla y gráfico 4…….pag. 74

Tabla y gráfico 5…….pag. 75

Tabla y gráfico 6…….pag. 76

Tabla y gráfico 7…….pag. 77

Tabla y gráfico 8…….pag. 78

Tabla y gráfico 9…….pag. 79

Tabla y gráfico 10……..pag. 80

Tabla y gráfico 11……..pag. 81

Tabla y gráfico 12……..pag. 82

Tabla y gráfico 13……..pag. 83

Tabla y gráfico 14……..pag. 84

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

INDICE DE ANEXOS DE CUADROS Y FIGURAS

** Anexo de cuadros…….…….pag.111

Cuadro 1…….……..…….pag.111

Cuadro 2……..…….…….pag.112

Cuadro 3……..……..…….pag.112

Cuadro 4……..…….…….pag.113

Cuadro 5……..…….pag.114

** Anexo de Figuras…….…….…pag.115

Figura 1……..…..pag.115

Figura 2……..……..……..pag.115

Figura 3……..……..……..pag.116

Figura 4……..…….……..pag.117

Figura 5…….……..……..pag.118

Figura 6……..……..pag.119

Figura 7……..…..pag.120

Figura 8……..……...pag.120

Figura 9……..…….……..pag.121

Figura 10……..…….……pag.121

Figura 11……..…….…….pag.122

Figura 12…….……..……pag.122

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

RESUMEN

Estudios Internacionales han demostrado una alta incidencia del etiológico Rotavirus en los pacientes pediátricos de los países en vías en desarrollo, siendo una causa muy frecuente de hospitalización por Síndrome Diarreico Agudo. El objetivo de este trabajo fue de establecer una incidencia de Síndrome Diarreico Agudo por Rotavirus en los menores de 3 años en el área de Hospitalización del Verdi Cevallos Balda durante Enero a Junio del año 2005, para poder representar una significativa estadística real de esta patología en nuestra población manabita.

Se investigó variables como la edad, sexo y procedencia, el método de diagnóstico clínico y de laboratorio empleado para confirmación del etiológico. Para ello se diseñó un estudio descriptivo-retrospectivo, se empleo como área de investigación el área de hospitalización pediátrica del Hospital Verdi Cevallos de Portoviejo, se utilizó para la investigación una población de 131 niños menores de tres años que habían sido ingresados con Diagnóstico de síndrome diarreico agudo. De estos, se determinó que 53 pacientes menores de tres años eran positivos mediante el diagnóstico clínico y el método de laboratorio correspondiendo a un porcentaje de 40,4%. ; de éste último solo se encontró como técnica para la determinación del Rotavirus la Inmunocromatografía en heces fecales ya que es el único estudio técnico que se encuentra en nuestro medio poblacional. Según la edad la más frecuente fue el de los pacientes pre-escolares, deacuerdo al sexo se observo predominio del tipo masculino, como procedencia se encontró una alta frecuencia la localización urbana.

Los resultados encontrados afirman la presencia del etiológico rotavirus en los niños atendidos en el área de hospitalización, confirmando de esta manera su presencia e incidencia en países en vías en desarrollo como el nuestro en los pacientes

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

pediátricos menores de tres años, por lo que debido a ello recomendamos a las autoridades sanitarias que utilicen estos datos para que tengan un conocimiento significativo real, y a futuro empleen métodos de diagnóstico de laboratorio gratuito para nuestros hospitales para realizar una vigilancia epidemiológica de este etiológico para de esta manera mejorar las condiciones necesarias de salud en los niños de nuestra población manabita.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

SUMMARY

International studies have demonstrated a high incidence of the etiologic Rotavirus in the pediatric patients of the countries in roads in development, being a very frequent cause of hospitalization for Acute Syndrome Diarrhea. The objective of this work was of establishing an incidence of Acute Syndrome Diarrhea for Rotavirus in those smaller than 3 years in the area of Hospitalization of the Verdi Cevallos it cripples during January to June of the year 2005, to be able to represent a significant real statistic of this pathology in our population manabita.

It was investigated variables as the age, sex and origin, the method of diagnostic clinical and of laboratory used for confirmation of the etiologic one. For it was designed it a descriptive-retrospective study, you employment as investigation area the area of pediatric hospitalization of the Hospital Verdi Cevallos of Portoviejo, was used for the investigation a population of 131 children smaller than three years that had been entered with Diagnostic of Acute syndrome Diarrhea. Of these, it was determined that 53 patients smaller than three years were positive by means of the clinical diagnosis and the laboratory method corresponding to a percentage of 40,4%.; of this last alone it was as technique for the determination of the Rotavirus the Inmunocromatografía in fecal grounds since it is the only study technician that is in our half population one. In connection with the age the most frequent was that of the pre-school patients, Agreement to the sex one observes prevalence of the masculine type, as origin he/she was a high frequency the urban localization.

The opposing results affirm the presence of the etiologic rotavirus in the children assisted in the area of hospitalization, confirming this way their presence and

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

incidence in countries in roads in development as ours in the pediatric patients smaller than three years, for that that due to we recommend it to the sanitary authorities that use these data so that they have a real significant knowledge, and to future they use methods of diagnostic of gratuitous laboratory for our hospitals to carry out an epidemic surveillance of this etiologic one for this way to improve the necessary conditions of health in our population's manabita children.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Aunque la mortalidad por enfermedad diarreica ha disminuido significativamente en las últimas décadas, la diarrea sigue siendo un problema global de salud pública con un mayor impacto en países en vías de desarrollo en donde esta enfermedad constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad infantil. La OMS estima que en el mundo ocurren aproximadamente [1]100 millones de episodios diarreicos al año y cinco millones aproximadamente de fallecimientos infantiles por esta causa. De estos, el Síndrome diarreico Agudo por Rotavirus constituye uno de los agentes etiológicos virales más importantes de la diarrea infantil en todo el mundo siendo responsable por 1 de cada 20 muertes infantiles en el mundo en vías de desarrollo.

[2]En América latina se indica que el síndrome diarreico por rotavirus es responsable de 75.000 hospitalizaciones y 15.000 muertes anuales, explicando del 10 - 20% de muertes asociadas con gastroenteritis.

En nuestro país, el síndrome diarreico agudo de carácter infeccioso ocupa el séptimo lugar de entre las diez principales causas de mortalidad infantil (ver anexo-cuadro 1), según datos ofrecidos por el CIE-10 durante el año 2003. No se conoce ningún estudio aplicado de investigación Nacional en la determinación del síndrome diarreico agudo por rotavirus.

[1] OMS- 2003
[2] Sexto simposio internacional sobre rotavirus

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Con el presente trabajo se procedió a la realización de un estudio de carácter descriptivo retrospectivo en base a las historias clinicas de los pacientes menores de tres años ingresados en el Departamento de Pediatría del Hospital Verdi Cevallos, que aportaron datos clínicos y de laboratorio sobre la incidencia del síndrome diarreico agudo por Rotavirus, los cuales se obtuvieron mediante el instrumento creado para esta investigación y que se aplicaron en las historias clínicas y estudios de laboratorio que llevaron al diagnóstico, sobre una población base de aproximadamente 131 niños. Una vez establecidos los datos, se trató de agruparlos de acuerdo a la edad pediátrica, sexo, y lugar de procedencia al cual pertenecieron los pacientes. Los datos así obtenidos fueron analizados y tabulados mediante el uso de programas de computadora para establecer las respectivas frecuencias y porcentajes.

Gracias a la información recolectada, se trató de generar una estimación estadística real de la presencia o no de esta patología en los niños de nuestra población manabita durante el periodo de Enero-Junio del año 2005.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo se lo realizó para recompensar en forma recíproca los conocimientos, actitudes y años de estudios otorgados por la muy prestigiosa Escuela de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Manabí, la cual ha viabilizado todas las facilidades necesarias para la formación de nuevos médicos; así mismo, se lo elaborará como requisito previo a la obtención del título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Los resultados de este estudio, servirán para que las autoridades sanitarias tengan un conocimiento significativo y real sobre la morbi-mortalidad del síndrome diarreico agudo por rotavirus en nuestra población infantil manabita, que afecta principalmente a los países en vías de desarrollo como el nuestro, para que por medio de ello, se puedan generar en el futuro medidas preventivas congruentes con la realidad local que beneficien tanto a los niños como a sus familias.

Para realizar este estudio de investigación, se contó con los recursos materiales bibliográficos, estadísticos, económicos, metodológicos y de especialistas pediátricos, necesarios para el desarrollo y ejecución del mismo.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CAPITULO 2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

DEFINICION Y DELIMITACIÓN

El Síndrome diarreico agudo por Rotavirus es una enfermedad caracterizada por diarrea aguda grave asociada o no con vómitos que pueden producir deshidratación, el choque y la muerte. Constituye una enfermedad democrática dado que infecta a todos los niños, tanto ricos como pobres.

La principal ruta de transmisión de los rotavirus es la vía fecal-oral, aunque también se ha especulado que el contacto persona a persona, el contacto con secreciones respiratorias, y/o el contacto con superficies contaminadas pudieran ser fuentes de transmisión, ya que los altos índices de infección por este virus en los primeros tres años de vida en todo el mundo son independientes de las condiciones higiénicas y sanitarias.

En Manabí, no se conocen estudios o casuísticas sobre Síndrome diarreico agudo por rotavirus. Es por lo expuesto anteriormente, se propone el siguiente problema científico:

¿Cuál es la incidencia de síndrome diarreico agudo por rotavirus en menores de 3 años ingresados en el hospital Verdi Cevallos Balda durante Enero - junio 2005?

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la incidencia de síndrome diarreico agudo por rotavirus en los niños menores de tres años ingresados al área de hospitalización pediátrica durante enero a junio del 2005.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar la incidencia del síndrome diarreico agudo causado por rotavirus.

2. Establecer algunos factores biológicos y demográficos asociados al problema:

- Sexo
- Grupo etario
- Lugar de procedencia.

3. Determinar métodos diagnósticos: clínico y laboratorio.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CAPITULO 3
MARCO TEÓRICO

SINDROME DIARREICO AGUDO POR ROTAVIRUS

3.1 GENERALIDADES

La diarrea aguda, actualmente sigue constituyendo un gran problema de salud pública en la mayoría de los países en desarrollo siendo causa de importante morbi-mortalidad durante la infancia, especialmente por su relación con la desnutrición y los altos costos que implica para los sistemas de salud por su alta demanda de atenciones ambulatorias y hospitalizaciones.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año se presentan alrededor de 100 millones de episodios de diarrea aguda en niños menores de cinco años en países en desarrollo y 5 millones de muertes infantiles se deben por esta causa; esta, a su vez relacionada en el 50-70% de los casos con deshidratación.

Desde 1973 se identifico al rotavirus como uno de los agentes causante de diarrea más importantes de gastroenteritis en lactantes y niños pequeños; [3]estimaciones de la Organización Mundial de la Salud indican que alrededor de 440.000 niños menores de 5 años mueren al año debido a la infección producida por rotavirus tanto en países desarrollados como en los países en vías de desarrollo, explicando en estos últimos el 10 - 20% de muertes asociadas con gastroenteritis infecciosa.

[3] OMS-2003

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Los factores de riesgo para la presentación de esta entidad se asocian a deficiencias higiénicas que facilitan la transmisión fecal-oral, niños de guarderías, individuos que migran a países en vías de desarrollo o áreas insalubres. Otro grupo lo constituyen los niños inmuno-comprometidos en quienes la diarrea se prolonga, complicaciones y excreción prolongada, así como desnutrición severa.

3.2 HISTORIA Y ETIMOLOGIA

En el año de 1929, Zahorsky describió la "enfermedad de vómitos invernales", la cual en su estudio de forma retrospectiva, probablemente correspondía en su mayor parte a gastroenteritis por rotavirus. Los rotavirus en humanos fueron inicialmente descritos en 1973 por Ruth Bishop y colaboradores en Australia, quienes encontraron la presencia de partículas virales al observar al microscopio electrónico biopsias de Intestino delgado de niños entre los 6 meses a 9 meses de edad que tenían diarrea aguda severa de origen no bacteriano. La literatura inicial les dio nombres como reovirus, orbivirus, duovirus y virus de la gastroenteritis infantil. Como resultado y en base a la morfología de estos virus, cuya apariencia al microscopio electrónico era la de una rueda de carreta antigua, estos virus fueron bautizados con el nombre de rotavirus, del latín rota, que quiere decir rueda.

Inicialmente resultó más fácil adaptar a crecer en cultivo de tejidos a varios tipos de rotavirus aislados de animales, a diferencia de los rotavirus aislados de humanos que resultaron ser difíciles de adaptar, por lo que el conocimiento de la bioquímica y la biología molecular de los rotavirus aislados de animales avanzó mucho más

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

rápidamente. Sin embargo, los conocimientos que hemos adquirido en estas áreas estudiando a los rotavirus aislados de especies animales se han podido extrapolar, en general, a los rotavirus aislados de humanos. Dentro de las cepas de rotavirus más estudiadas se encuentran dos cepas provenientes de simio; el rotavirus SA11 (Simian Agent-11), aislado de un mono verde africano y el rotavirus RRV (rhesus rotavirus), aislado de un mono rhesus. La mayoría de la información es extrapolable, en lo general, a la gran mayoría de las cepas de rotavirus del grupo A. Desde entonces, estos virus han sido reconocidos como el principal agente etiológico de las gastroenteritis virales en las crías de un gran número de mamíferos (incluyendo al hombre), y de aves, y también se ha generado una gran cantidad de información sobre las propiedades biológicas y epidemiológicas de estos virus.

3.3 EPIDEMIOLOGÍA

Si bien en las dos últimas décadas, la mortalidad infantil por diarrea en el mundo disminuyó de 4,6 millones de muertes anuales estimadas a 1,56 millones, el rotavirus sigue siendo considerado como la causa principal de gastroenteritis grave en la infancia en el mundo. Los investigadores aun no tienen un panorama completo del alcance real. La vigilancia hospitalaria ha sido irregular y los cálculos de la prevalencia mundial dependen de informes de más de 15 años de antigüedad. Pero, actualmente, los investigadores en muchas partes del mundo están intensificando sus esfuerzos para obtener un panorama actualizado de dicha prevalencia y de establecer

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

mapas epidemiológicos sobre la distribución mundial de esta epidemia (ver anexo-figura 1). [4]

Actualmente se considera, que el Síndrome diarreico agudo por Rotavirus, cobra la vida de más de 600.000 niños todos los años, más de 80% en los países en desarrollo, considerándose la principal causa de hospitalización y la única causa más importante de muertes por diarrea en los niños de hasta cinco años de edad en el mundo, siendo responsable de 75.000 hospitalizaciones y 15.000 muertes anuales en América Latina. En países en vía de desarrollo los rotavirus explican del 10 - 20% de muertes asociadas con gastroenteritis.

El Dr.Umesh Parashar et al, de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos, presentó y publicó durante el sexto simposio internacional sobre rotavirus, datos nuevos que sugieren que la cantidad de muertes anuales en relación con el rotavirus de niños menores de 5 años de edad alcanza 608.400 o 39% de las muertes a raíz de la diarrea. Esto es considerablemente superior al cálculo mundial anterior de 440.000 muertes infantiles o 22% de las muertes a raíz de diarrea dictadas anteriormente por la OMS. Si bien las cifras nuevas se basaron en un examen riguroso de los estudios publicados a partir de 2000, el cálculo anterior utilizó estudios llevados a cabo entre 1986 y 1999. El nuevo análisis comprendió 41 estudios, 18 de los cuales de países de ingresos bajos, y medianos, y cada uno con 100 pacientes como mínimo.

[4] Datos del sexto simposio internacional sobre rotavirus 2004

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Determinó que 39% de los niños con diarrea grave estaban infectados por el rotavirus. En consecuencia, se calculó el número total de muertes en relación con el rotavirus en el orden de 39% del 1,56 millones de muertes infantiles anuales debido a la diarrea, o 608.400. Las explicaciones posibles para las tasas más altas en estudios más recientes, se debieron a el uso de mejores métodos de detección y la posibilidad de que la higiene y el saneamiento mejorados hayan reducido las diarreas bacterianas y parasitarias más que las diarreas víricas.

Además, se estableció que los distintos Centros de Salud en mayor y menor medida, ofrecen los controles de prevalencia adecuados de anticuerpos en sueros de los niños en casi todo el ámbito mundial, casi todos los niños están infectados por rotavirus en los 3 primeros años de vida, siendo su mayor incidencia entre los lactantes y pre-escolares (6 a 24 meses de edad). Se determinó que deacuerdo al sexo no existe un predominio claro, aunque estudios actuales propuestos en el sexto simposio sobre rotavirus revelaron una inclinación sobre el sexo masculino que el femenino.

Se ha identificado a rotavirus todo el año con incidencia mayor en otoño e invierno. Su mecanismo de transmisión es fecal oral, aunque también se ha postulado la vía respiratoria.

El periodo de incubación es de 1 a 3 días y su excreción de 8 a 15 días; el reservorio para la persistencia de rotavirus entre las epidemias invernales aun es desconocido. Actualmente se han identificado 7 grupos de rotavirus de la A-G, de los cuales sólo los grupos A, B y C se han asociado a gastroenteritis en humanos y la mayoría de las casos se han asociado a cepas del grupo A, basándose en la sero-

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

tipificación la glicoproteína vp7 y vp4 que constituyen la hemoglutina del virus y la probable proteína de fijación. Los rotavirus son relativamente resistentes a los desinfectantes utilizados habitualmente para superficies duras y a los aspectos higiénicos para el lavado de manos, pero son inactivados por cloro y dióxido de cloro.

3.4 AGENTE ETIOLÓGICO

Los Rotavirus pertenecen a la familia reoviridae. Los miembros de esta familia de virus presentan las siguientes características comunes:

a) Las partículas virales tienen una geometría icosahédrica
b) No están envueltos por una membrana lipídica.
c) Tienen un genoma compuesto por segmentos de ARN de doble cadena.
d) El ARN genómico no es infeccioso per se en ausencia de las proteínas virales.
e) La partícula viral contiene todas las enzimas necesarias para la producción de sus ARNs mensajeros.
f) La replicación viral se lleva a cabo exclusivamente en el citoplasma de la célula.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.5 ESTRUCTURA DE LA PARTICULA VIRAL

3.5 –a *ESTRUCTURA MOLECULAR CONSTITUCIONAL*

Su tamaño aproximado es de 70 nm y tiene un aspecto exterior de una rueda de carreta antigua, su genoma viral consiste en 11 segmentos separados de RNA viral bacteriano de doble cadena. Cada segmento representa un gen que codifica una de las proteínas estructurales y no estructurales del virus. Estos segmentos se pueden separar por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de nitrato de plata, observando patrones electroforéticos característicos de RV. Estudios realizados recientemente, utilizando criomicroscopía electrónica y reconstrucción de imágenes, han permitido realizar análisis detallados de las características estructurales de la partícula viral ó virión, con una resolución de aproximadamente 26 Å.

Las partículas virales tienen aproximadamente 75 nm de diámetro, con una geometría icosahédrica. El virión maduro está compuesto por tres capas concéntricas de proteína que engloban al genoma viral. La capa externa del virión esta formada por 780 moléculas de la glicoproteína VP7. De esta capa lisa se proyectan 60 espículas de 12 nm de longitud constituidas por dímeros de la proteína VP4; la base de éstos dímeros de VP4 interacciona con la capa intermedia del virión. Esta capa intermedia, de aproximadamente 10 nm de grosor, consta de 260 unidades morfológicas constituidas por trímeros de la proteína VP6, esta proteína es la más abundante del virus, constituyendo aproximadamente el 50% de la proteína total del virión. La capa intermedia, a su vez, rodea a la capa más interna del virión o nucleocápside, que está formada por 60 dímeros de la proteína VP2, la cual engloba al genoma viral. Una copia de la proteína VP1 y una de VP3 están asociadas con la

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

cara interna de la capa de VP2, y localizadas en los doce vértices del icosahedro, donde se ha propuesto que llevan a cabo su función de replicar y modificar los genes del virus. También dentro de esta nucleocápside se encuentran los once segmentos de ARN de doble cadena (ARNdc) que constituyen el genoma del virus. (Ver anexo figura 3)

Los estudios de criomicroscopía electrónica han revelado que estos segmentos de ARN parecen estar también ordenados geométricamente dentro de la partícula, y se ha propuesto que de los aproximadamente 18,500 pares de bases (pb) que constituyen al genoma viral, cerca de 4,500 pb están organizados con una simetría que parece depender del ensamble icosahédrico de VP2, la cual al hacer contacto con los segmentos de ARN, induce en estos su organización. Tomando en conjunto todas estas observaciones, se ha sugerido que las proteínas VP1, VP2 y VP3 están involucradas en la organización del genoma dentro de la nucleocápside mediante interacciones ARN-proteína.

La existencia de cada una de las capas proteicas del virus, así como las interacciones que existen entre VP7 y VP4, y de estas proteínas con VP6, han sido corroboradas mediante la producción de pseudo-partículas virales, a través de la co-expresión de los genes que codifican para cada una de estas proteínas (VP2, VP6, VP4 y VP7), en sistemas de expresión heterólogos, como el sistema de células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes. Estos experimentos también han demostrado que las proteínas virales tienen la habilidad intrínseca de auto-ensamblarse.

Por criomicroscopía electrónica se ha observado que la partícula viral completa contiene 132 canales acuosos, que han sido clasificados en tres grupos (I, II y III)

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

dependiendo de sus características de simetría y tamaño. Estos canales atraviesan a la partícula viral desde la capa externa hasta la nucleocápside. Aún no es claro el papel que juegan estos canales durante el ciclo de replicación del virus, sin embargo se ha propuesto que podrían estar involucrados en la entrada de los metabolitos necesarios para la transcripción del ARN dentro de la partícula de doble capa, así como de la salida de los transcritos virales. De hecho, recientemente al observar por criomicroscopía electrónica partículas virales activas en el proceso de transcripción, se ha encontrado que los ARN mensajeros (ARNm) virales salen de la partícula a través de los canales tipo I, que se encuentran localizados en los 12 vértices de la partícula icosahédrica, en los que también se localizan las proteínas VP1 y VP3.

3.5 –b *ESTRUCTURA PROTEICA*

*** Proteínas de la nucleocápside***

Las proteínas que conforman la nucleocápside son VP1, VP2 y VP3. Como ya mencionamos, es en estas partículas donde se lleva a cabo la replicación del ARN viral. La actividad responsable de esta función, la ARN polimerasa dependiente de ARN, forma complejos con otras proteínas virales. Las proteínas que constituyen los complejos varían, dependiendo de si la función del complejo es la de sintetizar ARN de doble cadena utilizando como templado el ARNm (partículas replicativas), o si se trata de sintetizar ARN mensajeros a partir del ARN de doble cadena (partículas activas en transcripción).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Recientemente se implementó un sistema libre de células para estudiar la replicación del genoma viral. Este sistema, que consiste en nucleocápsides que han sido "abiertas" por exposición a bajas concentraciones de sales a las cuales se les añade ARNm viral, para que sea transformado en ARNdc, ha sido bien caracterizado y ha sido utilizado para definir el papel de cada una de las proteínas involucradas, así como las regiones en los ARNm que son necesarias para que estos puedan ser replicados. También se ha implementado un sistema similar partiendo de la co-expresión de las proteínas virales (VP1, VP2 y VP3) en células de insecto. Estas tres proteínas se ensamblan de manera espontánea, y tienen actividad de replicarse si se les añade ARNm viral. Esto ha permitido determinar de manera más fina la importancia de cada una de las proteínas en la replicación del ARN. En estos sistemas se ha observado que el ARNm funciona eficientemente como templado para la síntesis del ARNdc, sin embargo, el ARNdc viral no sirve como templado para la síntesis de ARNm, lo que es consistente con la observación de que los requerimientos estructurales, o las proteínas requeridas para la transcripción (síntesis del ARNm) son diferentes de los requerimientos para la replicación (síntesis de la cadena complementaria del ARNm). Los estudios realizados en este sistema de replicación, han demostrado que VP2, y no VP6, es esencial para la actividad de replicación de la partícula. Estos resultados indican también que las partículas que forman la nucleocápside, o un subgrupo de estas proteínas, tienen la función tanto de replicasas, como de transcriptasas.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

VP1. (Ver anexo-figura3) A pesar de que aún no existe evidencia directa para afirmar cual de las proteínas virales de la nucleocápside es la ARN polimerasa dependiente de ARN, la proteína VP1 (de 1088 aminoácidos), producto del gen 1 es la más probable, por las siguientes razones:

I. La secuencia de la proteína contiene regiones que tienen homología con motivos conservados entre la ARN polimerasas dependientes de ARN de otros virus.
II. VP1 está presente en partículas virales transcripcionalmente activas, y se puede entrecruzar con el ARNm, utilizando luz ultravioleta como agente entrecruzador.
III. VP1 es componente común de las partículas virales con actividad de ARN polimerasa (transcriptasa o replicasa). Además los complejos de VP1-VP2 co-expresados en células de insecto tienen la propiedad de sintetizar ARNdc in vitro a partir de ARNm viral.

VP2. (Ver anexo-figura3) El producto del gen 2, VP2, de 881 aminoácidos, es la proteína más abundante de la nucleocápside, y constituye la capa más interna del virus. Cuando esta proteína se expresa por si sola con el sistema de baculovirus se ensambla en partículas similares a las nucleocápsides, lo que sugiere que VP2 no depende de otros productos virales (ARNs o proteínas) para formar este tipo de partículas. VP2 es capaz de unirse a ARNs de cadena sencilla o doble, aunque tiene una mayor afinidad por los ARNs de cadena sencilla, función que podría estar relacionada con el empaquetamiento de los ARNs virales dentro de la nucleocápside.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

En experimentos de reconstitución utilizando proteínas purificadas, se ha encontrado que aunque muy probablemente VP1 es la ARN polimerasa viral, esta requiere de VP2 para realizar su función.

VP3. (Ver anexo-figura3) Esta proteína, de 835 aminoácidos, es codificada por el segmento de ARN 3, es una proteína básica, y al igual que VP1 existen muy pocas copias de este polipéptido por virión. A VP3 se le ha atribuido la actividad de guanilil-transferasa del ARN viral por las siguientes observaciones:

I. Tiene una alta afinidad por ARN de cadena sencilla y no se une al ARN de doble cadena.
II. Su secuencia contiene motivos estructurales que se han encontrado en otras guanilil-transferasas.
III. Une GTP de modo covalente en una reacción reversible. Dado que esta actividad es necesaria para la síntesis de los ARNs maduros, pero no para los ARNdc, VP3 debe de ser un componente esencial de los complejos de transcripción y no de los complejos replicativos. De hecho, como ya mencionamos, los complejos de VP1-VP2 producidos en el sistema de baculovirus recombinante, son capaces de replicar ARNm.

***** Proteínas de la capa intermedia***

La capa intermedia del virus esta formada por la proteína más abundante del virión, VP6, codificada por el gen 6 (color azul intermedio - anexo figura 3). Esta proteína, de 397 aminoácidos, juega un papel muy importante en la estructura del virión dado

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

que interacciona tanto con la proteína VP2, hacia el interior de la partícula, como con VP4 y VP7 en la capa externa del virión. VP6 forma espontáneamente trímeros y es muy estable; esta característica y el hecho de que contiene determinantes antigénicos (o epítopes) conservados entre diferentes cepas de rotavirus, son la razón de que VP6 sea el blanco antigénico principal en los ensayos de diagnostico inmunológico para los rotavirus. Los epítopes de VP6 que son conservados entre todas las cepas de rotavirus del grupo A son llamados epítopes de grupo. En esta proteína también se han identificado otros epítopes, llamados epítopes de subgrupo, los cuales han sido utilizados como marcadores epidemiológicos para clasificar diferentes cepas dentro del grupo A.

Aparentemente el papel de VP6 en esta función es principalmente estructural, a través de mantener la conformación apropiada, o la organización del complejo transcripcional en la nucleocápside viral.

Recientemente se resolvió la estructura cristalográfica de esta proteína. Sabemos que la unidad estructural de VP6 es un trímero, y que en este trímero existen un sitio de unión al ion calcio, y un sitio de unión al ion zinc, aunque aún no es claro cual es la función de estos iones en la partícula viral. Esta proteína es hidrofóbica y altamente antigénica e inmunogénica.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

*** Proteínas de la capa externa*

La capa más externa del virus esta formada por las proteínas VP4 y VP7, que son las proteínas responsables de los primeros contactos con la célula huésped y por lo tanto tienen funciones que determinan la infectividad del virus, tales como:

A. La determinación del rango de huésped del virus
B. La unión y la penetración del virus a la célula,
C. Son las principales inductoras de anticuerpos neutralizantes.

VP7 (color amarillo exterior anexo figura 3). Es la segunda proteína más abundante en el virión y es codificada por el segmento de ARN 7, 8, o 9 dependiendo de la cepa de rotavirus que se analice. Esta proteína es altamente inmunogénica y es muy buena inductora de anticuerpos neutralizantes, que son serotipo específicos;

Por estudios bioquímicos se conoce que VP7 es glicosilada co-transduccionalmente a medida que se inserta en el lumen del Retículo endoplasmático y la señal para esta inserción se encuentra contenida en el péptido señal presente en el extremo amino de VP7. La proteína VP7 es retenida en la membrana del RE, sin embargo no contiene la secuencia típica de retención en RE, lo que ha sido motivo de estudio para determinar la señal que le permite a esta proteína mantenerse como proteína residente en el RE.

Aún no se ha determinado ninguna función en la que VP7 participe directamente durante las primeras interacciones del virus con su célula huésped. Sin embargo, VP7

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

puede afectar la expresión de diferentes fenotipos y las propiedades antigénicas de VP4. Esto probablemente es el resultado de la interacción íntima de VP4 y VP7 en la superficie del virión.

También se ha observado que fenotipos, como la capacidad de formar placas, el tamaño de placa, y la especificidad de unión al receptor, que son características especificadas por VP4, son afectados por el fondo genético y dependen del origen parental de ambas proteínas de la capa externa.

VP4 (Pedículo exterior rojo anexo- figura 3) Es la otra proteína de capa externa y es codificada por el segmento de ARN 4. Esta proteína, de 776 aminoácidos tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del virus, incluyendo la unión al receptor y la penetración a la célula. Por lo tanto, las propiedades de esta proteína son determinantes importantes del rango de huésped, virulencia, tropismo, e inducción de inmunidad protectora. Esta proteína tiene varios dominios funcionales, los cuales se discuten a continuación:

- La infectividad de los rotavirus se incrementa, y muy probablemente depende, del tratamiento del virus con tripsina. Este tratamiento proteolítico resulta en el rompimiento específico de VP4 (776 aa) en dos polipéptidos de menor peso molecular, llamados VP8 (aa 1-131) y VP5 (aa 247 a 776). El corte de VP4 no afecta la unión a la célula, y más bien ha sido asociado con la entrada del virus al citoplasma celular, por penetración directa. El mecanismo por el cual el corte con tripsina activa la infectividad viral se

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

desconoce aún, sin embargo, se ha propuesto que la penetración del virus puede ser iniciada por los extremos recién generados por el corte con tripsina o por un posible cambio conformacional de VP4 a consecuencia del corte con esta proteasa.

- Algunas cepas de rotavirus de origen animal tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos, y esta aglutinación es mediada por la interacción de VP4 con el ácido siálico (AS) presente en la superficie de los eritrocitos.
- VP4 contiene dos puentes di-sulfuro intramoleculares, uno entre las cisteínas en VP8, y otro entre las cisteínas en VP5. El puente di-sulfuro en VP5 se encuentra conservado en todas las cepas de rotavirus, mientras el puente di-sulfuro en VP8 no se encuentra en la mayoría de las cepas de origen humano. La relevancia biológica de estos puentes no se ha demostrado aún.
- La proteína VP5 tiene la capacidad de unirse específicamente a la superficie de las células, y esta interacción se da con la integrina a2b1, a través de la secuencia DGE presente en la posición 308-310 de VP5.
- En VP5 existe una región hidrofóbica la cual comparte homología con el dominio de fusión de la proteína E1 de los virus Sindbis y Semliki. Esta región tiene la actividad de permeabilizar liposomas *in vitro*, sin embargo su funcionalidad in vivo aún no ha sido demostrada.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales de rotavirus, NSP1 a NSP6, son codificadas por los segmentos 5, 7, 8, 10 y 11, respectivamente. Como su nombre lo indican estas proteínas no forman parte de la estructura del virión. Son sintetizadas en el citoplasma de la célula durante la infección y tienen funciones relacionadas con el control de la síntesis de proteínas celulares y virales, con la replicación del genoma, con el empaquetamiento de los genes virales y con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula, aunque aún no se define completamente el papel de cada una de ellas en estas funciones. (Anexo figura 3)

3.5-c RESUMEN DE LA ESTRUCTURA VIRAL

En resumen, los rotavirus no contiene envoltura y principalmente consisten por su importancia para el desarrollo de la enfermedad, en una cápside externa (dos proteínas vp4 y vp7) y un core (nucleocápside).

****** La cápside externa***, esta estructurada por la proteína VP4 que está involucrada en una variedad de funciones como virulencia, aglutinación de glóbulos rojos y la penetración del virus a la célula. Por su parte, la VP7 es responsable de la unión inicial del virus a la célula blanco. Ambas proteínas de superficie contienen determinantes antigénicos, que representan blancos inmunológicos importantes e inducen respuesta inmune humoral y celular.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

La respuesta humoral (anticuerpos) tiene la capacidad de neutralizar la infectividad del virus tanto *in vitro* (cultivo de tejidos) como *in vivo* (animales experimentales).

La especificidad de estos anticuerpos para neutralizar diferentes cepas de rotavirus ha sido usada para clasificarlos en varios serotipos. Se ha propuesto nombrar *G* a los serotipos de VP7 (por glicoproteínas) y *P* a los serotipos de VP4 (por proteína sensible a proteasa). Basados en VP7 se han identificado a la fecha 14 serotipos diferentes de rotavirus del grupo *A*, de los cuales nueve infectan al humano (G1 a G4, G6, G8 a G10 y G12), aunque sólo cuatro de ellos (G1 a G4) son los responsables de la mayoría de las infecciones.

*** ***El core*** o nucleocápside, está formado por 4 proteínas vp1 vp2 vp3 y vp6 (que constituyen el 50% de la masa viral y el 80% del core viral) y de 6 proteínas no estructurales (NS53, NS34, NS35, NS28, NS26 y NS12) también son producidas durante la infección final.

Con base en las características antigénicas presentes en la proteína VP6 de la cápside interna se pueden clasificar en:

a) Grupos de A - G, de los cuales, los tres primeros se han reportado en humanos y animales, mientras que de la D a la G solo se han detectado en animales.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

b) Subgrupos denominados I y II, de los cuales el I se ha encontrado tanto en humanos como en animales y se asocia con un patrón electroforético corto, en tanto que el subgrupo II sólo se presenta en humanos y se asocia con un patrón electroforético largo.

Los rotavirus del grupo A son los principales agentes de diarrea infecciosa aguda, tanto en los niños como en los animales jóvenes (ver anexo cuadro 2)

3.6 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE LA PARTICULA VIRAL

Existen dos tipos de partículas virales con diferentes características estructurales y funcionales:

a. La partícula completa, que contiene las tres capas proteicas, es también llamada TLP (Triple-Layered Particle); esta es la partícula infecciosa ya que la presencia de la capa externa formada por las proteínas VP4 y VP7 le permite unirse y penetrar a su célula huésped.
b. La partícula que contiene dos capas proteicas o DLP (Doble-Layered Particle); esta partícula no es infecciosa, pero es activa transcripcionalmente.
c. Las partículas que contienen una sola capa de proteínas, o nucleocápsides, que tienen la actividad de replicar al genoma viral.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Además de tener diferentes actividades biológicas, estas partículas tienen diferentes propiedades fisicoquímicas. Entre estas vale la pena mencionar el hecho de que tienen diferentes densidades, lo que nos permite separarlas mediante gradientes de cloruro de cesio. También, dada su diferencia en tamaño, estos tres tipos de partículas pueden ser separadas mediante electroforesis en gel de agarosa.

Las partículas de rotavirus son relativamente estables. Las partículas virales son funcionales en un rango de pH de 3 a 9, y el virus es estable por meses a 40C, y aún a 200C cuando se mantiene en 1.5mM de calcio. La partícula completa mantiene su integridad y su infectividad cuando es tratada con solvente orgánico tales como éter, cloroformo o freón, lo que refleja la ausencia de lípidos en su estructura. Pero pierde su infectividad al ser tratada con desinfectantes tales como formalina, cloro, betapropiolactona y etanol al 95%, quizás por la perdida de la capa externa.

3.7 GENÉTICA DEL ROTAVIRUS

3.7-a GENOMA

El genoma de los rotavirus está constituido por once segmentos de ARN de doble cadena, (ARNdc) cuyos tamaños varían de aproximadamente 660 pb del gen más pequeño, hasta aproximadamente 3300 pb para el gen más grande. Esta diferencia de tamaños permite que estos segmentos al ser separados electroforéticamente presenten un patrón característico, típico y único para los rotavirus, lo que ha sido la base para

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

desarrollar un método diagnóstico para estos virus. En general el patrón electroforético, o electroferotipo, consiste de un grupo de cuatro segmentos de ARN de alto peso molecular; 5 segmentos de tamaño mediano (5 a 9) que incluyen un triplete muy característico formado por los segmentos 7, 8 y 9; y los dos segmentos más pequeños.

Como ya se ha mencionado, el genoma viral desnudo (en ausencia de las proteínas de la cápside) no es infeccioso, ya que para transcribirse, este genoma necesita de una ARN polimerasa que pueda utilizar ARN como molde. Esta polimerasa no se encuentra en las células, por lo que el virus debe de proveer esta actividad para garantizar su replicación.

Los ARN mensajeros (ARNm) de rotavirus contienen la estructura de CAP en su extremo 5', pero a diferencia de la mayoría de los ARNm celulares, no tienen poli(A) en su extremo 3'. En general, la secuencia nucleotídica de los genes virales es rica en A/T (58-67%). Cada segmento de ARN codifica por una proteína viral, excepto el gen 11 el cual contiene dos marcos abiertos de lectura, los cuales codifican dos proteínas virales. En la mayoría de los casos la traducción de los ARNm comienza en el primer codon de inicio.

Como mencionamos anteriormente, el genoma de estos virus se puede rearreglar, esto es que cuando una célula es co-infectada por dos cepas distintas de rotavirus, la progenie viral resultante de esta co-infección es una población de virus que contiene diferentes combinaciones de los diferentes genes parentales. La animación 2 ilustra una analogía a este proceso de rearreglo génico comparándolo con un juego de barajas. Este tipo de rearreglos génicos entre rotavirus de diferentes cepas es posible

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

gracias a las secuencias consenso que comparten todos los segmentos del genoma viral y es una fuente de variabilidad génica de esta familia de virus.

También, recientemente se ha reportado que en las regiones no traducidas de los mensajeros de los rotavirus existen señales de replicación que actúan en cis. Entre estas, se ha definido una señal promotora mínima, esencial para la síntesis de la hebra negativa de ARN (que es la hebra de ARN complementaria al mensajero o hebra positiva) durante la replicación del genoma, la cual esta formada por los últimos siete nucleótidos del extremo 3'. Se han identificado otras dos regiones adicionales, que funcionan como reguladores positivos, ya que en presencia de estas secuencias se obtiene un nivel optimo de síntesis de los ARNm virales; estas secuencias consisten de aproximadamente 25 nucleótidos, inmediatamente "río arriba" de la región promotora del extremo 3' y de al menos 10 nucleótidos en el extremo 5' del ARNm.

3.7-b ASIGNAMIENTO GÉNICO

Que proteína es codificada por cada segmento de ARN viral? Esta pregunta se abordó inicialmente mediante la traducción in vitro de cada uno de los ARN mensajeros virales y/o analizando las proteínas producidas por virus rearreglados provenientes de coinfecciones con dos cepas de virus diferentes. Los primeros asignamientos génicos completos se llevaron a cabo con el rotavirus de simio SA11.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

En la figura 3 de los anexos se muestra este asignamiento. Las proteínas estructurales del virus, es decir aquellas que conforman la partícula viral, se denominan con el prefijo VP (Viral Protein).

Seis de los genes virales, los genes 1, 2, 3, 4, 6, y 9 codifican por las proteínas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7, respectivamente. Los 5 genes restantes (segmentos 5, 7, 8, 10 y 11) codifican por las seis proteínas no estructurales, las que se denominan con el prefijo NSP (Non Structural Protein). Estas proteínas, que no forman parte del virión, se sintetizan en la célula durante el ciclo replicativo del virus y tienen funciones que discutiremos más adelante.

Algunas de las proteínas virales sufren modificaciones post- traduccionales, tales como glicosilación, fosforilación, o cortes proteolíticos. Estas modificaciones alteran el peso molecular aparente de las proteínas, por lo que los pesos moleculares que se pueden predecir en base al número de aminoácidos que contiene cada proteína, no correlaciona en algunos casos con el peso molecular observado para una proteína dada.

3.8 TRANSMISIÓN

La principal ruta de transmisión de los rotavirus es la vía fecal-oral, aunque también se ha especulado que el contacto persona a persona, el contacto con secreciones respiratorias, y/o el contacto con superficies contaminadas pudieran ser fuentes de transmisión, ya que los altos índices de infección por este virus en los primeros tres

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

años de vida en todo el mundo son independientes de las condiciones higiénicas y sanitarias. También se han descrito brotes en guarderías y residencias de ancianos. La infección es especie-específica (RV-humano); ya que la transmisión de rotavirus entre el hombre y animales no ha sido documentada, en investigaciones aleatorias realizadas en epidemias de diarrea por RV que se presentaron en Australia, EE.UU., Israel, Japón, Tailandia y Brasil entre 1974 y 1993, caracterizadas por manifestaciones clínicas severas, en niños menores de 5 años de edad; se encontró que algunas de las cepas infectantes tuvieron una marcada homología genética mayor del 90% con cepas provenientes de gatos, perros, cerdos, vacas y caballos (Ver anexo cuadro 3).

La presencia de RV de animales en estas epidemias presupone que la transmisión interespecies de este agente puede estar ocurriendo de manera natural y pudiera estar participando en forma importante en la evolución de los RV. Sin embargo, a pesar de la alta homología genética con las cepas aisladas en animales, la transmisión de una especie a otra no se ha podido comprobar en la naturaleza.

3.9 INMUNIDAD

Los estudios sobre inmunidad protectora a raíz de la infección por rotavirus o de las vacunas contra el rotavirus ayudan a los científicos a comprender la gama completa de respuestas biológicas de la protección contra la infección. Ruiz-Palacios describió las respuestas inmunitarias asociadas más estrechamente con la protección contra las

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

infecciones subsiguientes. Señaló que, de manera contraria a la mayoría de las infecciones víricas sistémicas como parotiditis o sarampión, en la cual una infección única protege plenamente contra la reinfección futura, son necesarios varios episodios de rotavirus antes de que un niño esté protegido completamente.

Con cada infección adicional por rotavirus disminuye la gravedad de los síntomas y aumenta la inmunidad. Los científicos están en condiciones de usar el nivel de anticuerpo que se encuentra en membranas mucosas, IgA, como una medida de penetración de las vacunas, es decir, para determinar si un lactante vacunado fue infectado por la cepa y desarrolló una respuesta inmunitaria.

Los investigadores aún analizan las proteínas del rotavirus que obtienen la respuesta inmunitaria humana más fuerte y si esas respuestas son homotípicas (eficaces contra solo una cepa del virus) o heterotípicas (efectivas contra más de una cepa vírica). El Dr. Harry Greenberg, de la Universidad de Stanford, analizó los conocimientos disponibles sobre la respuesta inmunitaria al rotavirus. Hizo notar que una respuesta inmunitaria dirigida al menos a dos proteínas víricas, VP4 y VP7, produce ambas formas de inmunidad. Mencionó que “el tipo de inmunidad que se tiene cuando hay protección depende del tipo de anticuerpo que se ha generado”. También facilitó nuevos datos preliminares de la Dra. Mary Estes que indican que incluso otra proteína del rotavirus, NSP4, provoca una respuesta inmunitaria en los ratones. No obstante, esto no se ha estudiado aún en los seres humanos.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

También se ha determinado que ciertas secciones del sistema inmunitario intervienen en la lucha contra el rotavirus. Si bien las células T contribuyen a la eliminación de una infección, las células humanas B son fundamentales para superar el rotavirus. Pero a fin de atacar el virus, las células B primero deben llegar al sitio de la infección en el intestino. Greenberg describió en un trabajo reciente como ha identificado algunas de las moléculas y los receptores que ayudan a las células B a localizar su blanco: la integrina ±4<7 y al menos dos receptores de quimioquinas, CCR9 y CCR10.

*** LACTANCIA MATERNA: PROTECCIÓN CONTRA EL ROTAVIRUS*

La lactancia materna ayuda a proteger contra la infección por el rotavirus, según un nuevo análisis de un estudio presentado por el Dr. Ruiz Palacios durante el último simposio internacional sobre rotavirus, determinó en una población de 400 bebés, amamantados o alimentados con biberón, que los beneficios de la lactancia materna cambian con la edad del niño. De los bebés amamantados menores de 6 meses de edad, la mitad estuvo completamente protegida contra la infección por rotavirus. En total, los estudios de cohortes han revelado una protección del 40% obtenida con la lactancia materna durante el primer año de vida de un bebé. Una proteína en la leche materna, la lactaderina, parece proteger contra la infección sintomática por rotavirus.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.10 PATOGENIA

Este virus infecta y destruye en forma selectiva a las vellosidades del intestino delgado con aplanamiento de las vellosidades y un infiltrado por las células redondas en la lámina propia en el intestino delgado, a nivel de los enterocitos de la parte superior de las vellosidades con células diferenciadas que tiene funciones digestivas como de hidrólisis de los disacáridos y de absorción como el transporte de agua, electrolitos mediante las contransportadores glucosa y aminoácidos; por lo tanto la infección por rotavirus conduce a desequilibrio, de absorción/secreción de líquidos intestinal y una mala absorción de carbohidratos, sobre todo de la lactosa.

Recientemente se ha propuesto que, al menos en parte, la diarrea es causada por la proteína no estructural NSP4 que estimula la secreción trans-epitelial de cloro, por una vía dependiente de calcio, lo que desequilibra el balance iónico de la célula y provoca la salida de agua. Aparentemente, todo esto sucede previo a la destrucción del epitelio intestinal por la replicación viral. De hecho, se ha propuesto que la proteína NSP4 pudiese representar la primera enterotoxina viral descrita (Ver anexo figura 4).

También recientemente, se ha involucrado al sistema nervioso entérico como responsable de inducir una salida aumentada de fluido y electrolitos de las células de las criptas intestinales. Estos mecanismos de inducción de la diarrea podrían sugerir nuevas estrategias para prevenir o controlar la enfermedad causada por los rotavirus.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Además del papel que las proteínas de superficie juegan en la primera fase de la infección viral, éstas contienen determinantes antigénicos que representan blancos importantes del sistema inmune. Anticuerpos dirigidos contra cualquiera de las dos proteínas de superficie neutralizan al virus in vitro y son capaces de proteger pasivamente a ratones contra la infección por rotavirus. La infección oral con rotavirus estimula una inmunidad protectora que puede estar mediada por VP7 y/o VP4.

Aunque se sabe poco de la inmunidad celular, ésta parece también tener un papel importante en la protección o cuando menos en la resolución de la infección, aunque no es claro cuál o cuáles de las proteínas virales la inducen.

El Dr. Richard Ward, Director del Centro Médico del Hospital Infantil de Cincinnati - EEUU, describió durante el VI simposio Internacional sobre rotavirus, el espectro pleno de la enfermedad asociada con este agente biótico. Afirmó que si bien habitualmente produce gastroenteritis, en ocasiones inusuales el rotavirus es causa de infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores, abscesos hepáticos, pancreatitis, diabetes, invaginación intestinal y atresia biliar.

Destacó que de todas las cepas del rotavirus evaluadas en ratones, sólo las cepas G3, de rotavirus de Macaca mulatta (RRV, por sus siglas en inglés), se reproducen fuera del intestino e inducen enfermedades como hepatitis y atresia biliar. RRV es la misma cepa del rotavirus que se utilizó en la vacuna de RotaShield, la cual se retiró del mercado después de que se la asociara con un riesgo levemente elevado de invaginación intestinal en los lactantes humanos. Otros investigadores como Ward

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

concluyen que posiblemente la invaginación intestinal sea inducida por una cantidad limitada de cepas G3 que pueden infectar y reproducirse en tejidos fuera del intestino.

3.11 FISIOPATOLOGÍA

La diarrea osmótica que ocasionan los rotavirus se debe a que lesionan en forma focal las células de las vellosidades del intestino delgado, disminuyendo la producción de la lactasa (disacaridasa responsable de la digestión de la lactosa) lo que provoca aumento de la osmolalidad en la luz intestinal y condiciona mayor secreción de agua, que se pierde a través de las heces (ver anexo figura 5 y figura 6).

Entre los mecanismos potenciales por que los rotavirus podrían inducir la diarrea tenemos:

- La superficie absorbente reducida.
- Denudación de la micro-vellosidad, acortando, allanando, y atrofiando las vellosidades intestinales
- La invasión de las vellosidades por el rotavirus causando secundariamente isquemia y acortando la absorción funcionalmente dañada.
- Las concentraciones de disacaridasas deprimidas.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- Lesión del co-transporte de glucosa y sodio
- La bomba de sodio-potasio se encuentra funcionalmente disminuida a su vez que la actividad de la ATPasa daña la pendiente electroquímica.
- El Daño celular que afecta la absorción: Hinchazón de la Mitocondrias, dilatación del retículo endoplasmático e infiltración mononuclear de las células del epitelio intestinal.
- La proteína NSP4 que actúa como enterotoxina del virus realiza a su vez los siguientes mecanismos de lesión:
    - Induce a que las concentraciones de calcio a nivel intracelular se vean aumentadas; en modelos experimentales actúa como una toxina para inducir la diarrea.
    - Estimula el sistema nervioso entérico
    - Estimula la secreción intestinal de fluido y electrólitos;
    - Esto a su vez genera mayor estímulo de la motilidad intestinal produciendo que el tiempo del tránsito intestinal normal se vea disminuido
    - La permeabilidad epitelial alterada
    - La permeabilidad del espacio para-celular esta aumentada debilitando las uniones firmes entre células(ver anexo cuadro 4)

Las células de las criptas, encargadas de reparar las vellosidades lesionadas, migran para sustituirlas en un periodo de 24 a 72 horas, con lo que desaparece la diarrea. Es reconocido que los rotavirus infectan el intestino delgado a través de la vía oral, aunque también se ha probado su transmisión a través de la vía aérea, dado que

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

incluso prácticas de higiene apropiadas no parecen ser del todo capaces de controlar las infecciones por estos virus.

Según otros autores, el sistema nervioso entérico modula la secreción de líquidos y electrolitos inducida por las toxinas del rotavirus. Una de las proteínas, denominada NSP4, genera aumento en los niveles de calcio intracelular, lo cual estimula las terminaciones nerviosas localizadas en la submucosa. Lo anterior plantea entonces la posibilidad de combinar soluciones de rehidratación oral con medicamentos que disminuyan la secreción intestinal, con lo cual se dispondría de efectivas herramientas en el control de la infección por rotavirus.

Las infecciones por rotavirus en niños menores de dos años pueden cursar asintomáticas hasta en 50 % de los casos. Estudios epidemiológicos sugieren que la inmunidad natural es adquirida después de una primoinfección (sintomática o asintomática) y que esta protección se incrementa con cada nueva infección, reduciendo la gravedad de los episodios diarreicos subsecuentes.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.12 INTERACCION INICIAL DEL VIRUS CON LA CÉLULA HUÉSPED (Adsorción, penetración, desnudamiento)

3.12-a ADSORCIÓN

La infección por rotavirus *in vivo* está restringida a las células de las puntas de las vellosidades del intestino delgado, lo que sugiere la existencia de receptores específicos del huésped. La infección *in vitro* está también limitada a líneas celulares epiteliales de origen intestinal y renal. Aunque ha existido grandes avances en el conocimiento de la biología molecular y estructural de los rotavirus, es aún muy poco lo que se conoce acerca del (los) receptor(es) específico(s) para estos virus.

La unión de algunos rotavirus de origen animal a la célula huésped es dependiente de la presencia de ácido siálico (AS) en la superficie celular, y se ha demostrado que esta interacción es necesaria para que exista una infección eficiente tanto *in vivo* como *in vitro*. Así, varios glicoconjugados que contienen AS han sido propuestos como posibles receptores para los rotavirus de origen animal. Tal es el caso de los gangliósidos GM3 en el intestino de cerdos recién nacidos, o GM1 en células LLC-MK2. Por otro lado, se ha propuesto que las integrinas α2b1, α4b1 y αxb2 y más recientemente la integrina αvb3, también pudiesen estar involucradas en las primeras interacciones de los rotavirus con su célula huésped. Las integrinas son una familia de proteínas hetero-diméricas compuestas por una subunidad α y una subunidad β, que se encuentran en la membrana celular y que participan en las interacciones de la célula con la matriz extracelular y en las interacciones célula-célula. Las integrinas

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

funcionan como señaladoras de una gran variedad de procesos celulares entre los que se encuentran la proliferación, migración y diferenciación celular, entre otros.

Los rotavirus son capaces de unirse a la superficie de una gran variedad de líneas celulares, sin embargo, sólo son capaces de infectar productivamente a un subgrupo de estas células. Por lo tanto, se ha sugerido que la primera interacción (dependiente de AS) es de naturaleza promiscua, mientras que la segunda interacción (independiente de AS) es más específica y podría determinar, al menos en algunos casos, si las células son susceptibles o no a la infección por rotavirus.

En estudios recientes se ha establecido que la unión de los rotavirus al receptor que contiene AS no es esencial, ya que se han aislado variantes cuya infectividad es independiente de la presencia de AS en la superficie celular. La importancia secundaria del AS como receptor para los rotavirus también se ve reflejada en el hecho de que los rotavirus de origen humano se unen a las células permisivas a través de una molécula que no contiene AS, la cual no se ha identificado.

La caracterización comparativa de la unión de rotavirus de origen animal y de origen humano a la superficie de las células ha arrojado los siguientes datos:

- Existen cuando menos dos dominios en la proteína VP4 de los rotavirus que interaccionan con la célula durante la infección viral, uno dependiente de AS, en VP8, y el otro independiente de AS, presente en VP5
- Estas dos interacciones aparentemente son secuenciales de modo que un virus dependiente de AS requiere de esta primera interacción, para posteriormente poderse unir al segundo receptor que es independiente de AS

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- Los rotavirus de origen humano se unen a una tercera molécula, diferente de las dos primeras, que podría representar un paso común en la infección de los rotavirus humanos y animales. Quedan aún por determinar las moléculas celulares, su organización en la superficie de la célula, y las moléculas virales que participan en estas interacciones.

3.12-b PENETRACIÓN

Posterior a la unión, el virus penetra hacia el interior de la célula huésped; sin embargo, el mecanismo por el cual este fenómeno se lleva a cabo es aún controversial. Se han utilizado técnicas bioquímicas y morfológicas para contestar esta pregunta; en estudios de microscopía electrónica se ha encontrado que los virus pueden entrar a célula por endocitosis o por penetración directa de la membrana plasmática. Sin embargo, el hecho de que la infección viral no se vea inhibida por agentes lisosomo-trópicos que incrementan el pH endosomal, o por drogas que afectan la endocitosis o el tráfico de las vesículas endocíticas ha sido tomado como evidencia en contra de que la vía de entrada de los rotavirus sea la de endocitosis clásica. Como alternativa se ha propuesto entonces, la penetración directa de la membrana plasmática, pero la evidencia que apoya este mecanismo es más bien indirecta. Actualmente varios grupos de investigación trabajan en esta área para definir de una manera precisa el mecanismo de entrada de estos virus.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.12-c DESNUDAMIENTO

Durante la penetración del virus a la célula, la partícula viral pierde las proteínas de la capa externa. Aunque el momento preciso y el mecanismo de este evento se desconocen, la remoción de la capa externa resulta en la activación de la transcriptasa viral.

Después de la internalización del virus al citoplasma celular, el genoma viral es transcrito a partir de partículas que carecen de la capa externa o DLPs. El inicio de la síntesis de los mensajeros virales se lleva a cabo dentro de las DLPs, por medio de la acción concertada de la transcriptasa viral VP1 y la guanililtransferasa VP3. Como se mencionó anteriormente, los ARNs mensajeros sintetizados sirven dos funciones:

- Son traducidos para sintetizar las proteínas virales
- Son empleados como templados para sintetizar el ARN de doble cadena que constituirá el genoma de la progenie viral.

Una vez que se acumula una masa crítica de proteínas virales, en las células infectadas se forman grandes inclusiones citoplásmicas llamadas viroplasmas y se ha propuesto que es en éstas estructuras donde las partículas con dos capas (formadas por VP2 y VP6) se ensamblan y donde se lleva a cabo la replicación del ARN viral.

La traducción de los ARNm de los rotavirus se efectúa tanto en polisomas libres como unidos al retículo endoplásmico. Un aspecto particular de la infección por rotavirus consiste en que, a medida que progresa la síntesis de las proteínas virales,

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

se disminuye la síntesis de las proteínas celulares, la cual finalmente se abate casi en su totalidad.

Los procesos de encapsidación y replicación del genoma son eventos finamente coordinados ya que se llevan a cabo de manera concomitante. La encapsidación del genoma se lleva a cabo mediante la interacción de los segmentos de ARNm con las proteínas de la nucleocápside. Una vez que la nucleocápside se ha formado, los segmentos de ARNm son internalizados; se ha sugerido que la síntesis de la hebra complementaria de ARN podría llevarse a cabo durante el mismo proceso de internalización de los ARNm. Durante estos eventos participan algunas de las proteínas no estructurales del virus, que se encuentran asociadas a las partículas virales, que se conocen como intermediarios de replicación. La adición de trímeros de la proteína VP6 a las nucleocápsides, lleva a la formación de una partícula mayor que tiene actividad de replicasa y de transcriptasa. Las proteínas no estructurales asociadas a esta partícula deben de perderse en algún evento posterior.

La distribución intracelular de cada una de las proteínas involucradas en esta etapa de la morfogénesis del virus, sugiere que la formación de los intermediarios de replicación, así como la replicación del genoma, se lleva a cabo en los viroplasmas. Una vez que las DLPs han sido formadas y que se ha replicado completamente el genoma, estas partículas migran hacia el retículo endoplásmico donde el virus adquiere la capa externa de proteínas.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Dos de las proteínas del virus son sintetizadas en asociación con el retículo endoplásmico (RE) y están glicosiladas:

- La proteína estructural VP7, la cual forma la capa externa del virus, es sintetizada en el RE y se mantiene asociada a la membrana, orientada hacia el lumen del RE
- La proteína no estructural NSP4 es también una proteína glicosilada residente del RE, la cual tiene al menos un dominio trans-membranal, el cual permite que 132 residuos carboxilo terminales estén orientados hacia el citoplasma. Este dominio citoplásmico funciona como receptor de las partículas con doble capa, interaccionando directamente con VP6. Además, NSP4 interacciona con la proteína VP4, la cual forma parte de la capa externa del virus.

La interacción de NSP4 con VP6 y VP4 media la gemación de las partículas de doble capa hacia el interior del RE; durante esta gemación, las partículas adquieren una cubierta lipídica temporal que se pierde durante el viaje de las partículas hacia el interior del RE, y a la vez, mediante un mecanismo aún desconocido, se ensamblan las proteínas de la capa externa, lo que resulta en la formación de las partículas virales maduras con sus tres capas de proteína. Finalmente los virus maduros se liberan al medio mediante la lísis de la célula.

Durante la infección, todas las proteínas virales se acumulan en el viroplasma, a excepción de las dos glicoproteínas (VP7 y NSP4), que se localizan en el RE, y las

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

proteínas no estructurales NSP1 y NSP3, que se localizan de una manera puntuada distribuidas en el citoplasma celular en asociación con el citoesqueleto. Además de las interacciones entre proteínas del citoesqueleto con las proteínas virales NSP1 y NSP3, se ha propuesto la existencia de otras interacciones. Se ha encontrado que la proteína no estructural NSP3 se une a los mensajeros virales reconociendo específicamente las cuatro últimas bases de la región conservada del extremo 3' de los ARNs. Esta proteína, además de interaccionar con el citoesqueleto de la célula, interacciona específicamente con el factor celular eIF4GI que es un factor de iniciación de la traducción. Se ha encontrado que la NSP3 puede desplazar selectivamente la unión de la PABP con el factor eIF4G1 *in vitro* e *in vivo*. Así, se ha propuesto que mediante las uniones simultáneas del extremo 3’ de los ARNm virales y del factor eIF4G1, NSP3 favorece la síntesis de las proteínas virales e interfiere con la traducción de los ARNm celulares. Además, se ha propuesto que NSP3 le confiere estabilidad al ARNm viral, y participa junto con NSP1 en el proceso de translocación del ARNm hacia el viroplasma, primer paso necesario para la morfogénesis del virus.

Por su parte, la proteína no estructural NSP1 interacciona con los 34 nucleótidos del extremo 5' del ARNm viral, y con el citoesqueleto, y se ha propuesto que pudiera bloquear la traducción de una fracción de los ARNm virales, conduciéndolos al viroplasma y secuestrándolos para servir como templados para la síntesis de la doble cadena del ARN. Se ha observado que los complejos NSP1-ARNm-NSP3 se asocian con las proteínas estructurales VP1 y VP3. Dado que VP1 reconoce el extremo 3' del ARNm, región que se sobrepone con la reconocida por NSP3, y VP3 reconoce el extremo 5', se ha sugerido que NSP1 y NSP3 son desplazadas competitivamente por

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

VP1 y VP3, y con este proceso quizá se concluye la translocación de los ARNm al viroplasma, donde continua la morfogénesis de las partículas virales.

En la célula infectada, además de las proteínas estructurales mencionadas, algunas proteínas no estructurales están asociadas a las partículas sub-virales que llevan a cabo la replicación del ARN. Asimismo, algunas de las proteínas no estructurales están asociadas a complejos moleculares que son precursores de estas partículas; en conjunto, estas partículas subvirales precursoras de la nucleocápside han sido denominadas partículas Intermediarias de Replicación (RI). Se ha observado que existen diferentes tipos de RIs que pueden ser aisladas de acuerdo a su diferencia en tamaño. La composición de cada una parece obedecer una secuencia de eventos en los que algunas proteínas se adicionan y otras se sustraen de estos complejos a lo largo de la morfogénesis del virión. El primer tipo de partícula en formarse (denominada "precore RI"), está constituida por los ARNm virales, VP1 y VP3 y parece mantener a las proteínas no estructurales NSP1 y NSP3 asociadas. La subsecuente pérdida de NSP1 y NSP3 y la adición de la proteína VP2 constituye la partícula "core RI", la cual tiene actividad de replicasa; a esta partícula están asociadas además las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5. La proteína NSP2 como multímero se une preferentemente al ARN de cadena sencilla, interacciona con VP1 y NSP5, y tiene una actividad de nucleósido trifosfatasa (NTPasa) a través de la cual se autofosforila *in vitro* e *in vivo*. Estas características han permitido suponer que NSP2 tiene un papel esencial en la replicación del ARN, y se ha propuesto que NSP2, por medio de su actividad de NTPasa, podría obtener la energía necesaria para funcionar como un motor molecular, facilitando el empaquetamiento de los ARNs

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

mensajeros en las partículas subvirales, donde entonces, se llevarían a cabo su replicación.

3.13 CUADRO CLÍNICO

La infección por rotavirus es muy común, se ha observado que a la edad de 5 años, el 95% de los niños ya han sido infectados. El pico de incidencia de la enfermedad es en los niños de entre 6 y 24 meses de edad, siendo esta, la población con más alto riesgo de sufrir una diarrea severa, que frecuentemente requiere de hospitalización. La infección en adultos es por lo regular asintomática, aunque ocasionalmente se presentan los síntomas en los padres de niños infectados, en pacientes inmunocomprometidos, y en adultos de la tercera edad. La diarrea por rotavirus ocurre principalmente durante los meses de otoño e invierno en los países de climas temperados; esta estacionalidad es menos marcada en los países con clima tropical. Generalmente después de un periodo de incubación inferior a 3 días la sintomatología típica que se presenta en la infección por rotavirus lo constituyen la fiebre que puede estar presente o no entre el 45 al 84% (temperaturas entre 37.8C-39C), vómitos de carácter alimenticio-postpandrial o mucosos, seguido de evacuaciones acuosas, amarillentas o verdosas fétidas o no; generalmente la fiebre y el vómito ceden al 2° día de enfermedad cediendo el paso a la diarrea de carácter acuosa intensa que suele mantenerse durante 5 a 7 días con frecuencia de hasta 10 evacuaciones en 24horas con presencia de moco en un porcentaje variable, aunque la

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

sangre y leucocitos es raro no debe descartarse y deben ser analizadas durante el diferencial con otras enfermedades; la infección por esta enfermedad es autolimitada, es decir con una duración entre 7 y 10 días con un promedio de aproximadamente cinco días.

La gran mortalidad asociada a esta enfermedad es debida a la severa deshidratación que provoca la infección, por lo que la recomendación principal en este padecimiento es la de rehidratar y mantener el balance electrolítico del paciente; probablemente el 50% o más de las infecciones son subclínicas.

Las manifestaciones clínicas de la infección por rotavirus no son lo suficientemente características para permitir un diagnóstico inequívoco basándose en éstas, por los que se requiere de la detección directa del virus, o del antígeno viral para tener el diagnostico preciso. Durante la infección los rotavirus se excretan en grandes cantidades durante los episodios diarreicos, por lo que se pueden detectar fácilmente por inmunoensayos o por electroforesis del genoma viral.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.14 DIAGNÓSTICO VIRAL

3.14-a INTRODUCCIÓN

El diagnóstico virológico comprende la detección e identificación del agente etiológico de una infección viral, clínica o inaparente, y /o de la respuesta inmune específica del huésped.

La primera etapa la constituye el diagnóstico viral clínico, que generalmente tiene un carácter de orientación. Se basa principalmente en el cuadro clínico y considera los antecedentes personales y familiares, además de la situación epidemiológica; en muchas circunstancias este diagnóstico clínico puede ser suficiente, sin embargo cada día se observa con mayor frecuencia la asociación de los virus entéricos con diversos cuadros clínicos, incluso muy severos, en los que el estudio específico de laboratorio virológico se hace indispensable como medio diagnóstico, de control evolutivo, con fines epidemiológicos, etc.

Hoy día, el avance de las técnicas diagnósticas ha demostrado que hasta los cuadros más típicamente asignados a una etiología pueden ser causados por otros agentes: las enfermedades son realmente síndromes.

Las aplicaciones del diagnóstico virológico son variadas y dependen de los medios disponibles y de las circunstancias que ameriten un diagnóstico etiológico específico.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

En salud pública se utiliza habitualmente en programas de vigilancia epidemiológica y en el control de vacunas mediante censos serológicos. En medicina curativa la necesidad del diagnóstico virológico alcanza a todas las disciplinas: pediatría, obstetricia, medicina, cirugía, dermatología, etc.

El gran desarrollo de las técnicas de diagnóstico virológico ha permitido ofrecer actualmente una ayuda directa al médico clínico y ha facilitado la investigación en salud, posibilitado su aplicación en muchos campos.

Actualmente el médico clínico puede tratar con nuevos antivirales y controlar el curso de muchas infecciones virales; en el presente existe comercialmente una gran variedad de técnicas que pueden implementarse en laboratorios clínicos, por lo que se requiere conocer sus características para seleccionar las de mayor aplicabilidad.

El diagnóstico definitivo requiere un análisis de correlación entre los antecedentes clínicos personales, familiares, epidemiológicos y los resultados del laboratorio virológico, considerando la oportunidad y calidad de la muestra, las propiedades de las técnicas utilizadas y la experiencia acumulada al respecto. La conclusión final depende entonces de un trabajo profesional multidisciplinario, más que de una cifra aportada por una moderna máquina automatizada.

3.14-b DIAGNÓSTICO CLÍNICO

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

En la historia clínica de la diarrea es esencial indagar sobre: duración de la enfermedad; características de las deposiciones: consistencia (líquida y disgregada), presencia de otros elementos (mucosidades, sangre, alimentos no digeridos); frecuencia de evacuaciones durante las 24 horas previas; presencia y frecuencia de vómitos; fiebre, irritabilidad, decaimiento, sed; capacidad o no de recibir alimentos y líquidos; tipo y volumen de los alimentos recibidos; normalidad o no de la diuresis. Luego, al practicar el examen físico, es esencial evaluar el estado general del niño, su estado de conciencia, y muy especialmente, el grado de deshidratación , así como la presencia de manifestaciones que puedan impartir un carácter especial al cuadro: distensión abdominal marcada (medición de circunferencia abdominal), disminución de ruidos intestinales, edema, fiebre alta. Es importante pesar al niño, puesto que así podrá objetivarse si sufrió o no una pérdida de peso importante durante la diarrea. En todo caso, el peso al ingreso servirá para ser usado como registro de línea base y valorar sus cambios durante el curso de la enfermedad.

El cuadro clínico, unido a las referencias epidemiológicas, puede guiar hacia el diagnóstico etiológico. La diarrea aguda por rotavirus, la mas frecuente en nuestro medio en lactantes, es una enfermedad autolimitada, de comienzo brusco, con vómitos y luego fiebre (etapa que dura 1 a 2 días) y deposiciones líquidas, abundantes y frecuentes, generalmente ácidas y de color amarillo, que duran de 5 a 7 días y suelen terminar abruptamente.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3.14-c DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Actualmente existen diversos métodos en el mercado que pueden utilizarse para el diagnóstico de rotavirus, de tal forma que la técnica de elección dependerá del equipo y reactivos con que se disponga en cada hospital. Los métodos de diagnóstico viral se basan fundamentalmente en:

- Detección del agente viral completo o de sus componentes: por aislamiento viral con observación del efecto inducido por el virus vivo propagado en un huésped biológico; por visualización de la partícula viral total o parcial; o por detección de sus componentes macromoleculares (antígenos virales o ácido nucleicos).
- Detección de la respuesta inmune del huésped mediante el estudio de anticuerpos antivirales (serología).

Varios métodos para la identificación del rotavirus o antígeno del mismo en heces han sido desarrollados en la actualidad. Los métodos más usados son: microscopía electrónica, inmunoelectromicroscopia, Inmunoensayos como ELISA Radioinmunoensayo y aglutinación en látex; electroforesis en gel.

- **La microscopía electrónica** fue el primer método diagnóstico usado en la identificación del virus y es actualmente el método de referencia. Detecta 10^6 o más partículas de rotavirus por ml/ heces. Este procedimiento no distingue grupo

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

o serotipo. se utilizan dos tinciones especiales con sales de metales pesados como el uranio o el tungsteno. La primera es la tinción negativa donde el acetato de uranilo forma una especie de molde viral que permite detallar la estructura del virus. La segunda tinción es la del sombreado, donde las partículas virales se ponen en un ángulo donde el metal que se utiliza en ella se deposita sobre el virus pero no sobre su sombra y sólo se visualiza lo que no se ha cubierto con el metal. Esta técnica no revela las estructuras internas del virus sino su forma y dimensiones. El uso de equipo especializado y costoso, el elevado nivel técnico que requiere, la baja sensibilidad cuando hay un bajo número de partículas virales y el hecho de que en algunos casos la morfología per se no es suficiente para un diagnóstico viral definitivo, hacen que este sistema sea poco usado y sólo se emplee a nivel investigativo o académico. Es de ayuda en ciertas ocasiones cuando pudiera existir una co-infección por otros virus. La sensibilidad de esta técnica depende de su preparación, tinción y la experiencia del observador, generalmente es menor que la de la inmunofluorescencia y el cultivo viral

- **inmunoelectromicroscopia** ha sido empleada en la detección, identificación y sero-tipificación del rotavirus y otros virus en heces. Es más sensible que la microscopía electrónica.

En la actualidad, los métodos de detección más usados son los inmunológicos (inmunoensayos).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- **Inmunoensayos: Ensayos de captura del Antígeno, Inmunocromatografía**. Son inmunoensayos en fase sólida donde se fijan los anticuerpos específicos para el virus en la superficie de una matriz, tubo o microplaca, Se emplea como sistema de amplificación del conjugado el oro coloidal para aumentar la sensibilidad del método. Posteriormente se pone en presencia del suero o muestra que contiene el antígeno que se quiere demostrar; una vez que ocurre la reacción antígeno-anticuerpo (que se observa por la acumulación de oro coloidal del conjugado en el papel de nitrocelulosa), se hace un lavado y se agrega un anticuerpo marcado de captura, que depende de la marcación del anticuerpo (Ver anexo - figura 7).

  Los más conocidos son: ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay-Inmunoensayo ligado a la absorción de enzimas), el radioinmunoensayo (RIA) y la aglutinación en látex dependiendo del trazador que se utilice para evidenciar la reacción.

1. **El método de ELISA** (descrito por *Towbin et al.*) en 1979 puede detectar 10^6 partículas virales por gramo de heces, lo cual lo hace más sensible que el microscopio electrónico. El uso de anticuerpos monoclonales incrementa aún más la sensibilidad y especificidad de esta prueba. Existen una gran cantidad de métodos de ELISA comerciales y varían en su sensibilidad y especificidad dependiendo de la casa comercial y si la prueba está hecha con anticuerpos monoclonales, policlonales o ambos.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Los ELISA comerciales detectan solamente rotavirus del grupo A (utilizan anticuerpos anti-VP6). Tienen por finalidad el diagnóstico de la infección por rotavirus mediante el uso de anticuerpos monoclonales que detectan la existencia de antígeno vírico VP6 (cápside interna del virión) en muestras de heces fecales. Estos a su vez generan complejos inmunes que pueden ser visibles incluso mediante microscopia electrónica. Con esta técnica se pueden procesar una gran cantidad de muestras clínicas en forma rápida y sencilla. Puede haber falsas positivas, por lo que se recomienda que aquellas muestras positivas obtenidas fuera del periodo epidémico se repitan nuevamente. Las ventajas de esta son: permite obtener resultados de una forma rápida y fácil, tiene poca complejidad técnica, es de fácil manipulación, emplea pocos reactivos y proporciona una información diagnóstica rápida, ya que los resultados se obtienen en un período de 30 minutos, lo cual resulta muy conveniente para el tratamiento de esta enfermedad.

TECNICA

Tiene como finalidad la identificación de las proteínas del virus en forma directa del genoma viral. Se emplea como fase sólida una membrana de nitrocelulosa marcada con un anticuerpo monoclonal antiRotavirus. Se pesan 0,2 g de heces fecales y se diluyen en 1 ml de tampón de dilución No. 1 para la muestra. Se agita en un vortex, centrifugándose posteriormente a 3 000 r.p.m. durante 10 min. Se toma el sobre nadante y se pasa a un vial teniendo 250 mL de tampón No. 2 para dilución de muestra. Se añade a este vial 250 ml del conjugado constituido por un anticuerpo monoclonal marcado con oro; incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se toma 1 ml de la mezcla anterior y se deposita en el vial que contenía la

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

tira reactiva de nitrocelulosa ya sensibilizada, se incuba con agitación durante 25 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, se sumerge la tira 1 vez en PBS y se pone a secar sobre un papel de filtro. En esta prueba se emplea un control positivo y otro negativo. Se considera la muestra como positiva al aparecer una mancha rojiza en la membrana de nitrocelulosa. Cuando la membrana queda de color blanco, la muestra se considera como negativa. Esta técnica ofrece sensibilidad del 96% y especificidad del 98%.

2. **Radioinmunoensayo (RIA)** se denomina, cuando el anticuerpo se marca con un isótopo radioactivo, el más utilizado es el yodo-$_{125}$, en este caso el anticuerpo reacciona a manera de sandwich, se pega a los epítopes del antígeno que han quedado expuestos; después de varios lavados, se mide o cuantifica la radioactividad mediante un contador de centelleo. El número de destellos por minuto es directamente proporcional a la concentración del antígeno que reacciona y de acuerdo con una serie de estándares de concentración conocida, se realiza una curva y se extrapolan los valores de la muestra. En la técnica ELISA el anticuerpo se marca con una enzima que puede ser la fosfatasa alcalina (FA) o la peroxidasa de rábano (PR) y para revelar la reacción se coloca el sustrato específico para la enzima que es modificado por ésta y produce un compuesto coloreado que hace visible la reacción. Para la cuantificación se mide la absorbancia en una longitud de onda determinada en un espectrofotómetro. La absorbancia será directamente proporcional a la cantidad de antígeno descubierto.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

3. **Aglutinación de Látex**. Esta técnica se usa comúnmente para la demostración de antígenos de rotavirus en materias fecales. Las partículas de látex son esferas de poliestireno que se unen fácilmente al fragmento cristalizable (Fc) de moléculas de inmunoglobulina G (IgG) o inmunoglobulina M (IgM), esta última es mucho más eficiente en aglutinar partículas naturales. Los fragmentos de unión del anticuerpo (FAb) quedan expuestos y son capaces de unirse al antígeno que se encuentra en la muestra. Cuando los antígenos tienen varios epítopes (o estructuras antigénicas repetitivas), los anticuerpos multivalentes acoplados a múltiples partículas de látex se unen al antígeno y se produce un entramado de las partículas de látex que dan como resultado una aglutinación visible. Esta técnica es fácil de realizar, requiere sólo unos minutos y no necesita equipo, pues se lee a simple vista. Sin embargo, ofrece como desventaja la presencia de reacciones cruzadas sobre todo con otros antígenos en la muestra y también ocurren interferencias por el fenómeno de prozona, en el que un exceso de anticuerpos no permite la formación del entramado. Esta técnica ha demostrado tener una alta especificidad, pero menor sensibilidad que la Elisa.

- **La inmunofluorescencia** es un método altamente específico para detectar antígeno en biopsias y células de cultivo. Es más sensible que el microscopio electrónico, pero menos sensible que la inmunoelectromicroscopia. Requiere de un equipo especial y costoso. Su uso está limitado a laboratorios de investigación.

  La demostración de antígeno se hace mediante la utilización de un anticuerpo marcado con un fluorocromo (conjugado) que es específico para el antígeno que

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

se ha de descubrir. Este proceso implica la preparación de un extendido en placa de la muestra, del tejido o de una monocapa celular inoculada con la muestra, luego se fija, se coloca el conjugado con fluoresceína y después de una incubación y un lavado, la placa se observa en el microscopio de fluorescencia. La IFA también es útil para confirmar los hallazgos de cultivo viral y la combinación de estos dos métodos mejora el diagnóstico[7]. Este método es fácilmente aplicable en tejidos que se pueden colocar sobre una placa a manera de huella y a partir de ésta aplicar la técnica. Esta prueba generalmente incrementa exponencialmente su positividad con el transcurso de los días; su eficiencia evidente amerita su empleo.

- **Coprocultivo**. **Los cultivos celulares** constituyen, desde 1950, el sistema más empleado para el aislamiento y propagación de la mayoría de los virus. Los cultivos de células *in vitro* consisten en un sistema formado por células provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas. La definición operacional de los cultivos celulares en tres tipos - cultivo primario, cepa celular y línea celular - depende del origen y tiempo de sobrevida de las células *in vitro*.

No existe un cultivo celular susceptible a todos los virus, de modo que un laboratorio de diagnóstico viral debe disponer de distintos cultivos celulares.

Algunos serotipos de rotavirus inducen un crecimiento muy característico en ciertos cultivos celulares, facilitando su diagnóstico. Considerando el cuadro clínico, el tipo

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

de muestra y de cultivo celular usado, las características y tiempo de aparición del crecimiento, se puede presumir una etiología viral con cierta seguridad. Para los cultivos virales se utilizan monocapas celulares adheridas al lecho de un tubo, que requieren de sustratos esenciales para su mantenimiento, una solución amortiguadora y un pH adecuado, además se deben suplementar con suero fetal animal, que contiene múltiples factores promotores de crecimiento celular. Una vez que la monocapa se inocula con una muestra pretratada que proviene de un individuo infectado, el virus se puede descubrir por el desarrollo de un efecto celular morfológico degenerativo visible o éste puede aparecer después de 3 ó 4 días. Sin embargo, para el caso de los rotavirus se requiere cultivos celulares muy especiales. (Ver anexo-figura 10)

Dado que el CP es un examen laborioso y de alto costo, es necesario racionalizar su indicación, seleccionando los pacientes que clínicamente o por situación epidemiológica lo ameriten además de que se necesitan laboratorios virológicos especializados. Habitualmente se sugiere realizar CP en pacientes ambulatorios con diarrea severa, que no ceda al tratamiento sintomático, cuando hay sangre en las deposiciones, en diarrea prolongada en pacientes inmunocomprometidos, si existen antecedentes de viajes, en pacientes con leucocitosis con neutrofilia y en pacientes desnutridos.

Los mayores predictores de positividad en un CP son: diarrea por más de 24 horas, fiebre, dolor abdominal y sangre en las deposiciones. En el caso de pacientes hospitalizados es necesario tomar CP en los estudios de brotes de gastroenteritis por lo que no se justifica realizar CP en los pacientes cuyo síndrome diarreico se ha iniciado al tercer día de hospitalización o de allí en adelante, ya que en estos casos,

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

los cuadros diarreicos probablemente no sean causados por los patógenos habitualmente buscados en el CP.

Ø TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR.

Comprenden las técnicas que evidencian o descubren el material genético específico viral conservado y replicable ya sea que se encuentre en un fluido, en una célula o tejido, ya sea activo o latente. Estas técnicas, que son más rápidas que las tradicionales, permiten hacer estudios en tejidos almacenados y se pueden clasificar en dos categorías:

- Ensayos de hibridización.
- Técnicas para la amplificación del ácido nucleico.

Ensayos de hibridización con sondas. Para la detección en rotavirus su sensibilidad es 10 a 1000 veces mayor que ELISA y su especificidad cercana al 100% Los recientes avances en el campo de la biología molecular y el conocimiento cada vez mayor de los virus que causan infecciones importantes en la comunidad, han hecho posible que en el momento se disponga de fragmentos de ADN del material genómico específico y altamente conservado de un determinado virus que se utiliza como sonda. Ésta frente a sus secuencias complementarias se hibridiza para formar una molécula dúplex. Esta técnica se puede aplicar ya sea para confirmar la identificación de un virus en cultivo o descubrirlo directamente en una muestra. Se pueden utilizar células o tejidos fijados con sustancias que conserven la morfología celular y la integridad del ADN o ARN. Para estudios de ARN se requieren tejidos frescos congelados rápidamente con nitrógeno líquido y para estudios de ADN se

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

pueden emplear tanto tejidos fijados como congelados. Utilizando el plásmido como vector y bacterias como huéspedes, es posible producir sondas genéticas en grandes cantidades. Los fragmentos de ADN o ARN (sondas) se someten a un análisis de hibridización (o apareamiento con el complementario que se encuentra en el material que se va a probar); éste se puede hacer ya sea con ADN o ARN tisular en solución, directamente en tejidos o células por hibridización in situ. Las sondas se pueden marcar con radioisótopos (P32, I125, S35), enzimas, avidina o moléculas quimioluminiscentes para que la formación de las moléculas dúplex sea descubierta. La sensibilidad de las sondas depende de la cantidad de material genético para la hibridización y su especificidad depende de la calidad de la sonda. Una de las principales limitaciones de esta técnica se ve cuando existe una baja cantidad de ADN o ARN y éste no se descubre. Muchas de estas pruebas tienen una sensibilidad que les permite descubrir 10^5-10^6 moléculas o aun 10^3-10^4 moléculas; sin embargo, esto puede ser insuficiente en muchas situaciones clínicas. (Ver anexo figura 8)

TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO

Reacción en cadena de la polimerasa. Conocida como PCR (siglas en inglés de polymerase chain reaction) mediante esta técnica se pueden encontrar cantidades mínimas del ácido nucleico del rotavirus en muestras de heces fecales gracias a la amplificación selectiva y repetitiva de una secuencia de nucleótidos de un microorganismo determinado que hace un proceso de síntesis de ADN. Nos sirve para serotipificar el virus en base a las diferencias del gene que codifica VP7.Tiene una sensibilidad de 1000 a 10000 veces más que el ELISA y la electroforesis. La

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

PCR consta de tres pasos: a) La desnaturalización del ADN en la muestra, lo que se logra al someterlo a altas temperaturas (95º C) para lograr la separación de las cadenas, b) La hibridización de los cebadores (a 55º C) que son unos fragmentos cortos de ADN complementarios a los extremos 5' y 3' de las secuencias por amplificar y a partir de los cuales se inicia la síntesis, y c) La extensión de estos cebadores por la enzima ADN polimerasa (a 72º C) termoestable (polimerasa extraída de la bacteria Thermus aquaticus) que produce dos bandas de ADN que son idénticas a la banda blanco original. Estas reacciones se llevan a cabo de una forma automatizada en un equipo denominado termociclador. Así, en cada ciclo de estos tres pasos, se duplica el material genético en un factor de 2n (donde n es el número de ciclos) hasta que éste se evidencia fácilmente en un gel de agarosa y se confronta con una sonda específica para confirmar la identificación final del material encontrado. De esta manera, después de 30 ciclos, se puede demostrar una copia del VIH aunque se encuentre en una de cada millón de células T. Es relativamente rápida (demora entre 6 y 8 horas) y se puede automatizar. Sin embargo, posee algunas limitaciones, como el alto costo, la necesidad de cebadores específicos para encontrar determinado microorganismo y por ello hay la posibilidad de falsos positivos, lo que implica un conocimiento adecuado de la secuencia de nucleótidos del agente. Además, la prueba se debe efectuar en condiciones adecuadas de astringencia, es decir, una temperatura, pH y concentración de cebadores y nucleótidos apropiados. Si hay fallas, pueden ocurrir amplificaciones inespecíficas, y contaminaciones con ADN extraño. Exige infraestructura y entrenamiento adecuados, por lo que esta técnica no es de uso habitual (Ver anexo figura 9).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CAPITULO 4

4.1 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	CONCEPTO	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
SINDROME DIARREICO AGUDO POR ROTAVIRUS	Caracterizado por diarrea aguda grave asociada con vómitos que pueden producir la deshidratación, el choque y la muerte.	**Gravedad** AIEPI	% de niños con deshidratación % de niños sin deshidratación	SI-NO SI-NO
		Intensidad (OMS-Fortín y Parent)	% de niños con DSH Leve % de niños con DSH Moderado. % de niños con DSH Severa	• Cuadro de OMS-fortín y Parent puntajes 0-1-2 SDA leve 0-4 puntos SDA moderada 4-8 puntos SDA severa 9-17 puntos
DIAGNÓSTICO	Métodos y técnicas establecidas por la ciencia médica, con las cuales se llega a la determinación de una enfermedad	**Clínico:**	% de pacientes con diarrea % de pacientes con vomito % de pacientes con fiebre %pacientes con dolor abdominal	• si-no • si-no • si-no • si-no
			% de niños con SDA leve % de niños con SDA moderado. % de niños con SDA Severa	• Cuadro de OMS-fortín y Parent puntajes 0-1-2 SDA leve 0-4 puntos SDA moderada 4-8 puntos SDA severa 9-17 puntos
		Laboratorio:	% de Inmunocromatografía	Positivos y Negativos
FACTORES BIOLÓGICOS				
SEXO	Género al que corresponde un individuo	Hombre Mujer	% de niños % de niñas	Masculino - femenino
EDAD	Número de años cumplidos	0 meses a 36 meses	% RN % lactantes menores	positivo-negativo positivo-negativo

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

			% lactantes mayores % pre-escolares (- 3 años)	positivo-negativo positivo-negativo
FACTOR DEMOGRÁFICO: **PROCEDENCIA**	Lugar donde ha nacido o vivido una persona y del cual se origina		% urbana % rural %urbano-marginal %otras	Urbana Urbano-marginal Rural otras

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CAPITULO 5

DISEÑO METODOLOGICO

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de tipo descriptivo-retrospectivo.

5.2 AREA DE ESTUDIO

Comprendió el Área de Hospitalización Pediátrica perteneciente al Hospital Provincial Verdi Cevallos Balda del cantón Portoviejo. Este Hospital, cuenta con una capacidad de atención de 300 camas. Para la atención de salud se divide en 2 áreas principales: Emergencia y Hospitalización ambas se subdividen dependiendo del tipo de atención sanitaria: área de Cirugía, área de Clínica, área de Gineco-obstetricia y área de Pediatría. En esta última área es donde se ejecutó el estudio. Esta área cuenta con cinco cuartos, estos deacuerdo al grupo etario, Lactantes, Pre-escolares, Escolares, Cuarto para especialidad Traumatológica, y cuarto de Infectología. Cada cuarto cuenta con una capacidad de ocho camas. Con respecto al material humano, Actualmente sigue contando con seis médicos tratantes para la especialidad pediátrica.

5.3 CRITERIOS DE INCLUSION

Se consideró dentro de este estudio todos los datos bibliográficos, estadísticos y de laboratorio que nos brindaron las historias clínicas de los pacientes menores a tres

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

años con síndrome diarreico agudo hospitalizados durante el periodo de Enero-junio del 2005.

5.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Se excluyeron de este estudio todas las historias clínicas de niños menores de tres años, ingresados por otras etiologías del síndrome diarreico agudo. Así mismo se descartó otros ingresos a hospitalización de pacientes que hayan sido ingresados por otras enfermedades.

5.5 POBLACION O UNIVERSO

La población de estudio estuvo compuesta por 131 niños menores de tres años ingresados en el área de hospitalización pediátrica del Hospital Verdi Cevallos Balda durante Enero a Junio del 2005 con diagnóstico de síndrome diarreico agudo, los cuales fueron categorizados deacuerdo a su edad pediátrica en Recién Nacidos, lactantes menores, lactantes mayores y pre-escolares hasta los tres años.

5.6 TECNICA PARA RECOLECCION DE DATOS.

Para la recolección de la información se utilizó:

- **Técnicas secundarias**: Análisis de contenidos bibliográficos, lecturas científicas, y revisión de Historias clínicas de los pacientes menores de tres años.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

5.7 PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos fueron procesados mediante la creación de una ficha bibliografía en función de las historias clínicas de los pacientes menores de tres años ingresados con síndrome diarreico agudo con posible rotavirus, la cual se constituirá de las siguientes partes:

- El encabezado
- Datos de filiación
- Datos clínicos del síndrome diarreico agudo por rotavirus
- Técnica y método de laboratorio para confirmación de la presencia de rotavirus: El Inmunoensayo-Inmunocromatografía-ELISA para heces fecales

1) ***El encabezado***, que indica la institución a la cual fue dirigida el desarrollo de este trabajo de tesis, en este caso la Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ciencias de la Salud-Escuela de Medicina. Posteriormente seguirá el tema que dio origen a este trabajo: "INCIDENCIA DE SINDROME DIARREICO AGUDO POR ROTAVIRUS EN MENORES DE 3 AÑOS INGRESADOS EN EL HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA. ENERO-JUNIO 2005".

2) ***Datos de filiación***. En ella se señaló:

   A. Número de historia clínica

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

B. Edad del paciente categorizada en recién nacidos, lactantes menores y mayores y el paciente pre-escolar hasta los tres años de edad.

C. El sexo del individuo que se dividirá en masculino y femenino.

D. Procedencia o lugar del cual provienen, localización urbana, rural, urbana marginal y otras. Esta última categoría se la aplicó debido a que este hospital es de carácter provincial y en la mayoría de veces pacientes de otras provincias son remitidos a esta casa de salud.

3) ***Datos clínicos del síndrome diarreico agudo por rotavirus***. En esta parte se anotaron los signos, síntomas de la enfermedad diarreica como tal, que pudieren ser compatibles o no con la presencia de enfermedad causada por rotavirus. En el caso de los signos, tales como diarrea y vómitos se les asignó una respuesta afirmativa y negativa para confirmar o negar su presencia, el cual fue señalado con un círculo; en el caso de que el signo sea afirmativo (si) se continuó posteriormente a anotar en valores numéricos el número diario de evacuaciones diarreicas o de vómitos para confirmar la frecuencia de deposición y emesis.

- En el caso de los ***signos*** para identificar deshidratación se han tomado partes de los cuadros descritos y propuestos por la Organización Mundial de la Salud, el cual ofrece algunas consideraciones de las cuales se han anotado las siguientes:

- Estado de Ojos, (ojos hundidos o no)

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- Estado de ingestión de líquidos (tiene sed, bebe mal o no)
- Presencia del signo del pliegue cutáneo (menos o mas de 2 segundos)
- Estado de conciencia normal, irritable, apático o somnoliento

Ø Dos de estos signos o la ausencia de estos confirmaron la presencia de deshidratación o no según lo estipulado por la OMS. Posteriormente a los anteriores, se les agregó el resto de signos propuestos para deshidratación derivados de los cuadros de la estimación clínica de la deshidratación propuestos por Fortín y Parent (ver anexo cuadro 5)

- Estado de piel
- Estado de mucosa oral
- Presencia de lagrimas
- Estado de Fontanelas
- Pulso
- Estado de la Respiración
- Estado de las extremidades
- Estado neurológico (modificado)
- Estado neurológico

En cada una de estas categorías de estimación se encuentran añadidas tres opciones a las cuales se les ha dado un valor numérico de 0 – 1 – 2 para determinar si el síndrome diarreico agudo es de intensidad leve, moderado o grave, deacuerdo a la pérdida de líquidos, tal como se establece en la tabla modificada de la OMS – Fortín y Parent para estimación clínica de deshidratación (ver anexo-cuadro 5).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Con respecto al estado neurológico del paciente se determinó la irritabilidad, Apatía y somnolencia tal como esta estipulado en el cuadro de la clínica de deshidratación de la OMS con modificaciones de Fortín y Parent.

Entre los **síntomas** como la fiebre (que además es un signo) se determinó en base a una respuesta afirmativa o negativa y señalada mediante un círculo. En caso de su presencia, se anotó su cantidad en valores numéricos y medida en grados centígrados para su confirmación referencial; por último, el síntoma de dolor abdominal fue anotado con una respuesta afirmativa y negativa para su evaluación y correlación posterior con la clínica del paciente como parte del complejo sintomático.

4) ***Técnicas y Datos de laboratorio***. En esta sección de la ficha bibliográfica, constaron el método y técnica empleada que se usó para la confirmación etiológica del rotavirus. Aquí, solo nos referimos a un solo método referido por la literatura y que se encuentra presente en nuestro medio, entre el cual tenemos:

- Inmunoensayos-Inmunocromatografía o Elisa en heces fecales

Después de confirmado la presencia del método de diagnostico de laboratorio usado, se anotó en cada uno de ellos la positividad (símbolo más) o negatividad (símbolo menos) del mismo para corroborar la presencia de casos positivos y casos negativos de este agente etiológico para su posterior tabulación correspondiente.

Esta ficha bibliográfica que se elaboró para la recolección de datos en base a la historia clínica de los pacientes hospitalizados durante enero a junio 2005, fue

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

constituida inicialmente como una prueba piloto primeramente probada aleatoriamente en 10 niños menores de 3 años ingresados en el área de hospitalización pediátrica durante el transcurso del mes de octubre, luego de ello se realizaron las mejoras necesarias para su posterior aplicación en las historias clínicas de los niños menores de tres años objeto de nuestro estudio, que estuvieron presentes en el Departamento de Estadística del Hospital Verdi Cevallos Balda de Portoviejo. (Ver anexo ficha bibliográfíca).

5.8 ANALISIS DE DATOS.

Para el análisis de los datos obtenidos se realizó una estadística descriptiva en base a porcentajes y frecuencia de cada una de las variables evaluadas y de sus posibles combinaciones.

- Para determinar los factores biológicos del paciente se recogió los datos de edad, sexo. Con respecto a la variable edad, se estableció sus frecuencias deacuerdo a cada mes, luego se estimó sus totales y luego se determinó su valor porcentual, Así mismo con la variable sexo. Con respecto al lugar de procedencia, se determinó sus totales y sus valores porcentuales.
- Para catalogar la presencia o no de la deshidratación, nos guiamos en base los signos y sintomas presentes propuestos por la OMS (la presencia de dos signos indican deshidratación). Para establecer la intensidad de la enfermedad, se determinó mediante la estimativa de signos y síntomas presentes en las historias clinicas y corroboradas mediante los cuadros de OMS-Fortín y Parent (ver anexo cuadro 5).Por medio de todos estos datos

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

clínicos, se estableció frecuencias de deshidratación en los pacientes y sus porcentajes relacionadas con la intensidad (leve moderada y grave).

- La determinación del etiológico rotavirus, fue realizado tomando en cuenta su presencia en la ficha bibliográfíca, su numero de casos negativos y casos positivos, sus totales en el tiempo de estudio y de esta manera se estableció sus respectivas frecuencias y porcentajes.
- Solo los casos positivos fueron seleccionados para estimar frecuencias y porcentajes y relacionarlas con las demás variables

5.9 TABULACION.

Se lo realizó primeramente en forma manual y posteriormente se analizarán con las sub-rutinas del programa Excel.

5.10 PRESENTACION DE RESULTADOS.

Para la presentación de los resultados de esta investigación se usó grafi-tablas en base a los datos de las variables recogidos. (Ver capitulo 6 GRAFITABLAS).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

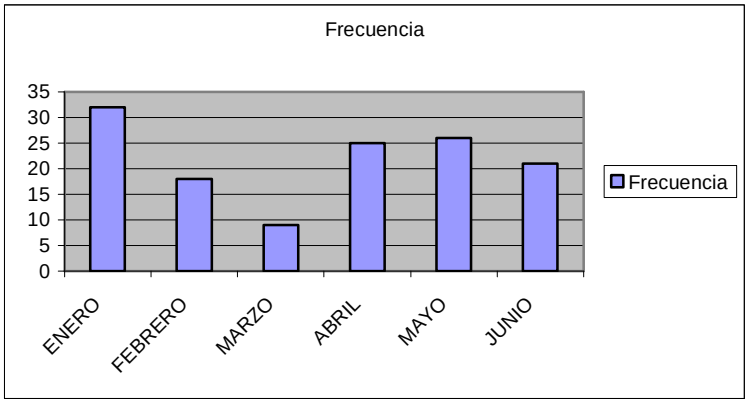
CAPITULO 6

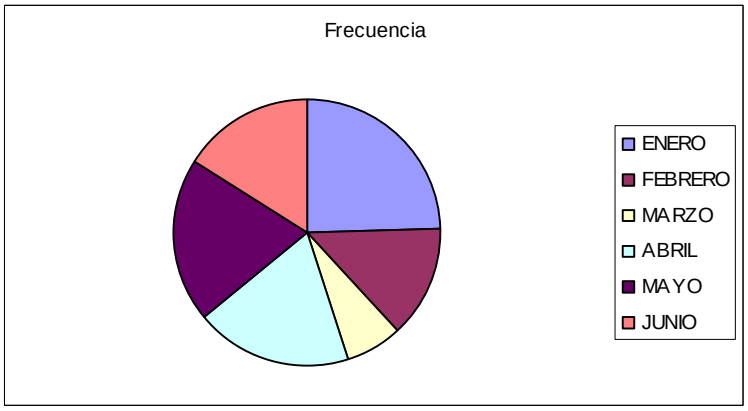
PRESENTACION DE RESULTADOS

GRAFI-TABLAS

TABLA Y GRAFICO 1
FRECUENCIA POR MES DEL SDA EN PACIENTES INGRESADOS EN EL HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA
ENERO-JUNIO DEL 2005

MESES	Frecuencia	Valor porcentual
ENERO	32	24,42%
FEBRERO	18	13,74%
MARZO	9	6,87%
ABRIL	25	19,08%
MAYO	26	19,84%
JUNIO	21	16,03%
TOTAL	131	100%



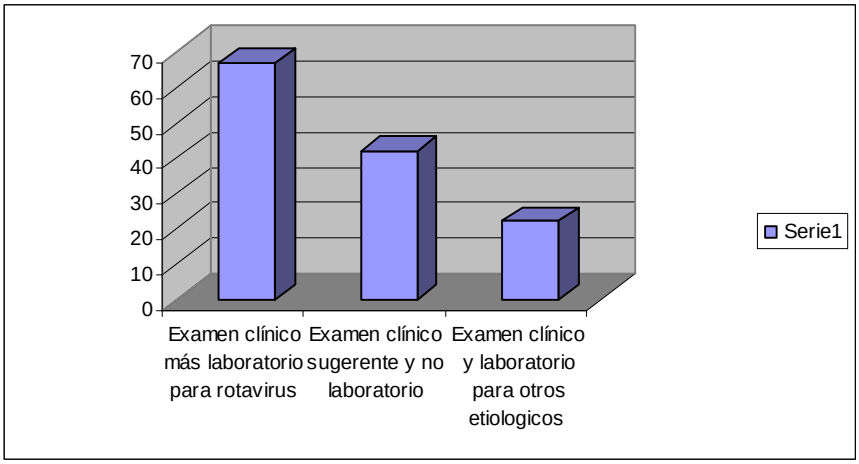


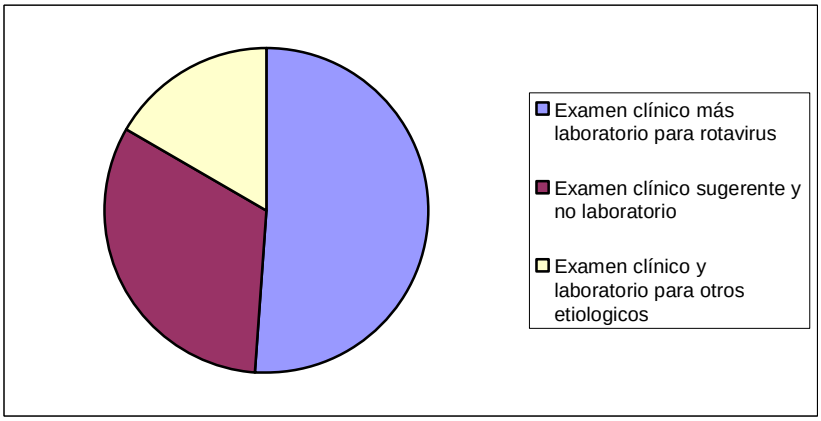
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 2

EXAMENES CLINICO Y DE LABORATORIO PARA ROTAVIRUS EN MENORES DE 3 AÑOS CON SINDROME DIARREICO HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO-JUNIO DEL 2005

METODO DIAGNOSTICO	FRECUENCIA	% del total de la población
Examen clínico más laboratorio para rotavirus	67	51,10%
Examen clínico sugerente y no laboratorio	42	32,00%
Examen clínico y laboratorio para otros etiológicos	22	16,79%
TOTAL	131	100%

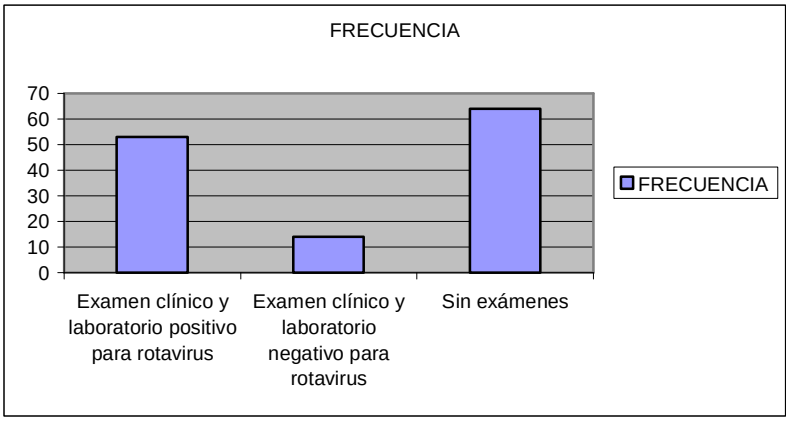


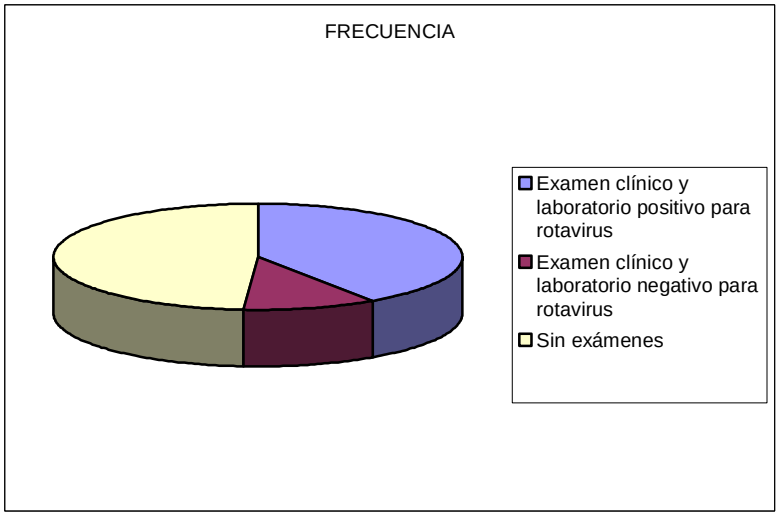


PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 3
EXAMENES CLINICO Y DE LABORATORIO PARA ROTAVIRUS REALIZADOS EN 67 PACIENTES MENORES DE 3 AÑOS HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO-JUNIO 2005

METODO DIAGNOSTICO	FRECUENCIA	% de total de examen y laboratorio	% del total poblacional
Examen clínico y laboratorio positivo para rotavirus	53	79,10%	40,40%
Examen clínico y laboratorio negativo para rotavirus	14	20,89%	10,68%
Sin exámenes	64	00,00%	48,85%
Total	131	100%	100%



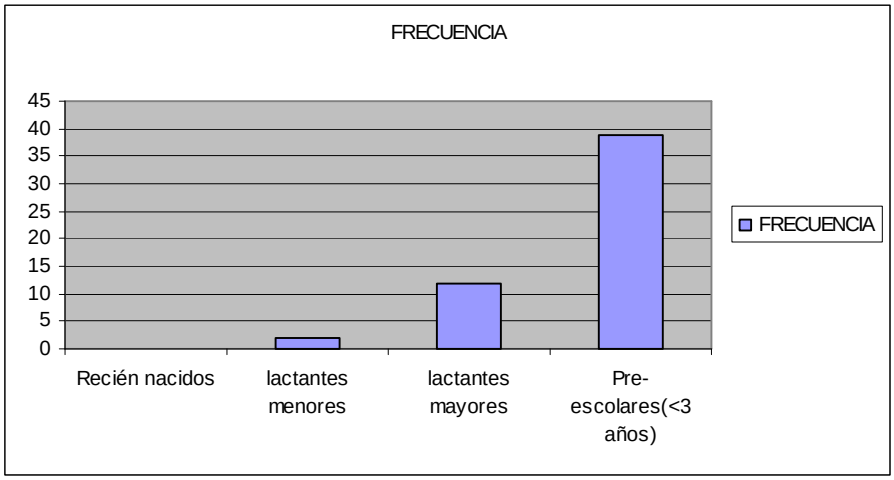


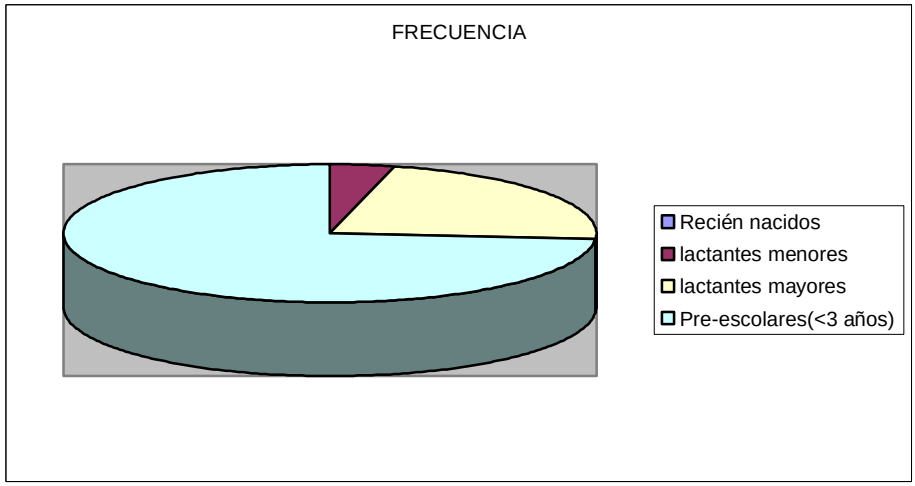
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 4

EDAD DE LOS PACIENTES POSITIVOS PARA ROTAVIRUS MENORES DE 3 AÑOS INGRESADOS HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO JUNIO DEL 2005

EDAD	FRECUENCIA	% DEL TOTAL DE POSITIVOS	% DEL TOTAL DE LA POBLACIÓN
Recién nacidos	0	0%	0%
lactantes menores	2	3,77%	1,52%
lactantes mayores	12	22,64%	9,16%
Pre-Escolares	39	73,58%	29,70%
TOTAL	53	100%	54,12%



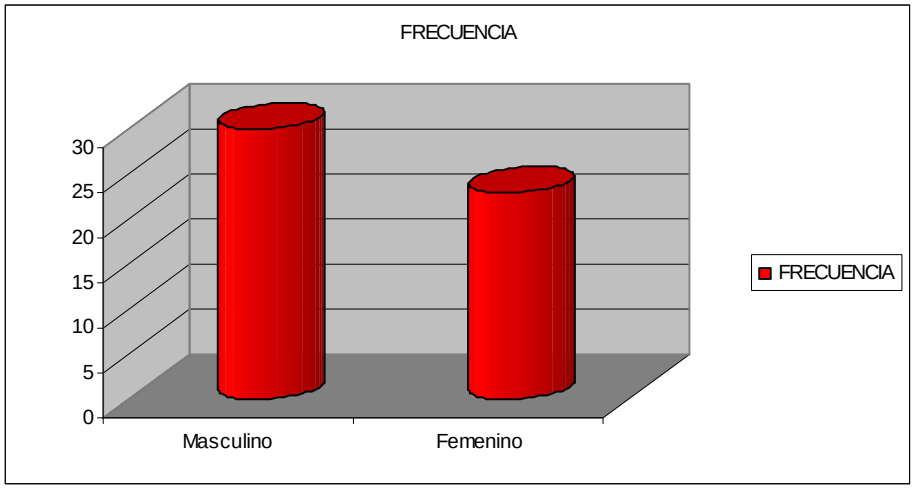


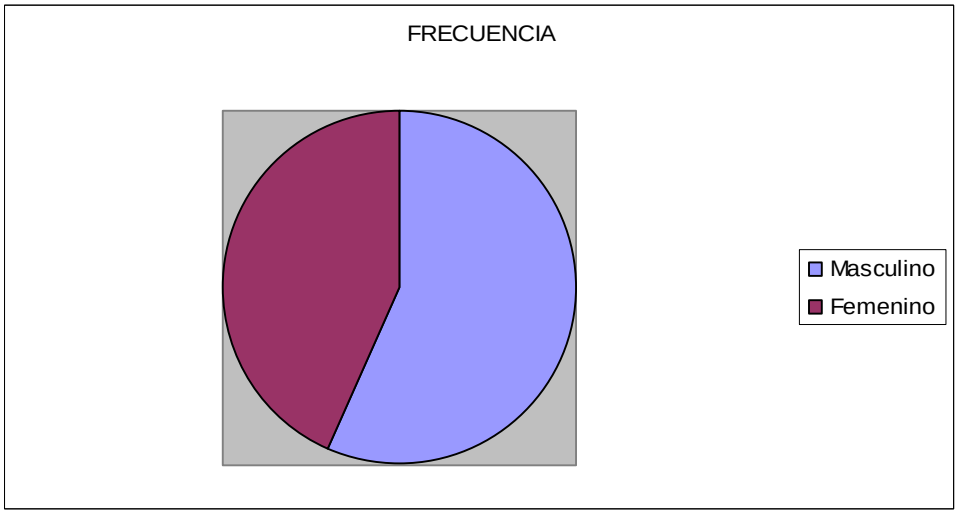
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 5

DISTRIBUCIÓN POR SEXO DE LOS PACIENTES MENORES DE 3 AÑOS POSITIVOS PARA ROTAVIRUS HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO JUNIO DEL 2005

SEXO	FRECUENCIA	% DEL TOTAL DE POSITIVOS	% DEL TOTAL DE LA POBLACIÓN
Masculino	30	56,60%	22,90%
Femenino	23	43,00%	17,55%
Total	53	100%	40,45%



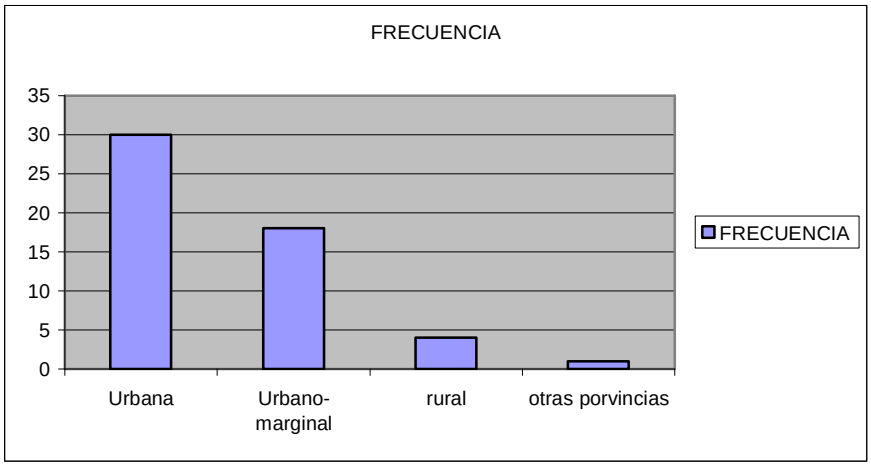


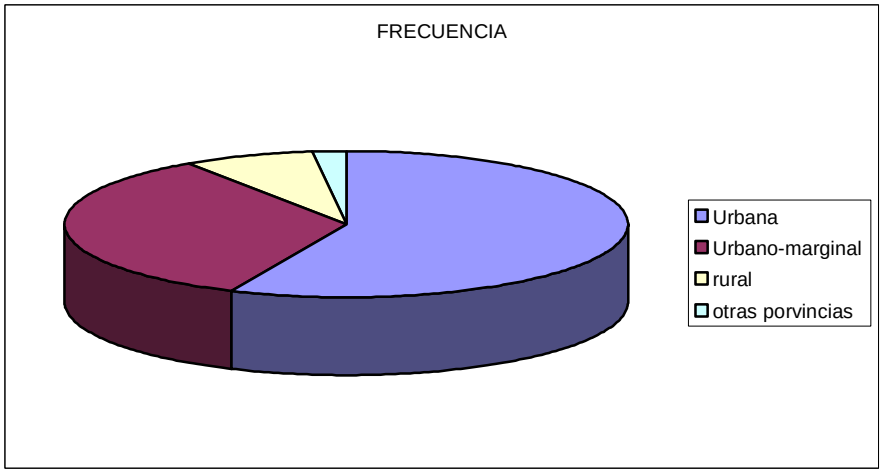
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 6

PROCEDENCIA DE LOS PACIENTES MENORES DE 3 AÑOS POSITIVOS PARA ROTAVIRUS HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO JUNIO DEL 2005

PROCEDENCIA	FRECUENCIA	% DEL TOTAL DE POSITIVOS	% DEL TOTAL DE LA POBLACIÓN
Urbana	30	56,60%	22,90%
Rural	18	34,00%	13,74%
Urbano marginal	4	7,50%	3,05%
otras provincias	1	1,88%	1%
total	53	100%	40,69%



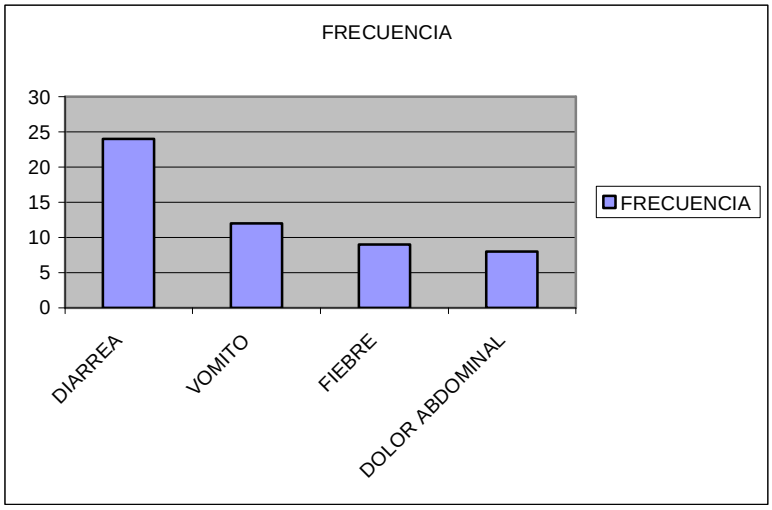


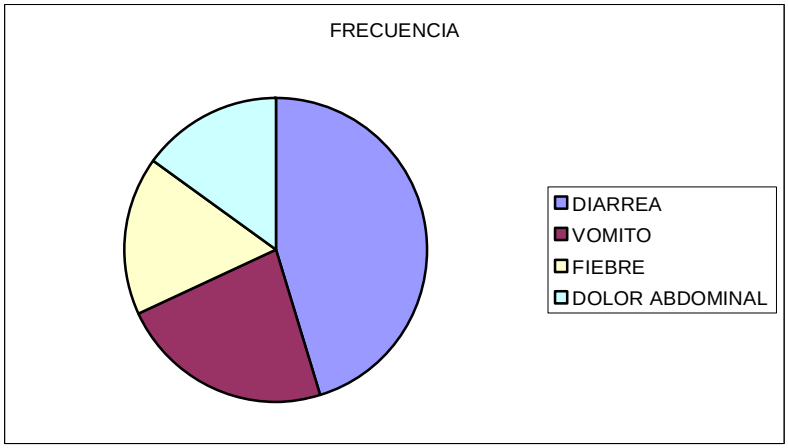
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 7

CUADRO CLÍNICO DE LOS PACIENTES POSITIVOS PARA ROTAVIRUS MENORES DE 3 AÑOS HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO JUNIO DEL 2005

CUADRO CLÍNICO DE LOS PACIENTES POSITIVOS PARA ROTAVIRUS E-J AÑO 2005		
SIGNOS Y SINTOMAS	**FRECUENCIA**	**% DEL TOTAL DE POSITIVOS**
DIARREA	24	45,28%
VOMITO	12	22,64%
FIEBRE	9	16,98%
DOLOR ABDOMINAL	8	15%
TOTAL	53	100%



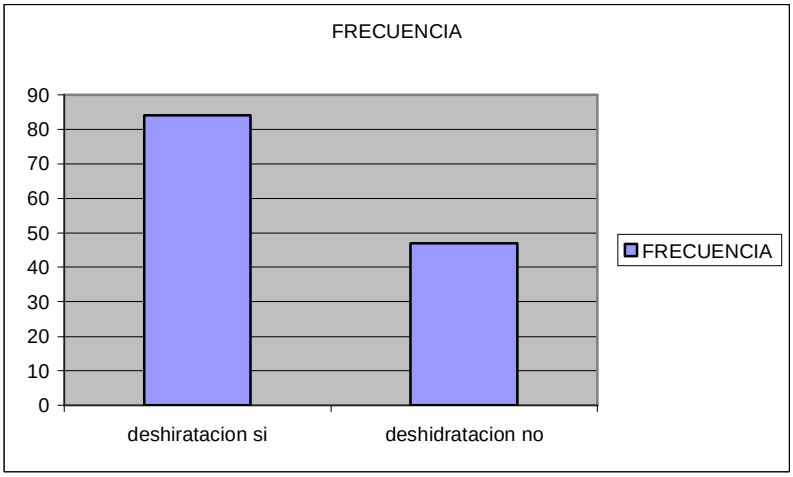


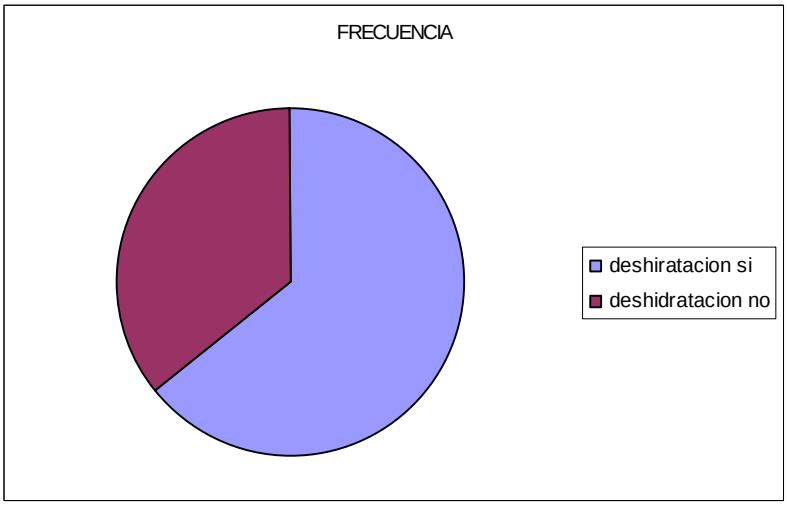
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 8

GRAVEDAD DEL SINDROME DIARREICO AGUDO EN LOS PACIENTES INGRESADOS EN EL HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO-JUNIO 2005

GRAVEDAD DEL SDA	FRECUENCIA	VALOR PORCENTUAL
deshidratación si	84	64%
deshidratación no	47	36%
total	131	100%



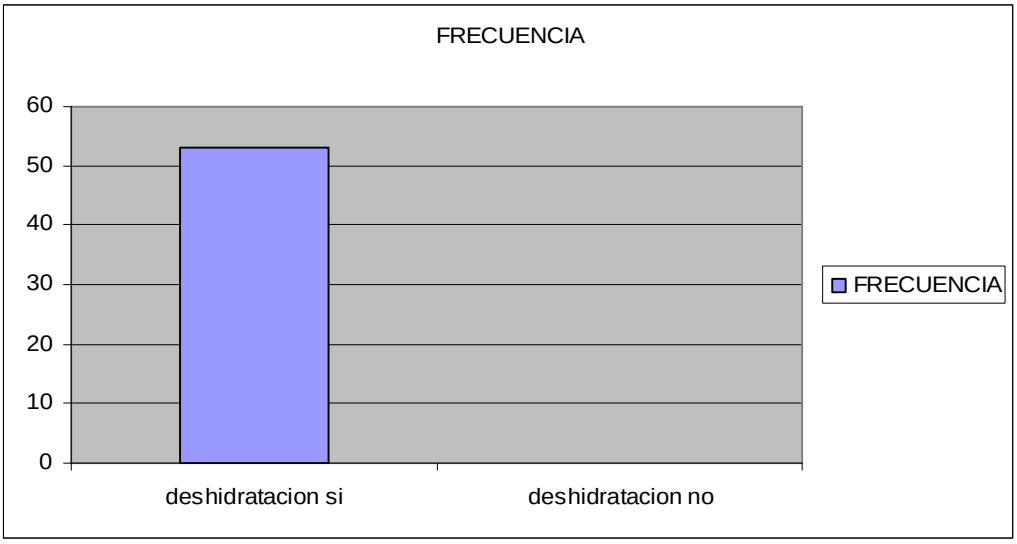


PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 9

GRAVEDAD DEL SINDROME DIARREICO AGUDO EN LOS PACIENTES POSITIVOS PARA ROTAVIRUS HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO JUNIO 2005

GRAVEDAD DEL SDA	FRECUENCIA	% del total de deshidratacion
deshidratación si	53	63,09%
deshidratación no	0	0%
total	53	63,09%

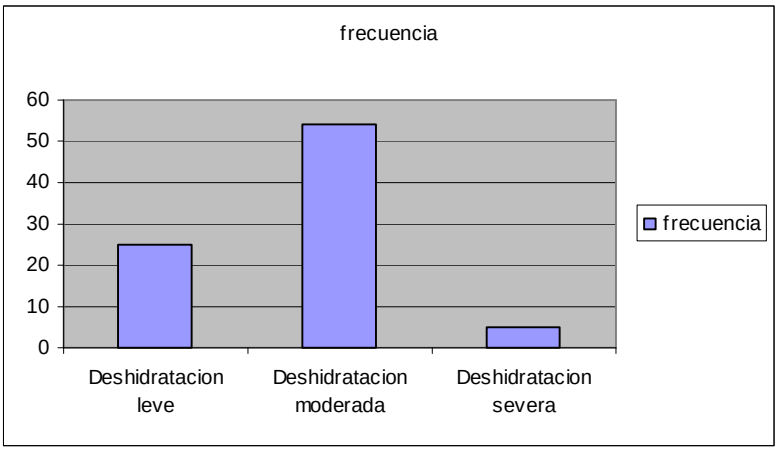


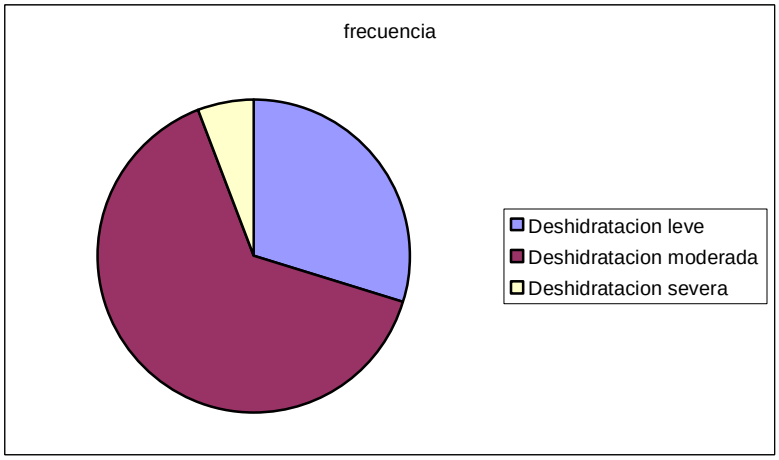
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 10

INTENSIDAD DEL SINDROME DIARREICO AGUDO EN PACIENTES INGRESADOS EN EL HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO-JUNIO 2005

INTENSIDAD	frecuencia	% del total de Deshidratación
Deshidratacion leve	25	29,76%
Deshidratacion moderada	54	64,28%
Deshidratacion severa	5	5,95%
TOTAL	84	100%



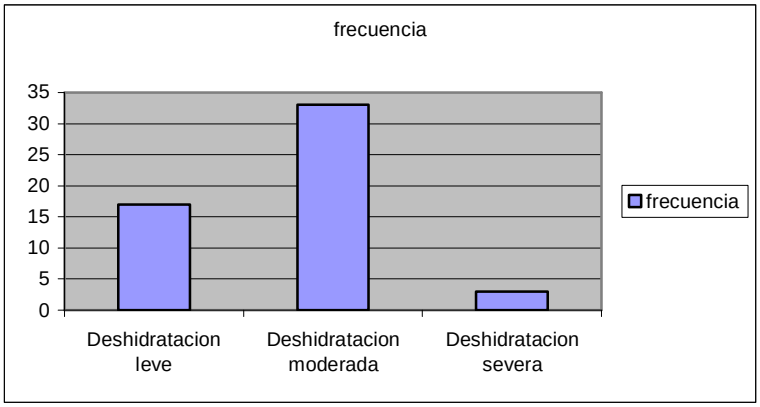


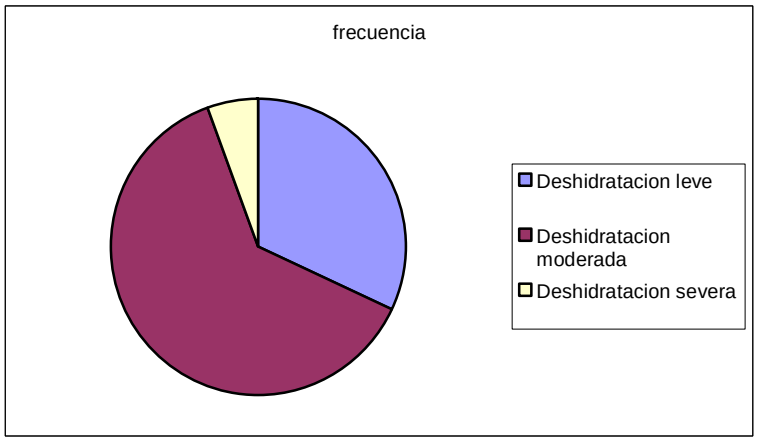
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 11

INTENSIDAD EN LOS PACIENTES POSITIVOS PARA ROTAVIRUS
HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA
ENERO JUNIO 2005

INTENSIDAD	frecuencia	% del total de positivos
Deshidratacion leve	17	20,23%
Deshidratacion moderada	33	39,28%
Deshidratacion severa	3	3,57%
TOTAL	53	100%

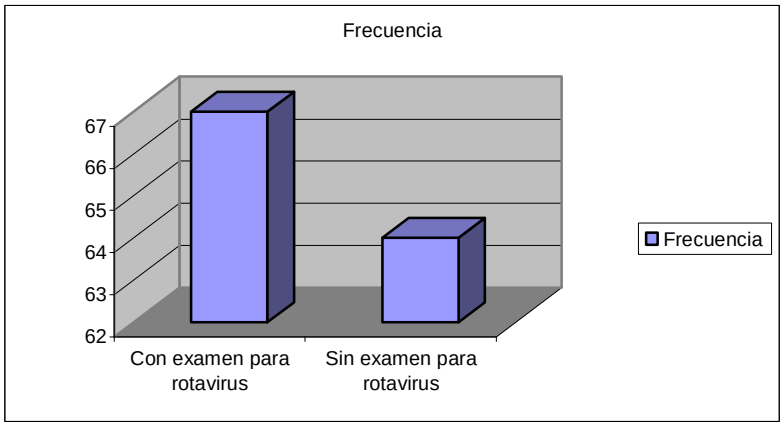


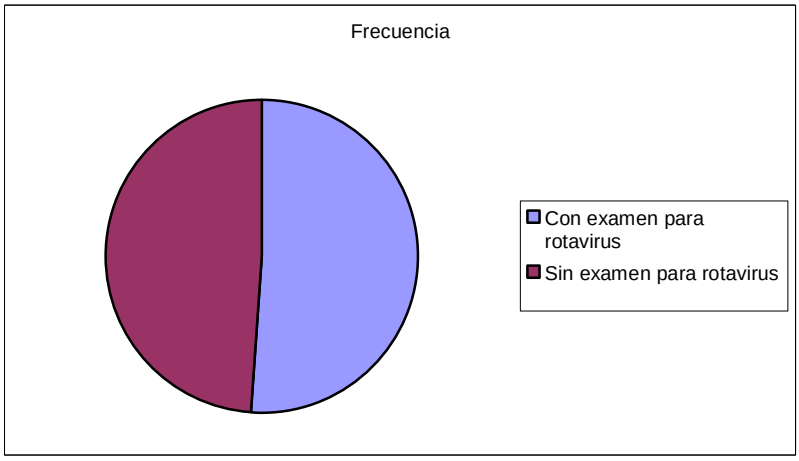


PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 12
MÉTODO DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO EN PACIENTES INGRESADOS EN EL HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO JUNIO 2005

METODO DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	Frecuencia	Valor porcentual
Con examen para rotavirus	67	51,14%
Sin examen para rotavirus	64	48,85%
Total	131	100%



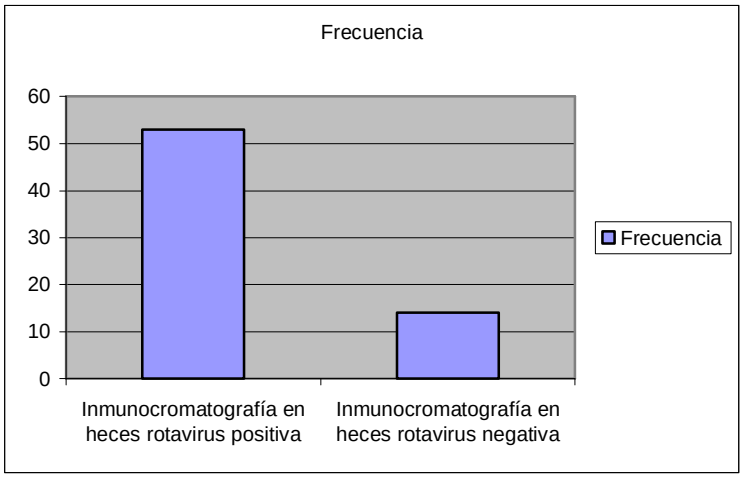


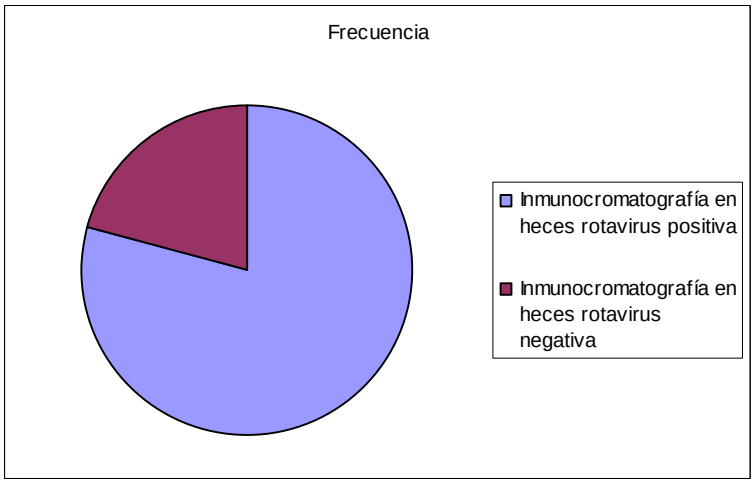
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 13

MÉTODO DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE INMUNOCROMATOGRAFÍA EN HECES EN LOS PACIENTES POSITIVOS PARA ROTAVIRUS HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO JUNIO 2005

METODO DIAGNOSTICO	Frecuencia	% del total de exámenes para rotavirus	% del total de la población
Inmunocromatografía rotavirus positivo	53	79,10%	40,45%
Inmunocromatografía rotavirus negativa	14	20,89%	10,68%
TOTAL	67	100%	51.13%



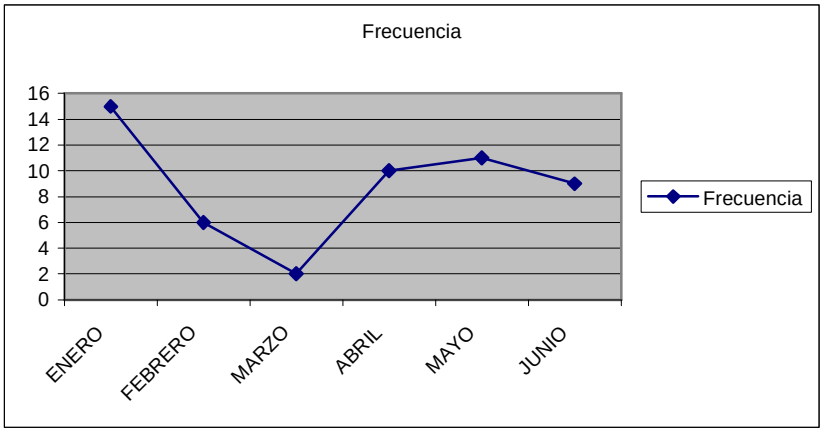


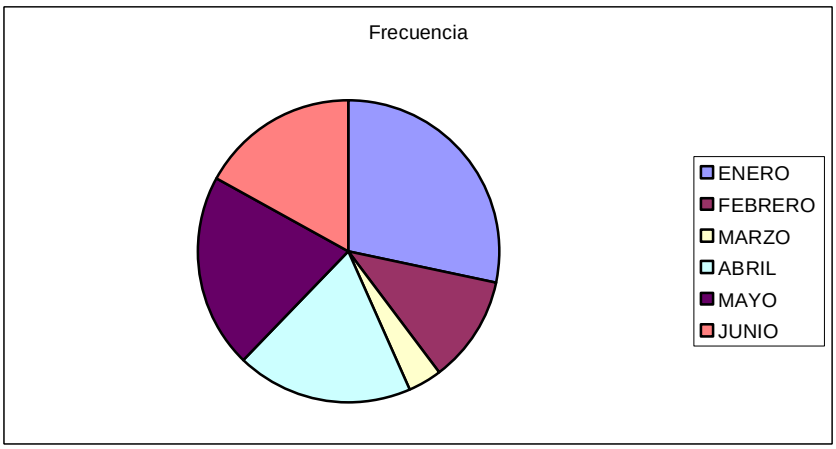
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TABLA Y GRÁFICO 14

INMUNOCROMATOGRAFÍA ROTAVIRUS POSITIVA DEACUERDO A LOS MESES INGRESADOS HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA ENERO-JUNIO AÑO 2005

MESES	Frecuencia	% del total de positivos	% del total de la población
ENERO	15	28,30%	11,45%
FEBRERO	6	11,32%	4,58%
MARZO	2	3,77%	1,52%
ABRIL	10	18,86%	7,63%
MAYO	11	20,75%	8,39%
JUNIO	9	16,98%	6,87%
TOTAL	53	100%	40,44%





PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CAPITULO 7

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Durante los meses de enero a junio la frecuencia y porcentaje de la población total de 131 pacientes menores de tres años con síndrome diarreico agudo ingresados en el área de hospitalización del Hospital Verdi Cevallos Balda fue la siguiente: En enero 32 pacientes lo que corresponde a un 24,42% ; en el mes de febrero 18 pacientes lo que corresponde a un 13,74% ; en el mes de marzo 9 pacientes lo que corresponde a 6,87% ; en el mes de Abril 25 pacientes lo que corresponde a 19,08% ; en el mes de mayo 26 pacientes lo que corresponde a 19,84% ; en el mes de Junio 21 pacientes lo que corresponde a 16,03 % (Ver tabla y gráfico de resultados Nº 1).

- De esta población de 131 pacientes menores de tres años ingresados por síndrome diarreico agudo, se observo la frecuencia y porcentaje de los pacientes con exámenes clínico y de laboratorio para rotavirus y de otros etiológicos, en lo cual se determinó lo siguiente: Para los pacientes con examen clínico más laboratorio para rotavirus se observó una frecuencia de 67 pacientes que corresponde a un porcentaje del 51,10% de la población total ; Para los pacientes con examen clínico sugerente y no presencia de examen de laboratorio se observó una frecuencia de 42 pacientes lo que corresponde a un 32% del total de la población ; Para los pacientes con examen clínico y de laboratorio para otros etiológicos corresponde un 22% del total de la población. (Ver tabla y grafico de resultados Nº 2).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- Deacuerdo a la frecuencia y porcentaje de los 67 pacientes con examen clínico y de laboratorio para rotavirus se obtuvo los siguientes datos: Los pacientes con examen clínico y de laboratorio positivo para rotavirus se observó una frecuencia de 53 pacientes lo que corresponde a un 79, 10% del total de exámenes de laboratorio y a un 40,40% del total de la población; para los pacientes con examen clínico y de laboratorio negativo para rotavirus se observó una frecuencia de 14 individuos lo que corresponde a un total del 720,89% del total de exámenes de laboratorio y a un 10,68% del total de la población. A este último con el porcentaje anterior corresponde a un porcentaje total de la población estudiada de un 51,08%.(Ver tabla y grafico de resultados Nº 3).

- En base a la frecuencia y porcentaje de la edad de los pacientes positivos, se observó lo siguiente: Con respecto a los recién nacidos durante todos los meses del tiempo de estudio se determino una frecuencia de cero pacientes; en los lactantes menores solo se observo una frecuencia de 2 pacientes lo que corresponde a un total de positivos de 3,77% y a un 15,26% del total de la población; en los lactantes mayores se observó una frecuencia de 12 pacientes lo que corresponde a un total de 22,64% del total de positivos y a un 9,165 del total de la población; Los pre-escolares presentaron una frecuencia de 39 pacientes lo que corresponde a un 73,58% del total de positivos y a un 29,70% del total de la población. (Ver tabla y gráfico de resultados Nº 4).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Con respecto a la frecuencia y porcentaje del **sexo** de los pacientes positivos, se observó lo siguiente: se determinó que la frecuencia del sexo masculino fue de 30 individuos con un porcentaje de 56,605 del total de positivos y a un 22,90% del total de la población; para la población femenina se observó una frecuencia de 23 individuos con un porcentaje de 435 del total de positivos y un 40,455 del total de la población. (Ver Tabla y gráfico de resultados Nº 5).

- Con respecto a **la procedencia** de los pacientes positivos tenemos la siguiente observación: los pacientes pediátricos positivos tenían una frecuencia de 30 niños de localización urbana lo que corresponde a un porcentaje del total de positivos de 56,60% y a un 22,90% del total d la población; 18 pacientes de localización rural con un porcentaje de 34% del total de positivos y un 13,74% del total de la población ; 4 pacientes de localización urbano marginal lo que corresponde a un 7,50% del total de positivos y a un 3,% del total de la población; pacientes de otras provincias tenían una frecuencia de 1 y un porcentaje de 1,88% del total de positivos y un 1% del total de la población (Ver tabla y gráfico de resultados Nº 6).

- Con respecto a la distribución de las frecuencias y porcentajes del **cuadro clínico de los pacientes positivos** tenemos la siguiente frecuencia: diarrea en 24 pacientes con un porcentaje de 45,28% del total de positivos; el vómito una frecuencia de 12 pacientes lo que tuvo un porcentaje de 22,64; la fiebre una frecuencia de 9 pacientes con un porcentaje de 16,98%; el dolor

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

abdominal tuvo una frecuencia de 8 pacientes con un porcentaje de 15% (ver tabla y gráfico de resultados Nº 7).

- Con respecto a la **gravedad**, se determinó la frecuencia de la deshidratación con respecto a su positividad o negatividad en la población total: una frecuencia de 84 pacientes para la si deshidratación lo que corresponde a un porcentaje del 64% del total. Y una frecuencia de la no deshidratación de 47 pacientes lo que corresponde a un porcentaje de 36% del total de la población (ver Tabla y gráfico de resultados Nº 8). Así mismo se determinó la positividad o negatividad en la población positiva: una frecuencia de 53 pacientes para la si deshidratación lo que corresponde a un porcentaje de 100% del total de la población y una frecuencia de 0 para la no deshidratación (ver Tabla y gráfico de resultados Nº 9).

- Con respecto a la **intensidad,** se determinó la frecuencia de la deshidratación con respecto a si es leve, moderada o grave primeramente en relación al número de los pacientes que estaban deshidratados: para la deshidratación leve frecuencia de 25 pacientes lo que corresponde a un 29,76% del total de pacientes deshidratados; deshidratación moderada 54 pacientes lo que corresponde a un 64,28% del total de pacientes deshidratados y deshidratación severa con 5 pacientes lo que corresponde a un 5,95% del total de los pacientes deshidratados(Ver tabla y gráfico de resultados Nº 10).Así mismo se estableció la frecuencia de la deshidratación con respecto a si es leve, moderada o grave en la población positiva: deshidratación leve 17

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

pacientes con un porcentaje de 20,23% del total de población deshidratada; deshidratación moderada 33 pacientes con un porcentaje de 39,28% del total de población deshidratada; y deshidratación severa 3 pacientes con un porcentaje de 3,57% del total de población deshidratada(Ver tabla y gráfico de resultados Nº 11).

- Con respecto al método de diagnostico de laboratorio para el examen de rotavirus en la población total se registró lo siguiente: La frecuencia de pacientes con examen para rotavirus tuvo una frecuencia de 67 exámenes de pacientes lo que corresponde a un porcentaje de 51,145 del total de la población. La frecuencia de pacientes sin examen para rotavirus fue de 64 lo que corresponde a un valor de 48,85% del total de la población.(ver tabla y gráfico de resultados Nº 12). De los pacientes con examen para rotavirus se determinó que el único tipo de método diagnóstico presente fue la Inmunocromatografía-ELISA en heces fecales. De estos 67 pacientes con examen para rotavirus se registro que 53 individuos tenían Inmunocromatografía en heces para rotavirus positiva lo que corresponde a un 79,105 del total de exámenes y un 40,45% del total de la población estudiada; Los 14 pacientes restantes pertenecían a la Inmunocromatografía en heces para rotavirus negativa lo que corresponde 20,89% del total de exámenes y a un 10,68% del total de la población. El total porcentual de la población de pacientes con examen para rotavirus es del 51,13%(Ver tabla gráfico de resultados Nº 13).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- En base a lo anterior, se estimó la frecuencia y porcentajes de presentación de los pacientes rotavirus positivos con Inmunocromatografía en heces fecales presentados en cada mes: En enero 15 pacientes positivos con un porcentaje de 28,30% del total de positivos y un 11,45% del total de la población; Febrero una frecuencia de 6 pacientes con un porcentaje de 11,32% del total de positivos y 4,58% del total de la población; Marzo frecuencia de 2 positivos lo que corresponde a 3,77% del total de positivos y a un 1,52% del total de la población; Abril frecuencia de 10 casos positivos lo que corresponde a un porcentaje de 18,86% y a un 7,63% del total de la población; Mayo frecuencia de 11 casos positivos lo que corresponde a un porcentaje de 20,755 del total de positivos y a un 8,39% del total de la población; Junio con una frecuencia de 9 casos positivos y un porcentaje de 16,98% del total de positivos y un 6,875 del total de la población(Ver tabla gráfico Nº 14).

INTERPRETACIÓN:

1. En base a los datos recogidos se determinó que entre los meses de Enero a Junio del 2005 existió un registro de 131 pacientes con Síndrome Diarreico Agudo siendo esta una causa importante de ingreso en el Hospital Verdi Cevallos Balda para la población infantil, tal como se aprecia en los datos ofrecidos por la OMS, constituyendo un problema de morbilidad y mortalidad de salud pública en nuestro población en vías en desarrollo.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

2. Se observó que de la población de 131 pacientes el 51% de niños menores de tres años tenían examen clínico y de laboratorio para rotavirus. De estos, se determinó que la Inmunocromatografía ELISA para heces fecales fue el único examen presente para la detección del rotavirus. De estos se determinó que el 79,10% eran Inmunocromatografía de heces para rotavirus positivos, mientras que el 20,89% eran Inmunocromatografía de heces para Rotavirus negativos. En función del total de la población la Inmunocromatografía de heces positiva representa el 40,45% mientras que la Inmunocromatografía en heces Negativa representa el 10,68%.
3. En relación a la edad Pediátrica de los casos positivos, el grupo de edad de los pre-escolares predominaron en un porcentaje de 29,70% del total de la población seguidos de los lactantes mayores en un 9,16%, los lactantes menores en un 1,52%. Los recién nacidos no mostraron ninguna presencia a lo largo del tiempo de estudio probablemente debido a que en ellos según demuestra la literatura se encuentran protegidos parcialmente por la inmunidad proporcionada por la madre. En relación de lo anterior se relaciona lo demostrado en la literatura que la población inferior a los tres años es la más afectada y el grupo más frecuente para infección del síndrome diarreico por rotavirus lo constituyen los lactantes mayores y pre-escolares.
4. Con respecto al sexo pediátrico de los casos positivos, se demostró que el 22,90% de la población estudiada eran individuos masculinos y un 17,55% de la población eran individuos de sexo femenino. Al respecto a

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

nivel mundial según la OMS y estudios propuestos por 41 países en el sexto simposio internacional sobre rotavirus han establecido que no hay una asociación clara real de la distribución por sexo pero hay una ligera inclinación del sexo masculino sobre el femenino.

5. Con respecto al lugar de procedencia, La población positiva para rotavirus de tipo Urbana, predominó en gran medida sobre las demás en un porcentaje del 22,90%.En orden descendente se le sumo la localización rural con un porcentaje de 13,74%, la urbano-marginal con un 3,05% y la de otras provincias con un porcentaje del 1 %, este ultimo fue un paciente derivado de la provincia del Guayas, lo que llama la atención debido a que los pacientes de los hospitales provinciales deben ser trasladados dependiendo de su complejidad, y este paciente provenía del Hospital Del Niño Roberto Gilbert de Guayaquil. A pesar del predominio demostrado en la población urbana la literatura refiere que el síndrome diarreico agudo por rotavirus constituye una enfermedad democrática y que en sí no respeta el estado social o económico de las poblaciones aunque existe un claro predominio a nivel mundial de los países sub-desarrollados en relación a los desarrollados en la presencia de esta enfermedad.

6. Con respecto a los signos y síntomas presentes en los pacientes positivos se registró que el signo de la diarrea se encontraba presente en los pacientes en un porcentaje de 45,28% en relación con la población, de ahí en orden descendente le siguieron el vómito en un porcentaje de 22,64%, la fiebre en un porcentaje 16,98% y el dolor abdominal en un 15%.De esta manera observamos que el signo de la diarrea y el vómito se presento

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

en forma más frecuente en esta patología sobre los anteriores signos y síntomas. Al igual que todos los gastroenteritis agudas la presencia de uno de estos signos o de ambos o de su combinación no exime la presencia de este etiológico en esta enfermedad, por lo que a pesar de que existe un claro predominio de la diarrea sobre el vómito son datos inconstantes y que pueden estar presentes en mayor o menor medida. Con respecto a ello la literatura nos reporta que la diarrea y el vómito son los signos más frecuentes de este síndrome diarreico agudo por rotavirus, pero que aparecen en orden cronológico debido a que en un plazo de 48 horas se re-epiteliza la vellosidad intestinal es decir uno da paso al otro y pueden estar presentes en combinación como parte del complejo sintomático.

7. Con respecto a la gravedad, la presencia positiva de deshidratación predominó en la población total en un 64% y en la población positiva para rotavirus en un 100%. Con ello demostramos que la presencia de deshidratación es una complicación muy frecuente en el síndrome diarreico agudo por Rotavirus tal como lo registra la OMS como complicación frecuente de morbilidad y mortalidad en un porcentaje de 50-70%.

8. Con respecto a la intensidad, se registró que la deshidratación moderada predominó en la población deshidratada tal como para la población positiva para rotavirus con los siguientes valores; la deshidratación moderada correspondió a un porcentaje 64,28% de la población deshidratada y a un 39,28% de la población positiva para rotavirus; de ahí en orden de frecuencia le siguió la deshidratación leve con un porcentaje

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

de 29,76% para la población deshidratada y un 20,23% para la población positiva para rotavirus. La deshidratación severa se encontró en último lugar en un porcentaje de 5, 95% para la población deshidratada y un 3,57% para la población positiva para rotavirus. Tal como nos ofrece la información de la OMS y el sexto simposio de Rotavirus, la deshidratación en los pacientes es muy severa si no se la trata en su respectivo momento. Así mismo tenemos que en mayor o menor medida los Centros de Salud ofrecen guías y controles de prevalencia adecuados de exámenes, lo que ofrece que la prevención y la atención temprana en la aparición de esta complicación no se de a efecto evolutivamente en la cronología de la enfermedad.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

1. Se concluye con este estudio, que existió una Incidencia de Síndrome Diarreico Agudo por Rotavirus de un 40,45% de un total de 131 pacientes menores de tres años ingresados en el Hospital Verdi Cevallos Balda de Portoviejo durante enero a Junio del 2005.

2. Del total de la población, la edad pediátrica mas frecuente de menores de tres años positivos para rotavirus, predominantemente lo constituyeron los pre-escolares seguido de los lactantes mayores.

3. Con respecto al sexo pediátrico de los pacientes positivos para rotavirus, se observó y determinó que la población predominante fue la masculina sobre la femenina.

4. Con respecto al lugar de procedencia se determinó que los pacientes de localización urbana en mayor medida predominaron sobre los demás. Seguida en menor medida por la población la rural.

5. Así mismo, concluimos que el método para la estimación clínica de los pacientes positivos, es decir, la tabla de OMS-Fortín y Parent es muy eficiente, sensible y fácil de usar en la determinación de la enfermedad diarreica y deshidratación.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

6. Con respecto a los signos y síntomas se determinó que la diarrea fue el signo más predominante y en segundo lugar el vómito aunque a nuestro criterio consideramos que ambos signos pueden estar presentes a lo largo del desarrollo de la enfermedad en mayor o menor grado.

7. Con respecto a la gravedad, se determinó que toda la población positiva para rotavirus desarrollo deshidratación en un 100% como complicación del síndrome diarreico agudo por Rotavirus y concluimos con los demás investigadores y autores que es un conjunto de signos muy frecuente para este tipo de enfermedad.

8. Con respecto a la intensidad, se determinó y concluyó que dentro de la población positiva para rotavirus, presentó un predominio de la deshidratación moderada sobre la leve y en último lugar sobre la severa. Este predominio de este tipo de deshidratación sobre las demás nos indica que muchas veces estos pacientes se ingresan después de dos hasta tres días de iniciado los síntomas, por motivos de falta de conocimiento de la población civil, ya que son muchas las ocasiones que observando una situación real de cuadro clínico de Síndrome diarreico Agudo por la gran cantidad de líquidos que se eliminan con las diarreas, generalmente los padres, no acuden en atención temprana preventiva para el tratamiento adecuado con líquidos y electrolitos y solo hasta que se ha generado la consiguiente pérdida de peso, es cuando estos acuden alarmados por los cambios corporales de la deshidratacion para recibir una adecuada atención medica en un centro hospitalario para la mejora del niño. Así mismo hay que considerar, que la oportuna, rápida y adecuada atención por los médicos residentes y por los

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

médicos tratantes han logrado que la incidencia de deshidratación severa no haya sido muy elevada por la adecuada vigilancia y tratamiento oportuno.

9. Con respecto al método de diagnóstico de laboratorio empleado, concluimos que en el momento del estudio, solo existió para la determinación de rotavirus en heces fecales, la prueba de Inmunocromatografía-ELISA, debido a que es un examen fácil de usar, práctico, de poco tiempo de espera (de media a 1-2 horas en nuestro medio) y que puede corroborar el diagnostico clínico . Dicho examen se observó presente en un 100% de los casos positivos.

10. En conclusión, del total de la población, de la Inmunocromatografía de heces para rotavirus, solo se observó que la población positiva para rotavirus representó el 40,45% mientras que la Inmunocromatografía en heces Negativa representó solo el 10,68% de la población.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CAPITULO 9

RECOMENDACIONES

- Todo paciente con Síndrome Diarreico Agudo que viene por primera vez a la emergencia, consulta o área de hospitalización debe de ser evaluado clínicamente y en forma adecuada, sugerimos el uso de la Tabla de OMS con modificaciones de Fortín y Parent ya que con ella a más de descartar o corroborar la presencia de deshidratación nos puede indicar su estaditaje por pérdida porcentual en líquidos en leve, moderado y severa a más de los signos clínicos tradicionales de diarrea, vomito y fiebre.

- Todo paciente con síndrome diarreico agudo de etiología desconocida y que presenta fiebre, vomito, diarrea y sangre a más de los exámenes coproparasitarios tradicionales, debe ser mandatorio el uso de examen de Inmunocromatografía para rotavirus en todos los menores de 5 años. El hecho de que existan estrías de sangre en heces, no niega la presencia de este agente etiológico debido a que las evacuaciones profusas, frecuentes a más de destruir las vellosidades intestinales, tienden a lacerar la mucosa recto-anal. Así mismo, pacientes pediátricos menores de tres años que tengan diagnóstico de intolerancia a la lactosa debe de realizarse examen en heces para Rotavirus, debido a que lesionan en forma focal las células de las vellosidades del intestino delgado, disminuyendo la producción de la lactasa, disacaridasa responsable de la digestión de la lactosa, lo que condiciona mayor secreción de agua, que se pierde a través de las heces.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

- Al realizar el examen de Inmunocromatografía para rotavirus, este siempre se lo recomienda realizarlo en la emergencia y en los primeros dos días de hospitalización debido al riesgo de contaminación de la muestra por etiológicos virales nosocomiales lo que disminuiría la sensibilidad del examen.

- Recomendamos a las autoridades sanitarias de nuestra provincia para que realicen en base a estos datos, las respectivas vigilancias epidemiológicas y además garanticen por medio del estado un acceso gratuito de los exámenes de laboratorio para realizar en forma rápida y adecuada el tratamiento con reposición de líquidos y en sí no dejar que el paciente genere la complicación de este síndrome que es la deshidratación.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CAPITULO 10

PARTE REFERENCIAL

RECURSOS

1. INSTITUCIONALES

** Departamento de Pediatría del Hospital Verdi Cevallos Balda De Portoviejo

** Departamento de Estadística del hospital Verdi Cevallos Balda De Portoviejo

2. HUMANOS

** Investigadores: Juan Pablo Macias Fernández

Yandri Alexander Delgado Mantuano

** Tratantes Médicos del área de Pediatría:

Dr. Augusto Pérez (Jefe del Departamento de Pediatría)

Dra. Melania Alcívar (Jefe del Departamento de Pediatría)

** Jefe del departamento de Estadística

Ing. Rosa Castillo.

** Personal institucional que labora en el departamento Estadístico del Hospital Verdi Cevallos Balda.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

** Personal que conforma el tribunal de seguimiento, análisis, evaluación y calificación de tesis:

Dra. Melania Alcívar (Directora de Tesis)

Dra. Magali Scott de Quijije (presidenta del tribunal)

Lcda. Julia Espinel (orientadora metodológica)

Dr. Félix Mogro Álvarez (miembro del tribunal)

3. MATERIALES

** Historias clínicas Pediátricas de los Pacientes hasta los tres Años de edad.

** Equipos de Oficina.

** Tratados de Medicina pediátricos.

** Navegación por Internet.

4. ECONÓMICOS (ver presupuesto).

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

PRESUPUESTO DEL PROYECTO DE TESIS

ITEMS	VALOR UNITARIO	CANTIDAD	VALOR TOTAL
Copias	0,02	500	100
Horas de Internet	1,50	100	150
Revistas científicas	10,00	2	20,00
Transporte	3,00	100	300
Artículos de oficina			1200
Refrigerio	2,00	120	240
Impresión. Colores	0,70	100	70,00
Impresión B/N	0,40	1000	400
Curso de investigación	30.00	2	60,00
Empastado de proyecto de tesis	5,00	5	25,00
CD	0,50	20	10,00
Imprevistos			250,00
TOTAL			**2825,00**

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES PARA LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS

AÑO 2005

ACTIVIDADES	*MAY*	*JUN*	*JUL*	*AGO*	*SEP*	*OCT*	*NOV*	*DIC*
PLANIFICA-CIÓN								
Elaboración del protocolo	X	X						
Aprobación del protocolo			X					
PRIMERA REUNIÓN TRIBUNAL DE TESIS				X				
Revisión del protocolo por tribunal				X				
Elaboración de instrumento	X	X	X	X				
Elaboración del marco teórico		X	X	X	X			
SEGUNDA REUNIÓN TRIBUNAL DE TESIS					X			
Elaboración del índice de contenidos					X			
Elaboración cronograma final de tesis					X			
Revisión bibliográfíca final					X			
TERCERA REUNIÓN TRIBUNAL DE						X		

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

TESIS								
EJECUCIÓN						X		
Aplicación de instrumento						X		
Recolección de datos						X		
CUARTA REUNIÓN TRIBUNAL DE TESIS							X	
Análisis de datos							X	
Tabulación de datos							X	
QUINTA REUNIÓN TRIBUNAL DE TESIS							X	
Elaboración de informe final							X	
SEXTA REUNION TRIBUNAL DE TESIS								**X**
Revisión de informe final							X	**X**
Aprobación de informe final								**X**
Elaboración final de tesis								**X**
Presentación de la tesis								**X**

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

BIBLIOGRAFIA

A. TEXTOS

1. ÁNGEL, Gilberto, Diccionario de Laboratorio Aplicado a Clínica. Editorial Médica-Panamericana, México, tercera Edición 2005.
2. ANDERSON, Lois E., Diccionario de Medicina Océano Mosby. Editorial Océano Internacional, España, edición 2002.
3. AVENDAÑO, L F, et al .Infección Intra-hospitalaria por rotavirus en Lactantes. Editorial Internacional, Chile, primera Edición 2000.
4. BRAS, J., et al. Pediatría en atención primaria. Editorial Masson, España, Segunda edición ,2005.
5. CLOHERTY, J. P., et al. Manual De Cuidados Neonatales. Editorial Masson, España, cuarta edición 2005.
6. GAGGERO, Aldo, et al. Prevalencia de la infección aguda por Rotavirus en Niños con gastroenteritis aguda. Editorial Interhispana, Cuernavaca-México, 2000.
7. GAGGERO, Aldo, et al. Transmisión nosocomial de Rotavirus en Pacientes Admitidos por Diarrea. Editorial Interhispánica, Cuernavaca-México, 2000.
8. GARCÍA, G, et al. Guías de Pediatría Práctica Basada en Evidencia. Editorial Mediciencia, Buenos Aires-Argentina, Edición 2003.
9. GONZALES, Napoleón Saldaño, et al. Infectología Clínica Pediátrica. Editorial Mc Graw Hill Interamericana S.A., Cuernavaca-México, séptima

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Edición 2004.

10.HOEKELLMAN, Adam, et al. Atención Primaria en Pediatría.Editorial Océano-MMI by Mosby Inc., Barcelona-España, cuarta edición, volumen II, 2004.

11.KLIEGMAN, Robert, et al. Practical Strategies in Pediatric Diagnosis And Therapy. Editorial Elsevier, EE UU, segunda Edición, 2004.

12.MENEGHELLO J., et al. Pediatría Práctica en Diálogos. Editorial Médica Panamericana, Chile, 2001.

13.NELSON, Waldo Emerson. Estrategias Diagnósticas en Pediatría. Editorial Mc Graw-Hill, Cuernavaca-México, primera edición, 2002.

14.WILLIAN, W. Hay Jr., et al. Diagnóstico y Tratamiento Pediátrico. Editorial Manual Moderno S.A., Cuernavaca-México, Décima edición, 2000.

15.WUETHRICH, Bernice**,** et al, Sexto Simposio Internacional sobre El Rotavirus 2004. Instituto de Vacunas Albert B. Sabin - Oficina de Programas Internacionales, Editorial Saunders Design, Washington-EEUU, Primera edición, 2005.

16.OMS, et al. Manejo y prevención de la diarrea-Pautas prácticas. Editorial Organización Panamericana de la Salud, Bogota-Colombia, quinta Edición 2001.

17.O" RYAN, Miguel, et al. Infectología Pediátrica. Editorial Saunders,EE UU, Quinta edición 2000.

18.OSBORN, Lucy M., et al. Pediatrics. Editorial Saunders, EE UU, Primera Edición, 2005.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

19. PLATA RUEDA, Ernesto, et al. Plata Rueda El Pediatra Eficiente. Editorial Mediciencia, Buenos Aires - Argentina, Edición 2002.

20. POSADA DIAZ, Álvaro, et al. El Niño Sano. Editorial Médica Panamericana, México, tercera edición 2005.

21. PEREZ MORGAN, Renato, Desequilibrio Electrolítico, Editorial Graficart, Quito-Ecuador, séptima edición, 2000.

22. QUIÑONEZ, Ernesto, et al. Bases de Pediatría Crítica. Editorial Nación, Quito-Ecuador, tercera edición 2001.

23. ROMERO CABELLO, Raúl, et al. Síndrome Diarreico Infeccioso. Editorial Médica-Panamericana, México D. F, Primera Edición, 2002.

INTERNET

BUSCADOR: GOOGLE

DIRECCIONES:

1. WWW.Spanishmexicocityproceedings.pdf Acta del Sexto Simposio Internacional sobre el Rotavirus celebrado en México del 7-9 Julio del 2004, versión online, editado por Bernice Wuethrich. Primera edición 2005.
2. WWW.AEG.ASOCIACIÓN española de gastroenterología.htm Secretaría técnica: Ediciones Doyma, S.L.Travessera de Gracia, 17 - 2ºedición 08021 Barcelona.
3. WWW.bbmundo.bbsalud.rotavirus.htm

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

4. WWW.Diagnóstico de infecciones gastrointestinales.htm
5. WWW. sede del XXIV Congreso Internacional de Pediatría.diarreaporrotavirus.htm. Artículo de la Dra. Ramírez Sandoval Patricia, Dr. Quintero Hernández-Tomo 2 Nº 8 Octubre 2001.Subdirección General Médica del ISSSTE-México.
6. WWW..medilegis.com/bancoconocimiento/T/Tribuna102n3pamc/Tribuna102n3pamc.asp
7. WWW.libros.los rotavirus.htm. Artículo de la Dra. López Susana y F. Arias Carlos del Departamento de Genética y Fisiología molecular, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional autónoma de México.
8. WWW.Rev biomed.1997 8:9-13.pdf. Artículo de Revista científica versión on-line titulado Transmisión natural de rotavirus entre humanos y animales**.** Autores Dr. Gerardo G. Polanco-Marín y Dr. Manuel Baeza-Bacab, et al. del Laboratorio de Virología, Centro de Investigaciones Regionales, "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
9. WWW. Revista Cubana de Medicina Tropical-Evaluación de un Dot E.Htm ISSN 0375-0760 *versión on-line.* Dra. RIBAS ANTUNEZ María, et al. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Rev Cubana Med Trop v.48 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2001.
10. WWW.Diagnosticoviralversionlufi.pdf.-métodos de diagnóstico.
11. WWW.ins.mx/salud/index.html-titulo pronóstico de la diarrea por rotavirus.
12. WWW.Enfermedadesinfecciosasymicrobiología2004.html Titulo: Diarrea por rotavirus. Volumen 24 numero 2.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CAPITULO 11

ANEXOS

ANEXO - FICHA BIBLIOGRÁFÍCA

UNIVERSIDAD TECNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD - ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: INCIDENCIA DE SINDROME DIARREICO AGUDO POR ROTAVIRUS EN MENORES DE 3 AÑOS INGRESADOS EN EL HOSPITAL VERDI CEVALLOS BALDA. ENERO-JUNIO 2005.

HISTORIA CLÍNICA Nº: MES:

EDAD

RN ☐

Lactante Menor ☐ Lactante Mayor ☐

Pre-escolar ☐
(Hasta los tres años)

SEXO

Masculino ☐ Femenino ☐

PROCEDENCIA

Urbana ☐ Rural ☐

Urbana marginal ☐ Otras ☐

S.D.A POR ROTAVIRUS **Signos**: diarrea Si No Nº diario ☐

Vómitos Si No Nº diario ☐

Ojos Normales Algo hundidos Hundidos

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Mucosas	Normal	Seca	Agrietada
Lagrimas	Presentes	Disminuidas	Ausentes
Fontanela	Normal	Algo deprimida	Hundida
Pliegue cutáneo	Normal	< de 2 seg.	> 2 seg.
Respiración	Tranquila	Rápida	Profunda
Ingestión de Líquidos	Toma normal	Toma ávidamente	No bebe
Extremidades	Calientes	Frías	Pálidas o azules
Estado Neurológico	Normal	Irritabilidad	Apático o somnoliento

Sintomas: Fiebre Si No Tº ☐ centígrados.

Dolor abdominal Si No

TECNICA DE LABORATORIO

Inmunocromatografía o Elisa de heces fecales ☐

Positivo ☐ Negativo ☐

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

ANEXO DE CUADROS

CUADRO 1

DIEZ PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD INFANTIL EN EL AÑO 2003

N° ORDEN	CÓDIGO	C A U S A S	NUMERO DE MUERTES	%	TASA **
1°	039	Trastornos relacionados con la duración de la gestación y el crecimiento fetal	460	11.5	25.8
2°	032	Neumonía	363	9.1	20.3
3°	044	Otras afecciones respiratorias del recién nacido	333	8.4	18.7
4°	045	Sepsis bacteriana del recién nacido	280	7.0	15.7
5°	042	Dificultad respiratoria del recién nacido	186	4.7	10.4
6°	041	Hipoxia intrauterina y asfixia del nacimiento	183	4.6	10.2
7°	002	Diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso	151	3.8	8.5
8°	052	Malformaciones congénitas del corazón	148	3.7	8.3
9°	055	Otras malformaciones congénitas	110	2.8	6.2
10°	024	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	105	2.6	5.9
		Síntomas, Signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio, no clasificados en otra parte	517	13.0	
		Las demás causas de mortalidad	1,149	28.8	
		TOTAL DEFUNCIONES	**3,985**	100.0	
		Total Nacidos Vivos	178,549		

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CUADRO 2

ROTAVIRUS DEL GRUPO A SEGMENTOS DEL GEN Y PRODUCTOS PROTEICOS		
Segmento del gen	Producto proteico	Comentario
1	VP1	Proteína del core interno
2	VP2	Proteína del core interno (Ligada a ARN)
3	VP3	Proteína del core interno
4	VP4 (división a VP5-VP8)	Proteína cápside externa Hemaglutinina, antígeno De neutralización menor.
5	NS 53	_____
6	VP6	Proteína estructural mayor Proteína cápside interna Antígenos de grupo y sub-Grupo.
7	NS 34	Ligada a ARN
8	NS 35	Participa en replicación ARN
9	VP7	Proteína mayor cápside Externa.
10	NS 28	Proteína de membrana R.E.
11	NS 26	_____

CUADRO 3

GRUPOS DE ROTAVIRUS SEGUN PROTEINA VP6	
GRUPO	RESERVORIO
A	Humano, mono, caballo, puerco, perro, gato, conejo, ratón, vaca, pájaro
B	Humano, puerco, vaca, oveja, rata.
C	Humano, puerco, hurón.
D	Pollo
E	Puerco
F	Pollo
G	Pollo

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CUADRO 4

MECANISMOS POTENCIALES POR LOS QUE EL ROTAVIRUS PRODUCE DIARREA

Reduce la superficie absortiva Desnudación de las microvellosidades, atrofia de las vellosidades, invasión del rotavirus en las vellosidades causando lesión e isquemia
Daño en la funcionalidad de la absorción Disminución de la concentración de disacaridasas, disminución del co-transporte de glucosa y sodio; actividad de la ATPasa disminuida reduciendo a su vez el gradiente electroquímico
Daño celular que altera la absorción Hinchazón mitocondrial, distensión del retículo endoplasmático e infiltración celular mononuclear
Efectos de la proteína enterotoxigénica rotaviral NSP4 Induce incremento de la co0ncentración de calcio intracelular, en modelos de murine actúa como una toxina que induce la diarrea
Estimulación del sistema nervioso Estimulación de la secreción intestinal de líquidos y electrolitos; aumento de la motilidad intestinal resultando en una disminución del tiempo normal de transito gastrointestinal
Alteración de la permeabilidad epitelial Incremento de la permeabilidad para-celular, debilitando las uniones entre las células

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

CUADRO 5

GRADO DE DESHIDRATACIÓN SEGÚN ESTIMACIÓN CLINICA

(Cuadro de datos de la OMS con modificación de las

Categorías de datos por Fortín y Parent)

EXAMEN	0	1	2
Piel	Normal	Seca	Acartonada
Mucosa oral	Normal	Seca	agrietada
Ojos	Normal	Algo hundidos	Hundidos
Lagrimas	Presentes	Disminuidas	ausentes
Fontanelas	Adecuada	Algo deprimida	Hundida
Pulso	Regular	Rápido	débil
Pliegue	Recuperación instantánea	< de 2 segundos	> de dos segundos
Respiración	Tranquila	Rápida	Profunda y lenta
Extremidades	Calientes	Frías	Frías, pálidas o azules
Neurológico	Normal	Irritable	Apático o Somnoliento

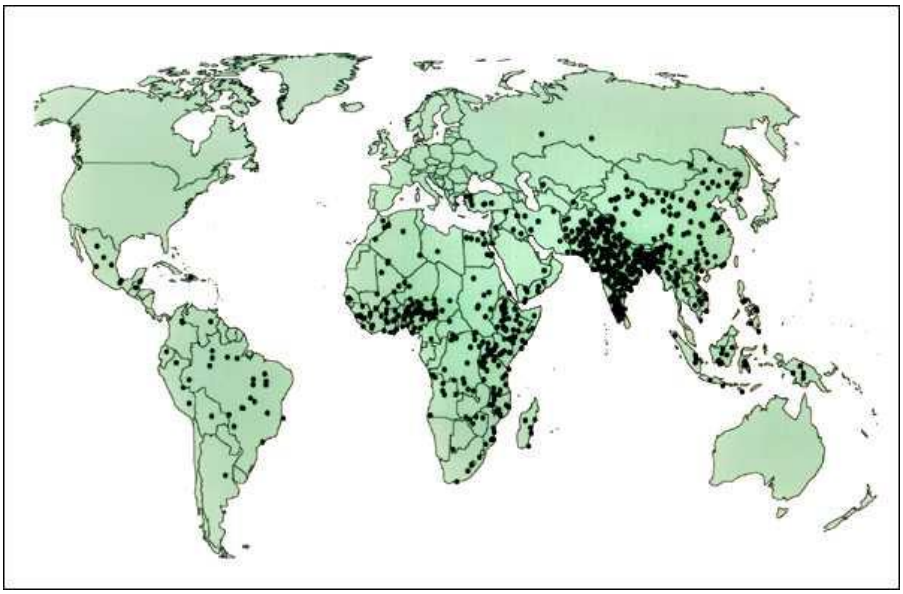
Si el niño está semi-comatoso o muy irritable añadir 3.

TIPO	**VALORACIÓN**
Deshidratación leve	0-3 puntos
Deshidratación Moderada	4-8 puntos
Deshidratación Severa	9-17 puntos

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

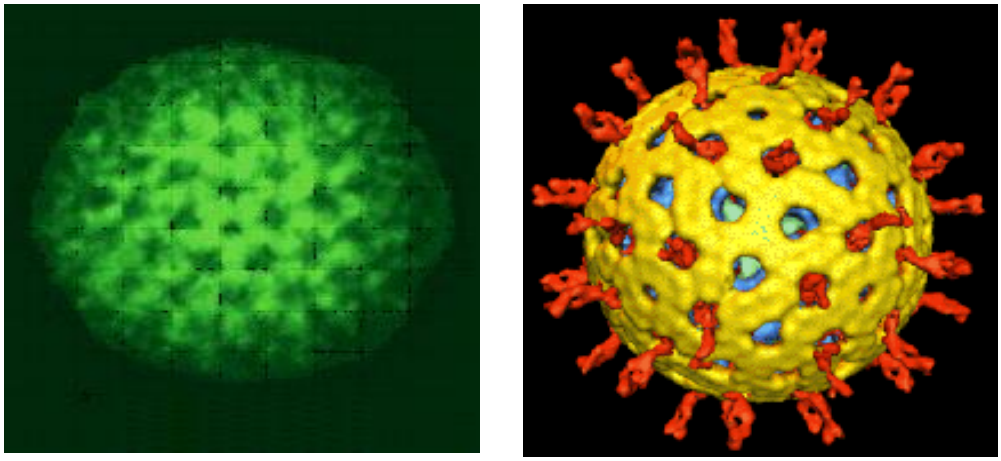
ANEXO DE FIGURAS

Figura 1



Distribución global de las 600.000 a 800.000 muertes anuales que causa la diarrea por rotavirus en la población pediátrica según el CDC de los Estados Unidos 2003.

Figura 2

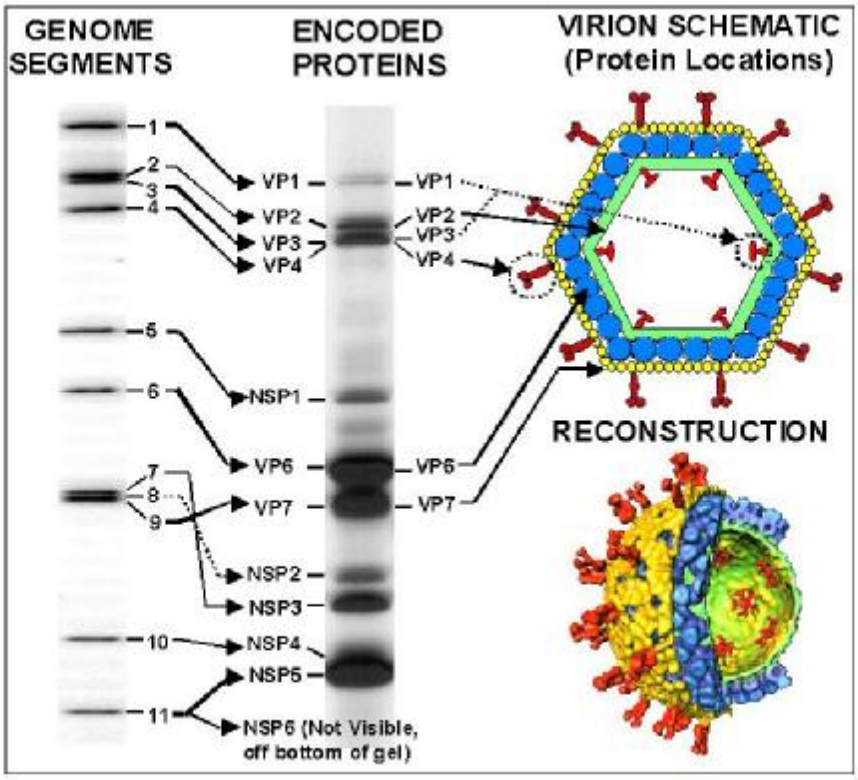


Rotavirus.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Figura 3

Asignaciones codificantes del virión del rotavirus en relación a las proteínas localizadas en la estructura del rotavirus-Imagen 3D



Genome Segments (segmentos de genoma): *Separación de los once segmentos confirmados del genoma rotaviral.*
Encoded proteins(proteínas codificantes): *Presentación de la separación de las posibles proteínas intracelulares sintetizadas mediante técnicas de laboratorio en base al segmento genético del cual fueron decodificados .La proteína estructural (VP) y la proteínas no estructurales son sintetizadas en la célula infectada.*
Viron Schematic (esquema del virión): *Presentación de las localizaciones de varias proteínas estructurales del virión de rotavirus. Se observa los arreglos de las proteínas en base a tres concéntricas capas y la localización del VP1/VP3 y la localización y constitución de las 5 puntas vértices de la estructura icosahédrica*
Reconstruction (reconstrucción): *Reconstrucción en tridimensional del virión a una resolución de 23 A mediante un modelo computarizado. El esquema de color indica la localización de varias proteínas.*

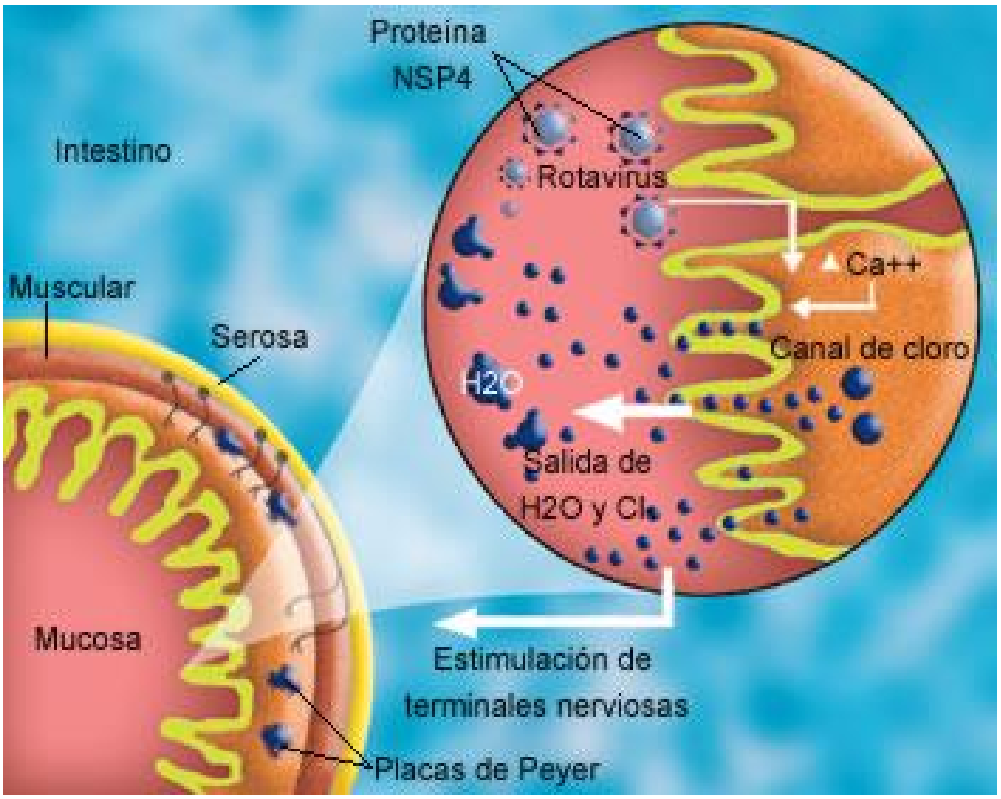
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Figura 4

PATOGENIA DEL ROTAVIRUS.

PROTEINA NSP4

ESQUEMA DEL CONTACTO DE ESTA PRIMERA PROTEINA ENTEROTOXIGÉNICA VIRAL



PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

FIGURA 5
FISIOPATOLOGIA DEL ROTAVIRUS

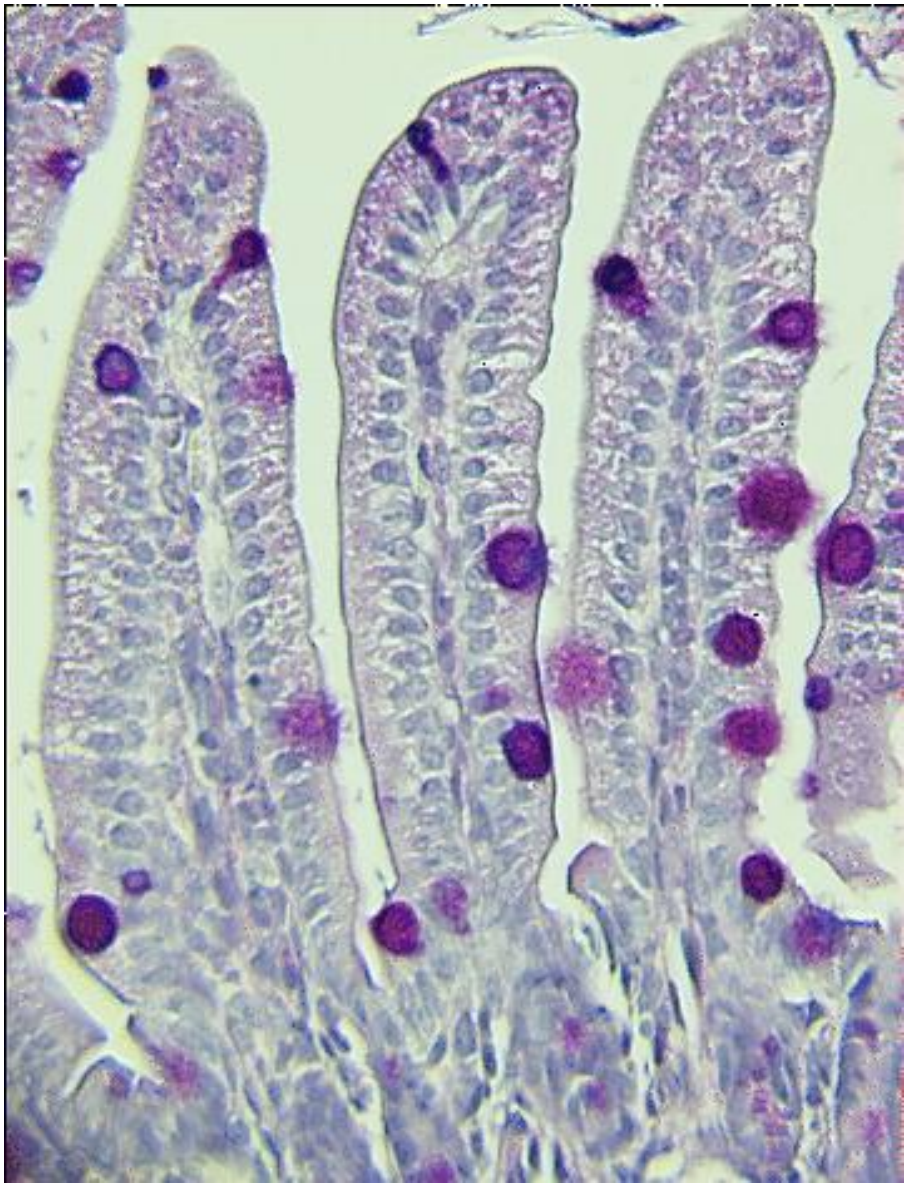
INTERACCION INICIAL DEL VIRUS EN LAS CRIPTAS DEL EPITELIO DEL INTESTINO DELGADO

(OBSERVESE AL ROTAVIRUS IMPREGNADO DE COLOR AZUL)

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

FIGURA 6
FISIOPATOLOGIA DEL ROTAVIRUS

DISTRIBUCION Y FOCALIZACION DEL ROTAVIRUS EN LAS CRIPTAS INTESTINALES A NIVEL DE POSIBLES SITIOS PRODUCTORES DE LACTASA

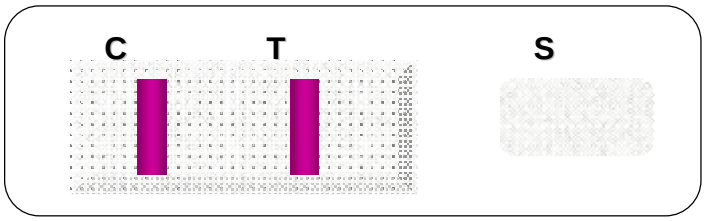


(OBSERVESE AL ROTAVIRUS IMPREGNADO DE COLOR AZUL)

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

FIGURA 7

TÉCNICA DE INMUNOCROMATOGRAFÍA



FUNDAMENTO DE INMUNOCROMATOGRAFÍA
PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

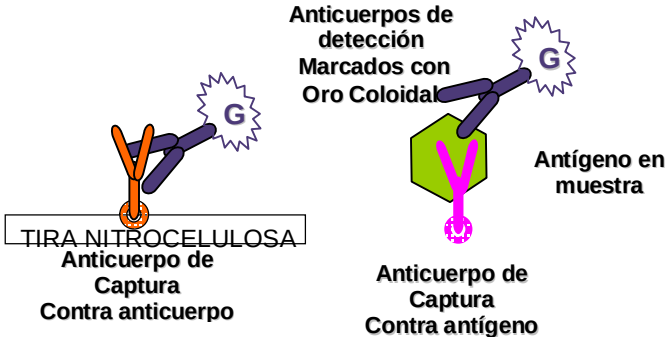
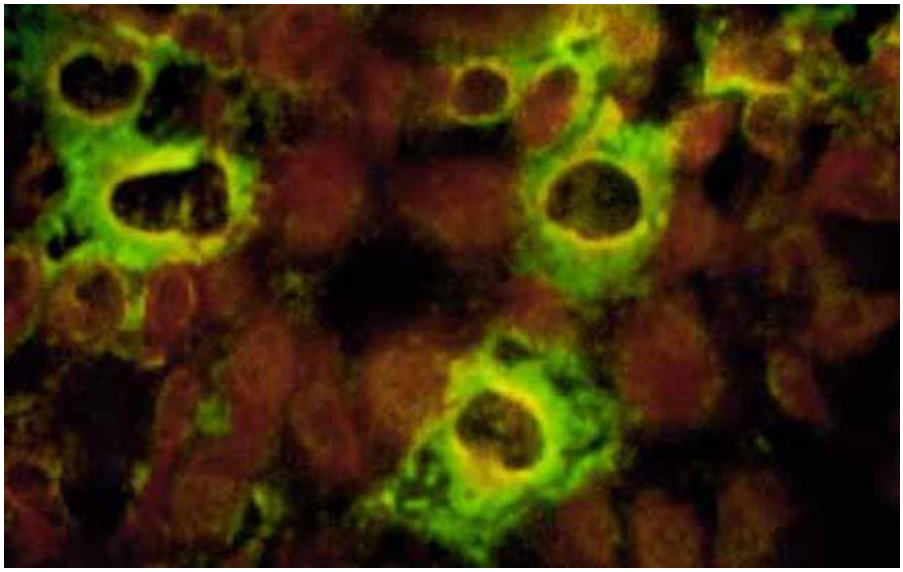


FIGURA 8
TECNICA DE RADIOINMUNOENSAYO



PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

FIGURA 9

INMUNOELECTROMICROSCOPÍA

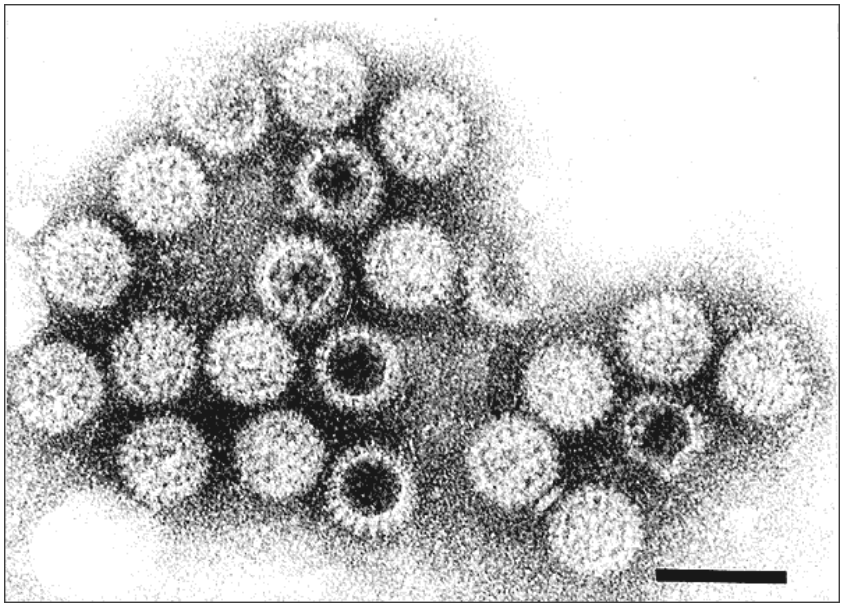
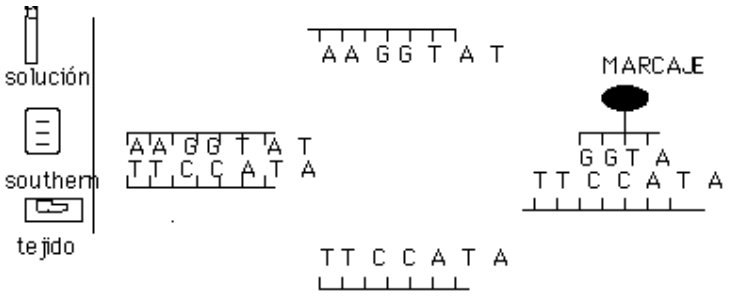


FIGURA 10

HIBRIDACIÓN CON SONDAS

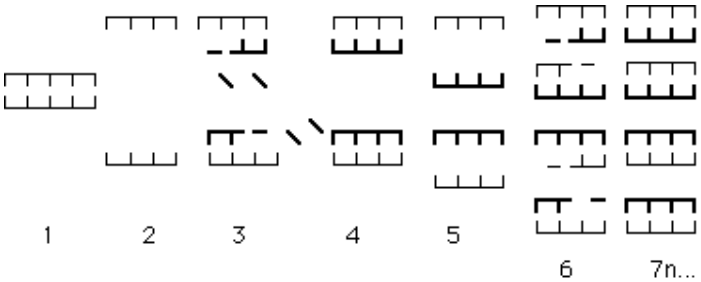


ADN blanco | **Desnaturalización Del ADN** | **Hibridización de la sonda con el ADN blanco**

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

FIGURA 11

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.



1= Primer paso. Mezcla de reacción

2= Desnaturalización

3= Hibridización y extensión

4= ADN duplicado

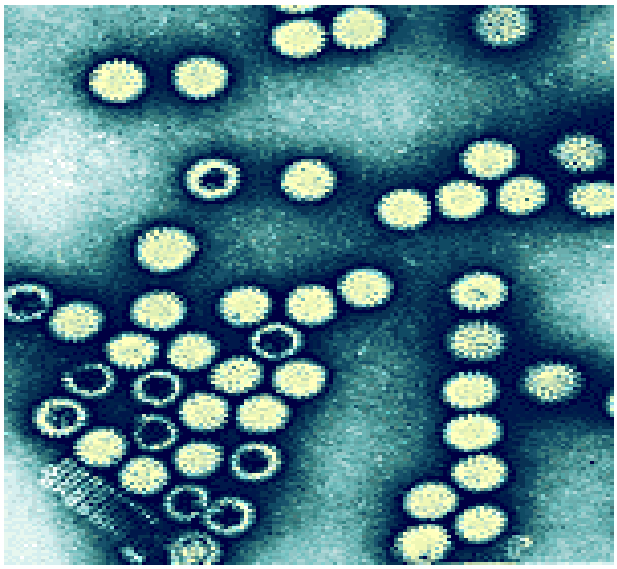
5= Desnaturalización

6= Hibridización y extensión

7= ADN duplicado

FIGURA 12

CULTIVO DE ROTAVIRUS A MANERA DE CONGLOMERADOS. LA OBSERVACIÓN SE REALIZA CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA



PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com