

302927

1
24

Universidad
femenina
de México

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO



Escuela:
Químico Farmacéutico Biólogo
Con Estudios Incorporados a la U.N.A.M.

ROTAVIRUS COMO AGENTE CAUSAL
DE DIARREA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ANDRADE HIDALGO ADELIA ERNESTINA

México, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| | Página |
|---------------------------------------|--------|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 2. OBJETIVO | 3 |
| 3. GENERALIDADES | 4 |
| 3.1 CARACTERISTICAS DEL VIRUS | 4 |
| 3.2 EPIDEMIOLOGIA | 8 |
| 3.3 MANIFESTACIONES CLINICAS | 11 |
| 3.4 PATOLOGIA | 13 |
| 3.5 INMUNOLOGIA | 14 |
| 3.6 METODOS DE DIAGNOSTICO | 15 |
| 3.7 TRATAMIENTO | 20 |
| 3.8 VACUNAS CONTRA EL ROTAVIRUS | 21 |
| 4. ESTUDIOS REALIZADOS | 22 |
| 4.1 MATERIAL Y EQUIPO | 24 |
| 4.2 TECNICA DE ELISA | 26 |
| 4.3 RESULTADOS | 34 |
| 4.4 GRAFICAS | 38 |
| 5. CONCLUSIONES | 46 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 48 |

INTRODUCCION

La gastroenteritis aguda cuya expresión clínica dominante es la diarrea sin agente patógeno demostrable, es atribuible a los virus.

Antes del decenio de 1960 no existían pruebas de que los virus fueran causantes de diarrea, pero la relación se sospechaba a raíz de ciertos estudios en que se administraron filtrados fecales de pacientes con diarrea, no bacilar y no amibica, a voluntarios que posteriormente contrajeron diarrea. (12, 41, 35).

Ahora, gracias a los adelantos tecnológicos de los últimos dos decenios, se descubrieron los agentes enterovíricos que podemos dividirlos en dos grandes grupos: la producida por los Rotavirus y la producida por agentes semejantes a los virus Norwalk, pueden reconocerse otros en menor escala como los Adenovirus, Astrovirus, Calcivirus, Coronavirus y algunos mal caracterizados como pequeños virus redondos (1,51).

La gastroenteritis infecciosa por Rotavirus se encuentra principalmente en niños desnutridos, se ha observado una mayor frecuencia en niños menores de 5 años y sobre todo en los menores de 2 años (9-12 meses), Alvarez-Muñoz (1,6).

Los Rotavirus tienen distribución mundial, pero sobre todo se detectan en Asia, Africa y América latina, encontrándose además en Australia, Inglaterra y Canadá (13, 25, 29).

En México fue descrito por primera vez por Espejo y Col., posteriormente se han realizado varios estudios en diferentes partes de la República (1, 13, 24, 25).

OBJETIVOS

Comprobar que la causa más frecuente de enfermedades diarreicas es el Rotavirus.

Analizar las características de las evacuaciones tanto macro y microscópicamente.

Revisar la metodología existente en el laboratorio clínico y ayudas diagnósticas, para la identificación oportuna del Rotavirus como agente causal importante de gastroenteritis viral.

Buscar la relación que tiene este germen con otros productores de diarrea.

Demostrar cuales son los meses del año en que el porcentaje de enfermedad diarreica aguda aumenta.

GENERALIDADES

CARACTERISTICAS DEL VIRUS

Fue descubierto en 1973 por Bishop y Col. en Australia al observar por microscopía electrónica biopsias de duodeno de niños con diarrea aguda; posteriormente otros investigadores identificaron Rotavirus en heces de niños con gastroenteritis. (6, 7, 8, 26)

Los Rotavirus pertenecen a la familia Rotviridae, basan su nombre en el aspecto observado en la microscopía electrónica donde dan la apariencia de "rueda o anillo".(6)

La observación con microscopía electrónica presenta a estas partículas virales con diferente morfología:

A) Estructuras integradas de 70 nm de diámetro, provista de una capa externa y una subestructura anterior.

B) Partículas de aspecto semejantes al de una rueda, con centro denso, debido a la penetración de la tinción, y una capa (nucleocapside) doble, perfectamente definida en un constituyente interno y otro externo; las dimensiones de estas estructuras son 35 nm para el centro denso y 70 nm la partícula intacta.

C) Partículas desnudas las cuales corresponden al centro denso del virus integro.

D) Estructuras circulares "vacías" con dimensiones de 55-60 nm por lo cual algunos autores las han denominado orvirus o virus semejantes a los Reo.

El análisis rotacional muestra la presencia de 20 unidades estructurales o proyecciones mayores hacia la periferia en forma de icosadeltahedróon, mas que apariencia circular es angular, cada unidad está compuesta de subunidades, hay 180 de ellas como trímeros, dando como resultado un total de 450 unidades estructurales en la superficie de la partícula. La familia Reoviradae tiene como una de sus características que el virión esta compuesto de 10 segmentos en una doble cadena de ARN, la cual esta rodeada por una nucleocapside y 2 capas de proteínas. Los Rotavirus no contienen lípidos, probablemente poseen hidratos de carbono unidos a algunas proteínas (13).

La estructura de estos virus es producto de la combinación de 9 proteínas. El ARN extraído del virus consiste de 11 moléculas de distintos tamaños, las cuales pueden ser separadas en sólo 9 componentes por electroforesis en gel de agarosa, ya que 3 de ellos son semejantes y con igual movilidad electroforética (7).

La partícula completa de las 2 capas del Rotavirus L (ligera) y D (Densa) es infectiva, cuando se pierde la parte polipeptídica externa queda una partícula simple D, no infectiva conservando su capacidad de revertir dentro del ciclo de réplica viral hacia una partícula íntegra, la infectividad del Rotavirus, se puede aumentar más de 100 veces cuando se expone a la acción de la tripsina, propiedad que ahora se utiliza para propagarlos en cultivos de células de riñón de mono (MA-104); la tripsina rompe la estructura del polipéptido L en dos fragmentos que permanecen anclados al virión facilitando su conversión de L a D; esta acción se presenta durante el paso intestinal de los Rotavirus en la infección humana. (52, 70)

Como se dijo anteriormente el genoma viral está constituido por 11 segmentos lineales del ARN de doble hélice, cada molécula contiene un mensaje monocistrónico expresándose en un polipéptido viral. Uno de ellos es una glicoproteína que representa la proteína mayor de la cápside superficial y es responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes (el segmento 8 codifica para la síntesis de esa glicoproteína) En esta región se encuentra la clave de la diversidad antigénica de los Rotavirus y como es de suponerse, ahí podría encontrarse la respuesta para la producción de una vacuna).

Además de la producción de los antígenos serotípicos

específicos los Rotavirus poseen un antígeno común de grupo, demostrado por diversas técnicas, fundamentalmente las de tipo ELISA. El segmento 4 del genoma es responsable de producir hemaglutinación de glóbulos rojos humanos; igualmente codificar para la acción de la tripsina, siendo responsable de la restricción del crecimiento en cultivos de tejidos. (60)

EPIDEMIOLOGIA

En los seres humanos la frecuencia de las diarreas causadas por Rotavirus es menor en los primeros seis meses de la vida. Los lactantes y los niños de 6 a 24 meses suelen contraer una enfermedad más grave, caracterizada por una diarrea muy acuosa que se presenta súbitamente, puede haber fiebre, vómito, deshidratación isotónica y acidosis metabólica compensada. Es común la infección de los hermanos mayores y adultos que están en contacto con los niños infectados. (1, 9, 36).

En Gran Bretaña y Australia se ha presentado en recién nacidos, también en la India, Costa Rica e Italia, se puede afirmar casi con certeza que esta enfermedad se contrae como infección nosocomial.

Es de interés señalar que las infecciones por Rotavirus son poco frecuentes en los neonatos de aborígenes Australianos y los indígenas de Guatemala.

En poblaciones no inmunes los Rotavirus son causas de grandes epidemias, como ocurrió en una comunidad de un Archipiélago aislado del Pacífico y en una aldea de Brasil (15).

Se han notificado brotes esporádicos en adultos y pacientes de geriatría hospitalizados que puede ser por un signo de la disminución de la inmunidad.

Los Rotavirus están distribuidos en todo el mundo, ésto se ha comprobado por medio de investigación seroepidemiológica (67).

En los países industrializados de clima templado los Rotavirus son la causa del 50 al 70% de los casos pediátricos de diarrea que requiere atención médica. La máxima incidencia se produce en invierno (34)..

En las zonas templadas rara vez se detecta Rotavirus durante el verano, por el contrario en los países en desarrollo de clima tropical, la frecuencia oscila entre el 40 y el 50% de los casos durante los meses de máxima incidencia, que generalmente son los más fríos, pero los Rotavirus siguen siendo endémicos (entre el 10 y el 20% de los casos) durante el resto del año.

La transmisión de Rotavirus es de persona a persona, por la vía fecal-oral.

Infecciones asintomáticas ocurren frecuentemente en adultos en contacto con niños. El Rotavirus ha sido asociado

en algunos casos de diarrea del turista.

En nuestro país existen reportes de la ciudad de México, Acapulco, Mérida, Córdoba, San Luis Potosí y Villahermosa.

MANIFESTACIONES CLINICAS

El período de incubación del Rotavirus es de 1 a 7 días para otros autores es de 1 a 4 días, pero en general la mayoría de los pacientes son sintomáticos a los dos días posteriores a la ingestión de material contaminado. El intervalo de duración de la enfermedad es de 1 a 10 días. Durante los 2 a 4 primeros días del inicio del cuadro diarreico, es la época en que las evacuaciones contienen mayor cantidad de virus; por lo que es el momento mas apropiado para identificarla en el laboratorio (7, 60).

La enfermedad se inicia brúscamente, con fiebre de 38 a 39 grados centígrados, la cual puede tener una duración de 1 a 2 días, acompañada de náuseas y/o vómito, el paciente no se muestra severamente afectados. Puede presentarse también sin manifestaciones previas gastrointestinales; súbitamente se inician evacuaciones patológicas aumentadas en número y con disminución en su consistencia; 24 - 48 horas después el paciente está en la fase más aguda del cuadro, la fiebre tiene tendencia a controlarse y ya no hay náuseas o vómito, la diarrea puede ser profusa y presentarse una deshidratación aguda. En ocasiones en esta etapa el paciente de más edad aqueja crisis viserales dolorosas simultáneas con el aumento de peristaltismo, con frecuencia los pacientes con gastroenteritis aguda por Rotavirus cursan con síndrome de absorción

intestinal deficiente. Se ha demostrado que esta deficiencia enzimática tiene su explicación en las lesiones histopatológicas duodenales (3, 60).

El manejo sintomático repositivo resuelve la mayoría de estos casos graves, sin embargo otros tienen curso fatal en pocos días.

En el 25% de los casos se encuentra moco en las heces, la sangre es rara.

Síntomas respiratorios han sido reportados pero no hay evidencias que indique que sean causadas por el virus. En adultos infectados por Rotavirus ocurre comúnmente infección subclínica, probablemente a causa de una inmunidad activa. Por razones desconocidas recién nacidos infectados por Rotavirus son también frecuentemente asintomáticos o tienen únicamente manifestaciones ligeras.

PATOLOGIA

Los Rotavirus infectan a las células en las vellosidades del intestino delgado, se replica en el citoplasma de estos enterocitos y alteran su mecanismo de transporte, las células dañadas, pueden descargar dentro de la luz intestinal una gran cantidad de virus los cuales aparecen en las heces.

La diarrea causada por Rotavirus puede deberse a la absorción inadecuada de sodio y glucosa, pues las células dañadas sobre las vellosidades son reemplazadas por células crípticas inmaduras no adsorventes. (17, 57)

La destrucción de los enterocitos maduros resulta en niveles reducidos de disacaridasas y un decremento en la superficie adsorvida del intestino delgado; lo anterior indica la probabilidad de que la diarrea por Rotavirus se debe a un decremento en la adsorción, ya que un incremento en la secreción, como se ha visto en la diarrea por bacterias toxigénicas, no parece estar envuelto.

INMUNOLOGIA

Se ha demostrado que la IgM sérica específica es producida en respuesta a la infección primaria seguida por Ig G; en algunos adultos una temprana elevación de Ig G ha sido notado indicativa de una respuesta amnésica, por lo tanto, la presencia de anticuerpos séricos no es protección total.

En otras infecciones virales entéricas, anticuerpos locales han demostrado ser un determinante importante de inmunidad.

El Rotavirus humano está asociado con anticuerpos específicos en las heces de algunos pacientes (24, 63).

Reportes de estudios de inoculación en voluntarios, establecen que la protección de infección con Rotavirus, correlaciona mejor con Ig A secretora en el intestino delgado, que con anticuerpos séricos.

Es aparente que la inmunidad inducida por los distintos serotipos, no da protección cruzada, lo que explica los repetidos ataques de gastroenteritis por Rotavirus.

La multiplicación de serotipos de Rotavirus y otros factores hace que la elaboración de vacunas sea incierta. (18)

METODOS DE DIAGNOSTICO

Los métodos de diagnósticos usados para observar el Rotavirus son:

MICROSCOPIA ELECTRONICA: Es el método estándar para valorar la eficacia de los otros métodos usados en el diagnóstico de Rotavirus. El procedimiento requiere una suspensión de heces que puede ser concentrada mediante ultracentrifugación (subsecuente a una clasificación preliminar y/o filtración para remover las bacterias y distritus) y posteriormente colocarse en una rejilla para microscopía electrónica después de teñirse negativamente, ésto con el objeto de bloquear el paso de electrones.

Un refinamiento de este procedimiento consiste en mezclar la muestra con el antisuero específico y después centrifugar el resultante agregado viral; esta poderosa técnica conocida como microscopía inmunoeléctronica fue la que permitió identificar, con todas sus características, al Rotavirus.(36,54)

INMUNOFLUORESCENCIA. Los anticuerpos fluorescentes han sido marcado con un colorante como la fluoresceína o la rodamina que presentan fluorescencia al ser expuestas a la luz ultravioleta o a la luz azul. Los procesos químicos de

conjugación pueden realizarse ahora como simple rutina de laboratorio. Existen dos variantes principales de esta técnica.

a) Inmunofluorescencia directa (A-af). El antígeno viral (A) (en forma de capa monocelular infectada con virus, fijada en acetona, en un cubreobjetos) se expone al suero antiviral marcado con fluoresceína (af). El exceso de af se lava y las células se inspeccionan microscópicamente usando una fuente poderosa de luz (lámpara de vapor de mercurio o de xenón) de la cual toda la luz, menos de la de onda corta, ha sido filtrada, así que la muestra aparece oscura excepto en aquellas áreas donde la fluoresceína es emitida como luz amarilla verdosa.

b) Inmunofluorescencia indirecta (A-a-gf). Este método es conocido como la técnica del "sandwich", difiere en que el anticuerpo viral (a) no está marcado, pero ocupa el lugar de la carne en el "sandwich". Se une al antígeno (A) y también a la antiglobulina gamma conjugada a la fluoresceína (gf) que se agrega posteriormente; la técnica indirecta tiene las ventajas de su gran sensibilidad y, más importante aún, que únicamente requiere de un solo reactivo marcado, la globulina gamma antihumana obtenida de cabra conjugada con fluoresceína, con la que se probará la interacción entre cualquier antígeno y su correspondiente anticuerpo humano (47-69).

FIJACION DEL COMPLEMENTO. Los complejos antígeno anticuerpo van a fijar complemento y los complejos virus-anticuerpo no son excepciones a la regla. Para la prueba de fijación del complemento (FC), los sueros de fase aguda y convaleciente son calentados (a 56° por 30 min) para inactivar el complemento: después se hacen diluciones seriadas. Por lo general, se emplean las microplacas con el fin de ahorrar reactivos, posteriormente se agregan de dos a cuatro unidades de antígeno a cada dilución del suero, así como dos unidades de complemento, derivado (libre de anticuerpos virales) de suero de cobayo. Los reactores se dejan actuar a 4°C . durante 18 horas para que se fije el complemento. Después se agregan eritrocitos de carnero sensibilizados por la adición de anti-suero de conejo GR de carnero (hemolisina) y las placas se incuban a 37°C . por unos 45 minutos. En aquellas partes cóncavas donde se ha fijado el complemento, por el complejo virus anticuerpo, la hemolisina aglutina los GR de carnero virus anticuerpo, la hemolisina aglutina los GR de carnero, pero no los lisa; donde el complemento queda libre, los GR son lisados.

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION. Los anticuerpos pueden inhibir la hemaglutinación mediada por virus (HA) bloqueando en la superficie del virión, a los antígenos, particularmente responsables de este fenómeno. La prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) se realiza de la manera siguiente:

el suero del paciente se trata primero para eliminar o destruir inhibidores no específicos de la HA. Los inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación de numerosos virus pueden ser removidos del suero mediante la absorción con bentonita, caolín o rivanol. Con el suero tratado se hacen diluciones seriadas en una placa cóncava de plástico usando asas de alambre calibradas. A cada dilución contenida en su respectivo recipiente, se añaden 4-5 "unidades aglutinantes" (UA) del virus a probar, utilizando una pipeta-gotero y se agregan en la misma forma, los eritrocitos de la especie animal apropiada. Esta placa se incuba a temperatura y pH adecuados lo suficiente para que se sedimenten los eritrocitos (45 min). El título de IH se toma como la mas alta dilución del suero que inhibe la hemaglutinación. (47, 52)

RADIOINMUNOENSAYO. La disponibilidad de preparaciones libres de portadores conteniendo radioisótopos, especialmente yodo que pueden reaccionar fácilmente con los residuos de tirosina de las proteínas, ha conducido al desarrollo de los radioinmunoensayos para analizar, tanto antígenos como anticuerpos; estos procedimientos son muy sensibles. Uno de los principales reactivos, ya sea el antígeno o el anticuerpo, es marcado con el isótopo de manera que puede seguirse mediante procedimiento estándar, como la autorradiografía o el conteo en un espectrofotómetro. Los dos tipos mas usados de radioinmunoensayo son la radioinmunolectroforesis y la radio inmunodi-

fusión. En ambos procedimientos se utiliza el conocimiento de que las globulina con la actividad de anticuerpos pueden reaccionar con el antígeno, después de su precipitación por el antisuero previamente preparado contra la globulina (52, 57).

ELECTROFORESIS DEL ARN VIRAL. Es de gran especificidad pero se pierden un buen número de casos positivos ya que se necesita que la muestra fecal cuente con un gran número de partículas virales, para poder dar bandas de precipitación. Es un estudio fino ya que se utiliza para tipificar a los Rotavirus.

ENSAYO INMUNOADSORBENTE CON UNA ENZIMA CONJUGADA (ELISA): Las proteínas en condiciones apropiadas de pH se adhieren a la superficie de polivinilo, sobre la proteína adsorbida se lleva a cabo una reacción antígeno-anticuerpo y a este complejo se le añade un reactivo consistente en un conjugado de inmunoglobulinafosfatasa alcalina. El conjugado tiene un gran afinidad por su antígeno homólogo así como una gran actividad enzimática, una vez que el conjugado ha reaccionado con su antígeno se adiciona un sustrato apropiado cuya hidrólisis por la fosfatasa alcalina genera un color fácil de distinguir visualmente y cuantificable espectrofotométricamente. (2, 21, 42,).

TRATAMIENTO

El tratamiento de la diarrea por Rotavirus o de algún agente viral es sintomática y repositiva, lo principal es la hidratación y reposición de electrolitos, ya que puede provocar acidosis, choque y muerte. (34)

La restitución de líquidos y electrolitos se hace por vía intravenosa u oral, de acuerdo a las condiciones del paciente.

No están indicados los antibióticos, antidiarreicos ni los agentes antivirales.

El uso de agua potable y la higiene personal, son medidas de prevención y de control importante. (58)

VACUNAS CONTRA EL ROTAVIRUS

La mejor vacuna hasta ahora documentada es la RIT-4237 que es obtenida del becerro Nebraska y ha sido atenuado pasandolo 147 veces en células del riñón de bovino, no se sabe si estos niveles de purificación son necesario para el uso de la vacuna humana pero la atenuación da un buen margen de seguridad.

El virus de la vacuna puede ser excretado en bajos títulos en evacuaciones en un 12% de los vacunados esta vacuna no se ha reportado ninguna reacción clínica observable en los niños.

La vacunación antes de los 6 meses o a esa edad puede inducir protección en los primeros 3 años de vida contra la gastroenteritis producida por virus. (57, 61)

Se encontró que la vacuna produce una protección mayor del 80% contra diarreas por Rotavirus pero no contra infecciones por Rotavirus. La protección contra la diarrea puede cubrir por lo menos 3 de los 4 serotipos de los Rotavirus humanos.

En las vacunas que muestran un 80% de protección el promedio de seroconversión fue solamente de 50% por el

método de ELISA y 50% por la prueba de neutralización.

La seroconversión puede ser incrementada en un 90% dando la vacuna con un antiácido como la leche, (49) otras vacunas se han ensayado, se encontró que la cepa del Rotavirus rhesus RRV-1 desarrollado por Kapokian en Finlandia, es más inmunogénica en humanos, que la vacuna RIT-4237 y puede ser usada a una mayor dilución con menor costo por unidad.

ESTUDIOS REALIZADOS

Se estudiaron 431 muestras de heces de pacientes con gastroenteritis aguda en la Unidad de Rehidratación oral en el Hospital del niño Dr. Rodolfo Nieto Padrón, en Villahermosa Tabasco en el período comprendido del primero de diciembre de 1984 al 30 de noviembre de 1985. Resultados positivos a Rotavirus fueron 132 (30.6%), se les realizó historia clínica buscando grado de deshidratación, vómito, fiebre, número de evacuaciones, estado nutricional, sexo y procedencia. (13,20)

Se estudiaron las características químicas a cada muestra; pH, sustancias reductoras, moco fecal, sangre oculta mediante tiras de Combur Test y Clínitest (tabletas).

La presencia del Rotavirus se detectó por el método de ELISA así como la detección de parásitos por el método de Faust. Se realizaron coprocultivos para investigar crecimiento bacteriano.

MATERIAL Y EQUIPO PARA DETECCION DE ROTAVIRUS

Material de Laboratorio

- A) Espectrofotómetro Quantum 11 de Abbott.
- B) Compresor con equipo de vacío
- C) Lava esferas automático (pentawash)
- D) Pipetor de volumen variable (Quickpette)
- E) Gradilla
- F) Aplicador de madera
- G) Baño maría
- H) Puntillas microlíticas con intervalo de 200-1000 ml
- I) Tubos de ensayo de plástico de 12 x 75
- J) Agua destilada
- K) Pipeta de 5.0 ml
- L) Matraces Erlenmeyer de 2000 ml
- M) Matraces de 100 ml
- N) Equipo E.L.I.S.A. para detección de Rotavirus
(Rotazyme Abbott Laboratories Chicago 111).

Material Biológico

- 1) Esferas recubiertas con el anticuerpo
- 2) Anti-rotavirus (conejo): Conjugado peroxidasa
ábrano picate). Concentración mínimo 0.2 mg/ml
en solución salina fisiológica. Medio de conserva-
ción: thimerosal al 0.01%.

3) Diluyente para pruebas Rotazyme. Solución salina fisiológica tamponada con fosfatos 0.01 ml conteniendo EDTA 0.025 ml.

Medio de conservación: Thimerosal al 0.01%

4) Control positivo Rotazyme. Simian Rotavirus Sall inactivado, equivalente a 108 partículas virales /ml en solución salina tamponada con fosfatos y 0.1% de albumina de suero bovino. Medio de conservación: Thimerosal al 0.01%.

5) Substrato de OPD, O-fenil-diamina. 2HCl, 15 mg/tab.

6) Diluyente para OPD. (o-fenil-diamina. 2HCl) tampon de citratos-fosfatos con 0.025% de peróxido de hidrógeno Medio de conservación: thimerosal al 0.01%.

7) Acido Sulfúrico 1 N

TECNICA DE ELISA**PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO****PRIMERA INCUBACION**

1. Se pipetea 200 microlitros de muestra o control y se distribuye dentro de las cavidades apropiadas de reacción.

2. Se añade cuidadosamente una esfera a cada cavidad que contiene un control o muestra.

3. Se cubre con un folio adhesivo, se agita vigorosamente la cavidad para mezclar muestras y esferas y eliminar burbujas de aire que hayan quedado atrapados.

4. Se incuba a 37 más menos 2 grados C^o. durante 60 min.

5. se retira el folio adhesivo, se aspira el líquido y se lava cada esfera tres veces con 4 o 6 ml de agua destilada o desionizada, para completar un volumen total del lavado de 12 a 18 ml.

SEGUNDA INCUBACION

6. Se pipetea 200 microlitros de enzima conjugada dentro de cada cavidad que contiene una esfera.

7. Se cubre con folio adhesivo, se golpea suavemente para que el líquido cubra las esferas y elimine burbujas de aire.

8. Se incuba a 37 más menos 2 grados centígrados por 60 min.

9. Se retira el folio adhesivo, se aspira el líquido y se lava cada esfera tres veces como en la primera incubación.

DESARROLLO DEL COLOR

10. Se transfiere inmediatamente las esferas a tubos de ensayos debidamente identificados.

11. Se pipetea 300 microlitros de solución de sustrato OPD recién preparado en dos tubos vacíos (blancos de sustratos) y después en cada tubo que contiene una esfera.

12. Se cubre y se incuba a temperatura ambiente (15 a 30 grados centígrados) por 30 min.

13. Se agrega 1 ml de ácido sulfúrico 1 N a cada tubo.

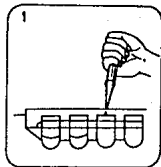
LECTURA

14. Se ajusta a cero el espectrofotómetro con un blanco de sustrato.

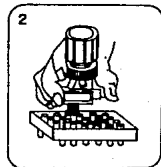
15. Se determina la absorción de los controles y de las muestras a analizar.

El sustrato de OPD reacciona con la enzima para formar un color amarillo - naranja medible a 429 nm; puede ser evaluado visualmente usando una carta de color. (2, 4, 21, 68).

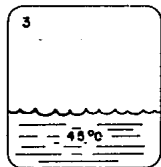
METODOLOGIA (ELISA)



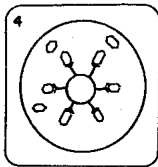
**COLOCAR CONTROLES Y MUESTRAS
DILUIDAS DE LOS PACIENTES EN
LA GRADILLA**



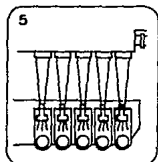
**COLOCAR LAS ESFERAS
RECUBIERTAS CON EL
ANTICUERPO**



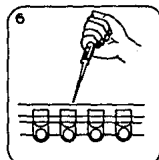
**INCUBAR DURANTE 3 Hrs.
EN BAÑO MARIA A 45 °C**



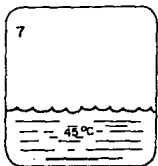
**LOS ANTIGENOS DE ROTAVIRUS DE LAS
MUESTRAS SE FIJAN A LOS ANTICUER-
POS EN LA ESFERA .**



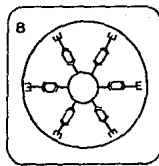
LAVAR LAS ESFERAS CON
AGUA DESTILADA



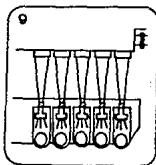
COLOCAR EL CONJUGADO
DE ANTI - ROTAVIRUS



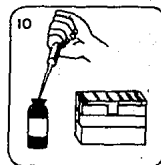
INCUBAR 60 MIN. EN BAÑO
MARIA A 45 °C



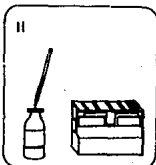
SE FORMA UN COMPLEJO
ANTI-ROTAVIRUS - ENZIMA Y
ANTICUERPOS DE LAS ESFERAS



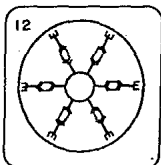
9
LAVAR LAS ESFERAS, TRANSFERIR
A LOS TUBOS DE REACCION PRO-
VISTOS.



10
ADICIONAR SUBSTRATO DE OPD E INCUBAR
A TEMPERATURA AMBIENTE POR 15 MIN.



11
PARAR LA REACCION AÑADIENDO
1 ML. DE H_2SO_4 1N

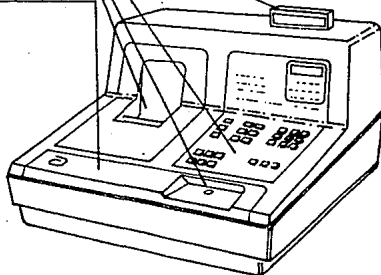


12
EL SUBSTRATO DE OPD REACCIONA CON LA
ENZIMA PARA FORMAR UN COLOR AMARILLO-
NARANJA MEDIBLE A 492 N.M PUEDE SER
EVALUADO VISUALMENTE USANDO UNA CARTA
DE COLOR .

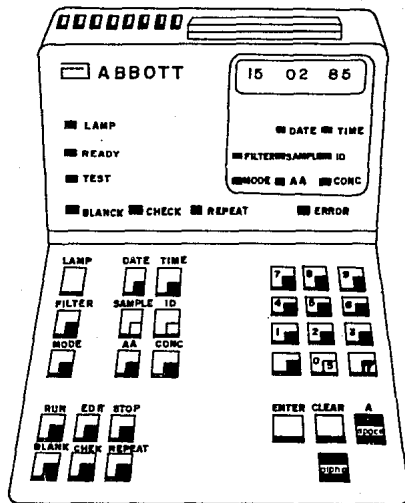
DESCRIPCION DEL ESPECTROFOTOMETRO - QUANTUM II

EL QUANTUM II EMITE DATOS MEDIANTE LAS LAMPARAS TESTIGO, VISUALIZANDOSE EN LA PANTALLA DE SEIS DIGITOS Y EN EL IMPRESOR. EL FUNCIONAMIENTO DEL APARATO SE CONTROLA A TRAVES DEL PANEL DE TECLADO. PARA SIMPLIFICAR EL USO, LAS LAMPARAS TESTIGO Y LAS TECLAS SE HAN MARCADO Y CONFIGURADO EN GRUPOS FUNCIONALES. TANTO LAS TECLAS, COMO LAS LAMPARAS FUNCIONAN EN CONJUNTO PARA VIGILAR LA OPERACION DEL QUANTUM II

MODULO DE MEMORIA
PANEL DE CONTROL
CUBETA de LECTURA
IMPRESOR
TAPA DELANTERA



TABLERO DE CONTROL



RESULTADOS

En las muestras analizadas se encontró positividad del Rotavirus en 132 ocasiones (30.6%), como se muestra en la tabla 1. En la Gráfica I se puede apreciar que los meses en donde mas aparece son noviembre 16 casos (51.6%), diciembre 41 (51%), enero 12 (44%) del total de casos positivos.

En la gráfica 2 se muestran las edades de los pacientes presentándose con mayor frecuencia entre los 4 v los 12 meses. En relación al sexo no se encontró diferencia significativa 70 (53%) masculinos contra 62 (46.9%) femeninos (ver grafica 3). Se encontró que la mayor parte de los pacientes provenían de la región del Centro 99 (75%) seguida por la región de la Chontalpa 9 (6.8%) Gráfica 4. Un total de 90 pacientes (68%) tuvieron desnutrición de algún grado: Grado 1: 43 (47%), Grado 2: 32 (35%), Grado 3: 15 (16%), Gráfica 5.

Todos los casos presentaron algún grado de deshidratación predominando la deshidratación leve en 111 casos (84%), moderada 21 (15.9%), severa 0; Gráfica 6.

Presentaron 61 muestras (49%) sustancias reductoras positivas asociadas a la presencia de Rotavirus.

Presentaron vómito 105 pacientes (79.55%) y fiebre 38 pacientes (28.79%). Se observó macroscópicamente la presencia de moco en 73 muestras (55.3%). Predominó el pH ácido 121 (91.6%) y el 100% presentó sangre oculta de 2 a 3 cruces, ver tabla 2.

El menor número de evacuaciones fue de 5 en 24 horas antes de su ingreso y la máxima de 20 con una media de 12.5 La bacteria que mas se asoció fue Escherichia coli no enteropatógena 53 (40.1%) Tabla 3. Se determinó además la asociación entre bacterias y parásitos siendo más frecuente Escherichia coli unido a Estamoeba histolytica 35 (26.5%) tabla 4.

Tabla 1

TOTAL DE CASOS ESTUDIADOS

| TOTAL DE MUESTRAS ESTUDIADAS | MUESTRAS POSITIVAS CON ROTAVIRUS | PORCENTAJE |
|-------------------------------------|---|-------------------|
| 431 | 132 | 30.6% |

Tabla 2

**CARACTERISTICAS DE MUESTRAS POSITIVAS
CON ROTAVIRUS**

| | |
|--|-------|
| Deposiciones con presencia macroscópica de moco. | 7 3 |
| Rotavirus con pH de 5 - 6 | 1 2 1 |
| Rotavirus con pH de 7 - 8 | 1 1 |
| Rotavirus con sangre oculta x | 5 4 |
| Rotavirus con sangre oculta xx | 5 2 |
| Rotavirus con sangre oculta xxx | 2 6 |

Tabla 3

| | |
|--|--|
| ASOCIACION DE ROTAVIRUS CON BACTERIAS | |
|--|--|

| | |
|------------------------|-----|
| Proteus retgeri | 2 |
| E. coli enteropatógena | 5 3 |
| E. coli poli A | 8 |
| E. coli poli B | 8 |
| Klebsiella pneumoniae | 4 4 |
| Shigella | 1 |
| Salmonella | 6 |
| Citrobacter diversus | 1 1 |
| Proteus mirabilis | 2 9 |
| Proteus vulgaris | 1 0 |
| Enterobacter aerogenes | 1 0 |
| Klebsiella occitoca | 1 1 |
| Pseudomonas aeruginosa | 3 |
| Citrobacter freundii | 1 2 |

Tabla 4

**ASOCIACION DE ROTAVIRUS CON PARASITOS Y BACTERIAS
EN ESTUDIO DE PACIENTES CON GASTROENTERITIS POR
ROTAVIRUS**

| | |
|---|-----|
| Amiba histolytica mas E. coli | 3 5 |
| Amiba histolytica mas Shigella | 1 |
| Amiba histolytica mas Salmonella | 6 |
| Amiba histolytica mas Citrobacter diversus | 3 |
| Amiba histolytica mas Citrobacter freundii | 1 |
| Amiba histolytica mas Klebsiella pneumoniae | 1 2 |
| Amiba histolytica mas Proteus mirabilis | 8 |
| Amiba histolytica mas Klebsiella occitocica | 7 |
| Amiba histolytica mas Enterobacter aerogenes | 2 |
| Giardia Lamblia mas E. coli | 2 |
| Giardia Lamblia mas Klebsiella pneumoniae | 1 |
| Trichuris trichiura mas E. coli | 2 |
| Ascaris lumbricoides mas E. coli | 3 |
| Trichomonas hominis mas Klebsiella pneumoniae | 1 |

Gráfica 1

FRECUENCIA POR MES
ROTAVIRUS POSITIVO

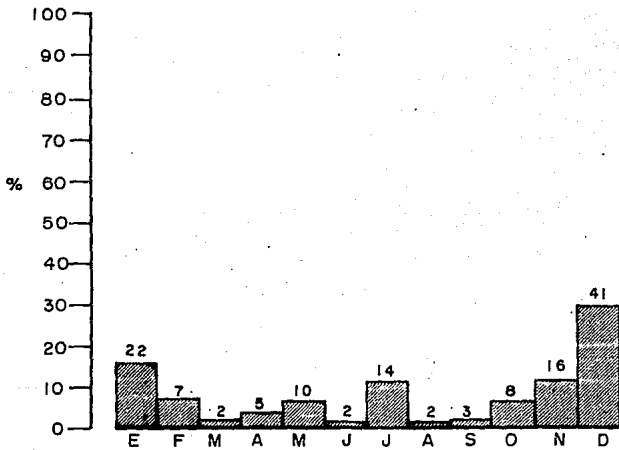
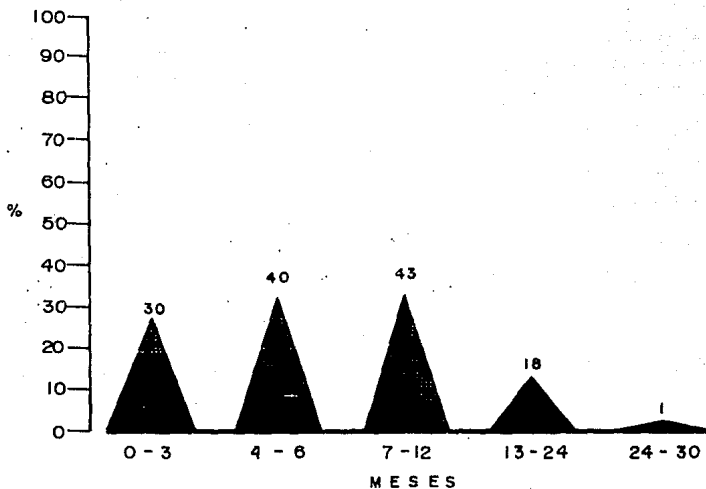


Gráfico 2

FRECUENCIA POR EDADES



Gráfica 3

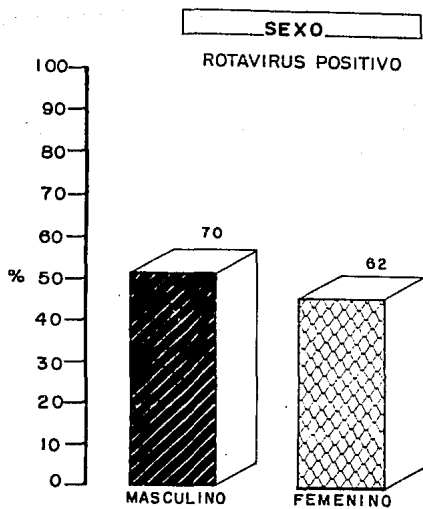
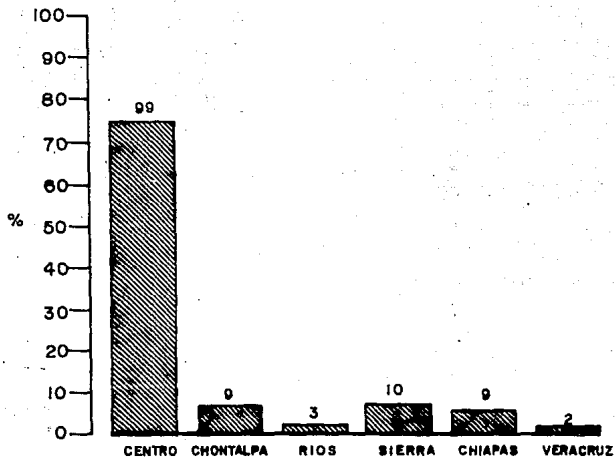


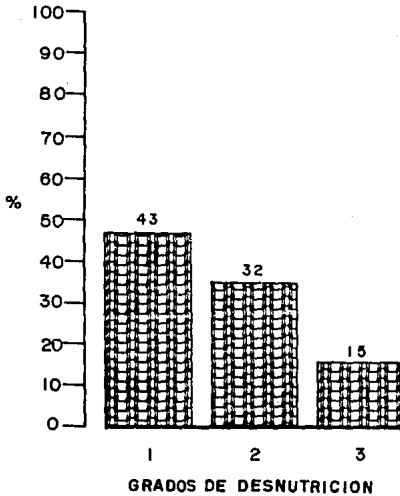
Gráfico 4

REGION DE PROCEDENCIA



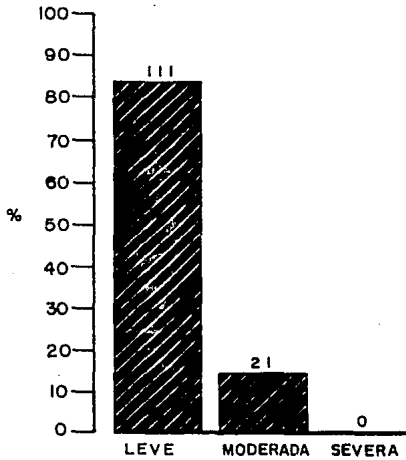
Gráfica 5

**ESTADO NUTRICIONAL DE LOS PACIENTES QUE INGRESARON
AL ESTUDIO DE ROTAVIRUS**



Gráfica 6

**GRADO DE DESHIDRATACION
ASOCIADOS A ROTAVIRUS POSITIVO**



CONCLUSIONES

La diarrea infantil producida por Rotavirus es elevada, por lo que se nos hace importante conocer la transmisibilidad y los factores que condicionan la infección, para poder controlar y prevenir la gastroenteritis por este agente causal.

Hay una importante relación entre las diarreas virales y bacterianas.

El rotavirus modifica las características del coprológico mostrando acidez sustancias reductoras positivas y sangre oculta.

El invierno es el periodo del año donde se encuentra la mayor prevalencia de infecciones por Rotavirus.

En un laboratorio ordinario se debiera utilizar la técnica de E.L.I.S.A. como prueba de elección para la búsqueda de Rotavirus en los casos de enfermedad diarreica aguda, pero si se requiere hacer un estudio mas fino tipificando a los Rotavirus se tendrá que utilizar también la técnica de ELEC (Electroforesis del ARN viral).

Se deben seguir buscando nuevas metodologías y ayuda diagnóstica, tanto clínicas como de laboratorio, para el mejor

manejo oportuno de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez Muñoz M.T., y Col. Frecuencia y tipo de Rotavirus en relación con la edad de los pacientes y en las diferentes épocas del año. *Gac Med Mex.* Vol 125: 240-247 (1983).
2. Alvarez Muñoz M.T., y Col. Comparación de las técnicas de electroforesis de ARN viral E.L.I.S.A. y fijación del complemento con la microscopía electrónica para demostrar Rotavirus. *Arch Invest Med (Mex).* Vol 13: 145-150 (1982).
3. Avendaño L.F., y Col. Comparación de la electroforesis del ARN virídico con el método de ELISA indirecto de infección por Rotavirus humano. *Bol of Sanit Panam.* Vol 95: 1-5 (1984).
4. Barron Romero B.L., y Col. Asymtomatic Rotavirus infections in day care centers. *J Clin Microbiol.* Vol 21: 116-118 (1985).
5. Bishop R.F., y Col. Detection of a new virus by Electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet.* Vol 1: 149-156. (1974).
6. Bishop R.F., y Col. Virus particles in epitheliul cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastro enteritis. *Lancet.* Vol 1: 310-317 (1973).
7. Blacklow N.R., y Col. Viral gastroenteritis, *N Engl J Med.* Vol 305: 350-356. (1981).
8. Bonsdorff Von., y Col. Rotavirus infections in adults in association with acute gsatroenteritis. *J Med Virol.* Vol 2: 99-106 (1978).

9. Brandt C.D., y Col. Evaluation of a latex test for Rotavirus detection. *J Clin Microbiol.* Vol 21: 340-346. (1985).
10. Calderón J. Etiología viral de la gastroenteritis. *Bol Med Hosp Infant Mex.* Vol 34: 577-579 (1984).
11. Calderón E., y Col. Aspectos epidemiológicos de la gastroenteritis producida por Rotavirus. *Bol Med Hosp Infant Mex.* Vol 36: 45-55 (1986).
12. Carlson J., y Col. Fatal Rotavirus gastroenteritis. *Am J Dis Child.* Vol 139: 340-345 (1978).
13. Champsaur H., y Col. Rotavirus Carriage, asymptomatic infection and disease in the first two years of life 1 and 2, virus Shedding. *J Infect Dis.* Vol 149: 667-670. (1984).
14. Chenesky M., y Col. Examination of the Rotaxyme 11 Enzyme Immunoassay for the diagnosis of Rotavirus gastroenteritis. *J Clin Microbiol* Vol 20: 432-436. (1985).
15. Cheung E.Y., y Col. Comparación of Rotazyme and direct Electron Microscopy for detection of Rotavirus in Human stools
J Clin Microbiol. Vol 17: 234-239. (1982)
16. Davidson G.P., y Col. Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. *Infect. Immun.* Vol 40: 447 (1983).
17. Delage G., y Col. A clinical study of rotavirus gastroenteritis. *J Pediatric.* Vol 95: 182-186 (1978).

18. Doern G.V., y Col. Detection of Rotavirus with a new polyclonal antibody Enzyme immunoassay (Rotazyme 11) and a comercial latex agglutination test (Rotalex): Comparison with a monoclonal antibody Enzyme Immunoassay. J Clin Microbiol. Vol 24: 258-262. (1986).
19. Dolan K.T., y Col. Epidemiology of Rotavirus electropherotypes determined by a simplifica diagnostic technique with RNA analysis. J Clin Microbiol. Vol 23: 430-448 (1985)
20. DuPont H.L. Rotaviral gastroenteritis some recent developments. J Infect Dis. Vol 149: 663 (1984).
21. Escarzaga E.T. y Col. Infección por Rotavirus en niños de dos ciudades del Estado de Chiapas México. Rev Lat Am Microbiol vol 26: 150-156 (1984).
22. Espejo P., y Col. Prevalence of two distinct types of rotavirus in infant and young children hospitalized with acute gastroenteritis en México city. J Infect Dis. Vol 142: 477-480 (1977).
23. Espejo R., y Col. Rotavirus gastroenteritis in hospitalized infants and young children in México City. Rev Lat Am Microbiol Vol 20: 239 (1978).
24. Espinoza Larios E.L., y Col. Persistencia de anticuerpos transplacentarios contra rotavirus en niños menores de seis meses de edad. Bol Med Hosp Infant Mex. Vol 38: 595 (1981).
25. Espinoza Larios E.L., y Col. Frecuencia de gastroenteritis infecciosa agudapor Rotavirus en niños de diversas poblaciones de la República Mexicana. Bol Med Hosp Infant Mex.

- Vol. 40: 560-567 (1983).
26. Eteele A.D., y Col Rotavirus associated gastroenteritis in black infants in South Africa. *J Clin Microbiol.* Vol 24: 324 (1986).
 27. Flewett T.H., y Col Moreserotypes of human rotavirus. *Lancet* Vol 1:349-354 (1978).
 28. Hammond G.W., y Col. Human Rotavirus detection by Counterimmunoelectrophoresis versus Enzyme immunoassay and Electron Microscopy after direct ultracentrifugation. *J Clin Microbiol* Vol 19: 439 (1984).
 29. Holdaway M.D. Rotavirus infection in small community. *J Med Virol.* Vol 10: 274-280 (1985).
 30. Hughes J., y Col. Latex immunoassay for rapid detection of Rotavirus *J Clin Microbiol.* Vol 20: 220-228 (1984).
 31. Hamilton J.R., y Col Viral diarrhea. *Pediatric Ann.* Vol 41 577-580 (1985).
 32. Juárez Figueroa L., y Col. Prevalencia y características de la infección por rotavirus en niños con gastroenteritis en la ciudad de Puebla. *Rev Invest Clin (Mex).* Vol 34: 327-334 (1984).
 33. Kapikian A.Z., y Col. Human Reovirus - like agent as the mayor pathogen associated with "Winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Engl J Med.* Vol 299: 195-200 (1976).

34. Konno T., y Col. Changing RNA patterns in Rotavirus of human origin: Demonstration of a single dominant pattern at the start of an epidemic and various patterns thereafter. *J Infect Dis.* Vol 149: 421-426 (1984).
35. Konno T., y Col. Influence of temperature and relative humidity on human rotavirus infection in Japan. *J Infect Dis.* Vol 148: 125-129 (1983).
36. K.L. Yap., y Col. Human rotavirus infection in Malaysia I. A hospital based study of Rotavirus in children with acute gastroenteritis. *J Trop Med.* Vol 26: 131-136 (1980).
37. Kmsley C.V., y Col. Detection of Rotavirus in stool specimens with monoclonal and polyclonal antibody - based assay systems. *J Clin Microbiol.* Vol 24: 315-326 (1986).
38. Moreau M.C., y Col. Relationships between Rotavirus diarrhea and intestinal microflora establishment in conventional and gnotobiotic. *J Clin Microbiol.* Vol 25: 315-321. (1986).
39. M. Paul., y Col. Rotavirus infection in Nigerian infants and young children with gastroenteritis. *Am J Trop Hyg.* Vol 32: 322-328 (1982).
40. Muñoz O., y Col. Gastroenteritis infecciosa aguda. Etiología y su correlación con las manifestaciones clínicas y moco fecal. *Arch Invest Med (Mex).* Vol 10: 135. (1979).
41. Nakagomi O., y Col. Relative frequency of human Rotavirus subgroup 1 and 2 in Japanese children with acute gastroenteritis *J Med Virol.* Vol 18: 264-272 (1985).

42. Nazer H., Astrovirus gastroenteritis. *J Trop Pediatr.* Vol 31 67 (1985).
43. Nicolas J.C., y Col. Survey of human Rotavirus propagation as studied by Electrophoresis of genomic RNA. *J Infect Dis* Vol 151: 688-693 (1984).
44. Obert G., y Col. Comparison of immunosorbent electron microscopic, enzyme immunoassay and counterimmunoelectrophoresis for detection of human rotavirus in stool. *J virol methods.* Vol 34: 99-107 (1981).
45. Olly H., y Col. Rapid detection of Rotavirus in stool by latex agglutination comparison with Radioimmunoassay and electron microscopy and clinical evaluation of the test. *J Med Virol* Vol 15: 190-197 (1983).
46. Penelope H.D., y Col. Comparison of nine comercial immunoassays. *J Clin Microbiol* Vol 26: 430-438 (1988).
47. Pickering L.K., y Col. Acute infectious diarrhea of children in the tropics. *Pediatr Ann.* Vol 11: 197-211 (1982).
48. Ruiz Gomez J., y Col. Rotavirus: 1 Anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y fijadores del complemento en individuos de la ciudad de México. *Arch Invest Med (Mex).* Vol. 12: 121 (1981).
49. Scientific Working Group in Epidemiology and Etiology: Rotavirus and other viral diarrhops. *Bull WHO.* Vol. 58: 183-186 (1980).
50. Schmidt N.L., y Col. Advances in the serodiagnosis ef viral infections. *Progr Med Virol* Vol 15: 170-175 (1973).

51. Simhon A. Virología de los Rotavirus y Epidemiología de la diarrea por Rotavirus. Bol of Sanit Panam. Vol. 98: 295-320 (1985).
52. Sitbon M., y Col. Rotavirus prevalence and relation ships with climatological factores in Gabon Africa. J Med Virol. Vol 20: 186-193. (1985).
53. Steinhoff M., Rotavirus: The first five years. J Pediatr. Vol 96: 611-622 (1980).
54. Steinhoff M., y Col Rotavirus infections of neonates. Lancet Vol 2: 421-426 (1978).
55. Symposium: Laboratory diagnosis of viral infections: Recent advances and their clinical application. Amer J Clin Pathol Vol 35: 308-315 (1972)
56. Tallett S., y Col Clinical laboratory and epidemilogy fractures of a viral gastroenteritis in infants and Childrens. Pediatric. Vol 42: 124-132 (1977).
57. Thouless M.E., y Col. Serotypes of human rotavirus. Vol 2 487-493 (1978).
58. Torregrosa Ferraez y Col Enfermedades diarreicas en el niño. Ed Med Hosp Infant Mex. 9a edición 136-148 (1988).
59. Truant A.L. and Chonmaitree T. Incidence of Rotavirus infection in different age group of pediatric patients with gastroenteritis. J Clin Microbiol. Vol 17: 450-459. (1982).

60. Trujillo H., y Col Rotavirus y otros enteropatógenos en la etiología de la diarrea aguda en Medellín Colombia. Bol of Sanit Panam. Vol. 98: 251. (1985).
61. Uhnoo I., y Col Clinical and Epidemilological features of acute infantile gastroenteritis associated with human rotavirus Sungroups 1 and 2. J Clin Microbiol. Vol 24: 437-450 (1986).
62. Vega Franco L., y Col. Sensibilidad y Especificidad de la retaforesis en el diagnostico de diarrea por Rotavirus. Bol Med Hosp Infant Mex. Vol 34: 415-423 (1984).
63. Vesicari T., y Col Rotavirus, adenovirus and non-viral esteropathogenos in diarrhoea. Arch Dis Child. Vol 42: 162-167 (1981).
64. WJ. Rodriguez.; y Col. Use of Electrophoresis of RMA from human Rotavirus to establish the identy of strain involved in outbraks in a teartinary care nursing. J Infect Dis. Vol 148: 195-203 (1983).
65. Yamaguchi H., y Col. Anamnestic responsa in fecal IgA antibody production after rotaviral infection of infants. J Infect Dis. Vol 152: 398. (1985).
66. Yap KI., y Col Human Rotavirus infection in Malasya. I.A. hospital based study of Rotavirus in children with acute gastroenteritis. J Trop Pediatr. Vol 26: 320-326. (1984).
67. Y.D. Senturis. Epidemilogy of Rotavirus gastroenteritis. J Epid and comun Health. Vol 35: 236-241 (1986).

68. Yolken R.H., y Col Enzyme linked immunosorbente assay ELISA for detection of human reovirus like agent on infantile gastroenteritis. Lancet. Vol 1: 263-268 (1977).
69. Yolken RH., y Col Evaluation of Enzyme Immunoassays for the detection of human rotavirus. J Infect Dis. Vol 137: 310-315 (1981).
70. Zissis G., y Col Diferent serotyoes of human rotavirus. Lancet. Vol 1: 223-229 (1978).