

18
10; 11261



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado
e Investigación

EFFECTO PROTECTOR DE LA INFECCION TEMPRANA
POR ROTAVIRUS EN CONTRA DE LA INFECCION
SUBSECUENTE EN NIÑOS MENORES DE DOS AÑOS

TESIS que presenta
FEDERICO RAUL VELAZQUEZ CASTILLO
para obtener el grado
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

1991



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

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
II. ANTECEDENTES CIENTIFICOS	3
2.1 Generalidades sobre la infección por rotavirus humano	3
2.2 Inmunidad conferida por una infección por rotavirus humano	16
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	21
IV. OBJETIVOS	24
a) Primario	24
b) Secundarios	24
V. HIPOTESIS DE TRABAJO	25
VI. MATERIAL Y METODOS	26
6.1 Diseño del estudio	26
6.2 Población estudiada	26
6.3 Seguimiento de la cohorte	29
6.4 Estimación de factores potenciales de confusión	32
6.5 Métodos de laboratorio	38
6.6 Análisis de datos	47
VII. RESULTADOS	53
7.1 Selección y reclutamiento de la muestra estudiada	53
7.2 Eficiencia del seguimiento de la cohorte	55
7.3 Tasas de incidencia	57
7.4 Gravedad de la diarrea asociada a RVH	61
7.5 Serotipos de RVH identificados	61
7.6 Infecciones mixtas con RVH	63
7.7 Infección temprana por RVH	64
7.8 Efecto protector de la infección temprana por RVH	68
7.9 Serotipos de RVH en la infección temprana y subsecuente	81
VIII. DISCUSION	84
IX. CONCLUSIONES	95
X. LITERATURA CITADA	97
XI. ANEXOS	109

RESUMEN

Rotavirus (RVH) es la causa más importante de diarrea aguda que induce deshidratación grave que pone en peligro la vida de niños menores de 2 años en todo el mundo. Se ha sugerido que el control de la diarrea asociada a RVH no dependerá del mejoramiento en el suministro de agua, saneamiento ambiental ó en la higiene, si no que más bien podría depender del uso a gran escala de una vacuna efectiva.

Existen pocos estudios longitudinales que han intentado determinar si la inmunidad adquirida en forma natural después de una infección por RVH previene infecciones posteriores ó la gravedad de su diarrea asociada; estos estudios no muestran resultados definitivos ni consistentes y presentan inconvenientes metodológicos que obligan a tomar sus conclusiones con reserva.

Por tal motivo, de octubre de 1987 a junio de 1990, conducimos el estudio de una cohorte de 200 niños seguidos durante 2 años desde el nacimiento, con la intención de conocer si una infección temprana por RVH (ITRVH) protege contra reinfecciones ó contra la frecuencia y gravedad de su diarrea asociada y para determinar si las reinfecciones ocurren por serotipos de RVH diferentes de los que causan una infección temprana.

El seguimiento de la cohorte se realizó mediante visitas domiciliarias semanales durante las cuales se investigaba la presencia de diarrea y se colectaba una muestra de heces, de existir diarrea, su gravedad era evaluada médicamente empleando una escala de indicadores clínicos y se buscaba la existencia de otros enteropatógenos; todas las muestras fecales se probaron para la presencia de antígeno de RVH por el método de ELISA y los serotipos se identificaron usando anticuerpos monoclonales. Se midieron diversos factores potenciales de confusión en el niño y en su familia, ajustando los resultados finales para la acción de los mismos.

Sesenta y dos niños presentaron ITRVH (durante los primeros 180 días de edad), 108 no la tuvieron y 30 se excluyeron del análisis debido a seguimiento insuficiente. Los factores que participaron en la adquisición de una ITRVH fueron la corta duración de la lactancia (RM=2.21, IC_{95%}=1.25-3.92) y el bajo peso al nacimiento (RM=2.08, IC_{95%}=1.18-3.66).

Mediante modelos de regresión logística múltiple y curvas de sobrevida de Kaplan-Meier se pudo determinar que los niños con ITRVH tuvieron un menor riesgo de adquirir, después de los 6 meses de edad, una infección por RVH (RM=0.30, IC_{95%}=0.13-0.65; Logrank p=0.001), una diarrea asociada a RVH (RM=0.32, IC_{95%}=0.13-0.80; Logrank p=0.006) ó una diarrea asociada a RVH moderada-grave (RM=0.16, IC_{95%}=0.03-0.89; Logrank p=0.01) en comparación con los niños que no tuvieron ITRVH.

El efecto protector de una ITRVH fue más evidente cuando ocurrió asociada a diarrea ó durante el segundo trimestre de edad; la mayoría de las infecciones subsecuentes por RVH (89%, IC_{95%}=75%-100%) fueron debidas a serotipos diferentes de los identificados durante una ITRVH, lo cual sugiere que la protección ofrecida es serotipo-específica. De acuerdo a estos resultados, una vacuna eficaz en la prevención de la diarrea asociada a RVH debería: i) Imitar la respuesta inmune natural inducida por una ITRVH asociada a diarrea, ii) Incluir los antígenos de los 4 serotipos de RVH importantes y iii) Ofrecerse al inicio del segundo trimestre de edad ó al suspenderse la alimentación con leche materna.

Esta información podría contribuir en el desarrollo de una vacuna eficaz y/ó en la implementación de estrategias adecuadas de vacunación ó programas de control.

I. INTRODUCCION :

Las enfermedades diarreicas han sido consideradas desde hace mucho tiempo como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en países en desarrollo (1). Esfuerzos internacionales para combatir este problema han sido encabezados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) con el inicio del Programa de Control de Enfermedades Diarreicas, cuyos objetivos principales son reducir la morbi-mortalidad debida a diarrea (2).

En una revisión reciente, realizada con la intención de obtener una adecuada estimación del problema global de la enfermedad diarreica aguda, se analizó la información de 24 estudios de comunidad (longitudinales y prolectivos), desarrollados en Africa, Asia y Latinoamérica en las tres últimas décadas.

Las tasas de morbilidad más elevadas se encontraron en el grupo de niños de 6 a 11 meses de edad, mientras que las tasas de mortalidad fueron mayores en el grupo de menores de un año. Para los niños menores de 5 años de edad, la mediana de la tasa de incidencia fue de 2.2 episodios diarreicos por niño por año, considerando todos los estudios y de 3 episodios por niño-año cuando se tomaron en cuenta solo aquellos estudios con una población reducida y una vigilancia más frecuente (3).

Considerando los cálculos de población de 1980, la morbi-mortalidad anual estimada de las enfermedades diarreicas en niños menores de 5 años de edad, en Africa, Asia (excluyendo China) y Latinoamérica fue de 744 a 1000 millones de episodios y de 4.6 millones de muertes (3). Esta estimación conservadora de la mortalidad es difícil de comprender de primera intención; sin embargo, cuando es expresada en unidades menores, esta estimación anual se traduce en - 12,600 muertes por día, ó - 525 muertes por hora, ó bien, - 9 muertes por minuto.

II. ANTECEDENTES CIENTIFICOS :

2.1 Generalidades sobre la infección por rotavirus humano :

a) Importancia de rotavirus humano como causa de diarrea.

Anterior al inicio de la década de 1970 ningún agente viral había sido implicado como causa importante de diarrea infantil. El descubrimiento en 1972 del virus Norwalk y su asociación con gastroenteritis viral epidémica en niños mayores y adultos, seguido por el descubrimiento en 1973 de rotavirus humano (RVH) y su asociación con gastroenteritis aguda en niños pequeños, representaron avances recientes de gran importancia en la búsqueda de agentes etiológicos de diarrea aguda no bacteriana (4,5).

Desde que Bishop y colaboradores identificaron en 1973 a RVH en biopsias de mucosa duodenal de niños con gastroenteritis aguda, en Melbourne, Australia (5), estudios de todas partes del mundo lo han confirmado como una de las principales causas de morbi-mortalidad por diarrea, sobre todo en niños menores (6 a 24 meses), tanto en países en desarrollo, como desarrollados (6-19).

La frecuencia de diarrea asociada a RVH ha sido determinada en estudios de niños hospitalizados (6-12) y a nivel de la comunidad (13-19). Estos estudios muestran que RVH es el agente etiológico en 15% a 50% de los casos de diarrea aguda que ocurren en hospitales de países en desarrollo y de 35% a 60% de los que suceden en países desarrollados (6-12); la variación en los márgenes de estimación, es debida a diferencias en el grupo de edad estudiado, en los métodos de detección empleados, en el periodo y duración de la realización del estudio, además de la diferente localización geográfica.

En estudios de comunidad, las tasas de diarrea asociada a RVH corresponden a 6% a 24% del total de episodios diarreicos ocurridos durante los 2 primeros años de edad, (13-19). A pesar de las bajas tasas de aislamiento en la comunidad, RVH es responsable de aproximadamente la tercera parte de los episodios diarreicos que requieren hospitalización en niños pequeños, lo cual sugiere que la diarrea causada por este virus es de mayor gravedad que la causada por otros agentes.

Estudios realizados en nuestro país, fundamentalmente en la Ciudad de México, han mostrado que RVH es el enteropatógeno identificado con mayor frecuencia en niños hospitalizados por gastroenteritis aguda y que también es una de las principales causas de diarrea aguda a nivel comunitario, en niños menores de 5 años de edad (8,9,20-26). En hospitales pediátricos se ha aislado en 16% a 26% de los casos (8,9,20-24) y en la comunidad se ha detectado en 6% a 10% de las diarreas agudas (25,26).

Es importante destacar que RVH es el agente etiológico que tiene la mayor capacidad de inducir deshidratación grave que pone en peligro la vida de niños menores de 2 años de edad, tanto en países desarrollados, como en desarrollo, lo cual se ha hecho evidente en estudios prolectivos a nivel hospitalario y de la comunidad (10,13,14,27-29).

Dos estudios transversales efectuados a largo plazo (7 a 8 años de duración), en niños que requirieron hospitalización por diarrea aguda, realizados en Washington D.C.,EUA (10) y en la Ciudad de Yamagata, Japón (27), demostraron claramente la importancia de este virus, al asociarse respectivamente con el 35% a 45% de las diarreas graves.

En dos estudios longitudinales de campo, conducidos por Black y colaboradores en Bangladesh, RVH estuvo asociado a deshidratación de una manera más significativa que cualquier otro de los enteropatógenos identificados (13,14). En el primer estudio se observó que del total de niños menores de 2 años de edad con deshidratación secundaria a diarrea, 46% eliminó RVH, 24% *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), 7% *Shigella* sp., y en 22% no se aisló ningún agente (13); en el segundo estudio, 26% de los episodios asociados a RVH resultaron en deshidratación, mientras que solamente 3% de los asociados a ECET y 1% de aquellos sin patógeno reconocido la presentaron (14).

Estimaciones realizadas por la OMS en países en desarrollo señalan que RVH puede ser responsable de cerca de 8% de los episodios diarreicos en niños de 0-5 meses, 10% en niños de 6-23 meses, 1% en los de 24-59 meses y en forma global de 6% del total de episodios diarreicos en niños menores de 5 años. Por otro lado, RVH puede estar involucrado en 12% de la mortalidad por diarrea en niños de 0-5 meses, 30% en niños de 6-23 meses, 5% en los de 24-59 meses y globalmente en 20% de todas las muertes ocurridas por diarrea en niños menores de 5 años de edad (30).

Por todo lo anterior, los esfuerzos encaminados a la búsqueda de medidas adecuadas para la prevención de la diarrea causada por este virus están completamente justificados.

b) Virología y patogénesis.

Los rotavirus pertenecen a un género de la familia *Reoviridae*, son un grupo de virus de amplia distribución que infectan a diversos vertebrados, incluido el hombre (31). El primer rotavirus identificado fue el murino, agente causal de la diarrea epizootica de ratones lactantes (32); posteriormente, se han identificado en casos de diarrea de un gran número de mamíferos, como terneras, corderos, conejos, perros, y en aves, como pavos y pollos (33).

Observados al microscopio electrónico, con tinción negativa, los rotavirus de mamíferos comparten una apariencia común y se pueden distinguir como dos tipos de partículas redondeadas en las heces diarreicas:

- i) viriones "lisos" ó "completos", de doble cápside y 70 nm de diámetro, y
- ii) partículas "rugosas" ó "incompletas", de cápside simple y 60 a 65 nm de diámetro (31).

El nombre *rotavirus* es derivado de la palabra del Latín *rota* (rueda) y fue sugerido debido a la apariencia que tienen los capsómeros que radian de la cápside interna a la externa simulando los ejes de una rueda. La doble cápside viral envuelve un centro icosaédrico de 38 nm de diámetro que contiene el ARN genómico, la polimerasa del ARN y otras enzimas (34,35).

El genoma de los rotavirus contiene 11 segmentos de ARN de doble cadena, en RVH se ha determinado que los segmentos 1,2 y 6 codifican para polipéptidos de la cápside interna VP1, VP2, y VP6 respectivamente; VP6 contiene un dominio para el antígeno común de grupo, el cual es compartido por la mayoría de los rotavirus humanos y de animales, y otro dominio separado para el antígeno de subgrupo. Los segmentos de ARN 4 y 8 ó 9 codifican para los principales polipéptidos de la cápside externa VP4 y VP7, respectivamente, el último de ellos es el principal antígeno de neutralización que sirve de base para la designación de serotipos; el resto de los segmentos de ARN codifican para 4 proteínas no estructurales (35-37).

En base a esta información, la nomenclatura propuesta para los rotavirus incluye la categoría más general de *grupo*, que es definido antigénicamente por la proteína VP6 de la cápside interna; genéricamente existen 2 grupos (A y no-A), la mayoría de los episodios diarreicos observados en humanos y animales son debidos a rotavirus del grupo A que comparten este antígeno común que los diferencia del grupo no-A, también llamado pararotavirus, que engloba a los grupos B-F.

Dentro del grupo A existen dos subdivisiones: los *subgrupos* que son definidos por diferencias antigénicas adicionales en la proteína VP6 (subgrupos I y II) y los *serotipos* que son definidos mediante ensayos específicos de neutralización en cultivos celulares, determinados por diferencias antigénicas de las proteínas VP4 y VP7 de la cápside externa. En la actualidad se han identificado 4 serotipos de RVH epidemiológicamente importantes (serotipos 1 a 4) (35-37).

La nomenclatura propuesta para RVH se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1 NOMENCLATURA PROPUESTA PARA RVH*

<i>Cepas de RVH representativas</i>	<i>Subgrupo</i>	<i>Serotipo</i>
DS-1,S2,KUN	I	2
Wa,K8,KU	II	1
M,P,ITO,NEMOTO,YO	II	3
ST4,HOCHI.HOSOKAWA	II	4

* Referencia 37

De acuerdo a este sistema de nomenclatura, algunos rotavirus animales pueden ser de serotipo similar a una cepa humana pero corresponder a diferente subgrupo; por ejemplo, SA-11 que es un virus de simio reacciona como serotipo 3 y subgrupo I (38).

En el humano como en los animales, los rotavirus infectan los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado (31,35); la naturaleza del receptor no ha sido determinada, pero se ha considerado que pudiese ser la lactasa del borde en cepillo del enterocito ó receptores Fc en el intestino delgado (39).

El yeyuno es el principal sitio de infección, aunque el ileon también puede estar involucrado (40). Las biopsias de intestino delgado del ser humano revelan que el epitelio cilíndrico es rápidamente reemplazado por células cuboideas, con acortamiento de las vellosidades, hipertrofia de las criptas, infiltración de la lámina propia con células mononucleares y presencia de partículas víricas fácilmente reconocibles en las cisternas distendidas del retículo endoplásmico rugoso (5,40,41). La replicación de RVH se produce en el citoplasma de la célula

infectada, todos los organelos citoplásmicos, incluso el núcleo, quedan destruidos (41,42); la regeneración del epitelio se inicia entre los 5 y 7 días después del comienzo de la diarrea, 10 a 15 días después de la enfermedad el aspecto del vello es casi normal (43).

La diarrea resulta de la denudación inherente, de la atrofia de las vellosidades y la disminución en la capacidad de absorción de sal y agua de los enterocitos; otro mecanismo involucrado parece ser la reducción de la actividad de la disacaridasa, lo cual ocasiona mala absorción de carbohidratos con diarrea osmótica secundaria (31,35,44). No obstante, en los casos de diarrea causada por RVH, la absorción y la digestión no son afectadas al grado de que se impida la rehidratación oral con soluciones de sal y azúcar (45).

c) Cuadro clínico.

La diarrea asociada a RVH ocurre en todos los grupos de edad, observándose con mayor frecuencia en niños de 6 a 24 meses, para declinar posteriormente de manera paulatina (6,7,14,16,18). El espectro de la enfermedad también se modifica con la edad y puede ser divergente dentro de un mismo grupo, variando desde la infección asintomática hasta los episodios diarreicos graves (35,46).

Los niños de 6 a 24 meses generalmente presentan una enfermedad de 2 a 8 días de duración, de inicio abrupto, con diarrea acuosa y explosiva, a menudo asociada a vómitos y fiebre en el estadio temprano, que es capaz de condicionar deshidratación isotónica leve a moderada, con acidosis metabólica compensada en 40% a 80% de los niños, aunque también se ha informado de casos de deshidratación grave y muerte (7,12,34,47); en contraste, 23% a 35% (16,18) y excepcionalmente hasta 87% (48) de las infecciones que ocurren en niños de esta misma edad, pueden cursar de manera asintomática, como se ha determinado en diferentes estudios longitudinales (16,18,48). En adultos, la infección por RVH tiende a ser asintomática ó bien se acompaña de diarrea leve que habitualmente se autolimita sin complicaciones (49).

La infección neonatal por RVH muestra características particulares. En salas de cuneros de hospitales en países industrializados (50-55), y con menor frecuencia de países en desarrollo (56,57), se ha informado de infección endémica que afecta a 13% a 57% de los recién nacidos y que se puede detectar desde su primer semana de vida; sin embargo, esto no ocurre de manera universal, ya que también existen informes de infección neonatal esporádica que de manera inversa, provienen con mayor frecuencia de cuneros de países en desarrollo (58-61), que de países industrializados (62,63). Hasta ahora no existe una explicación para esta distribución divergente de la infección neonatal por RVH en cuneros de diferentes áreas geográficas.

La infección neonatal generalmente cursa de manera asintomática ó bien con diarrea muy leve, sobre todo en recién nacidos a término en quienes se ha detectado eliminación fecal de RVH no asociada a diarrea en 70% a 90% de los niños de diferentes estudios (50-56,64); se desconoce si la atenuación de la infección neonatal es inherente a factores del huésped relacionados al estado de maduración del intestino delgado, ó si es debida a protección pasiva transferida por anticuerpos maternos, ó bien, si depende de atenuación natural de las cepas de RVH (50-52,56). Por otro lado, durante este período también se ha informado de enfermedad grave, que se manifiesta por diarrea con sangre, acompañada de distensión abdominal y perforación intestinal (enterocolitis necrosante), la cual se ha descrito particularmente en recién nacidos pretérmino, con bajo peso para su edad gestacional y estancia hospitalaria prolongada

(65-67). La presencia de diarrea neonatal asociada a RVH, varía dependiendo de las medidas de atención que reciben los recién nacidos durante sus primeros días de vida (68).

La infección por RVH tiene un período de incubación que varía de 1 a 7 días, pero que generalmente es menor de 48 horas (6,70); la excreción del virus en las heces se puede detectar desde 5 días antes del inicio de la enfermedad y puede continuar hasta una semana después de que los síntomas se han resuelto (71), el mayor título de 10^{11} partículas virales por gramo de heces se alcanza después del tercer día de inicio de la enfermedad declinando gradualmente hasta el 9º y 10º día (69,72).

Los pacientes con diarrea asociada a RVH generalmente presentan evacuaciones acuosas, sin sangre, ni leucocitos fecales y con escaso moco (21,34,46); se han reportado evacuaciones pálidas con presencia de grasa que sugieren que la infección por este virus puede impedir su digestión y alterar el color de las heces (69). Frecuentemente se observan síntomas del tracto respiratorio superior, faringitis y otitis media, asociados a la diarrea que no son necesariamente característicos de la misma (12).

En niños con algún tipo de inmunodeficiencia se han llegado a observar infecciones crónicas por RVH (73); así mismo, la presencia de infecciones mixtas ó simultáneas de este virus con otros enteropatógenos virales, bacterianos ó parasitarios se ha documentado en niños de países en desarrollo (14,18) y de guarderías en EUA (74), estas infecciones mixtas no parecen ser de mayor duración que las causadas solo por RVH (14,18,74).

El subgrupo II de RVH es el que se aísla con mayor frecuencia en episodios diarreicos (64% a 77%); sin embargo, hasta ahora no se ha logrado establecer si existe una correlación evidente entre el subgrupo antigénico infectante y la presencia de enfermedad (75-78).

RVH se ha identificado en secreciones del tracto respiratorio de pacientes hospitalizados con neumonía (79) y ha sido asociado con otras enfermedades ó condiciones clínicas que incluyen intususcepción, síndrome de Reye, encefalitis, meningitis aséptica, síndrome de muerte súbita infantil, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome de Kawasaki, síndrome urémico hemolítico y exantema súbito; sin embargo, hasta ahora no se ha determinado si existe una verdadera asociación causal (34,80).

d) Métodos de diagnóstico.

La posibilidad de diagnosticar la infección por RVH y de estudiar su epidemiología ha dependido del desarrollo de ensayos de detección prácticos, rápidos y precisos. Las muestras más adecuadas para su procesamiento diagnóstico son aquellas colectadas entre el tercero a quinto día posterior al inicio de la diarrea, debido a que son las que contienen mayor cantidad del virus (69,72).

El método clásico para determinar la presencia de RVH en muestras fecales es la microscopía electrónica (ME), que generalmente se usa como "estándar de oro" para comparar las demás técnicas; para visualizar los virus son necesarias concentraciones de por lo menos 10^6 partículas de RVH por gramo de heces, este método no presenta falsas positivas, pero su sensibilidad es limitada (31,34,35,46). La microscopía inmunoelectrónica (MIE) incrementa la sensibilidad del método, ya que los especímenes son incubados con anticuerpos policlonales ó monoclonales lo cual favorece la aglutinación y por lo tanto, la visualización de las partículas virales (81,82).

Una de las ventajas importantes de los métodos de ME son su capacidad para detectar rotavirus del grupo no-A, así como otras partículas virales; sin embargo, estos métodos tienen un uso limitado ya que requieren de equipo costoso, de técnicos muy competentes, consumen mucho tiempo y no son apropiados para el estudio de muchos especímenes (31,34,35).

Las técnicas tradicionales como la inmunofluorescencia (IF), la fijación de complemento (FC), la hemaglutinación por inmunoadherencia (HIA) y la contrainmunolectroforesis (CIEF) han sido reemplazadas por la aglutinación de partículas de latex (AL), el radioinmunoensayo de fase sólida (RIA) y el ensayo inmunoenzimático (EIA ó ELISA). Diversas comparaciones iniciales de estas técnicas mostraron la superioridad del método de ELISA, con una sensibilidad de 95% a 97%, especificidad de 82% a 85% y, dependiendo de la prevalencia de la infección, con valores predictivos positivos de 67% a 83% y negativos de 95% a 99% (83-87). Como se puede inferir, un problema encontrado con los ensayos iniciales de ELISA fue la presencia de reacciones falsas positivas, por lo que posteriormente se desarrollaron ensayos que han mejorado su especificidad hasta 91% a 95% (87-90).

Son varios los ensayos de ELISA que han sido comercialmente desarrollados y son diversos los estudios que comparan su eficiencia; sin embargo, para la mejor elección de alguno de ellos, se recomienda no solamente tomar en cuenta su adecuada sensibilidad y especificidad, si no también, considerar cuales serán las condiciones de colección de los especímenes fecales, así como las condiciones de su procesamiento en el laboratorio ya que éstos factores pueden afectar su eficiencia. Debe señalarse, que ninguno de los inmunoensayos actualmente disponibles en el comercio es capaz de detectar rotavirus del grupo no-A (84,87-90).

Recientemente se han obtenido anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con la proteína VP7 de cada uno de los 4 serotipos importantes, que han permitido la serotipificación directa de cepas de RVH a partir de especímenes fecales al ser empleados en ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), lo cual previamente solo era posible mediante técnicas de neutralización. Estos ensayos han sido validados, son muy sensibles y específicos, además de que son procedimientos simples, rápidos y adecuados para la serotipificación de gran número de aislamientos, como los obtenidos de estudios epidemiológicos (91-96).

Otros métodos alternativos de diagnóstico incluyen la detección de segmentos de ARN de rotavirus mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA); las ventajas de esta técnica incluyen su alta sensibilidad y especificidad y su habilidad para detectar tanto rotavirus del grupo A, como del grupo no-A, ya que no depende de anticuerpos específicos para la detección del antígeno viral, sus desventajas incluyen su inhabilidad para identificar serotipos de RVH, debido a la aparente existencia de diferentes electroferotipos para un mismo serotipo y la variabilidad inherente de los electroferotipos (97-100).

La hibridación del ARN de rotavirus con ADN complementario sintetizado a partir de secuencias genéticas conocidas, es otro método recientemente desarrollado para detectar ARN de rotavirus; es capaz de detectar segmentos específicos de ARN que incluyen las secuencias que codifican para la síntesis de VP7, de esta manera se ha intentado con éxito la serotipificación de rotavirus del grupo A a partir de especímenes fecales, por lo que pudiese ser empleado como un recurso diagnóstico epidemiológicamente útil (101,102).

El cultivo de RVH fue inicialmente difícil, pero en 1980 una cepa del subgrupo II (Wa) fue exitosamente adaptada a crecer en pasés seriados de cultivos celulares primarios de riñón de mono verde africano, después de que se había sometido a 11 pasés en lechones gnotobióticos

recién nacidos (103). Poco después, en Japón se pudieron cultivar cepas humanas de tipo silvestre en líneas celulares de riñón de mono, en presencia de tripsina, incubadas en tubos rotatorios a 37°C, que no requirieron de pases previos en animales (104,105).

Actualmente el cultivo de RVH a partir de especímenes clínicos es posible, pero la frecuencia de aislamiento no es mayor de 70%, el método consume mucho tiempo y es costoso, por lo que no se le puede considerar como una herramienta diagnóstica útil. Sin embargo, la habilidad para hacer crecer cepas de RVH en cultivos celulares ha sido un paso crítico en el entendimiento del genoma del virus, en la realización de ensayos de neutralización para la identificación de serotipos, así como en la producción de cepas que pudiesen ser candidatos para una vacuna (35,104-106).

e) Epidemiología.

Los mecanismos exactos de transmisión de la infección por RVH son desconocidos, pero en general se asume que este virus se transmite por la ruta fecal-oral (34,35,46); dado que la dosis infectante en un niño puede ser tan pequeña como 10 partículas virales (107), la transmisión de persona a persona probablemente perpetúe la enfermedad endémica. En algunos estudios se ha informado de una rápida diseminación de persona a persona, lo cual, en ausencia de una fuente común de infección ha sugerido la posibilidad de diseminación por vía respiratoria (108,114).

Se ha detectado que desde una día antes del inicio de la diarrea asociada a RVH la mitad de los niños pueden estar excretando el virus en heces y que la tercera parte de ellos continúan eliminándolo hasta una semana después de que los síntomas se han resuelto (71); así mismo, muchos niños y adultos pueden eliminar RVH en heces aún sin evidencia de enfermedad (16,48,49,64), se considera que esta eliminación asintomática de RVH puede ser importante en la transmisión de este enteropatógeno (31,34).

Se ha estudiado la transmisión de la infección por RVH dentro del grupo familiar, guarderías y en el ámbito hospitalario (11,49,53,109-112). En un estudio familiar protectorio, la tasa de ataque en niños fue de 32% y 17% en adultos, 70% de los niños y 40% de los adultos que adquirieron la infección presentaron síntomas (49); en otro estudio, se determinó que el tamaño de la familia y el hacinamiento pueden ser factores de riesgo para la adquisición de infección por RVH (109). La infección por RVH en guarderías es común, presentándose en forma endémica y en brotes (110,111); la diarrea nosocomial, ha sido bien descrita y es un riesgo claro durante la estancia en salas de pediatría (11,53,112).

Los brotes de diarrea asociados a RVH son poco frecuentes, sin embargo, se han observado brotes secundarios a contaminación de agua ó alimentos (113). Cuando RVH es introducido en una población previamente no expuesta, causa brotes extensos que afectan a todos los grupos de edad, como ocurrió en una comunidad de un Archipiélago aislado del Pacífico (108) y en una aldea indígena aislada del norte de Brasil (115); así mismo, se han notificado brotes esporádicos de diarrea grave asociada a RVH en adultos y pacientes geriátricos hospitalizados, lo cual se ha interpretado como signo de inmunidad específica disminuida a edad tardía (116,117).

En diferentes áreas geográficas se ha informado de variaciones estacionales en la presentación de la diarrea asociada a RVH (6,7,10,14,16,24,48,109,118-122); en países con clima templado se observa un incremento durante los meses fríos de invierno (6,7,10,16,109,118), mientras que en países con clima tropical no existe estacionalidad evidente (14,24,48,119-122). Así mismo, la baja humedad relativa ha sido considerada como importante en la transmisión de RVH (123), la diarrea asociada a este virus aumenta en algunos países durante la temporada seca (10,48), sin embargo, en otros, la humedad relativa no parece tener importancia (18,27).

La infección por RVH tiene una distribución mundial, con una mayor frecuencia de la enfermedad en niños de 6 a 24 meses de edad (6,7,14,16,18). Su dispersión generalizada se ha confirmado mediante estudios de campo, longitudinales y prolectivos, que determinan su incidencia en diversas partes del mundo, como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2 ESTUDIOS DE COMUNIDAD DE DIARREA ASOCIADA A RVH
(cohortes de niños de 0-24 meses de edad)

<i>País</i>	<i>Tasa de incidencia*</i>		<i>Proporción de DARVH^b</i> %	<i>Referencia</i>
	<i>Diarrea total</i>	<i>DARVH</i>		
Bangladesh	3.4	0.4	11.4	13
Canada	1.2	0.3	24.2	16
Bangladesh	6.4	0.4	6.4	14
Guatemala	7.9	0.8	10.0	18
Costa Rica	0.7	0.1	9.8	48
E U A	1.2	0.2	18.5	124
Nigeria ^c	3.0	0.2	7.2	125
Brasil	2.5	0.2	8.0	121
Argentina	2.1	0.1	6.2	122

*Número de episodios por niño-año

^bDiarrea asociada a RVH

^cNiños de 0-12 meses de edad

Aunque estos estudios presentan diferencias (en la frecuencia y eficiencia del seguimiento y de la colección de muestras fecales, así como, en el tipo de espécimen colectado, en la definición de diarrea y en el método de diagnóstico empleado para la detección del virus) que hay que mantener en mente, se debe destacar que las tasas de incidencia de diarrea asociada a RVH no muestran fluctuaciones tan amplias como las que se observan para diarrea total (30).

De hecho, si no consideramos las tasas observadas en Guatemala y Costa Rica, que parecen corresponder a situaciones extremas de alta y baja incidencia de ambos eventos, respectivamente (18,48); encontramos que la incidencia de diarrea asociada a RVH es similar en países desarrollados y en desarrollo (30). La incidencia observada en Bangladesh (13,14) es muy parecida a la encontrada en Canadá (16) y la informada en EUA (124) es igual a la de Brasil (121).

Se ha considerado que la proporción de diarreas asociadas a RVH es probablemente mayor en países donde la incidencia total de diarrea es baja y que es menor donde la incidencia global es elevada, esto probablemente debido al control de diarreas por otras causas que se ha logrado en países desarrollados (30).

Hasta hace poco tiempo, la mayoría de las infecciones por rotavirus identificadas en humanos habían sido causadas por virus del grupo A, por lo que se consideraba que los rotavirus del grupo antigénico no-A (B-E) eran cepas estrictamente zoonóticas (126); sin embargo, en 1982, un brote por rotavirus del grupo B afectó a más de un millón de personas en China (incluyendo adultos, niños y recién nacidos) (127) y desde entonces otros brotes de menor intensidad le han seguido (128), no se conoce que el grupo B epidémico se haya diseminado más allá de China, a pesar de que existen evidencias serológicas de infección en humanos en el Sureste de Asia (126). Los rotavirus del grupo C también son patógenos primarios del cerdo y han sido detectados en humanos en varias partes del mundo, habiendo ocurrido brotes en Japón e Inglaterra (129).

La participación e importancia de estos rotavirus del grupo no-A ó pararotavirus en la epidemiología de la infección que ocurre de manera endémica en diferentes áreas geográficas no ha sido determinada, y permanece como un aspecto importante a clarificar que debe ser considerado al intentar desarrollar una vacuna (126).

f) Tratamiento y prevención.

No hay agentes antivirales disponibles contra la infección por RVH y posiblemente de existir, no se esperaría que fuesen efectivos para el tiempo en que la diarrea se ha iniciado; de tal modo, las únicas medidas de apoyo disponibles se encaminan hacia la prevención y/o corrección de la deshidratación (34,46). El reemplazo de líquidos se puede realizar con el uso de soluciones orales de glucosa y electrolitos, como la formulada por la OMS, ó bien, mediante el empleo de líquidos parenterales cuando la deshidratación es grave ó cuando existe alguna contraindicación formal de la vía oral (45,130,131).

En base a todo lo expuesto, la prevención de esta enfermedad grave y potencialmente mortal en niños pequeños es una necesidad imperativa. A este respecto, algunos autores han sugerido que, considerando la similitud de las tasas de incidencia de la diarrea asociada a RVH observadas tanto en países industrializados, como en desarrollo, existe la posibilidad de que esta enfermedad no pudiese ser controlada mediante mejoras en el suministro de agua, en el

saneamiento ambiental ó en la higiene, si no que más bien su control podría depender del uso a gran escala de una vacuna efectiva (30).

Algunas medidas alternativas de prevención que hasta ahora se han intentado en humanos incluyen el uso de calostro ó leche materna y la inmunoglobulina de suero humano con anticuerpos contra RVH, que han disminuido ó prevenido la diarrea asociada a este virus en pacientes con inmunodeficiencia primaria (73) ó recién nacidos con bajo peso al nacer (132); sin embargo, este abordaje es considerado de utilidad restringida a este tipo de huéspedes (34,35).

Muchos estudios han demostrado que los niños alimentados con leche materna, durante el primer año de edad, tienen menor riesgo de sufrir diarrea aguda, comparados con aquellos niños que no la reciben (133). La mayoría de muestras de calostro y leche humana muestran la presencia de anticuerpos contra RVH; sin embargo, el efecto protector de la leche materna y/ó de sus anticuerpos RVH específicos transferidos de la madre a su hijo en la prevención y/ó modificación de la diarrea inducida por este virus no ha sido aclarado (134-136).

Existen estudios con resultados discordantes, que varían desde aquellos que no muestran ningún efecto protector (16,137), hasta uno de ellos en el que se observa únicamente disminución en la gravedad de la enfermedad (138). Diversos autores señalan que aún no existe una respuesta definitiva a éste importante aspecto y sugieren la realización de estudios más adecuados (136-138).

Actualmente están en curso diversos intentos para el desarrollo de una vacuna oral, con virus vivo atenuado, que sea efectiva en la prevención de la diarrea asociada a RVH (34-36,139-141).

Se han empleado varios abordajes para la obtención de un antígeno adecuado:

- i) Los candidatos más desarrollados se han derivado de cepas de rotavirus que naturalmente infectan animales y que han sido adaptadas en cultivos celulares, las cuales, debido a que comparten antígenos de grupo se espera que puedan proteger contra infección por rotavirus del grupo A. Dentro de este grupo se incluyen las cepas bovinas RIT 4237 y W-C3, y la cepa rhesus RRV-1.
- ii) Modificaciones del virus en el laboratorio han resultado en la selección de "híbridos" no patogénicos de cepas animal-humano, en las cuales segmentos de ARN que codifican para la proteína VP7 de la cepa humana (correspondientes a los serotipos 1-4) son incorporados a una cepa heteróloga animal atenuada. Actualmente existen cepas de bovino-humano y rhesus-humano, en éste último caso, se han desarrollado "híbridos" para los serotipos 1,2, y 4, no siendo necesaria la del serotipo 3, ya que este serotipo tiene estrecha relación antigénica con la cepa RRV-1.
- iii) Otros candidatos han sido desarrollados de cepas humanas naturalmente atenuadas ("cepas de cuero"), las cuales difieren de los RVH virulentos por una modificación en la proteína de superficie VP4. La justificación para el uso de estas cepas como posibles candidatos a vacuna es derivada de la observación de que usualmente causan infecciones asintomáticas en el período neonatal.
- iv) Por último, segmentos del genoma de RVH han sido clonados dentro de células procarióticas y eucarióticas para intentar desarrollar un medio de producción de grandes cantidades de antígeno de RVH.

El desarrollo de candidatos a vacuna para RVH ha progresado rápidamente a la evaluación de algunas cepas vivas atenuadas en estudios clínicos-controlados de campo, realizados en varios países con la finalidad de determinar su posible eficacia en la prevención de la diarrea causada por este virus (139-151); los resultados de estos estudios se resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 3
ESTUDIOS CLINICOS CONTROLADOS CON CANDIDATOS A VACUNA CONTRA RVH

País	Número de dosis ofrecidas	Edad en meses	Protección contra episodios D _{ARVIP} (%)		Serotipo RVH aislado	Referencia
			todos	graves		
A. Cepa RIT 423^b						
Finlandia	1	8 -11	50	88	1	142
Finlandia	2	6 -12	58	82	1	143
Finlandia	1	0 - 1	0	80	1,4	139
E U A	1	2 - 6	0	0	1,2,4	140
Rwanda	1	2 - 5	0	0	ND	144
Gambia	3	2 - 6	33	33	2	145
Perú	1,2 ó 3	3 -18	40	75	1,2	146
B. Cepa WC-3^c						
E U A	1	3 -11	76	100	1	147
C. Cepa RRV-1^d						
Suecia ^e	1	5 -12	48	80	1	148
Finlandia	1	2 - 5	38	67	1,4	149
E U A	1	2 - 4	0	30	1	150
E U A	1	2 - 6	0	0	1,2,4	140
Venezuela	1	1 -10	68	90	3	151

^aDiarrea asociada a RVH

^bDosis 10⁵ Unidades Formadoras de Placa (UFP)

^cDosis 10⁷ UFP

^dDosis 10⁴ UFP

^eDosis 10⁶ UFP

ND no determinado

La primer cepa disponible para evaluación clínica fue la cepa bovina RIT 4237, con la cual se obtuvieron resultados iniciales muy alentadores al ser probada en niños finlandeses (142,143); sin embargo, cuando fue posteriormente evaluada en niños de países en desarrollo (144-146) y de una comunidad de indios apaches en EUA (140), esta cepa no mostró que tuviese inmunogenicidad y eficacia significativas por lo que su producción finalmente fue discontinuada (139).

La cepa WC-3 es derivada de un rotavirus bovino diferente, su evaluación inicial en EUA mostró niveles altos de protección (147); sin embargo, resultados preliminares de estudios en países menos desarrollados (República de África Central, Israel y China), actualmente en curso, señalan menores porcentajes de protección (141).

Analizados en conjunto, estos hallazgos sugieren que la protección evocada por cepas bovinas es pobre en niños de países en desarrollo y generalmente adecuada en niños de países industrializados. Esto sugiere, que la eficacia de candidatos a vacuna de RVH en países en desarrollo no se puede predecir de manera confiable tomando en cuenta los resultados obtenidos en países industrializados (141).

El estudio conducido en Suecia con la cepa rhesus RRV-1 mostró un alto porcentaje de protección contra episodios graves, sin embargo, esta cepa, a esta dosis, provocó fiebre en 79% de los niños que la recibieron (148); en Venezuela, se empleó una dosis menor, con lo cual se conservó una adecuada eficacia pero con menor frecuencia de efectos colaterales, en este estudio, la mayor incidencia de casos de diarrea se asoció a serotipo 3 con el cual RRV-1 está muy relacionado (151). En otros estudios en los que el serotipo 1 fue más común, esta cepa ya no fue tan efectiva; estos resultados sugieren que la protección evocada por RRV-1 es fundamentalmente serotipo-específica (para serotipo 3) (140,149-151).

Actualmente se están realizando evaluaciones preliminares con cepas de "híbridos" de RRV-1 con serotipo 1 y 2 en estudios de campo en EUA, Finlandia y Perú (141); así mismo, recientemente se ha preparado un "híbrido" tetravalente de RRV-1 con los determinantes antigénicos de los 4 serotipos de RVH más importantes y se han iniciado ensayos clínicos de eficacia con esta cepa en Perú, EUA y Brasil (141).

En relación a las "cepas de cuerno", la cepa candidato M37 es un virus "intertipo" que tiene reacción cruzada con los serotipos 1 a 4 de RVH; actualmente esta cepa está siendo probada en voluntarios para evaluar su seguridad e inmunogenicidad (140,141).

A pesar de que existen progresos sustanciales en el desarrollo de una vacuna contra RVH, aún existen preguntas importantes que deben ser contestadas antes de que su uso racional a gran escala pudiese ser considerado (35,152).

Se desconoce cuál es la edad óptima de vacunación, las cepas hasta ahora probadas se han ofrecido a lo largo de los primeros 18 meses de vida (139-151); sin embargo, es necesario determinar si existe algún período durante el cual, el efecto protector de una vacuna podría ser más evidente. Algunas consideraciones logísticas asociadas deberán ser tomadas en cuenta; se deberá determinar si la vacuna puede ser neutralizada por leche materna ó por anticuerpos séricos transplacentarios, ó bien, si puede existir interferencia mutua entre la vacuna de polio y de RVH al ser ofrecidas simultáneamente (30,31,35,36,136,137,141,152).

Para determinar si la vacuna debe incluir varios serotipos para ofrecer una protección adecuada, se requiere estudiar cuál es la importancia relativa de los diversos serotipos de RVH en la etiología de la diarrea y si la inmunidad conferida por una infección natural ó por una

vacuna contra RVH es ó no serotipo-específica. Debe señalarse, que de ninguno de los actuales candidatos a vacuna se espera algún efecto protector contra rotavirus del grupo no-A (35,36,141,152).

Será necesario establecer la concentración óptima del virus y el número de dosis de vacuna necesarias para ofrecer protección, debiéndose mantener un equilibrio entre inmunogenicidad adecuada y mínimos efectos colaterales; así mismo, se deberá determinar cuál es la duración de la protección conferida (35,36,141,152).

Se requerirán estudios de costo-beneficio, sobre todo en países desarrollados, en donde la diarrea asociada a RVH no es de manera frecuente un evento fatal (30,35).

De demostrarse que existe efecto protector mediado por anticuerpos específicos en leche materna contra la diarrea causada por este virus, un abordaje que se deberá considerar será la inmunización por vía oral de las madres gestantes, con la intención de incrementar los títulos de anticuerpos en leche materna y así poder evitar la infección y/o diarrea asociada a RVH en lactantes, especialmente en aquellos de países en desarrollo (31).

Estimaciones de la OMS han determinado, que el empleo a gran escala de una vacuna efectiva en la prevención de la diarrea asociada a RVH podría reducir en un 30% la mortalidad total por diarrea y en 10% su morbilidad, en niños de 6 a 24 meses de edad, de países en desarrollo. En otras palabras, se considera que se podrían prevenir de 500 000 a 1 000 000 de muertes infantiles anualmente, lo cual, expresado en unidades menores, se traduciría en \approx 1 400 a 2 700 muertes diarias, ó \approx 57 a 114 muertes por hora, ó bien, \approx 1 a 2 muertes por minuto (30).

El impacto proporcional que tendría la inmunización sobre la morbilidad por diarrea asociada a RVH en niños de la misma edad, de países industrializados, probablemente sea más elevado ya que la proporción de episodios atribuibles a este virus en estos países es mayor (30).

2.2 Inmunidad conferida por una infección por rotavirus humano :

a) Respuesta inmune sistémica y local.

La respuesta inmune humoral secundaria a la infección causada por RVH parece seguir el patrón clásico de elevación temprana de IgM específica, a menudo presente en la muestra de la fase aguda, seguida o reemplazada por IgA e IgG (153-155).

La IgM específica a RVH ha sido detectada en muestras séricas desde 3 días y hasta 5 semanas después del inicio de la enfermedad, encontrándose los títulos más elevados durante la 2ª a 3ª semana (69,154). Hjelt y colaboradores han mostrado la presencia de IgA sérica específica a RVH hasta 6 meses después del inicio de la diarrea asociada a este virus, así como, la existencia de inmunoglobulina secretoria específica (sIg) durante los 4 a 10 días posteriores al inicio de la misma, lo cual pudiese ser consecuencia de la extensa denudación de enterocitos de las vellosidades del intestino delgado que habitualmente ocurre durante la fase aguda de la infección por RVH (156,157).

Los niveles circulantes de IgG específica se empiezan a elevar 10 días después del inicio de la enfermedad y se pueden mantener en el suero por muchos años, pudiendo ser detectados en la senectud a títulos bajos. Para los 6 años de edad, hasta 90% de los niños que viven en áreas endémicas pueden tener niveles detectables de IgG específica para el subgrupo I y/ó II de RVH (75,158).

Existen varios métodos serológicos disponibles para el diagnóstico de la infección por RVH, dentro de los cuales se incluyen el de fijación de complemento, inmunofluorescencia, hemaglutinación por inmunoadherencia, ELISA y otros empleados con menor frecuencia; la mayoría de los estudios comparativos muestran que ELISA es el ensayo más sensible actualmente disponible (153,159). La determinación de anticuerpos séricos mediante las pruebas de ELISA ó ELISA por bloqueo han permitido la detección de las diferentes clases de inmunoglobulinas; éstas pruebas han sido utilizadas ampliamente, particularmente en estudios sero-epidemiológicos (153,155,158,160).

Con el empleo del método de ELISA, también se ha podido detectar de manera eficiente la presencia de IgM, IgA, sIgA e IgG específicas a RVH en líquidos intestinales (155,160); en general, se ha observado que las diferentes clases de inmunoglobulinas son excretadas al intestino aproximadamente de 1 a 2 semanas después del inicio de la enfermedad y son detectadas por varias semanas antes de declinar paulatinamente (154-156,158,160). Las elevaciones de IgM, IgA y sIgA ocurren de manera similar a las observadas en suero, encontrándose IgG con menor frecuencia en secreciones intestinales (154-156).

Se ha observado que el nivel de IgA del líquido duodenal puede ser interido de manera confiable mediante la determinación de algunos tipos de inmunoglobulinas en heces y sangre, por lo que actualmente se considera innecesaria la intubación intestinal para la medición de la respuesta inmune local (161).

Estudios efectuados en un modelo murino, que intentan determinar cual es la posible participación de la inmunidad celular en el control de la infección por RVH no han mostrado resultados definitivos. Se ha observado que la transferencia pasiva de linfocitos inmunes acorta la duración de la enfermedad, lo cual parece sugerir que este tipo de inmunidad participa en la resolución de la diarrea, sin embargo, en ratones desnudos deficientes en células T, la

recuperación de la infección por RVH ha ocurrido de manera similar a la de ratones normales, lo cual a su vez ha sugerido que la inmunidad mediada por células no parece ser absolutamente esencial para la recuperación; así mismo, se ha encontrado que la enfermedad desarrollada por ratones desnutridos es más grave, comparada con la de ratones bien nutridos (139).

En la actualidad, la participación e importancia relativa que tienen la respuesta sistémica humoral, local intestinal y la mediada por células en la inmunidad desarrollada contra la infección por RVH no ha sido totalmente definida. Las evidencias acumuladas, sobre todo de estudios realizados en animales, muestran que aunque existe una respuesta sistémica sustancial, la presencia de anticuerpos circulantes independientemente de su clase no parecen ser un indicador confiable de inmunidad a la infección y se ha considerado que la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos a nivel de la luz intestinal podría ser el factor crítico en la protección y probable recuperación de la infección por RVH (35,152,158).

Debido a esta aparente importancia de la inmunidad intestinal en la protección contra la diarrea asociada a este virus, se ha considerado que la inmunización más adecuada pudiese ser aquella en la que se emplee una vacuna con virus vivo atenuado que sea administrada por la vía oral (35,36).

En la actualidad, se considera que existen más preguntas relacionadas a la inmunidad naturalmente conferida por una infección a RVH que no han sido contestadas, que aquellas que ya tienen una respuesta (152,158).

b) Efecto protector de la inmunidad adquirida naturalmente.

Independientemente de la importancia de determinar cuales son los mecanismos biológicos íntimamente involucrados en la respuesta inmune a una infección por RVH y de conocer cuál es su participación relativa; el efecto que esta inmunidad naturalmente adquirida tiene para prevenir eficientemente una reinfección ó la enfermedad asociada durante la misma es un aspecto que no ha sido suficientemente aclarado (152).

En estudios protectivos y longitudinales de niños seguidos desde el nacimiento, se ha observado que la incidencia de la enfermedad asociada a RVH alcanza un pico máximo entre los 6 a 18 meses de edad, para después declinar paulatinamente (16,18,48,122,124).

Se ha señalado que el incremento inicial en la incidencia de diarrea asociada a RVH coincide con el período de destete, lo cual pudiese resultar de la suspensión del posible efecto protector de la leche materna, ó bien, de un mayor riesgo de exposición a éste enteropatógeno (16,18,122); lo cual, como ya se mencionó, hasta ahora no ha sido aclarado (136-138). Por otro lado, se ha considerado que el descenso que posteriormente se observa en la incidencia ó severidad de la diarrea asociada a este virus, que ocurre conforme la edad avanza, pudiese ser consecuencia de la inmunidad adquirida naturalmente posterior a una infección inicial por RVH (18,35).

Sin embargo, también se ha considerado que esta inmunidad naturalmente adquirida parece ofrecer protección incierta, incompleta ó posiblemente de corta duración, ya que se han observado infecciones ó episodios diarreicos repetidos asociados a RVH durante la infancia, cuya incidencia se desconoce (16,18,48,121,122,124). Se ha encontrado que estas infecciones secuenciales ó subsiguientes pueden ser debidas a RVH de subgrupo ó serotipo diferente e incluso similar al aislado durante la infección inicial; no existe información suficiente en relación a cuál

es la gravedad de los síntomas que ocurren durante una primoinfección y una reinfección por RVH, ya sean debidas a serotipos iguales ó diferentes (75,121,162-166).

Algunos estudios protectivos y longitudinales, que no incluyen el seguimiento de niños desde el nacimiento, han mostrado que un título alto de anticuerpos séricos, IgG (167), fijadores de complemento (168) ó IgA (169) específicos contra RVH, se asocia a un menor riesgo de infección y/ó de episodios diarreicos repetidos (167,168), ó bien, a atenuación en la gravedad de la enfermedad durante los mismos (169); sin embargo, esta aparente protección no es completa, ya que algunos niños se reinfectan ó presentan diarrea subsecuente a pesar de tener títulos altos de anticuerpos, así mismo, se ha observado un efecto protector per se asociado a la edad, lo cual ha sugerido la existencia de otros factores independientes al nivel sérico de anticuerpos que podrían estar participando en la inmunidad conferida por una infección previa por RVH; de hecho, se ha considerado que no es posible determinar si los anticuerpos séricos son los mediadores del efecto protector ó si bien, están estrechamente asociados a otros factores no identificados (posiblemente anticuerpos excretados localmente en la superficie intestinal) que podrían ser los responsables de la protección conferida (167-169).

Existe evidencia de que esta protección parece ser serotipo-específica u homotípica, aunque también se ha encontrado protección contra serotipos diferentes ó heterotípica que es dependiente del título de anticuerpos (170). Sin embargo, estas observaciones no son consistentes, ya que existen otros estudios longitudinales en los que no se ha demostrado ningún efecto protector contra la reinfección por RVH ó su enfermedad que pudiese ser asociado a la presencia de un título alto de anticuerpos totales (16,49), ó bien de anticuerpos serotipo-específicos (171) previamente adquiridos.

Son pocos los estudios de cohortes incipientes ó tempranas (que incluyen el seguimiento de niños desde su nacimiento), que han sido realizados con el propósito de determinar si la inmunidad adquirida naturalmente después de una primo-infección por RVH, ya sea adquirida ó no a edad temprana, ofrece algún efecto protector en contra de la reinfección ó de la diarrea asociada durante la misma (172-175).

A este respecto, se debe mencionar el estudio realizado por Bishop y colaboradores, en Melbourne, Australia, en una cohorte de 108 niños seguidos durante tres años, en el cual se observó que aquellos niños que adquirieron una infección por RVH durante los primeros 14 días de edad no mostraron posteriormente un menor riesgo de reinfección, ó de episodios diarreicos leves ó moderados asociados durante la misma, pero sí tuvieron un menor riesgo de diarrea grave, comparado con aquellos niños que no presentaron una infección neonatal (172).

En otro estudio realizado en la República de Africa Central, por Georges-Courhot y colaboradores en una cohorte inicial de 223 niños seguidos desde el nacimiento hasta los dos años de edad, se encontró que aquellos niños que adquirieron una infección por RVH durante los primeros 6 meses presentaron con menor frecuencia diarrea asociada a este virus a edades posteriores, comparados con aquellos niños que no la presentaron (173).

El estudio informado por Reves y colaboradores en una cohorte de 363 niños egipcios seguidos desde el nacimiento, no exploró el efecto de una infección temprana, sino más bien, el efecto protector de un episodio diarreico inicial asociado a RVH que pudo ocurrir durante los primeros dos años de edad en contra de episodios subsecuentes. Se observó que este episodio inicial no ofreció protección evidente, ya que aquellos niños que lo presentaron no tuvieron un menor riesgo de diarrea asociada a RVH, comparados con niños de la misma edad que nunca

antes habían presentado diarrea por este virus (174).

En nuestro país, Cravioto y colaboradores determinaron en una cohorte de 75 niños seguidos durante un año desde su nacimiento, la edad de colonización inicial del tracto intestinal por diferentes enteropatógenos, y además, compararon la proporción de infecciones iniciales y repetidas para cada uno de ellos que se asociaron a diarrea (relación enfermedad/infección). En el caso particular de RVH, observaron que la diarrea se presenta con menor frecuencia durante una reinfección que durante una primoinfección; sin embargo, no determinaron específicamente si el tener una primoinfección disminuye el riesgo de presentar otra infección o su diarrea asociada, ya que no compararon si la incidencia de estos eventos era diferente entre niños hasta entonces no infectados por RVH con la de niños ya infectados por el virus (175).

Además de que los resultados obtenidos no son definitivos, ni consistentes, debe señalarse que estos estudios presentan inconvenientes metodológicos que pudieron haber sesgado sus resultados, los cuales por lo tanto, deben ser tomados con reserva y requieren confirmación (172-175).

Dentro de los principales problemas metodológicos encontrados, podemos destacar :

- i) Seguimiento incompleto ó desigual de los grupos comparativos de la cohorte (172-174); esto se debió a pérdidas en el seguimiento total esperado de la cohorte, que variaron de 24% (172) hasta 50% (173), ó bien, a mayores pérdidas registradas en el grupo expuesto tempranamente a RVH, que en el no expuesto (172). Por tal motivo, existe la posibilidad de que las diferencias encontradas entre los grupos comparativos de la cohorte pudiesen ser debidas más a un seguimiento incompleto ó desigual, que a la presencia ó no de una infección temprana por RVH (172,173).
- ii) Vigilancia de episodios diarreicos de manera no especificada (173), o bien, a intervalos muy amplios y de manera no activa (visitas domiciliarias ó llamadas telefónicas cada 3 meses, esperando el reporte espontáneo de los episodios por parte de la madre) (172); lo cual pudo haber favorecido subregistro en su frecuencia.
- iii) Carencia de una definición operacional de diarrea, que limita comparaciones al respecto (172-174).
- iv) Ausencia de evaluación clínica de la gravedad de la diarrea (173,174), ó bien, evaluación incompleta de la misma (172,175); sobre todo en episodios que no fueron considerados como importantes por la madre y que se notificaron hasta tres meses después (172).
- v) Posible asociación errónea de infecciones por RVH con episodios diarreicos; en uno de estos estudios (172), las infecciones causadas por RVH se identificaron principalmente mediante la detección del incremento en el título de anticuerpos contra RVH en una muestra de sangre, respecto al título de otra colectada 3 ó 6 meses antes (seroconversión), y se consideró que el episodio diarreico observado durante este intervalo de seroconversión era debido a RVH; sin embargo, la posibilidad de que la diarrea intercurrente haya sido debida a otra causa, no se investigó suficientemente, debido a que únicamente se colectaron el 65% de las muestras diarreicas asociadas a seroconversión

y únicamente en el 35% de las diarreas de esta manera asociadas a RVH se pudo confirmar la eliminación del virus en heces. Por tal motivo, no se puede descartar la posibilidad de que algunas infecciones asintomáticas por RVH hayan sido consideradas erróneamente como sintomáticas, cuando en realidad no lo eran.

- vi) Colección y búsqueda de RVH en muestras fecales únicamente durante la presencia de diarrea, lo cual impide identificar de esta manera, las infecciones asintomáticas por RVH (172-174).
- vii) Carencia total de especímenes fecales cuando las infecciones asintomáticas son detectadas exclusivamente por métodos serológicos de seroconversión, e imposibilidad para determinar con precisión la edad en que ocurrieron las mismas (172).
- viii) Caracterización incompleta de las cepas de RVH aisladas durante una primo ó reinfección, de acuerdo a subgrupo ó serotipo; lo cual impide un entendimiento de la posible adquisición de inmunidad homotípica ó heterotípica (172-175).
- ix) Nula consideración (174,175) ó medición parcial (172,173) de variables potencialmente confusoras; lo cual pudo haber favorecido sesgo en los resultados obtenidos, debido a que no se realizó ningún tipo de ajuste para las mismas en el análisis final (172-175). Existen diversas variables que por sí mismas podrían favorecer un menor ó mayor riesgo de adquirir una infección por RVH, ya sea asintomática ó asociada a diarrea, leve ó grave; por tal motivo, la posibilidad de que los resultados encontrados en los grupos de niños con ó sin infección previa por RVH pudiesen estar modificados ó confundidos debido a la acción de alguna ó algunas de estas variables, denominadas potencialmente confusoras, no se puede descartar convenientemente, a menos de que dichas variables sean medidas y de que los resultados finales obtenidos para los grupos comparativos se ajusten, tanto para las que se asocian a la presencia ó no de una infección por RVH, como para aquellas que se distribuyen de manera diferente entre los grupos comparados. Dentro de estas variables potencialmente confusoras, se podrían considerar : En el niño, su estado nutricional, su alimentación con leche materna, la edad de inicio de ablactación; en la familia, su condición socio-económica, su nivel de higiene doméstica, entre otras.

Por todo lo anterior, se ha considerado la necesidad de realizar un estudio que supere estas limitantes metodológicas, para así poder determinar de manera adecuada, cuál es la efectividad de la inmunidad adquirida después de una infección por RVH en la prevención de una reinfección ó en la atenuación de la frecuencia ó gravedad de la diarrea asociada durante la misma.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION DEL ESTUDIO :

RVH es la causa más importante de diarrea aguda que tiene la mayor capacidad de inducir deshidratación grave, que pone en peligro la vida de niños menores de 2 años de edad en todo el mundo (6-29); en México, se ha confirmado como uno de los principales agentes causales de diarrea aguda, tanto en estudios hospitalarios, como de comunidad (8,9,20-26).

El desarrollo de métodos de diagnóstico eficientes (81-106) ha conducido a un mejor entendimiento de las características del virus (31-38), así como de la epidemiología (13-27,107-129) e importancia de su enfermedad (6-29,46-80). Los serotipos 1 a 4 de RVH son los que se han identificado con importancia epidemiológica (35-37,139-141).

De acuerdo a estimaciones de la OMS en países en desarrollo, RVH puede ser responsable de 10% de los episodios diarreicos y de 30% de las muertes ocurridas por diarrea en niños menores de dos años de edad. En países desarrollados, la mortalidad por diarrea es baja, pero se ha considerado que la proporción de diarrea asociada a este virus es mayor, a pesar de que la incidencia global de la misma es menor, esto debido al control que existe de otras causas de diarrea (30).

La prevención de esta enfermedad grave y potencialmente mortal en niños pequeños es considerada como una necesidad imperativa. La similitud observada en las tasas de incidencia de diarrea asociada a RVH en países industrializados y en desarrollo ha sugerido la posibilidad de que el control de esta enfermedad no dependerá del mejoramiento en el suministro de agua, saneamiento ambiental ó en la higiene, si no que más bien su control podría depender del uso a gran escala de una vacuna efectiva (13,14,16,30,121,124).

Diversos intentos para el desarrollo de una vacuna oral, con virus vivo atenuado, están en curso y han progresado rápidamente a la evaluación de algunas cepas de origen animal en estudios clínicos controlados de campo, con la intención de determinar su posible eficacia en la prevención de la diarrea causada por este virus (34-36,139-151). Los primeros candidatos a vacuna probados en niños de países desarrollados mostraron índices de protección muy alentadores (142,143), sin embargo, cuando se evaluaron en niños de comunidades menos desarrolladas su eficacia fue muy pobre (140,144-146).

Actualmente son diversas las alternativas para la obtención de antígenos adecuados que pudiesen ser empleados como candidatos a vacuna: sin embargo, aún no se cuenta con alguno que sea eficaz, y que idealmente :

- i) pudiese inducir protección substancial y duradera en contra de la diarrea asociada a RVH después de una sola dosis, y que
- ii) pudiese ser administrado por vía oral, sin reacciones secundarias, ni interferencia de ningún tipo (34-36,139-151).

Para lograr estos objetivos, se ha considerado que es necesario responder previamente algunas preguntas importantes; de tal manera, se deberá determinar cuál es la edad óptima para la administración de una vacuna, cuál sería su posible interferencia por la inmunidad de origen materno, ó bien por la administración simultánea con vacuna de polio, cuál sería la concentración óptima del virus para lograr un equilibrio entre respuesta inmunógena adecuada y mínimas

reacciones secundarias y cuál sería la necesidad de incluir varios serotipos de RVH en la misma (30,31,35,36,134-141,152).

Estimaciones preliminares de la OMS han determinado, que de contarse con una vacuna efectiva para la prevención de la diarrea asociada a RVH, el impacto de su uso a gran escala podría ser considerable ya que se podrían evitar de 500 000 a 1 000 000 de muertes anuales por diarrea, en niños de 6 a 24 meses de edad de países en desarrollo (30,140). Se considera que ésta podría ser la intervención más significativa desde la introducción de la terapia oral en la prevención de la mortalidad por diarrea en niños (152).

Una década después del descubrimiento de RVH por Bishop en 1973 (5), Vesikari realizó en 1984 el primer ensayo clínico controlado exitoso con una vacuna (142); esta rápida obtención de una vacuna aparentemente eficaz, se siguió de una euforia inicial que provocó que el entendimiento de la virología de RVH y de la respuesta inmune natural contra su infección se consideraran como aspectos de importancia secundaria, a pesar de que para entonces su conocimiento era todavía superficial. La segunda década de investigación sobre RVH ha sido más problemática y las fallas observadas con esas vacunas iniciales han forzado a los investigadores a reconsiderar la importancia que tiene el lograr un entendimiento más profundo de estos aspectos básicos (152).

Actualmente, se ha acumulado información acerca de las características de la respuesta inmune natural posterior a una infección por RVH; sin embargo, no se ha logrado definir con claridad cuál es la participación e importancia relativa que tienen la respuesta sistémica humoral, la mediada por células y la local intestinal, aunque a ésta última se le ha conferido una mayor relevancia (139,152-158,160,161).

Del mismo modo, se ha intentado determinar cuál es la eficiencia de la inmunidad adquirida naturalmente contra RVH para prevenir infecciones repetidas ó disminuir la frecuencia ó gravedad de su diarrea asociada (167-175); sin embargo, los estudios realizados específicamente a este respecto no muestran resultados definitivos, ni consistentes y presentan inconvenientes metodológicos que pudieron haber sesgado sus resultados, los cuales deben ser tomados con reserva (172-175). Diversos autores han destacado la importancia de lograr un entendimiento adecuado sobre este aspecto, ya que se considera que esta información podría:

- i) ayudar a resolver algunas preguntas que actualmente limitan el desarrollo de una vacuna eficaz,
- ii) indicar cual sería el abordaje más adecuado en la búsqueda de candidatos a vacuna contra RVH,
- iii) ser útil en la evaluación de la efectividad de estos mismos candidatos a vacuna en futuros ensayos clínicos de campo, y
- iv) señalar cuales podrían ser las estrategias más adecuadas a seguir durante una vacunación a gran escala, una vez que se haya obtenido una vacuna efectiva (30,31,35,36,141,152).

Por todo lo antes expuesto, se consideró conveniente conducir un estudio de una cohorte de niños seguidos durante 2 años desde el nacimiento, con la intención de determinar si una infección por RVH adquirida a edad temprana protege contra infecciones subsecuentes, ó bien, contra la frecuencia y/ó gravedad de su diarrea asociada. Así como para conocer si las reinfecciones ocurren por serotipos de RVH diferentes de los que causan una infección temprana: todo esto aunado a la intención de tratar de evitar los problemas metodológicos identificados en estudios previos (172-175).

Por tal motivo, consideramos necesario realizar un seguimiento lo más completo posible de la cohorte, una vigilancia frecuente y activa de los episodios diarreicos, una colección regular de las muestras fecales aún en ausencia de diarrea, contar con definiciones operacionales de los eventos de interés, efectuar la confirmación y evaluación médica de la gravedad de los episodios diarreicos, hacer la búsqueda de antígeno de RVH en todas las muestras fecales, serotipificar los especímenes positivos con los métodos más adecuados actualmente disponibles (ELISA) y realizar un análisis multivariado de los resultados ajustando para aquellas variables potencialmente confusoras que así lo requieran.

Consideramos que la información de esta manera obtenida sería útil para el desarrollo de medidas de control contra la infección y diarrea asociada a RVH en poblaciones de alto riesgo, como la incluida en el presente estudio y que podría contribuir en el desarrollo de una vacuna eficaz y/ó en la implementación de estrategias adecuadas de vacunación.

IV. OBJETIVOS :

a) Primario :

Conocer si la infección temprana por RVH, adquirida durante los primeros 180 días de edad, ya sea en forma asintomática ó asociada a diarrea, disminuye la incidencia y/ó gravedad de infecciones subsecuentes en niños menores de 2 años, en comparación con niños sin infección temprana.

b) Secundarios :

- i) Determinar si en los niños con infección temprana por RVH, las infecciones subsecuentes son debidas a serotipos diferentes.
- ii) Determinar si la probabilidad de tener una infección sintomática ó asintomática por RVH en la fase temprana depende del serotipo infectante.

V. HIPOTESIS DE TRABAJO :

- i) La infección temprana por RVH, adquirida durante los primeros 180 días de edad, ya sea de manera asintomática ó asociada a diarrea, confiere una respuesta inmune protectora en contra de la incidencia y gravedad de infecciones subsecuentes en niños menores de 2 años.
- ii) En los niños con infección temprana por RVH, las infecciones subsecuentes son debidas a serotipos diferentes.
- iii) La probabilidad de presentar una infección temprana sintomática ó asintomática por RVH varía dependiendo del serotipo infectante.

VI. MATERIAL Y METODOS :

6.1 Diseño del estudio :

Este es un estudio de comunidad, longitudinal y prolectivo, de una cohorte de recién nacidos reclutados dentro de los primeros 5 días que se siguieron hasta completar dos años de edad, en el cual se realizaron 3 visitas domiciliarias por semana durante el primer mes y posteriormente una visita por semana hasta el final del seguimiento. Durante cada visita se investigó la existencia de diarrea y se colectó una muestra fecal, buscándose en todas ellas la presencia de antígeno de RVH con el método de ELISA.

El grupo con infección temprana lo constituyeron aquellos niños que excretaron antígeno de RVH en heces, ya sea de manera asintomática ó asociada a diarrea, durante los primeros 180 días de vida; los niños sin eliminación fecal de RVH durante este mismo período pertenecieron al grupo sin infección temprana. Después de esta edad y hasta el final del seguimiento, se determinó en ambos grupos la incidencia de infecciones por RVH asintomáticas ó asociadas a diarrea (eventos subsecuentes) cuya gravedad se evaluó médicamente empleando una escala cuasidimensional.

La incidencia de estos eventos resultado ó de interés se comparó entre el grupo con y sin infección temprana con la intención de establecer diferencias. Durante la fase basal (primeros 180 días de edad) también se midieron otras variables, tanto en el niño, como en su familia, que se consideraron que podrían asociarse con los eventos de interés y que por tal motivo podían ser fuente de confusión de los resultados, por lo que en el análisis final, en un modelo multivariado de regresión logística, se ajustó simultáneamente, tanto para las variables distribuidas de manera diferente entre ambos grupos comparativos (con y sin infección temprana), como para aquellas variables que mostraron asociación con alguno de los eventos de interés, Figura 1.

Durante el estudio, se realizó la serotipificación de los aislamientos fecales de RVH obtenidos tanto en una infección temprana como en una infección subsecuente, con la intención de determinar si estas infecciones repetidas eran debidas a serotipos similares ó diferentes; así mismo, se investigó la asociación entre el serotipo de RVH infectante y la presencia de infección (temprana ó subsecuente) asintomática ó asociada a diarrea.

6.2 Población estudiada :

Este estudio se realizó de octubre de 1987 a junio de 1990 en dos comunidades contiguas, San Pedro Mártir y San Andrés Totoltepec D.F., situadas en la periferia suroeste de la Ciudad de México. Dos meses antes del inicio del estudio se levantó un censo casa por casa, que mostró la presencia de 2,950 familias en el área estudiada, con un promedio de 4.5 individuos por familia; 28% de esta población eran niños menores de 5 años y en total la mitad de los habitantes eran menores de 18 años de edad.

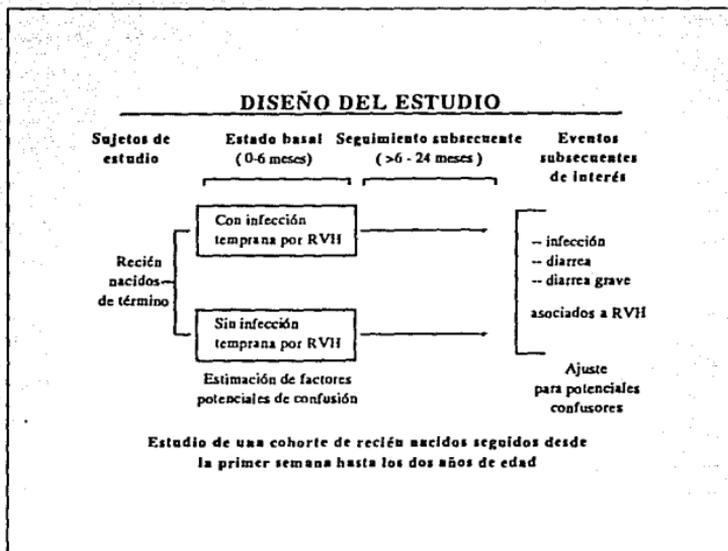


Figura 1. Diseño del estudio.

La mayor parte de los adultos involucrados en actividades laborales (70%) eran empleados asalariados y el resto eran comerciantes, campesinos, técnicos o profesionales; 87% de los jefes de familia habían completado la instrucción primaria y solamente el 2% eran analfabetos. Así mismo, se verificó que la mayoría de las casas estaban construidas a base de ladrillo y cemento (94%), que contaban con una toma de agua entubada en su domicilio (98%) y con algún sistema cerrado de eliminación de excretas (91%).

El grupo de investigación del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" había trabajado en estas comunidades desde 4 años antes del inicio de este estudio, al principio realizando una vigilancia epidemiológica pasiva en una "Clínica de enfermedades diarreicas" y posteriormente a través de estudios de campo prolectivos y longitudinales, por lo que se contaba con la experiencia de una gran aceptación y cooperación adecuada por parte de sus habitantes.

6.2.1 Criterios de elegibilidad :

a) Criterios de inclusión.

- i) Recién nacidos de término (38 a 40 semanas de gestación por fecha de última menstruación).
- ii) Madres que planearan permanecer con su hijo, en el área de estudio, cuando menos durante dos años.

b) Criterios de exclusión.

- i) Recién nacidos de término con malformación congénita del tubo digestivo.
- ii) Madres con alguna enfermedad crónica, diferente de desnutrición.

c) Criterios de eliminación.

Se eliminaron del análisis comparativo de grupos (niños con y sin infección temprana por RVH) :

- i) Los niños con un seguimiento total igual ó menor a 180 días; independientemente de que hubiesen ó no presentado infección por RVH durante su corto período de seguimiento.
- ii) Los niños con 20% ó más de tiempo perdido de manera transitoria a lo largo de su seguimiento; ya sea que esta pérdida parcial ó transitoria hubiese ocurrido durante los primeros 180 días de vida (>35 días perdidos), ó bien, después de esta edad y hasta el final de su seguimiento (>3.5 meses perdidos), sin importar si hubiesen presentado ó no una infección temprana por RVH.

Sin embargo, las observaciones obtenidas de todos estos niños durante su seguimiento incompleto, sí se tomaron en cuenta para la estimación de tasas de incidencia de diarrea y de infección sintomática ó asintomática por RVH.

6.2.2 Reclutamiento de la muestra estudiada :

Durante el censo de población y a lo largo del período de reclutamiento se realizó una búsqueda y registro de mujeres embarazadas dentro del área de estudio, las cuales eran inicialmente entrevistadas por una enfermera de campo con la intención de determinar su elegibilidad. De considerarse elegibles, un médico realizaba una segunda entrevista domiciliaria al final del 3^{er} trimestre de embarazo, durante la cual explicaba en detalle cuales eran los propósito y características del estudio, las invitaba formalmente a participar y en caso de que aceptaran obtenía un consentimiento por escrito (anexo 1).

En base al total de embarazadas captadas durante el censo, se estimó que se podrían incorporar al estudio un máximo de 15 a 18 niños nacidos consecutivamente por mes, lo cual, a lo largo de un año de reclutamiento permitiría reunir una cohorte de 180 a 220 niños; se consideró que este número de niños eran factibles de ser seguidos adecuadamente, tomando en cuenta el personal de campo disponible y la capacidad de procesamiento de muestras fecales en el laboratorio.

6.3 Seguimiento de la cohorte :

El seguimiento de la cohorte y la vigilancia de episodios diarreicos se realizó mediante visitas domiciliarias por un grupo de trabajadoras de campo; tres veces por semana durante el primer mes de edad, con la intención de determinar la incidencia de infección neonatal por RVH y posteriormente una vez por semana. Durante cada visita se interrogaba a la madre acerca del número y consistencia de las evacuaciones del niño en las 24 horas previas, así como, de la presencia de diarrea, fiebre ó vómito ocurridos a partir de la última visita, se solicitaba información relacionada a su alimentación y se colectaba una muestra fecal (anexo 2).

En caso de que la trabajadora de campo identificara un posible episodio diarreico, lo reportaba de inmediato al médico y colectaba una muestra fecal diarreica en la cual se buscaban otros enteropatógenos además de RVH. A su vez, el médico acudía al domicilio del niño a la brevedad posible con la intención de confirmar la presencia de diarrea y evaluar clínicamente su gravedad, mantenía una vigilancia a lo largo del episodio hasta su completa resolución y anotaba esta información en un registro de "historia clínica" (anexo 3), Figura 2.

6.3.1 Definiciones operacionales :

a) Diarrea.

Para considerar si un niño cursaba con un episodio diarreico, se tomó en cuenta su patrón habitual de evacuaciones que era registrado regularmente durante cada visita domiciliaria; de esta manera, se definió como diarrea a la presencia en el niño de uno ó más de los siguientes eventos durante 24 horas :

- i) Dos ó más evacuaciones de lo usual, acompañadas de disminución en su consistencia.
- ii) Tres ó más evacuaciones líquidas.
- iii) Una ó más evacuaciones con sangre.

Estos eventos podían acompañarse ó no de la presencia de otros signos ó síntomas, como vómito, fiebre ó deshidratación. El médico consideraba que el episodio diarreico había concluido cuando el niño recuperaba su patrón habitual de evacuaciones y no presentaba otros datos clínicos anormales atribuibles al mismo.

Con la intención de determinar cual era el nivel de acuerdo ó la concordancia que existía entre esta definición operacional y el concepto personal de diarrea que cada madre tenía con su propio hijo, se realizó un estudio piloto durante la fase inicial del estudio que incluyó la evaluación de 658 eventos como posibles episodios diarreicos, Cuadro 4.

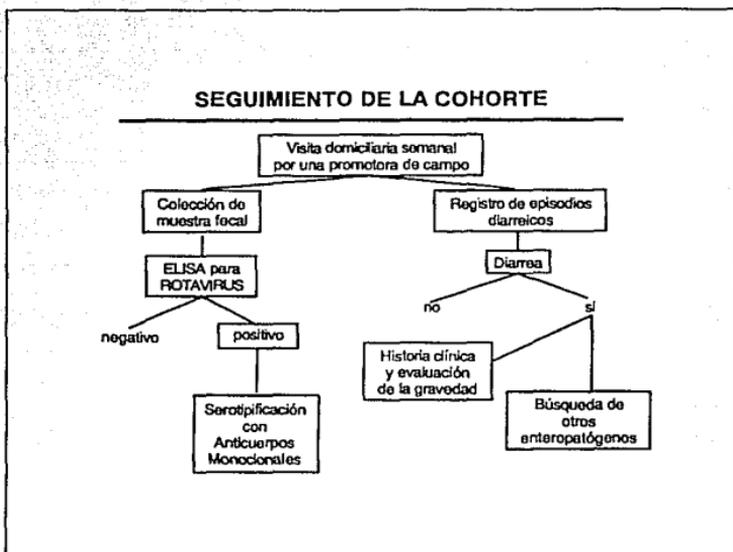


Figura 2. Seguimiento de la cohorte.

Cuadro 4 CONCORDANCIA^a DEL CONCEPTO DE DIARREA

MEDICO ^c	MADRE ^b	
	DIARREA	NO DIARREA
DIARREA	583	3
NO DIARREA	25	47

^a Índices de concordancia :

Kappa = 0.76

Z = 16.9

p < .001

Fi = 0.75

Y = 0.90

Médico vs Madre

Madre vs Médico

Sensibilidad = 96%

Especificidad = 94%

Sensibilidad = 99%

Especificidad = 65%

^b Concepto materno de diarrea

^c Definición operacional de diarrea

Se pudo observar, que el acuerdo que había entre la definición operacional y el concepto materno de diarrea era muy bueno, tomando en cuenta los adecuados índices de concordancia. Así mismo, cuando se consideraba a la definición operacional como "estándar de oro" y se comparaba el concepto materno de diarrea, se podía observar que la información proporcionada por la madre era muy sensible (99%), lo cual favorecía la detección de casi todos los episodios diarreicos, aunque era poco específica (65%) ya que presentaba falsas positivas; y por otro lado, cuando se comparaba a la definición operacional contra el concepto materno de diarrea, se podía observar que tanto su sensibilidad (96%), como su especificidad (94%) eran muy buenas, por todo esto, se consideró que la definición adoptada de diarrea era adecuada para los propósitos del estudio.

b) Infección sintomática y asintomática por rotavirus humano.

La infección sintomática por RVH se definió como la presencia de antígeno de RVH en las evacuaciones de un niño con diarrea, el mismo día en que la muestra fecal positiva se colectó, ó bien, 5 días antes ó después del aislamiento; y una infección asintomática por RVH se definió como la presencia de antígeno de RVH en las heces de un niño sin diarrea durante este mismo intervalo de tiempo. Todo esto considerando, como ya se señaló, que puede existir excreción fecal del virus desde antes del inicio de un episodio diarreico y aún después de que clínicamente se ha resuelto (71). Así mismo, se consideró que un episodio diarreico era de etiología mixta ó polimicrobiana, cuando además de la presencia de RVH en heces se detectó simultáneamente otro enteropatógeno.

6.3.2 Evaluación de la gravedad de la diarrea :

La gravedad de los episodios diarreicos confirmados médicamente se evaluó empleando una escala de indicadores clínicos previamente informada (154). Para tal efecto, se tomó en cuenta la información registrada durante cada uno de los episodios (anexo 3) y se asignó una puntuación de 0 a 3 a los siguientes datos clínicos: Número de evacuaciones por día, duración de la diarrea, número de vómitos al día, duración del vómito, grado de deshidratación y nivel de la fiebre, Cuadro 5.

Cuadro 5 CALIFICACION DE LA GRAVEDAD DE LA DIARREA*

DATOS CLINICOS	PUNTUACION		
	1	2	3
Diarrea			
No. evacuaciones/día	<5	5-7	>7
Duración (días)	1-4	5-7	8-14
Vómitos			
No. vómitos/día	1-3	4-6	>6
Duración (días)	1-2	3-5	>5
Deshidratación			
Grado (%)	<5	5-9	>9
Fiebre			
Grados centígrados	37.5-38.5	38.6-38.9	>38.9

* Modificado parcialmente de referencia 154

De esta manera, cuando se obtenía una puntuación total de 6 ó menor se consideraba al episodio diarreico como leve, cuando era entre 7 y 12 moderado y cuando la puntuación era de 13 ó mayor indicaba enfermedad grave.

6.4 Estimación de factores potenciales de confusión :

Durante la fase basal (primeros 180 días de vida) y en algunos casos, aún después, a lo largo de todo el seguimiento, se registraron y midieron un grupo de variables tanto en el niño, como en su familia que se consideraron como potenciales factores de confusión.

La comparabilidad de estas variables entre ambos grupos de niños (con y sin infección temprana) fue estimada, realizándose un ajuste en el análisis final de resultados para aquellas que mostraron un desequilibrio estadísticamente significativo; así mismo, también se realizó un ajuste para aquellas variables que mostraron asociación con alguno de los eventos resultado ó de interés: Infección por RVH, diarrea asociada a RVH y diarrea moderada/grave asociada a RVH, subsecuentes.

6.4.1 Registro de variables potencialmente confusoras :

a) Variables registradas durante la fase basal.

(0-180 días de edad)

i) En el niño:

- Sexo
- Lugar que ocupa en los hijos de la madre
- Lugar de nacimiento
- Permanencia en cunero
- Peso al nacimiento
- Estado nutricional
- Duración de la lactancia al pecho materno
- Edad de inicio del biberón
- Edad de inicio de la ablactación
- Tiempo de exposición a una temporada de mayor incidencia de infección por RVH

ii) En la familia:

- Tamaño
- Número de niños menores de 5 años de edad
- Nivel educacional del jefe de familia
- Nivel educacional de la madre
- Nivel socio-económico
- Hábitos higiénico-domésticos

b) Variables registradas considerando todo el seguimiento.

(0-24 meses de edad)

i) En el niño:

- Asistencia a guardería
- Tiempo de seguimiento subsecuente (después de 180 días de edad)

ii) En la familia:

- Exposición de los hermanos a posibles fuentes de infección (guarderías, escuelas)
- Madre con actividad laboral fuera de su domicilio

6.4.2 Medición de las variables potencialmente confusoras :

- 1) Sexo : Se consideró como una variable dicotómica; para fines de análisis, el masculino fue 1 y el femenino 2.
- 2) Lugar que ocupa en los hijos de la madre ó número de hijo : De la lista de hijos nacidos vivos de la madre, se registró el lugar que ocupaba el niño incluido en el estudio; la variable se analizó como continua.
- 3) Lugar de nacimiento : Variable categórica, si el nacimiento ocurrió en su domicilio se consideró como 0 y si tuvo lugar en un medio hospitalario como 1.
- 4) Permanencia en cunero ó lugar de estancia : En aquellos niños nacidos en medio hospitalario, se consideró al tiempo de estancia en días como una variable continua y como variable nominal, se consideró como 0 a la permanencia del niño con su madre y como 1 su estancia en alguna sala de cunero.
- 5) Peso al nacimiento : Se tomó en cuenta el peso registrado al nacimiento en kilogramos; para el análisis esta variable se consideró como dimensional y también como ordinal (bajo peso al nacer) con 3 estratos: 0 \geq 3.0 kg, 1 \geq 2.5 - <3.0 kg y 2 <2.5 kg.
- 6) Estado nutricional ó desnutrición basal (0-180 días) : Se estimó considerando el peso adecuado para la edad.

A lo largo del seguimiento de cada niño se registró su peso corporal cada mes a dos meses; inicialmente se empleó una báscula pesa-bebé sin resortes (Bame, 16 kg de capacidad) disponible en el consultorio de la "Clínica de Diarreas", sito en el Centro de Salud de la S.S., de San Pedro Mártir y posteriormente fue necesario además, el empleo de 4 básculas portátiles (CMS Weighing equipment LTD, modelo MP25, 25 kg de capacidad) para que los niños pudiesen ser pesados con mayor regularidad en su domicilio, ya que no todas las madres acudían espontáneamente al consultorio. La exactitud de todas las básculas era verificada regularmente y el personal de campo fue capacitado para su empleo adecuado.

Las curvas de peso para la edad de acuerdo a sexo "de los niños de Boston" (NCHS/CDC) (176) se emplearon como valores de referencia. Se ha considerado que la comparación con estos valores es válida, ya que existen evidencias de que el pobre crecimiento observado en grupos de población menos privilegiados es debido a factores sociales, más que a diferencias étnicas ó geográficas, además de que estos valores han sido ampliamente empleados y aceptados, lo cual favorece la comparabilidad de resultados con otros estudios similares (177).

Los registros de peso de cada niño, se compararon con la mediana de la curva correspondiente, de esta manera se obtuvo el porcentaje de adecuación de peso para una edad determinada, que podía ser mayor ó menor a 100% dependiendo si el peso registrado estaba respectivamente por arriba ó por abajo del valor de la mediana que se consideró el 100% de peso. A su vez, se obtuvo la mediana de los porcentajes de adecuación de peso por niño durante toda la fase basal.

Para definir la presencia de desnutrición durante este período se tomó en cuenta la clasificación de Gómez (178), de acuerdo a la cual un niño se pudo ubicar dentro de alguno de los siguientes 4 estratos, dependiendo del valor de su mediana del porcentaje de adecuación de peso para la edad: Eutrófico si era $>90\%$, codificado como 0; desnutrición grado I si era entre 76% y 90% , como 1; desnutrición grado II de 60% a 75% , como 2; y desnutrición grado III si era $<60\%$, como 3. Para el análisis, estos estratos de desnutrición se consideraron como una variable ordinal de 0 a 3.

La estimación del estado de nutrición en base a la adecuación del peso para la edad podría considerarse una medición insuficiente ó inadecuada, sin embargo, como lo ha señalado Ramos-Galván, el empleo de valores de peso-edad tiene su mejor aplicación en trabajos epidemiológicos realizados en niños de corta edad, en quienes la talla ha tenido poca oportunidad de sufrir considerablemente. A diferencia de la talla, durante la desnutrición el peso disminuye más tempranamente y de manera más intensa; la relación talla-edad es más bien aplicable para juzgar la cronicidad del proceso de desnutrición (179).

Se ha señalado también, que en trabajos de campo, para la valoración colectiva del estado de nutrición, resulta admisible el empleo de cifras relativas (mediana del porcentaje de adecuación del peso, grado de desnutrición), ya que el procedimiento tiene las ventajas de la uniformidad en la expresión de los resultados y de la posibilidad de una comparación rápida y fácil (179,180); para tal efecto, la clasificación propuesta por Gómez ha demostrado su utilidad epidemiológica y ha sido adoptada en muchos países (179).

- 7) Duración de la lactancia al pecho materno: Durante las visitas domiciliarias se registraron las fechas exactas de inicio y término de la alimentación al pecho materno, se calculó la diferencia entre ambas y se determinó la duración de la lactancia expresada en días, se consideró solamente la lactancia ofrecida durante la fase basal. La variable se analizó de manera dimensional y como una variable ordinal (lactancia de corta duración) con 3 estratos: Lactancia >90 a 180 días = 0; entre 1 a 90 días = 1; y lactancia nula ó de 0 días = 2.
- 8) Edad de inicio del biberón: A través de las visitas domiciliarias se determinó la edad de introducción del biberón, independientemente de que en él se ofreciera alguna fórmula láctea, ó cualquier otro tipo de líquido (agua, tisanas, etc): la variable se consideró como continua expresada en días.

- 9) Edad de inicio de la ablactación : Durante las entrevistas domiciliarias también se pudo conocer la edad de introducción de los alimentos sólidos; la variable se expresó en días y se analizó como continua.
- 10) Tiempo de exposición a una temporada de mayor incidencia de infección por RVH ó temporalidad de RVH : Debido al carácter estacional de la infección por RVH, se determinó el número de días que un niño se expuso a una temporada de alta incidencia durante su fase basal, ya que se consideró que esta diferente exposición temporal a RVH podría ser un factor que favoreciera la adquisición de una infección, ya sea a edad temprana ó a edad subsecuente. La variable se consideró como continua y se expresó en días de exposición.
- 11) Asistencia a guardería : A lo largo del seguimiento de cada niño se registró su asistencia ó no a alguna guardería, la variable se consideró de manera dicotómica, como 1 ó 0 respectivamente. La duración de la asistencia a la guardería se registró en meses y se consideró de manera continua.
- 12) Tiempo de seguimiento subsecuente : Debido a que un seguimiento diferente de los grupos comparados podría ser fuente de sesgo en los resultados, se determinó el tiempo de seguimiento después de los 180 días de edad en cada uno de los niños y se consideró como una variable dimensional expresada en días.
- 13) Familia (tamaño de la familia) : Se definió como familia al grupo de individuos, niños ó adultos, que convivían juntos en la misma vivienda y que dependían del mismo ingreso económico. Dentro de éste apartado se consideraron 4 variables continuas:
- i) el tamaño per se de la familia, expresado como número total de miembros; ii) número de personas por cuarto, que correspondió al cociente del número total de individuos entre el total de dormitorios disponibles; iii) número de personas en el cuarto del bebé, que registró al número de individuos que compartían el dormitorio con el niño; y iv) número de personas en la cama del bebé, que se refiere al número de personas que compartían el lecho con el niño.
- 14) Número de niños menores de 5 años de edad : Se registraron todos aquellos niños menores de esta edad que convivieron dentro del grupo familiar con el niño incluido en el estudio; se analizó como una variable continua.
- 15) Nivel educacional del jefe de familia : En la mayoría de las ocasiones se consideró como jefe de familia al padre, ya que era quien aportaba el mayor ingreso económico para el sustento familiar, solamente en caso de estar ausente se consideró como tal a la madre. Su nivel educacional se estimó tomando en cuenta los años completos de escolaridad formal; la variable se analizó como continua.

- 16) Nivel educacional de la madre : De manera similar, se tomaron en consideración sus años de escolaridad formal y como en el caso anterior de existir analfabetismo el nivel educacional era de cero; esta variable también se consideró como continua.
- 17) Nivel socio-económico : Empleamos un instrumento previamente desarrollado y validado por Bronfman y colaboradores (181), el cual consiste en la construcción de un índice complejo a partir de la información de 6 variables socioeconómicas. Del cociente número de personas en la vivienda entre número de cuartos de la misma se obtuvo la variable nivel de hacinamiento, la cual se combinó con otras 3 variables de condiciones de la vivienda : Material del piso, disponibilidad de agua potable y forma de eliminación de excretas; para cada una de estas 4 variables se consideraron 3 categorías en un nivel de medición ordinal : Malo, regular y bueno, a partir de las cuales se construyó el "Índice de condiciones de la vivienda" ó INCOVI, que se calificó como bueno para aquellas combinaciones en las que aparecieron por lo menos 2 variables con bueno y una con regular y como malo para las combinaciones en las que aparecían por lo menos 2 variables con malo y una con regular y el resto de las combinaciones se ubicaron en la categoría regular.
- La escolaridad del jefe de familia también se ordenó en 3 niveles ordinales similares a los previamente señalados, los cuales se combinaron con los 3 niveles del INCOVI dando lugar a 9 combinaciones, en base a las cuales se construyó el "Índice socioeconómico", el cual se consideró como bueno para aquellas combinaciones que tuvieran cuando menos un bueno y un regular y malo para aquellas en las que hubiera por lo menos un malo y un regular, dejando al resto de combinaciones como regular.
- Para el análisis, este índice conservó su carácter ordinal, tomándose en cuenta como : malo = 0, regular = 1 y bueno = 2.
- 18) Hábitos higiénico-domésticos : Para la medición de esta variable desarrollamos y validamos un instrumento de medición observacional (182,183) que ha mostrado su utilidad para evaluar los factores de riesgo ambientales para la adquisición de diarrea aguda (184).
- El instrumento se desarrolló para que fuera aplicado durante una visita domiciliaria convencional por una trabajadora social ó una enfermera de campo, la cual efectuaba una serie de observaciones sin hacer preguntas directas a la madre, quien no era informada del motivo de la visita.
- El instrumento se desarrolló a partir de 51 observaciones que tenían la intención de obtener información relacionada con las condiciones higiénicas: Del exterior e interior de la casa, de la madre y niño estudiado, así como, de la preparación y conservación de los alimentos y el agua. El número de observaciones se disminuyó a 25 una vez que se consideró su factibilidad, capacidad discriminante, grado de acuerdo entre observadores y reproducibilidad; las variables eran de tipo ordinal ó dicotómico, la información contenida en estas variables se relacionó con la tasa anual de diarrea de cada niño mediante regresión logística, identificándose a aquellas asociadas con un riesgo protector, ya que la premisa era que a mejor calificación de la variable existiría menor riesgo de adquirir diarrea aguda.

Las variables seleccionadas se incluyeron en un análisis discriminante escalonado, que a su vez identificó a aquellas que mejor predecían la probabilidad de presentar diarrea. El instrumento así desarrollado mostró una exactitud de 75%, con sensibilidad y especificidad de 75% y valores predictivos positivos y negativos de 50% y 90%, respectivamente.

Las variables de esta manera incluidas en el instrumento observacional final (anexo 4) fueron 3 de carácter ordinal, calificadas como 1, 2 ó 3 de acuerdo a su mejor condición: tipo de eliminación de excretas, refrigeración de alimentos, limpieza de las ropas de la madre; y una dicotómica : vivienda tipo "cuarto redondo" calificada como sí = 1 ó no = 3. Cada una de estas observaciones se analizó como una sola variable conservando su carácter ordinal ó dicotómico y además se construyó una calificación global con la suma de todas ellas, que podía variar de 4 a 12 y que se tomó en cuenta como un "Índice de higiene".

- 19) Exposición de los hermanos a posibles fuentes de infección : A lo largo de todo el seguimiento de cada uno de los niños estudiados, se determinó su convivencia ó no con hermanos menores de 5 años que asistieran a alguna guardería, escuela ó algún otro sitio común de reunión de grupos de niños. La variable se consideró como dicotómica, sin (como 0) y con (como 1) exposición y como continua, tomando en cuenta el número de hermanos expuestos.
- 20) Madre con actividad laboral fuera de su domicilio ó Madre que trabaja : Se determinó si la madre tenía alguna actividad laboral que le obligara a permanecer fuera de su domicilio y que por lo tanto, le impidiera temporalmente continuar con el cuidado directo de su hijo incluido en el estudio: la duración de ésta actividad se registró en meses y la jornada diaria de la misma en horas. La presencia ó no de la actividad laboral se analizó como una variable dicotómica, como 1 ó 0 respectivamente y la duración y jornada de la misma como variables continuas.

La información contenida en los puntos 7 a 10 y 12, se obtuvo a partir del anexo 2; para obtener la información considerada en los puntos 1 a 5, y 13 a 17, se empleó el anexo 5 y para la contenida en los puntos 11, 19 y 20, el anexo 6.

6.5 Métodos de laboratorio :

Las muestras fecales colectadas durante cada visita domiciliaria, ya sea en ausencia ó presencia de diarrea, se obtenían a partir de evacuaciones emitidas por el niño en el curso de la mañana, se mantenían en hielo y se transportaban a la brevedad posible al laboratorio en donde eran registradas y procesadas el mismo día de su colección.

6.5.1 Detección de antígeno de rotavirus humano en heces :

Se empleó el ensayo inmuno-enzimático (ELISA) tipo emparejado de doble anticuerpo desarrollado y validado por Grauballe y colaboradores (84). Este ensayo utiliza microplacas de poliestireno como fase sólida, a la cual se fija la fracción inmunoglobulínica del antisuero policlonal de conejo anti-RVH como anticuerpo de captura, este mismo anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano también se emplea como conjugado. De esta manera, de existir partículas de RVH en la muestra fecal son atrapadas entre ambos anticuerpos en un ensayo tipo emparejado, para detectar la presencia de este complejo antígeno-anticuerpo se agrega un sustrato (peróxido de hidrógeno más otrofenilendiamina) que da lugar a una reacción colorida, que se puede detectar visualmente ó que puede ser medida con un espectrofotómetro (Figura 3).

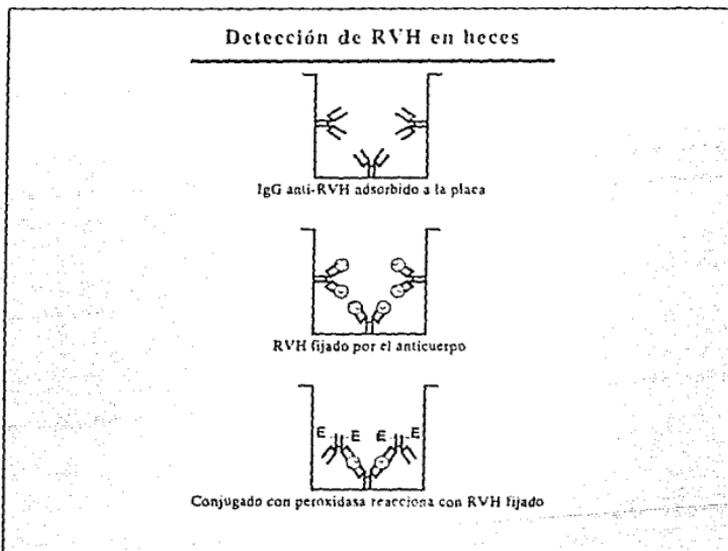


Figura 3. Detección de RVH en heces.

Este ensayo inmuno-enzimático es capaz de detectar <1 ng de proteína de RVH en heces, es un procedimiento reproducible (coeficiente de variación intra e interensayo <10%) que fue comparado en su fase inicial con técnicas de microscopía electrónica mostrando una sensibilidad de 95% y especificidad de 85%, habiéndose minimizado la posibilidad de reacciones falsas positivas al introducirse un paso de bloqueo de sitios inespecíficos previo a la incubación con el conjugado (84,185).

El ensayo se encuentra disponible en el comercio (Rotavirus ELISA kit, DAKOPATTS) y recientemente ha sido comparado con el ELISA desarrollado bajo el auspicio del Programa de Control de Enfermedades Diarreicas de la OMS en un estudio colaborativo con 7 países, en el cual mostró una sensibilidad y especificidad de 97%, siendo un procedimiento más sencillo en su realización y que proporciona resultados de manera más rápida. Por estos motivos, se considera que el ELISA kit DAKOPATTS es un método muy recomendable para el diagnóstico de la infección por RVH, sobre todo en estudios de campo realizados en países en desarrollo (185).

a) Descripción de la técnica de laboratorio.

i) Preparación de sobrenadantes de heces para la búsqueda de RVH por ELISA :

Las muestras fecales eran procesadas el mismo día de su colección para la obtención de sobrenadantes con una concentración de \approx 10%.

- 1) Se empleaban 2 viales de eppendorf por muestra, en cada uno de ellos se dispensaban 2 ml de solución de PBS-merthiolate.
- 2) En cada uno de los viales se depositaba aproximadamente 0.5 g de heces.
- 3) Ambos viales se agitaban vigorosamente en Vortex, durante 30 segundos hasta obtener una mezcla homogénea.
- 4) Uno de los viales se centrifugaba a 12,000 rpm., durante 15 minutos.
- 5) El sobrenadante era decantado en otro vial de eppendorf, que se completaba a un volumen de 2 ml con PBS-merthiolate.
- 6) Ambos viales, el de muestra concentrada y el de sobrenadante se etiquetaban con la clave del niño y la fecha.
- 7) Todas las muestras se congelaban a -20°C hasta su procesamiento.

ii) ELISA para la detección de RVH en sobrenadantes de heces :

Se emplearon los reactivos biológicos incluidos en el Rotavirus ELISA kit, DAKOPATTS (código K220).

- 1) Sensibilización de una placa de micro-ELISA (NUNC-Immuno plate) con 96 pozos, distribuidos en 12 columnas (1 a 12) y 8 líneas (A a G) :
- 1a) Se realizaba una dilución 1:50 de la fracción inmunoglobulínica del antisuero de conejo anti-RVH (Dakopatts código B218) en solución reguladora de carbonatos-bicarbonatos, depositándose 100 µl de la dilución dentro de cada pozo de las columnas 1,2,5,6,9 y 10 (de A a G) de la microplaca. Los cuales correspondían a los pozos de prueba.
- 1b) De manera similar, a partir de una dilución 1:50 de la fracción inmunoglobulínica de suero normal de conejo (código X904) con la misma solución reguladora, se depositaban 100 µl de la dilución dentro de todos los pozos de las columnas 3,4,7,8,11 y 12 de la microplaca. Estos pozos correspondían a controles negativos.
- 2) La placa se incubaba durante toda la noche a 4°C.
- 3) Posteriormente, se lavaban todos los pozos de la placa en 3 ocasiones con solución reguladora de fosfatos salinos más Tween 20 (PBS-Tween).
- 4) Se aplicaban 100 µl de cada uno de los sobrenadantes – al 10% de heces en 4 pozos consecutivos (2 pozos de prueba y 2 de control negativo), la primer muestra se aplicaba de A1 a A4, la segunda de B1 a B4, etc. En los pozos G9 a G12 se aplicaba el control negativo (PBS) y de H9 a H12 el control positivo (antígeno de RVH. Behring).
- 5) La placa se incubaba a 37 °C durante 60 minutos.
- 6) El lavado de la placa se repetía de manera similar al paso 3.
- 7) El bloqueo de reacciones no específicas, se realizaba depositando en cada pozo 150 µl de una solución al 1% de albúmina sérica bovina esencialmente libre de inmunoglobulinas (BSA, SIGMA).
- 8) Posteriormente, la placa se incubaba durante 40 minutos.
- 9) Se lavaban todos los pozos con PBS-Tween en una sola ocasión.
- 10) Se depositaba en cada uno de los pozos 100 µl de una dilución 1:500 del conjugado de antisuero de conejo anti-RVH más peroxidasa de rábano (código P219), con solución reguladora PBS-Tween.

- 11) Se dejaba en incubación durante 90 minutos a 37°C.
- 12) Se lavaba toda la placa con PBS-Tween en 4 ocasiones.
- 13) Se preparaba en fresco el sustrato de la reacción enzimática, que consistía en 0.0056 g de ortofenilendiamina (SIGMA) disueltos en 10 ml de solución reguladora de citratos, a lo cual se agregaban 10 µl de peróxido de hidrógeno.
- 14) De inmediato se depositaban 100 µl del sustrato en cada uno de los pozos de toda la placa.
- 15) Se dejaba reaccionar durante 5-15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 16) Una vez que se observaba el desarrollo de color en el control positivo, la reacción era detenida agregando a cada uno de los pozos 100 µl de ácido sulfúrico 1M.
- 17) Los resultados eran evaluados por el desarrollo de color a simple vista y también, mediante la medición de la absorbancia del líquido contenido en los pozos a 492 nanómetros, empleando un espectrofotómetro (Organon teknika, reader microelisa system).

iii) Soluciones empleadas en los ensayos inmuno-enzimáticos :

1) Solución reguladora de fosfatos salinos (PBS).

Cloruro de sodio	16.00 g
Fosfato dibásico de sodio	5.80 g
Fosfato monobásico de potasio	0.40 g
Cloruro de potasio	0.40 g
Agua desionizada c.s.p.	2.00 l
pH = 7.2	

2) Solución reguladora de fosfatos salinos más merthiolate (PBS-merthiolate).

PBS	Idem
merthiolate	0.005 g

3) Solución reguladora de fosfatos salinos más Tween (PBS-Tween).

PBS	Idem
Tween 20	1.00 ml

4) Solución de albúmina al 1%.

PBS	100.0 ml
Albúmina bovina esencialmente libre de inmunoglobulinas	1.0 g

- 5) Solución reguladora de carbonatos-bicarbonatos.
- | | |
|----------------------|----------|
| Carbonato de sodio | 0.159 g |
| Bicarbonato de sodio | 0.293 g |
| Agua desionizada | 100.0 ml |
| pH = 9.6 | |
- 6) Solución reguladora de citratos.
- | | |
|----------------------|----------|
| Acido cítrico | 0.730 g |
| Bicarbonato de sodio | 1.180 g |
| Agua desionizada | 100.0 ml |
| pH = 5.5 | |
- 7) Acido sulfúrico 1M.
- | | |
|------------------|----------|
| Acido sulfúrico | 55.0 ml |
| Agua desionizada | 945.0 ml |

b) Interpretación de los resultados.

Los resultados podían ser leídos visualmente, comparando el color de los 2 pozos de prueba con el color de los correspondientes 2 pozos de control negativo, aquellas muestras que mostraban una tinción evidentemente más intensa en los pozos de prueba comparados con los pozos de control negativo, se consideraban positivas para la presencia de antígeno de RVH.

Sin embargo, los resultados visuales siempre se confirmaron mediante la lectura de la absorbancia del líquido contenido en los pozos de la placa a 492 nanómetros, con el uso de un espectrofotómetro. Para considerar una muestra de heces positiva para la presencia de antígeno de RVH se tenía que cumplir con los 2 siguientes criterios :

- 1) La absorbancia de los pozos de prueba menos la absorbancia de los pozos de control negativo, tenía que ser >0.1 ; y,
- 2) La absorbancia de los pozos de prueba dividida entre la absorbancia de los pozos de control negativo, debería ser >6 .

En caso de que no se cumpliera con alguno de estos 2 criterios, o bien, de que existiese duda en alguno de ellos, la prueba de ELISA de esa muestra fecal era repetida; así mismo, si la diferencia del valor de la absorbancia entre ambos pozos de prueba excedía 20% el ELISA también era repetido.

6.5.2 Determinación de serotipos de RVH identificados en heces :

La serotipificación de RVH se realizó a partir de las muestras fecales positivas, mediante un ensayo-inmunoenzimático que emplea anticuerpos monoclonales serotipo-específicos (1-,2-,3- y 4-) dirigidos contra la proteína VP7, desarrollado y validado por Taniguchi y colaboradores (94).

Los anticuerpos monoclonales producidos contra cepas de los 4 serotipos de RVH más importantes (1-,2-,3- y 4-) son adsorbidos a microplacas de polivinil como anticuerpos de captura, a los cuales se agrega la muestra fecal positiva para RVH; como 2° anticuerpo se emplea la fracción inmunoglobulínica de antisero de conejo anti-RVH, de esta manera, la existencia de la reacción antígeno-anticuerpo tipo emparejado se revela con el empleo de un conjugado de IgG de cabra contra IgG de conejo acoplada a fosfatasa alcalina. Al agregarse al sistema el sustrato correspondiente se da lugar a una reacción colorida que puede ser medida con el uso de un espectrofotómetro (Figura 4).

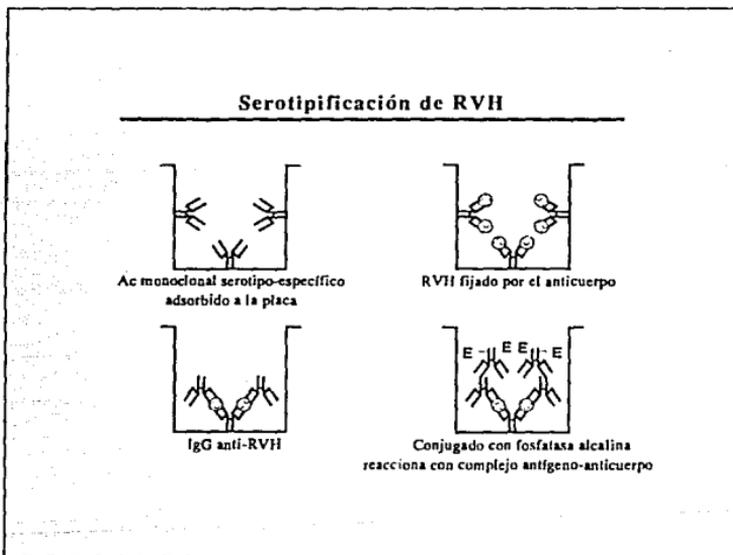


Figura 4. Serotipificación de RVH.

Se ha determinado que este ELISA tiene una sensibilidad capaz de detectar una concentración viral en las heces de ≈ 3 a 8 unidades formadoras de placa (UFP)/ml y que los anticuerpos monoclonales desarrollados son serotipo-específicos dirigidos a la proteína VP7 de la cápside externa, sin existir evidencia de reacciones cruzadas. Comparado con los ensayos de neutralización que requieren de la adaptación y crecimiento de cepas de RVH en cultivos celulares, este ELISA ha demostrado ser un método más fácil y adecuado para el procesamiento de muestras obtenidas de estudios epidemiológicos (94).

a) Descripción de la técnica de laboratorio.

La serotipificación de RVH a partir de las muestras fecales positivas se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Gastroenteritis Viral, de la División de Enfermedades Virales, de los Centros para el Control de Enfermedades en Atlanta, Georgia, EUA, a cargo del Dr. Roger I. Glass. A continuación se anota el procedimiento efectuado :

- 1) Los pozos de una placa de micro-ELISA de polivinil eran sensibilizados con 50 μ l de una dilución 1:10,000 del anticuerpo monoclonal (1 a 4) con PBS. En la línea A se depositaba el anticuerpo monoclonal dirigido contra VP7 del serotipo 1, en la B para el serotipo 2 y así sucesivamente.
- 2) La placa se incubaba a 4°C hasta el día siguiente.
- 3) Se lavaba toda la placa con PBS-Tween en 2 ocasiones.
- 4) Se bloqueaban los sitios inespecíficos, aplicando en cada pozo 50 μ l de albúmina sérica bovina libre de inmunoglobulinas al 1% diluida en solución PBS-Tween.
- 5) Incubación hasta el día siguiente a 4°C.
- 6) Se repetía una fase de lavado similar a 3.
- 7) Por duplicado, se aplicaban 50 μ l de los sobrenadantes de muestras fecales ($\approx 10\%$) positivos para RVH en los pozos de cada uno de los anticuerpos monoclonales (1 a 4); la primera muestra se depositaba en la columna 1 y 2 de las líneas A a D (8 pozos por muestra) y así sucesivamente. En las columnas 11 y 12 y de las líneas A a D se agregaban los controles positivos.
- 8) Nueva incubación a 4°C hasta el día siguiente.
- 9) Se realizaba una nueva fase de lavado, similar a 3.
- 10) Se agregaban 50 μ l por pozo de una dilución 1:10,000 de antisero de conejo contra RVH en PBS-Tween.

- 11) Se incubaba a 37°C durante una hora.
- 12) Se repetía una fase de lavado, similar a 3.
- 13) Se agregaban 50 µl por pozo de una dilución 1:10,000 del conjugado de IgG de cabra anti-IgG de conejo más fosfatasa alcalina, diluido en PBS-Tween.
- 14) Nuevamente se incubaba a 37°C durante una hora.
- 15) Se repetía una fase de lavado, similar a 3.
- 16) Posteriormente se agregaban 100 µl por pozo del sustrato, que era una solución de 1mg/ml de ácido paranitrofenil-fosfórico en solución reguladora de carbonatos-bicarbonatos.
- 17) Se dejaba reaccionar a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 18) Una vez que aparecía el desarrollo de color en los controles positivos, la reacción era detenida agregando a cada pozo 50 µl de ácido sulfúrico 1M.
- 19) La absorbancia del color desarrollado en los pozos era determinada por un espectrofotómetro.

b) Interpretación de los resultados.

La medición de la absorbancia del color desarrollado, densidad óptica (DO), se realizaba con un espectrofotómetro a 410 nanómetros. Una muestra se consideraba positiva para un serotipo determinado, cuando el valor de la absorbancia (DO) de ambos pozos probados multiplicada por 1,000 era mayor de 300.

Cuando se obtenía para una misma muestra un valor de DO mayor de 300 en los pozos de los 4 serotipos probados, se consideraba que esa muestra no era serotificable (NT); por el contrario, cuando la muestra positiva a RVH en el ELISA inicial no mostraba ninguna reacción positiva para los serotipos probados, se consideraba que era una muestra que no pudo ser serotificada (NV), posiblemente debido a una insuficiente concentración de viriones en la misma.

6.5.3 Búsqueda de otros enteropatógenos :

Ante la presencia de un episodio diarreico en alguno de los niños incluidos en la cohorte, se le colectaba una muestra fecal que era señalada como "muestra diarreica", la cual, a su llegada al laboratorio era procesada de inmediato para la búsqueda de otros enteropatógenos, además de la búsqueda habitual de RVH por ELISA.

i) Examen en fresco :

Se realizaba un examen directo de las heces con microscopía óptica; con la ayuda de un aplicador se tomaba una pequeña cantidad de la muestra diarreaica, de preferencia de los sitios que mostraban sangre ó moco y se depositaba en una laminilla que contenía una gota de solución salina isotónica, de lugol y de azul de metileno, se realizaba una suspensión con cada una de ellas y se observaban con los objetivos seco débil (10x) y seco fuerte (40x). Se buscaba la presencia de trofozoitos ó quistes de protozoarios, huevecillos ó larvas de helmintos, así como de leucocitos y sangre microscópica.

ii) Coprocultivo :

Todas las muestras diarreaicas eran sembradas en agar MacConkey, Xilosa-Lisina-Deoxicolato (XLD), Salmonella-Shigella (SS), sangre con ampicilina (C/AMPI) y CAMPY-BAP, (Bioxon). A excepción de éste último, todos los medios eran incubados a 37°C durante 24 horas, el CAMPY-BAP se incubaba a 42°C durante 48 horas y en ambiente microaerofílico.

Del agar MacConkey se seleccionaban las colonias lactosa positivas con morfología colonial compatible con *E. coli*, a partir de 3 de estas colonias se realizaba un ELISA-GM₁-LT y un ELISA-Inhibición-GM₁-ST para buscar la presencia de *E. coli* enterotoxigénica (ECET) productora de toxina termolábil y termoc estable, respectivamente, ó bien de ambas, conforme a lo descrito por Svennerholm y colaboradores (186,187). Así mismo, con el empleo de antisueros específicos (Difco) se buscaba la presencia de especies de *E. coli* enteropatógena (ECEP), todas las cepas de *E. coli* eran confirmadas bioquímicamente (188).

A partir de los medios XLD y SS se seleccionaban las colonias lactosa negativas sospechosas de *Salmonella sp* y *Shigella sp*, que se confirmaban bioquímicamente (188) y mediante aglutinación con antisueros específicos (Difco). Del medio C/AMPI se identificaban a las colonias hemolíticas, oxidasa positiva, que podían ser confirmadas mediante reacciones bioquímicas como *Aeromonas sp*.

Así mismo, en el agar CAMPY-BAP se buscaba el crecimiento de colonias típicas, pequeñas, redondeadas, de 1 mm de elevación, oxidasa positiva, que se confirmaban mediante morfología microscópica como bacilos gram negativos, curvos en forma de "S", compatibles con *Campylobacter sp*, realizándose bioquímicamente la determinación de especie (189).

6.6 Análisis de datos :

La información registrada a lo largo del estudio se capturó en microcomputadoras compatibles con IBM, empleando el programa Paradox 3 que permite crear, relacionar y analizar bases de datos.

6.6.1 Eficiencia del seguimiento de la cohorte :

El tiempo de seguimiento efectivo obtenido en cada niño se registró en días. La eficiencia del seguimiento se estimó considerando la proporción del tiempo de seguimiento obtenido, del total de tiempo de seguimiento esperado al final del estudio (tiempo obtenido/tiempo esperado), se calculó para toda la cohorte en general y en particular para los grupos de niños con y sin infección temprana por RVH, para determinar posibles diferencias entre ambos.

Las pérdidas en el tiempo de seguimiento pudieron ser parciales ó totales, entendiéndose por pérdida parcial, cuando un niño salió transitoriamente del estudio y se reintegró a su seguimiento, y pérdida total, cuando un niño salió definitivamente antes de completar su tiempo esperado de seguimiento.

De manera similar, la eficiencia de la colección de muestras fecales se determinó considerando el número de muestras colectadas, del total de muestras que se habían programado coleccionar durante cada visita domiciliaria y cada episodio diarreico.

6.6.2 Tasas de incidencia :

a) Globales ó totales :

Las tasas globales de incidencia de diarrea, infección por RVH (sintomática y asintomática) y diarrea asociada a RVH, se estimaron como el cociente del total de cada uno de estos eventos observados en todos los niños incluidos en la cohorte, entre el seguimiento total obtenido de todos ellos, expresado en términos de persona-tiempo, niño-año (No. total de eventos/niño-año). El intervalo de confianza de 95% ($IC_{95\%}$) de las tasas de incidencia, se calculó conforme al método informado por Kahn (190).

La relación Enfermedad/Infección se estimó como el cociente de la tasa de incidencia de las infecciones por RVH asociadas a diarrea, entre la incidencia total de infecciones por el virus, la cual expresa la proporción de infecciones sintomáticas por RVH.

b) Por grupos de edad y mes del año :

Las tasas de incidencia de diarrea, infección por RVH (sintomática y asintomática) y diarrea asociada a RVH por grupos de edad, estratificados por trimestres, se calcularon como el cociente del número de eventos observados en un estrato de edad, entre el seguimiento obtenido en el estrato, expresado como niño-mes y multiplicando este cociente por 100 (No. de eventos/100 niño-mes). Para cada uno de los estratos ó trimestres se obtuvo la relación enfermedad/infección.

Las tasas de incidencia de diarrea y diarrea asociada a RVH, para cada mes del año, también se estimaron como el cociente del número de eventos observados durante cada mes, entre el seguimiento obtenido durante ese mismo mes, expresado como niño-mes y multiplicando el cociente por 100 (No. eventos/100 niño-mes). Así mismo, la incidencia mensual de la infección

por RVH (sintomática y asintomática) de acuerdo serotipo, a lo largo de todo el estudio, se estimó como el cociente del número de aislamientos de un serotipo dado (1-,2-,3-,4- ó no determinado) en un mes, entre el seguimiento obtenido en el mismo mes, multiplicado por 100 (No.serotipo/100 niño-mes).

6.6.3 Gravedad de la diarrea asociada a RVH :

En este análisis, se incluyeron los episodios diarreicos identificados de octubre de 1987 a marzo de 1989 (18 meses del estudio); la relación entre la gravedad de la diarrea (episodios con calificación >6 puntos) y su asociación ó no con RVH, se estimó calculando el riesgo relativo y su IC_{95%} con el método informado por Kahn (190).

6.6.4 Serotipos de RVH en infección temprana y subsecuente :

La posible asociación entre un determinado serotipo de RVH y la presencia de diarrea durante una infección temprana ó subsecuente, se estimó mediante χ^2 y el cálculo de la razón de momios con su IC_{95%}, de acuerdo al método de Cornfield (190).

Para determinar si las infecciones subsecuentes por RVH son debidas a serotipos diferentes de los aislados en una infección temprana, se obtuvo la proporción de infecciones subsecuentes debidas a serotipos diferentes y se calculó su intervalo de confianza 95% (191).

6.6.5 Efecto protector de una infección temprana por RVH :

a) Definición de los eventos resultado ó de interés.

i) Infección subsecuente por RVH :

Se refiere a la presencia de una ó más infecciones por RVH, adquiridas de manera sintomática ó asintomática después de los primeros 180 días de edad y hasta el final del seguimiento, período denominado como subsecuente.

A cada uno de los niños pertenecientes a los grupos con ó sin infección temprana se les determinó su tasa de incidencia de infección subsecuente por RVH (No. infecciones/niño-año). Para el análisis, la tasa de incidencia se consideró como una variable dicotómica, si era cero, se tomó como 0, y si la incidencia era mayor de cero, cualquiera que fuera su valor, como 1.

ii) Diarrea subsecuente por RVH :

Así se consideró a la presencia de una ó más infecciones por RVH asociadas a diarrea durante el período subsecuente de seguimiento. De manera similar, a cada uno de los niños incluidos en los grupos con ó sin infección temprana se les determinó su tasa de incidencia de diarrea subsecuente por RVH (No.infecciones sintomáticas/niño-año).

Esta tasa de incidencia también se consideró como una variable dicotómica; si era cero,

como 0, si era mayor de cero, como 1.

- iii) **Diarrea moderada/grave subsecuente por RVH :**
Se consideraron las infecciones por RVH asociadas a diarrea, con una gravedad >6 puntos, detectadas durante el período de seguimiento subsecuente. Se determinó la tasa de incidencia, en cada uno de los niños de ambos grupos comparativos (No.infecciones sintomáticas >6 puntos/niño-año), se consideró de manera dicotómica, como 0, si era igual a cero y como 1, si era mayor de cero.
- iv) **Infección temprana por RVH :**
Para propósito de análisis, la presencia de infección temprana se consideró como 1 y su ausencia como 0.

b) Distribución de variables potencialmente confusoras.

Para determinar si las variables consideradas como potenciales confusores se distribuían de manera semejante entre el grupo de niños con y sin infección temprana, se compararon entre ambos grupos mediante pruebas estadísticas para identificar diferencias significativas. Para las variables dicotómicas, ordinales y categóricas se empleó χ^2 , con la corrección de Yates ó la prueba exacta de Fisher, según la indicación lo requiriera; para las variables continuas ó dimensionales la prueba t de Student ó U de Mann-Withney, dependiendo del cumplimiento de los supuestos de normalidad de la variable.

Las variables distribuidas de manera diferente entre ambos grupos comparativos se incluyeron en el análisis final, en un modelo de regresión logística múltiple para ajustar para el desequilibrio de las mismas.

c) Regresión logística.

Para la realización de los modelos de regresión logística empleamos un paquete estadístico, EGRET (Epidemiological GRaphics, Estimation, and Testing package; módulo de análisis PECAN, versión 0.22.10, 1987) que nos permitió estimar el nivel de significancia de la asociación de variables (valor de p) y la razón de momios (R.M.), con su intervalo de confianza de 95% (IC_{95%}).

- i) **Regresión logística univariada :**
La asociación de la infección temprana por RVH, ó la de los factores potencialmente confusores con cada uno de los eventos de interés (infección, diarrea y diarrea moderada/grave asociada a RVH, subsecuentes) se investigó inicialmente mediante un análisis univariado de regresión logística, en el cual, se identificó a las variables asociadas con un nivel de significancia de $p < 0.10$, no importando si la razón de momios era de protección ó de riesgo. Estas variables se incluyeron posteriormente en un modelo de regresión logística múltiple.

ii) Regresión logística múltiple :

Para cada uno de los eventos de interés se desarrolló un modelo de regresión logística múltiple, en el cual se incluyeron a los grupos comparativos de niños con y sin infección temprana y para ajustar el modelo, a las variables distribuidas de manera diferente entre ambos grupos y a aquellas que habían mostrado asociación en el análisis univariado; posteriormente, mediante un análisis escalonado solamente se mantenían en el modelo a las variables asociadas con una $p < 0.05$.

De esta manera, el efecto de la infección temprana por RVH se ajustó para la acción de posibles factores confusores y para el desequilibrio de variables entre ambos grupos comparativos, se determinó su nivel de asociación con cada uno de los eventos de interés y se estimó su razón de momios con su $IC_{95\%}$.

De manera semejante, se determinó el efecto de una infección temprana sintomática ó asintomática y el de una infección temprana adquirida durante el primero ó segundo trimestre de edad, sobre cada uno de los eventos de interés, con la intención de conocer si el efecto de una infección temprana se modificaba con alguna de estas condiciones.

Se desarrollaron modelos de regresión logística múltiple en los cuales, se incluyeron al grupo de niños con alguno de estos tipos particulares de infección temprana y al grupo sin infección temprana, se ajustó para el desequilibrio de variables y para los potenciales confusores que mostraron asociación en el análisis univariado; se estimó el nivel de la asociación, la razón de momios y su $IC_{95\%}$.

d) Curvas de sobrevida.

Con el empleo del paquete estadístico STATA (Statistics, Graphics, Data management, versión 2.05, 1989) se construyeron curvas de sobrevida con el método de Kaplan-Meier. La probabilidad acumulada de adquirir alguno de los eventos de interés durante el periodo de seguimiento subsiguiente se determinó en ambos grupos de estudio y la significancia de la diferencia de sus curvas de sobrevida se evaluó con la prueba de Logrank.

En caso de que alguno de los eventos de interés hubiese ocurrido en más de una ocasión durante el período subsiguiente, las curvas de sobrevida siempre se construyeron tomando en cuenta solamente el primero de estos eventos, ya que el propósito de este análisis fue el de observar si el tiempo de aparición del evento subsiguiente era diferente entre ambos grupos comparados aún cuando la incidencia pudiese ser similar.

6.6.6 Adquisición de una infección temprana por RVH :

Con la intención de determinar cuáles eran los factores que participaban en la adquisición de una infección temprana por RVH, se realizó un análisis que consideraba a la presencia de una infección temprana como el evento de interés; esta variable estaba constituida por los grupos de niños con y sin infección temprana por RVH.

De las variables medidas durante la fase basal, se detectaron mediante regresión logística univariada a aquellas asociadas con la presencia ó no de una infección temprana a un nivel de $p < 0.10$, estas variables se incluyeron en un modelo de regresión logística múltiple y después

mediante un análisis escalonado, solamente permanecieron en el modelo las variables que se asociaron con una $p < 0.05$. De esta manera, se identificaron los factores ya ajustados a posible confusión, que favorecieron ó evitaron que un niño presentara una infección temprana por RVH, determinándose el nivel de la asociación y la razón de momios con su IC_{95%}.

De manera similar, se investigó cuales eran los factores que evitaban ó favorecían que un niño adquiriera una infección temprana por RVH asintomática ó bien asociada a diarrea, para tal efecto, se realizaron modelos de regresión logística múltiple, en los cuales, cada evento de interés estuvo constituido por el grupo de niños con alguno de estos tipos particulares de infección temprana, junto con el grupo de niños sin infección temprana.

VII. RESULTADOS :

7.1 Selección y reclutamiento de la muestra estudiada :

Durante el censo de población y a lo largo de la fase de reclutamiento se detectaron 531 embarazadas, de las cuales, el 65% se consideraron como elegibles (346), a todas ellas se les invitó a participar, lográndose un 90% de aceptación. Del total de embarazadas aceptantes (312), doscientas madres y sus recién nacidos ingresaron de manera consecutiva a este estudio y el resto (112) ingresaron a otro que se realizaba de manera paralela; de tal forma se incluyeron a 38% del total de embarazadas detectadas y a 58% de las consideradas como elegibles, obteniéndose buena aceptación para la participación en el mismo (Figura 5a).

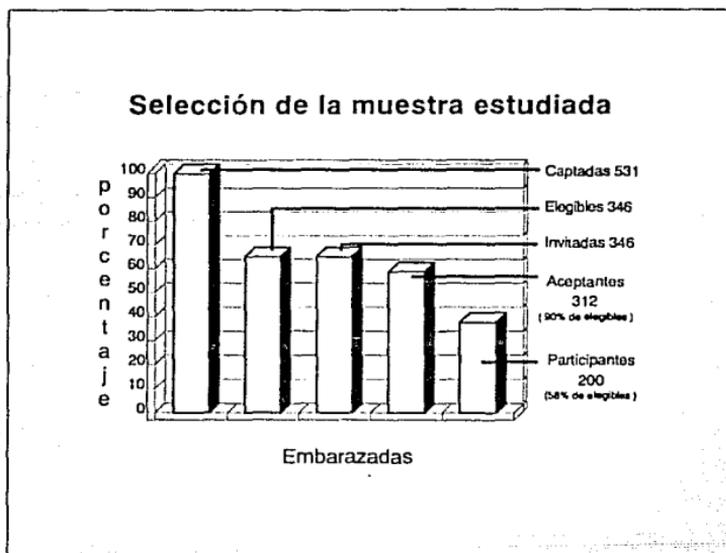


Figura 5a. Selección de la muestra estudiada.

El período de reclutamiento comprendió de octubre de 1987 a noviembre de 1988 (14 meses), se inició y terminó durante la temporada anual de mayor incidencia de diarrea asociada a RVH (octubre a diciembre) previamente detectada en estas comunidades (25); lo cual favoreció el reclutamiento de niños que nacieron ó cursaron parte de sus primeros 180 días de vida durante una temporada de alta incidencia de infección por RVH, así como el reclutamiento de niños en los cuales este mismo período de edad ocurrió fuera de dicha temporada.

En promedio se lograron incluir 14 niños por mes, dentro de sus primeros 5 días de edad, lo cual se encontraba dentro de la factibilidad de reclutamiento previamente planeado. En la Figura 5b se muestra el número de niños reclutados y perdidos cada mes, así como el número acumulado de niños incluidos al estudio durante la fase de reclutamiento.

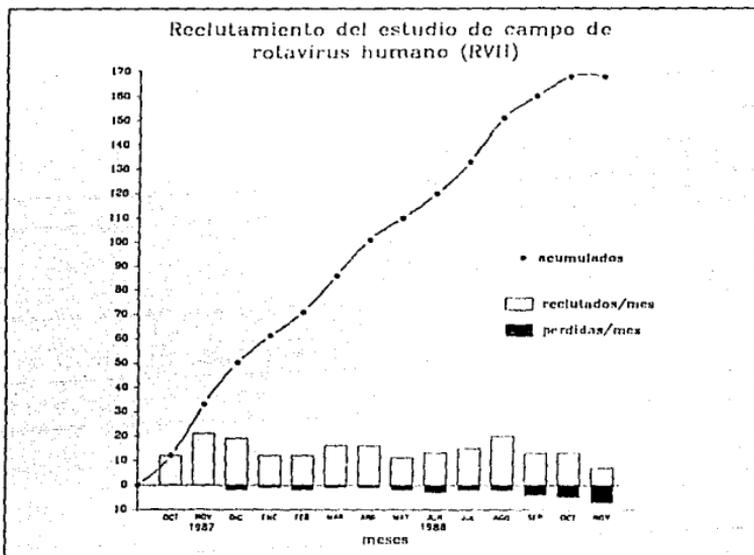


Figura 5b. Reclutamiento de la muestra estudiada

7.2 Eficiencia del seguimiento de la cohorte :

a) Tiempo de seguimiento.

i) De toda la cohorte :

El tiempo de seguimiento efectivo por niño varió de 0.6 a 24 meses, con un promedio de 18.3 meses. Setenta niños (35%) no completaron los 24 meses planeados debido a que salieron del estudio antes de terminar su seguimiento (pérdida total) y 49 niños (24.5%) tuvieron pérdidas transitorias a lo largo del mismo (pérdida parcial).

De esta manera, el seguimiento total efectivo obtenido de la cohorte (109,922 niño-día) expresado en términos de niño-mes, descontando las pérdidas totales y parciales fue de 3,664 niño-mes, si consideramos que el seguimiento esperado de los 200 niños incluidos en la cohorte era de 4,800 niño-mes, la proporción de seguimiento obtenida correspondió a 76.3% del total esperado. Las pérdidas totales sumaron 983 niño-mes (20.5%) y las parciales 153 niño-mes (3.2%).

Los motivos que ocasionaron la pérdida total de 70 niños fueron : El cambio de domicilio fuera del área de estudio en 57 niños (81.5%), la decisión de los padres de 8 niños de no continuar participando (11.4%), la imposibilidad de los padres de otros 4 de mantenerse participando (5.7%) y la defunción de un niño (1.4%) por causas diferentes de diarrea aguda. La causa principal de las pérdidas parciales de seguimiento fue la salida transitoria del niño del área de estudio.

ii) De los grupos comparativos de la cohorte :

De acuerdo a lo señalado en los criterios de eliminación, no se incluyeron en el análisis comparativo de grupos a 26 niños (13%) que tuvieron un seguimiento \leq 180 días, ni tampoco a 3 niños (1.5%) que presentaron una pérdida parcial de seguimiento \geq 20% durante la fase basal, ni a otro (0.5%) con una pérdida transitoria \geq 20% durante la fase subsecuente. Estos niños fueron excluidos, debido a que no era posible determinar en ellos su incidencia de los eventos de interés, por no contar con seguimiento subsecuente, ó bien, porque no era posible descartar que se hubiese omitido la detección de una infección por RVH, ocurrida durante su salida transitoria del estudio. De los 30 niños excluidos, 5 niños (2.5%) habían presentado una infección temprana por RVH y en los otros 25 niños (12.5%) no se había detectado.

De los 170 niños (85%) incluidos en el análisis comparativo, 62 niños correspondieron al grupo con infección temprana y 108 niños al grupo sin infección temprana. Como se observa en la Tabla 1, el seguimiento obtenido en ambos grupos fue muy semejante.

Tabla I GRUPOS COMPARATIVOS DE LA COHORTE

SEGUIMIENTO*	INFECCION TEMPRANA	
	presente (n = 62)	ausente (n = 108)
Esperado	1,488.	2,592.
Obtenido	1,283. (86.2)	2,232.5 (86.1)
Pérdida total	154.6 (10.4)	290.4 (11.2)
Pérdida parcial	50.4 (3.4)	69.1 (2.7)
Promedio	20.7	20.7

*Como niño-mes (% del seguimiento esperado)

La proporción de seguimiento obtenido del total esperado en ambos grupos comparativos es prácticamente la misma (86%), con porcentajes de pérdidas totales y parciales muy similares, e idénticos promedios de seguimiento.

b) Colección de muestras fecales.

De acuerdo al programa de colección de muestras fecales que debería realizarse durante cada visita domiciliaria a lo largo del seguimiento efectivo de la cohorte de niños, se esperaba la colección de 17,485 muestras fecales, de las cuales se colectaron 15,503 que corresponde a 88.7% del total esperado. Así mismo, de los 962 episodios diarreicos detectados durante todo el estudio, se lograron coleccionar 820 muestras diarreicas, que corresponden a 85.2% del total esperado.

Todas las muestras coleccionadas fueron probadas para la búsqueda de RVH por ELISA y en todas las muestras diarreicas se investigó además la presencia de otros enteropatógenos.

c) Evaluación de episodios diarreicos.

De los 962 episodios diarreicos inicialmente identificados por las promotoras de campo a lo largo del seguimiento efectivo de la cohorte de niños, 939 (97.6%) casos se confirmaron médicamente y pudieron ser evaluados clínicamente; el resto, se confirmaron a partir de la información contenida en el anexo 2. La primera evaluación médica se pudo realizar en promedio 4.6 días después del comienzo del episodio diarreico, variando desde 1 hasta 18 días; en el retraso de la pronta evaluación médica influyó la no detección temprana por se del episodio diarreico.

7.3 Tasas de incidencia :

a) Globales ó totales.

Se identificaron 962 episodios diarreicos, con una variación de 0 a 17 episodios por niño; considerando el seguimiento total obtenido expresado como niño-año (301.16 niño-año), la tasa de incidencia de diarrea fue de 3.2 episodios/niño-año ($IC_{95\%} = 3.05-3.35$).

En los 200 niños estudiados se detectaron 177 infecciones por RVH (síntomáticas y asintomáticas); 66 de los niños no se infectaron, 98 presentaron una infección, 29 se infectaron en 2 ocasiones y en 7 niños ocurrieron 3 infecciones. La tasa de infección por RVH (síntomática y asintomática) fue de 0.6 infecciones/niño-año ($IC_{95\%} = 0.56-0.64$).

De las 177 infecciones identificadas, 89 fueron síntomáticas, con una tasa de 0.3 diarreas asociadas a RVH/niño-año ($IC_{95\%} = 0.25-0.34$), lo cual corresponde al 9.4% del total de diarreas. La relación enfermedad/infección fue de 0.50 ($IC_{95\%} = 0.43-0.57$); de los 89 episodios diarreicos asociados a RVH, 34 se calificaron con una gravedad >6 puntos (31 episodios moderados, 3 graves) lo cual corresponde al 38% del total de diarreas asociadas a este virus ($IC_{95\%} = 28\%-48\%$).

b) Por grupo de edad.

Las tasas de incidencia de diarrea, infección por RVH y diarrea asociada a RVH por trimestres de edad, se anotan en la Tabla 2.

Tabla 2 TASAS DE INCIDENCIA POR GRUPO DE EDAD^a

<i>E D A D</i> <i>trimestre</i> <i>(días)</i>	<i>SEGUIMIENTO</i> <i>niño-mes (%)^d</i>	<i>DIARREA TOTAL</i>		<i>DARVH^b</i>		<i>INF.RVH^c</i>		<i>Relación</i> <i>Enf/Inf^e</i>
		<i>No.</i>	<i>(tasa)</i>	<i>No.</i>	<i>(tasa)</i>	<i>No.</i>	<i>(tasa)</i>	
1° (0-90)	571.9 (95.3)	151	(26.4)	12	(2.1)	31	(5.4)	0.39
2° (91-180)	537.6 (89.6)	141	(26.2)	28	(5.2)	40	(7.4)	0.70
3° (181-270)	493.9 (82.3)	161	(32.6)	20	(4.0)	33	(6.7)	0.60
4° (271-360)	468.4 (78.1)	143	(30.5)	10	(2.1)	24	(5.1)	0.41
5° (361-450)	437.6 (72.9)	107	(24.4)	4	(0.9)	13	(3.0)	0.43
6° (451-540)	410.8 (68.5)	102	(24.8)	7	(1.7)	19	(4.6)	0.37
7° (541-630)	392.5 (65.4)	85	(21.7)	6	(1.5)	11	(2.8)	0.54
8° (631-720)	351.3 (58.6)	72	(20.5)	2	(0.6)	6	(1.7)	0.35
T O T A L	3664 (76.3)	962	(26.2)	89	(2.4)	177	(4.8)	0.50

^aTasas expresadas como No. episodios/100 niño-mes

^bDiarrea asociada a RVH

^cInfección por RVH (sintomática y asintomática)

^dPorcentaje de seguimiento obtenido/total esperado para el período

^eRelación enfermedad/infección

Como se puede apreciar, la incidencia de diarrea total independientemente de su etiología, alcanzó su máximo nivel durante el 3^{er} trimestre de vida, 32.6 episodios/100 niño-mes, después de lo cual mostró un descenso paulatino hasta 20.5 episodios/100 niño-mes. En cambio, la diarrea asociada a RVH alcanzó su mayor incidencia de manera más temprana, 5.2 episodios/100 niño-mes, durante el segundo trimestre de edad y posteriormente disminuyó más rápidamente hasta 0.6 episodios/100 niño-mes, al final del 8^o trimestre.

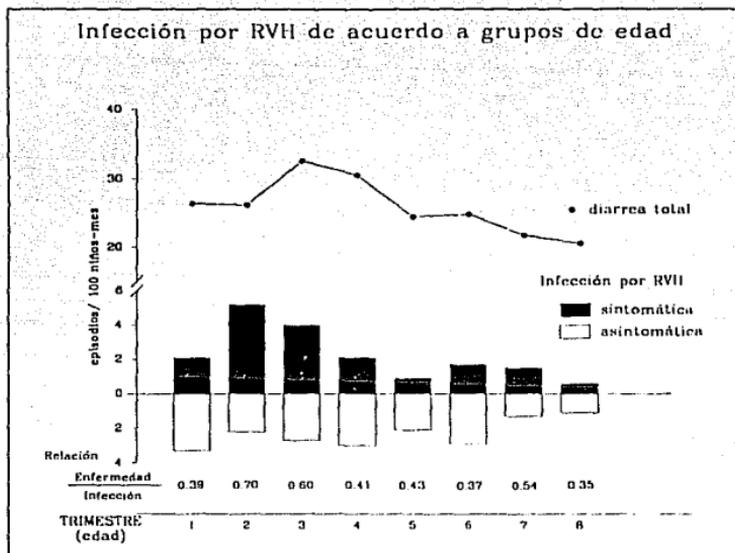


Figura 6. Infección por RVH de acuerdo a grupos de edad

Lo anterior se puede apreciar de manera más evidente en la Figura 6, la cual además, muestra la relación enfermedad/infección de acuerdo a la edad expresada como un patrón de "icebergs" en donde las infecciones sintomáticas se grafican arriba del eje X y las asintomáticas en su parte inferior. Como se puede observar, en el 1° trimestre la infección por RVH ocurrió preferentemente de manera asintomática, relación enfermedad/infección 0.39, lo cual se invirtió drásticamente en el 2° trimestre a un predominio evidente de infecciones sintomáticas, relación enfermedad/infección 0.70; posteriormente, conforme aumenta la edad, la incidencia de infección por RVH disminuye y se observa una nueva inversión en la relación enfermedad/infección (0.35), con un predominio de infecciones asintomáticas al final del 8° trimestre de edad.

La tasa de incidencia de infección neonatal fue de 4.5 infecciones/100 niño-mes, correspondiendo a diarrea neonatal una tasa de 1.5 episodios/100 niño-mes, con una relación enfermedad/infección de 0.33.

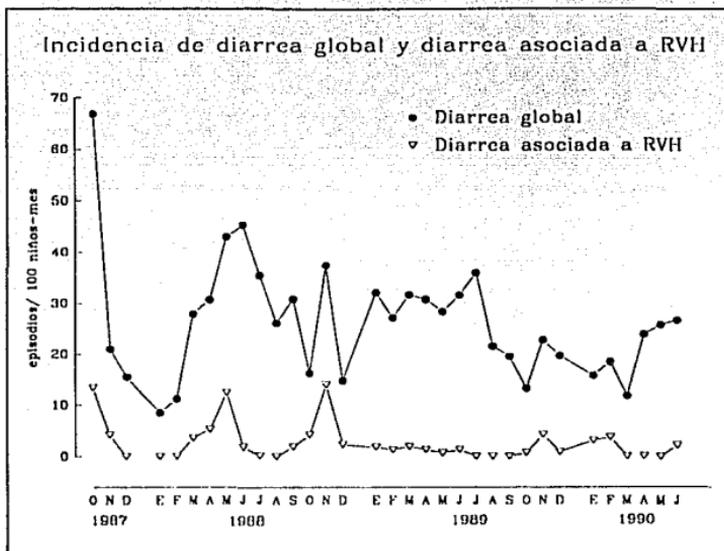


Figura 7. Incidencia de diarrea global y diarrea asociada a RVH

c) Por mes del año.

La incidencia de diarrea total y de diarrea asociada a RVH a lo largo de todo el estudio (octubre de 1987 a junio de 1990), se muestra en la Figura 7; como se puede apreciar, la mayor incidencia de diarrea ocurrió durante los meses de primavera-verano (marzo-agosto) con una variación de 23.8 a 45.3 episodios/100 niño-mes y con un incremento menos evidente durante los meses de otoño (octubre-diciembre) de cada año, 22.7 a 37.4 episodios/100 niño-mes.

La diarrea asociada a RVH mostró un patrón estacional, observándose su mayor incidencia durante los meses de otoño (octubre-diciembre) siendo más evidente en el mes de noviembre de cada año, 4.2 a 13.9 episodios/100 niño-mes; durante la primavera de 1988 (marzo a junio) ocurrió un brote adicional que alcanzó su mayor incidencia durante el mes de mayo, 12.4 episodios/100 niño-mes. Así mismo, se debe señalar que existieron meses (julio y agosto de cada año) durante los cuales la diarrea asociada a este virus no se detectó.

7.4 Gravedad de la diarrea asociada a RVH :

La diarrea asociada a RVH tuvo una mayor relación con la presencia de episodios graves, que la diarrea no asociada a este virus; el riesgo de presentar un episodio diarreico con una calificación >6 puntos (moderada/grave) fue mayor cuando se asoció a RVH, que cuando no se asoció a este virus (RR = 2.33; IC_{95%} = 1.65-3.30), Tabla 3.

Tabla 3 GRAVEDAD DE LOS EPISODIOS DIARREICOS

DIARREA	CALIFICACION				
	Moderada/Grave (>6 puntos)		Leve (≤6 puntos)		TOTAL
	No.	(%)	No.	(%)	
ASOCIADA A RVH	31	(44)	39	(56)	70
NO ASOCIADA A RVH	93	(19)	397	(81)	490
T O T A L	124	(22)	436	(78)	560

Riesgo Relativo (RR) = 2.33 IC_{95%} = 1.65 a 3.30

$\chi^2 = 21.31$

p = <0.00001

Como se puede observar, a pesar de que la mayoría de los episodios diarreicos se evaluaron con una calificación ≤6 puntos (78%), la diarrea asociada a RVH presentó una mayor proporción de episodios moderados/graves (44%), comparada con la diarrea no asociadas a este virus (19%) ($\chi^2 = 21.3$, p <0.00001).

7.5 Serotipos de RVH identificados :

a) Frecuencia de serotipos de RVH.

En 62.7% de las 177 infecciones detectadas se pudo determinar el serotipo de RVH involucrado, en 13% de los casos las muestras de heces positivas para RVH no fueron serotipificables y en el 19.2% no pudieron ser serotipificadas de acuerdo a los criterios de la prueba de ELISA empleada. En 9 de las infecciones (5.1%) no se investigó el serotipo involucrado.

De esta manera, el serotipo identificado con mayor frecuencia fue el 3 (28.8%), seguido por los serotipos 1 (14.7%) y 2 (14.1) que se aislaron en proporciones similares y con una baja participación del serotipo 4 (5.1%), Tabla 4.

Tabla 4 SEROTIPOS IDENTIFICADOS EN LAS INFECCIONES POR RVH

SEROTIPO	INFECCION		TOTAL	
	Sintomática	Asintomática	No.	(%)
1	15	11	26	(14.7)
2	14	11	25	(14.1)
3	29	22	51	(28.8)
4	5	4	9	(5.1)
NT ^a	11	12	23	(13.0)
NV ^b	12	22	34	(19.2)
NP ^c	3	6	9	(5.1)
TOTAL	89	88	177	(100.0)

^aNT No serotificable

^bNV No serotificada

^cNP No probada

Ninguno de los 4 serotipos mostró asociación significativa con la presencia de infección sintomática por RVH ($\chi^2 = 0.021$; $p > 0.5$).

b) Predominio secuencial de los serotipos de RVH.

La incidencia mensual de la infección por RVH (sintomática y asintomática) de acuerdo a los serotipos identificados a lo largo de los 33 meses de estudio, mostró cambios secuenciales en su predominio.

Durante el primer brote de infección por RVH observado en octubre de 1987, únicamente se detectó serotipo 1; en el siguiente, ocurrido en mayo de 1988 participaron los serotipos 1 y 3. En el pico observado en noviembre de 1988 el predominio se invirtió a serotipos 3 y 1 y finalmente durante el brote de noviembre de 1989 el serotipo 2 fue el único detectado, Figura 8.

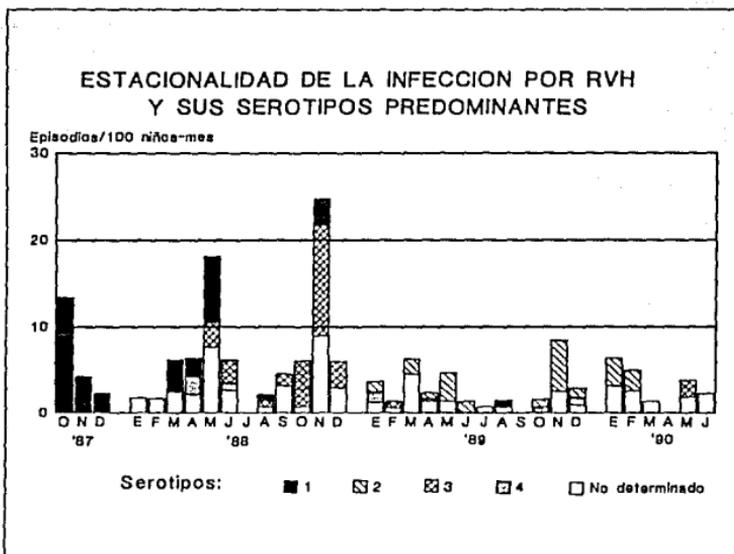


Figura 8. estacionalidad de la infección por RVH y sus serotipos predominantes

7.6 Infecciones mixtas con RVH :

En 23 (25.8%) de los 89 episodios diarreicos asociados a RVH se detectó otro enteropatógeno de manera simultánea, en 20 de estas infecciones mixtas o polimicrobianas se encontró uno y en 3, dos microorganismos agregados. En 7 ocasiones *Campylobacter* sp se aisló junto con RVH, seguido por ECEP en 6 episodios diarreicos. *Entamoeba histolytica* en 4 y en una sola ocasión: ECET productora de toxina termolábil. ECET toxina termoestable positiva y *Aeromonas* sp, en las 3 combinaciones con 2 microorganismos agregados a RVH siempre estuvo presente *E. histolytica* que se acompañó de *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis* ó ECEP serotipo O111;K58.

Las infecciones mixtas con RVH no favorecieron una mayor gravedad de los episodios diarreicos; 35% de las diarreas asociadas a RVH y otro enteropatógeno tuvieron una calificación >6 puntos, mientras que 39% de las diarreas asociadas únicamente a RVH se calificaron con una gravedad similar, ($\chi^2 = 0.02$; $p = 0.89$).

Las infecciones mixtas ó polimicrobianas asociadas a este virus mostraron una tendencia a ser más frecuentes conforme se incrementaba la edad, 18%, 27%, 36% y 50%, durante el 1° al 4° semestre, respectivamente ($\chi^2 = 4.45$; $p = 0.03$). Sin embargo, las infecciones mixtas no fueron más frecuentes durante una primera infección (27%) ó una reinfección (21%) por RVH (Fisher; $p = 0.77$) ni tampoco se asociaron a algún serotipo de RVH en particular; 13%, 33%, 28% y 40%, para los serotipos 1 a 4, respectivamente ($\chi^2 = 2.48$; $p = 0.48$).

7.7 Infección temprana por RVH :

7.7.1 Características de la infección temprana :

De los 170 niños incluidos en la cohorte comparativa, 62 (36.5%) presentaron una infección por RVH en la fase temprana y 108 (63.5%) no se infectaron durante este período.

De los 62 niños con infección temprana, en 28 ocurrió de manera asintomática (45.2%) y en 34 se asoció a diarrea (54.8%); de estos niños, 20 tuvieron diarrea leve (58.8%), 13 diarrea moderada (38.3%) y uno presentó un episodio grave (2.9%). En este período, 2 niños con gravedad >6 puntos requirieron hospitalización.

La infección temprana ocurrió en 28 niños (45.2%) durante el primer trimestre y en 34 (54.8%) durante el segundo trimestre; las infecciones adquiridas en éste último trimestre se asociaron a diarrea (70.6%) con mayor frecuencia que cuando ocurrieron durante el primer trimestre (35.7%), ($\chi^2 = 6.2$; $p = 0.01$).

Cuatro de los 62 niños tuvieron 2 infecciones por RVH durante los primeros 180 días de edad; para propósitos de análisis, la primera se consideró como la infección temprana, la secuencia clínica y edad de presentación (en días) de estas infecciones fue: Diarrea leve (43)-asintomática (162), diarrea leve (55)-diarrea moderada (109), diarrea moderada (72)-diarrea moderada (157) y asintomática (9)-diarrea leve (109). Los dos primeros niños ya no se reinfectaron con RVH, el tercero presentó otra infección asintomática (327) y el último tuvo un episodio diarreico leve (521).

7.7.2 Adquisición de una infección temprana :

De las variables medidas durante la fase basal, las que se asociaron univariadamente ($p < .10$) con la presencia de una infección temprana por RVH (sintomática ó asintomática) se anotan en la Tabla 5.

Tabla 5 FACTORES ASOCIADOS CON INFECCION TEMPRANA POR RVH*

VARIABLE	<i>p</i>	<i>R.M.</i>	<i>IC</i> _{95%}
Sexo (femenino)	0.05	0.536	0.285 - 1.039
Número de hijo	0.03	0.751	0.578 - 0.977
Duración lactancia (continua)	<.001	0.992	0.988 - 0.997
Lactancia de corta duración (ordinal)	0.007	2.096	1.219 - 3.668
Bajo peso al nacer (ordinal)	0.02	1.946	1.123 - 3.369

*Por regresión logística univariada

Algunas de estas variables se asociaron como posibles factores de protección ó de riesgo para la adquisición de una infección temprana; como variables protectoras se detectaron, el pertenecer al sexo femenino, el ocupar un lugar progresivo mayor en la lista de nacimientos de la madre y la mayor duración de la lactancia. Esta última variable, analizada en su carácter ordinal, mostró que la nula ó corta duración de la lactancia con leche materna es un factor de riesgo, así como también lo es la tendencia a presentar un bajo peso al nacer.

Una vez que estas variables se incluyeron en un modelo de regresión logística múltiple, se identificaron los factores que participan en la adquisición de una infección temprana por RVH que son: La duración de la alimentación con leche materna y el bajo peso al nacer, Tabla 6.

Tabla 6 FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA ADQUISICION DE UNA INFECCION TEMPRANA POR RVH*

VARIABLE	p	R.M.	IC _{95%}
Duración lactancia (continua)	0.001	0.992	0.987 - 0.997
Bajo peso al nacer	0.02	2.022	1.143 - 3.576
Significancia del modelo : p <0.001			
Lactancia de corta duración (ordinal)	0.006	2.214	1.249 - 3.924
Bajo peso al nacer	0.011	2.079	1.182 - 3.688
Significancia del modelo : p <0.001			

*Modelos de regresión logística múltiple

Como se puede apreciar en la Tabla anterior, se desarrollaron dos modelos de regresión logística múltiple, en el primero se incluyó a la alimentación con leche materna como una variable continua (duración de la lactancia) y en el segundo como una variable ordinal (lactancia de corta duración).

En el primer modelo se anota el efecto protector que tiene la leche materna por cada día que el niño es alimentado al pecho (RM= 0.992; IC_{95%} = 0.987-997) y en el segundo modelo se anota el riesgo que tiene un niño de adquirir una infección temprana cuando recibe leche materna durante un tiempo menor de 91-180 días (RM = 2.21; IC_{95%} = 1.25-3.92); en ambos modelos, los niños con peso al nacer menor de 3.0 kg mostraron un mayor riesgo de adquirir una infección temprana por RVH (RM = 2.08; IC_{95%} = 1.18-3.66).

De manera similar, se detectaron los factores que participan en la adquisición de una infección temprana sintomática ó asintomática, Tablas 7 y 8.

Tabla 7 FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA ADQUISICION DE UNA INFECCION TEMPRANA SINTOMATICA POR RVH*

VARIABLE	p	R.M.	IC _{95%}
Lactancia de corta duración (ordinal)	0.04	2.048	1.016 - 4.127
Bajo peso al nacer	0.003	2.716	1.401 - 5.263
Significancia del modelo : p <0.001			

*Por regresión logística múltiple

Tabla 8 FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA ADQUISICION DE UNA INFECCION TEMPRANA ASINTOMATICA POR RVH*

VARIABLE	p	R.M.	IC _{95%}
Lactancia de corta duración (ordinal)	0.02	2.226	1.108 - 4.472
Sexo (femenino)	0.03	0.364	0.148 - 0.892
Significancia del modelo : p <0.001			

*Por regresión logística múltiple

Como se puede observar, la corta duración (<91-180 días) de la alimentación al pecho materno es un factor de riesgo que participa de manera semejante, tanto para la adquisición de una infección temprana asociada a diarrea (RM = 2.05; IC_{95%} = 1.02-4.13), como para una infección asintomática (RM = 2.23; IC_{95%} = 1.11-4.47).

Se pudo determinar que el bajo peso al nacer es un factor de riesgo que participa fundamentalmente en la adquisición de una infección temprana asociada a diarrea (RM = 2.72; IC_{95%} = 1.40-5.26) y que no influye en la presentación de una infección asintomática; así mismo, se hizo evidente que el pertenecer al sexo femenino es un factor protector en contra de la adquisición de una infección temprana asintomática (RM = 0.36; IC_{95%} = 0.15-0.89).

7.8 Efecto protector de la infección temprana por RVH :

7.8.1 Distribución de variables potencialmente confusoras :

La distribución de las variables consideradas como factores potenciales de confusión entre los niños con y sin infección temprana por RVH se resume en las Tablas 9 y 10; algunas de estas variables no pudieron ser evaluadas en todos los niños, sin embargo, las diferencias de evaluación entre los grupos comparados no fueron significativas para ninguna variable. En general, ambos grupos de niños mostraron características muy semejantes.

La proporción de niños de sexo masculino fue un poco mayor en el grupo con infección temprana (58%) que en el grupo que no la presentó (43%), sin embargo esta diferencia no fue significativa. En ambos grupos, la mayoría de los niños nacieron en un hospital (94%) y permanecieron en un cuero (81%) durante poco tiempo (promedio 1.2, 1.4 días).

Durante la fase basal, la mayor parte de los niños de la cohorte comparativa eran eutróficos (74%, 79%) siendo pocos los que presentaron desnutrición de II a III grado (6%, 3%); en este mismo período, ambos grupos de niños se expusieron en promedio durante casi un mes (28.2, 26.8 días) a una temporada de mayor incidencia de infección por RVH.

En los niños con ó sin infección temprana, el biberón se inició en promedio durante la primer semana de edad (6.3, 6.8 días) y la ablactación durante el primer trimestre (81.6, 84.3 días). Así mismo, el tiempo de seguimiento efectivo después de los 180 días de edad para ambos grupos fue prácticamente el mismo y equivalente a 80.3% del seguimiento total esperado para el período subsecuente.

A pesar de que en ambos grupos casi la tercera parte de las madres (31%, 33%) tuvieron alguna actividad laboral fuera de casa, fueron muy pocos los niños que asistieron a una guardería (10%, 2%) no siendo significativa la diferencia. Así mismo, el contacto con niños <5 años de edad fue similar en ambos grupos (<1 niño), y a su vez, la proporción de hermanos de esta edad que estuvieron expuestos a posibles fuentes de infección no fue diferente (31%).

El nivel socio-económico de las familias comparadas fue calificado entre bueno (47%) y regular (48%, 41%) con una pequeña proporción considerada como malo (5%, 12%), sin diferencias importantes entre los 2 grupos. El promedio de personas por cuarto (3.9, 4.1), el de personas en el cuarto del bebé (3.1, 3.3) y el de personas en la cama del bebé (1.6, 1.7) fue muy semejante.

El promedio del "Índice de higiene" en las familias de ambos grupos (9.3, 9.6) fue similar. Aún más, la distribución tanto de las variables ordinales: tipo de eliminación de excretas, refrigeración de alimentos, limpieza de las ropas de la madre, como de la variable dicotómica: vivienda tipo "cuarto redondo", que constituyen este índice, tampoco fue diferente entre los grupos comparados (información no mostrada).

La educación ó escolaridad promedio, tanto del jefe de familia (7.8, 7.3 años) como de la madre (6.9, 6.3 años) fue superior al nivel de primaria completa, y no mostró diferencias significativas entre los grupos de niños con ó sin infección temprana por RVH, respectivamente.

Tabla 9 DISTRIBUCION DE LOS FACTORES POTENCIALMENTE CONFUSORES*
ENTRE GRUPOS COMPARATIVOS DE NIÑOS

VARIABLE	Con infección temprana n = 62 (%)	Sin infección temprana n = 108 (%)	Prueba estadística	p
Sexo:				
masculino	36 (58)	46 (43)	$\chi^2=3.18$	0.07
femenino	26 (42) n = 62	62 (57) n = 108		
Nacimiento en:				
domicilio	4 (6)	6 (6)	Fisher	1.00
hospital	58 (94) n = 62	102 (94) n = 108		
Estancia en:				
cunero	47 (81)	83 (81)	$\chi^2=0.25$	0.87
madre	11 (19) n = 58	19 (19) n = 102		
Peso al nacer:				
≥ 3 kg	29 (53)	72 (72)	$\chi^2=6.06$	0.04*
≥ 2.5 -<3kg	21 (38)	24 (24)		
<2.5kg	5 (9) n = 55	4 (4) n = 100		
Desnutrición basal:				
eutrófico	38 (74)	78 (79)	$\chi^2=0.80$	0.67
grado I	10 (20)	18 (18)		
grado II-III	3 (6) n = 51	3 (3) n = 99		
Asistencia a guardería:				
sí	5 (10)	2 (2)	Fisher	0.10
no	47 (90) n = 52	88 (98) n = 90		
Nivel socio-económico:				
bueno	29 (47)	51 (47)	$\chi^2=2.70$	0.26
regular	30 (48)	44 (41)		
malo	3 (5) n = 62	13 (12) n = 108		
Hermanos expuestos:				
sí	16 (31)	28 (31)	$\chi^2=0.02$	0.88
no	36 (69) n = 52	62 (69) n = 90		
Madre trabaja:				
sí	16 (31)	30 (33)	$\chi^2=0.02$	0.90
no	36 (69) n = 52	60 (67) n = 90		

*Variables dicotómicas, categóricas y ordinales

*Diferencia significativa ($p < 0.05$)

Tabla 10 DISTRIBUCION DE LOS FACTORES POTENCIALMENTE CONFUSORES*
ENTRE GRUPOS COMPARATIVOS DE NIÑOS

VARIABLE	Con infección temprana n = 62 ($\bar{X} \pm de$)		Sin infección temprana n = 108 ($\bar{X} \pm de$)		Prueba estadística	p
Número de hijo:	62	(2.0 ± 1.2)	108	(2.5 ± 1.4)	Z=2.23	0.03*
Estancia ^b hospital:	58	(1.2 ± 0.5)	102	(1.4 ± 1.6)	Z=0.17	0.86
Duración ^b lactancia:	62	(89.3 ± 68.9)	108	(128.4 ± 68.5)	t=3.57	0.00*
Inicio ^b biberón:	61	(6.3 ± 4.5)	107	(6.8 ± 6.1)	Z=0.06	0.95
Inicio ^b sólidos:	62	(81.6 ± 33.7)	108	(84.3 ± 35.6)	t=0.49	0.62
Temporada de RVH ^b :	62	(28.2 ± 5.7)	108	(26.8 ± 7.7)	Z=0.32	0.75
Seguidos ^b >180 días:	62	(442.1 ± 153)	108	(441.4 ± 158)	t=-0.03	0.98
Familia: tamaño	62	(5.1 ± 2.4)	108	(5.4 ± 1.7)	Z=2.21	0.03*
personas p/cuarto	62	(3.9 ± 1.2)	108	(4.1 ± 1.4)	t=0.76	0.45
p/cuarto bebé	62	(3.1 ± 1.2)	108	(3.3 ± 1.3)	t=0.78	0.43
Niños <5 años:	62	(0.7 ± 0.7)	108	(0.8 ± 0.7)	Z=0.66	0.51
Educación jefe ^c :	62	(7.8 ± 3.1)	108	(7.3 ± 3.0)	t=-1.06	0.29
Educación madre ^c :	62	(6.9 ± 3.5)	108	(6.3 ± 3.6)	t=-1.01	0.31
Índice de higiene:	54	(9.3 ± 2.2)	94	(9.6 ± 2.1)	t=0.85	0.40

*Variables continuas

^bExpresado en días

^cAños escolaridad

*Diferencia significativa (p<0.05)

Fueron 4 las diferencias identificadas entre ambos grupos comparativos. Los niños que adquirieron una infección temprana, tuvieron un menor peso al nacer comparados con los niños que no la presentaron: la proporción de niños con peso ≥ 3 kg fue menor en el grupo con infección temprana (53%) que en aquel que no la presentó (72%) y en contraste, la proporción de niños con peso al nacimiento ≥ 2.5 <3 kg (38%) y <2.5 kg (9%) fue mayor en los niños con infección temprana, que sin ella (24% y 4% respectivamente).

Los niños sin infección temprana ocuparon en promedio una posición más tardía en la lista de nacimientos consecutivos de sus madres (2.5) que aquellos niños infectados tempranamente (2.0), lo cual fue significativamente diferente. Así mismo, los niños infectados en forma temprana se alimentaron con leche materna, en promedio, durante un menor periodo de tiempo (89.3 días) que aquellos niños no infectados en el período basal (128.4 días).

Por último, el tamaño de las familias de niños con (5.1 ± 2.4 personas) ó sin infección temprana (5.4 ± 1.7) fue diferente. Estas variables distribuidas de manera estadísticamente diferente entre ambos grupos comparativos de niños se incluyeron en los modelos de regresión logística múltiple desarrollados para cada uno de los eventos de interés.

7.8.2 Características de la infección subsecuente por RVH :

De los 62 niños incluidos en el grupo con infección temprana se identificaron 28 infecciones subsecuentes por RVH (síntomáticas y asintomáticas); 38 de los niños (61.3%) ya no se infectaron, 20 (32.3%) presentaron una infección y 4 (6.4%) se infectaron en otras 2 ocasiones. De las 28 infecciones subsecuentes, 16 (57.1%) fueron asintomáticas y 12 (42.9%) asociadas a diarrea, 2 de ellas (16.7%) tuvieron una calificación >6 puntos (moderada-grave); durante este período, ninguno de estos niños ameritó hospitalización.

A su vez, de los 108 niños pertenecientes al grupo sin infección temprana se identificaron 77 infecciones en el período subsecuente (síntomáticas y asintomáticas); 42 de los niños (38.9%) no se infectaron, 56 (51.9%) presentaron una infección, en 9 (8.3%) ocurrieron 2 y un niño (0.9%) se infectó en 3 ocasiones. De estas 77 infecciones por RVH, 40 (51.9%) fueron asintomáticas y 37 (48.1%) se asociaron a diarrea, 15 de las cuales (40.5%) tuvieron una calificación >6 puntos; uno de estos niños fue hospitalizado.

7.8.3 Modelos de regresión logística para los eventos de interés :

a) Infección subsecuente por RVH.

Los factores potenciales de confusión que se asociaron de manera univariada ($p < 0.10$) con la presencia de una infección por RVH (síntomática ó asintomática) en la fase subsecuente, fueron la existencia de desnutrición durante la fase basal y un mayor tiempo de seguimiento, expresado en días, durante el período subsecuente; ambas variables se identificaron como posibles factores de riesgo. La adquisición de una infección temprana por RVH (ya sea en forma asintomática ó asociada a diarrea) se mostró como un posible factor de protección, Tabla 11.

Tabla 11 FACTORES ASOCIADOS CON INFECCION SUBSECUENTE POR RVH^a

VARIABLE	p	R.M.	IC _{95%}
Desnutrición basal	0.07	1.852	0.955 - 3.592
Seguimiento subsecuente	<.001	1.005	1.002 - 1.007
INFECCION TEMPRANA	0.005	0.402	0.212 - 0.763

^aPor regresión logística univariada

Estas variables se incluyeron en un modelo de regresión logística múltiple, junto con las variables desbalanceadas entre ambos grupos comparativos de niños, para ajustarlo. De tal forma, el modelo multivariado que explica la adquisición de una infección por RVH durante el período subsecuente se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12 FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA ADQUISICION DE UNA INFECCION SUBSECUENTE POR RVH^a

VARIABLE	p	R.M.	IC _{95%}
Número de hijo	0.99	0.999	0.745 - 1.339
Duración lactancia	0.49	0.998	0.993 - 1.003
Peso al nacer	0.23	1.459	0.782 - 2.733
Familia (tamaño)	0.30	0.908	0.757 - 1.090
Seguimiento subsecuente	<.001	1.005	1.003 - 1.007
INFECCION TEMPRANA	0.002	0.296	0.134 - 0.667

Significancia del modelo : p <0.001

^aPor regresión logística múltiple

*Variables con p<0.05

Se hace evidente que el presentar una infección por RVH durante la fase temprana protege en contra de la adquisición de infecciones subsecuentes por este virus, ya sean asintomáticas ó asociadas a diarrea, al menos durante los 2 primeros años de edad.

Como se puede apreciar, el efecto de la infección temprana por RVH identificado en el análisis univariado (RM = 0.40; IC_{95%} = 0.21-0.76) estaba confundido, ya que al ajustar para otros factores asociados y para el desequilibrio de variables entre grupos, el efecto protector se hizo más evidente (RM = 0.30 IC_{95%} = 0.13-0.65). Este mismo ajuste confirmó que conforme se incrementan los días de seguimiento en el periodo subsecuente existe un mayor riesgo o posibilidad de detectar una infección por RVH (RM = 1.005; IC_{95%} = 1.003-1.008 por día), así mismo, no se pudo confirmar que el bajo peso para la edad detectado durante la fase basal fuese un factor de riesgo para la adquisición de una infección por RVH a edad subsecuente.

b) Diarrea subsecuente por RVH.

Las variables potencialmente confusoras que en el análisis univariado se asociaron ($p < 0.10$) como posibles factores de riesgo para la adquisición de una infección sintomática por RVH en el período subsecuente, fueron el bajo peso al nacer y un mayor número de días de seguimiento durante la fase subsecuente, y como posibles variables protectoras, el ocupar un lugar progresivo mayor en la lista de hijos nacidos vivos de la madre y el introducir el uso de biberón a edad tardía (expresada en días); nuevamente, la adquisición de una infección por RVH a edad temprana se mostró como un posible factor de protección, Tabla 13.

Tabla 13 FACTORES ASOCIADOS CON DIARREA SUBSECUENTE POR RVH*

VARIABLE	p	R.M.	IC _{95%}
Peso al nacer	0.07	1.674	0.954 - 2.936
Seguimiento subsecuente	0.03	1.003	1.000 - 1.006
Número de hijo	0.08	0.775	0.581 - 1.036
Edad inicio biberón	0.04	0.909	0.831 - 0.994
INFECCION TEMPRANA	0.05	0.469	0.218 - 1.012

*Por regresión logística univariada

Al incluir estos posibles factores de confusión en un modelo de regresión logística múltiple, junto con las variables distribuidas de manera diferente entre los grupos de niños comparados, con y sin infección temprana, se obtuvieron las variables que pueden explicar la presencia de un episodio diarreico asociado a RVH en el período subsecuente, Tabla 14.

Tabla 14 FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA ADQUISICION DE UNA DIARREA SUBSECUENTE POR RVH*

VARIABLE	p	R.M.	IC _{95%}
Número de hijo	0.05	0.699	0.487 - 1.006
Duración lactancia	0.59	0.998	0.993 - 1.004
Peso al nacer	0.11	1.679	0.889 - 3.173
Familia (tamaño)	0.91	1.012	0.829 - 1.234
Seguimiento subsecuente	0.03	1.003	1.001 - 1.007
Edad inicio biberón	0.04	0.907	0.826 - 0.987
INFECCION TEMPRANA	0.01	0.325	0.132 - 0.797

Significancia del modelo : p < 0.001

*Por regresión logística múltiple

*Variables con p < 0.05

Se confirma, que la adquisición temprana de una infección por RVH es un factor de protección en contra de la ocurrencia de diarrea asociada a este virus a edades posteriores, al menos durante los 2 primeros años de edad. Su efecto protector estaba confundido, ya que el análisis univariado mostró una significancia límite (RM = 0.47; IC_{95%} = 0.22-1.01) y una vez que se ajustó en el modelo de regresión logística múltiple se pudo establecer su asociación significativa (RM = 0.32; IC_{95%} = 0.13-0.80).

Del mismo modo, otra vez se hizo evidente que la mayor duración del seguimiento durante la fase subsecuente es un factor que favorece la identificación de los episodios diarreicos asociados a RVH en este período (RM = 1.003; IC_{95%} = 1.001-1.007 por día de seguimiento). Así mismo, se pudo determinar que conforme se introduce el biberón a una mayor edad, existe un menor riesgo de que un niño adquiera una infección sintomática por RVH en la fase subsecuente (RM = 0.91; IC_{95%} = 0.83-0.99 por día de edad).

El efecto de estas 2 variables no estaba confundido ya que su asociación fue muy semejante tanto en el análisis de regresión logística univariado, como en el múltiple; por el contrario, el bajo peso al nacer y el ocupar un lugar progresivo mayor en la lista de nacimientos de la madre fueron factores de confusión para los cuales se ajustó en el modelo de regresión múltiple.

c) Diarrea moderada/grave subsecuente por RVH.

En el análisis de regresión logística univariada, el que la madre tuviese alguna actividad laboral fuera de su domicilio, se identificó como un posible factor de riesgo para la adquisición de un episodio diarreico asociado a RVH con gravedad >6 puntos (moderado-grave) en la fase subsecuente y como posibles variables protectoras el tener un lugar progresivo mayor en los nacimientos de la madre y el estar expuesto durante mayor tiempo (expresado en días) a una temporada de alta incidencia de infección por RVH en la fase basal. La presencia de una infección por RVH a edad temprana también se mostró en esta condición, con un posible efecto protector, Tabla 15.

Tabla 15 FACTORES ASOCIADOS CON DIARREA MODERADA/GRAVE SUBSECUENTE POR RVH^a

VARIABLE	<i>p</i>	R.M.	IC _{95%}
Madre que trabaja	0.07	2.677	0.906 - 7.907
Número de hijo	0.07	0.608	0.357 - 1.085
Temporalidad de RVH	0.01	0.935	0.886 - 0.987
INFECCION TEMPRANA	0.05	0.224	0.049 - 1.000

^aPor regresión logística univariada

El modelo de regresión logística múltiple que muestra a los factores, ya ajustados, que intervienen en la adquisición de un episodio diarreico asociado a RVH con gravedad >6 puntos durante el período subsecuente se anota en la Tabla 16.

Se puede apreciar, que el presentar una infección por RVH a edad temprana no solamente protege en contra de infecciones posteriores por RVH ó de su diarrea asociada, si no que también tiene un efecto protector en contra de la gravedad de los episodios diarreicos en niños menores de 2 años de edad.

Nuevamente se hace evidente que el efecto de la infección temprana por RVH estaba confundido, ya que el análisis univariado mostró una protección limitrofe (RM = 0.22; IC_{95%} = 0.05-1.02) que se hizo significativa en el modelo de regresión logística múltiple (RM = 0.16; IC_{95%} = 0.03-0.89). Del mismo modo, se pudo determinar que el estar expuesto durante mayor tiempo en la fase temprana a una temporada de alta incidencia de infección por RVH es un factor que disminuye el riesgo de adquirir episodios diarreicos graves (>6 puntos) a edad posterior (RM = 0.92; IC_{95%} = 0.86-0.98 por día de exposición), el efecto de esta variable no se encontraba confundido.

Tabla 16 FACTORES QUE PARTICIPAN EN LA ADQUISICION DE UNA DIARREA MODERADA/GRAVE SUBSECUENTE POR RVH*

VARIABLE	p	R.M.	IC _{95%}
Número de hijo	0.05	0.497	0.244 - 1.011
Duración lactancia	0.98	1.000	0.992 - 1.009
Peso al nacer	0.64	1.262	0.480 - 3.315
Familia (tamaño)	0.52	0.894	0.634 - 1.299
Temporalidad de RVH	0.008	0.919	0.863 - 0.988
INFECCION TEMPRANA	0.04	0.159	0.029 - 0.887

Significancia del modelo : p <0.001

*Por regresión logística múltiple

*Variables con p<0.05

Se debe señalar, que ni la actividad laboral de la madre fuera de su domicilio, ni el ocupar un lugar progresivo mayor en su secuencia de nacimientos fueron factores que participaron de manera significativa en la adquisición de un episodio diarreico grave por RVH (>6 puntos) durante la fase subsecuente.

7.8.4 Efecto de diferentes tipos de infección temprana por RVH :

Con la intención de determinar si el efecto protector identificado para una infección temprana en contra de la infección subsecuente por RVH, su diarrea asociada y la gravedad de la misma, se modificaba ó era más evidente cuando la infección temprana se adquiría de manera asintomática ó asociada a diarrea, ó bien cuando ocurría durante el primero ó segundo trimestre de vida, se desarrollaron modelos de regresión logística múltiple de manera similar a los previamente anotados.

La Tabla 17 muestra la razón de monios y el IC_{95%} del efecto que tiene cada uno de estos tipos de infección temprana (una vez ajustado en un modelo de regresión logística múltiple) en contra de cada uno de los eventos subsecuentes de interés. Como se puede observar, el efecto protector conferido por una infección temprana es debido fundamentalmente a la adquisición de una infección sintomática, más que a una asintomática, ya que la infección temprana asociada a diarrea mostró protección evidente en contra de las infecciones subsecuentes por RVH (RM = 0.17; IC_{95%} = 0.06-0.47) y de su diarrea asociada (RM = 0.19; IC_{95%} = 0.06-0.63), mientras que la infección asintomática no mostró efecto protector aparente en contra de ninguno de estos eventos de interés.

Tabla 17 EFECTO PROTECTOR DE LA INFECCIÓN TEMPRANA POR RVH^a EN CONTRA DE INFECCIONES SUBSECUENTES

INFECCION TEMPRANA	EVENTOS SUBSECUENTES					
	INFECCION ^b		DIARREA		DIARREA MIG ^c	
	R.M.	IC _{95%}	R.M.	IC _{95%}	R.M.	IC _{95%}
Todas ^b	0.30	0.13-0.65*	0.32	0.13-0.80*	0.16	0.03-0.89*
Con Síntomas	0.17	0.06-0.47*	0.19	0.06-0.63*	0.13	0.01-1.28
Sin Síntomas	0.43	0.16-1.16	0.58	0.17-1.96	0.21	0.02-1.97
Primer ^d Trimestre	0.31	0.12-0.79*	0.43	0.16-1.18	0.40	0.08-1.95
Segundo ^d Trimestre	0.27	0.11-0.71*	0.24	0.08-0.74*	0.24	0.04-1.42

^aPor regresión logística múltiple

^bInfecciones asintomáticas y asociadas a diarrea

^cDiarrea moderada-grave

^dEdad de adquisición de la infección temprana

*p < 0.05

Así mismo, el efecto protector de una infección temprana por RVH en contra de la infección subsecuente por este virus (RM = 0.27; IC_{95%} = 0.11-0.71) y de su diarrea asociada (RM = 0.24; IC_{95%} = 0.08-0.74) fue más evidente cuando esta primera infección ocurrió durante el segundo trimestre de edad (91-180 días), más que durante el primer trimestre, ya que la infección adquirida durante los primeros 90 días de edad solamente mostró protección en contra de la infección subsecuente (RM = 0.31; IC_{95%} = 0.12-0.79) y no en contra de su diarrea asociada.

Ninguna de estas variantes de infección temprana mostró una protección significativa en contra de la gravedad de la diarrea subsecuente por RVH, lo cual sí se apreció cuando se evaluó en conjunto el efecto de una infección temprana por RVH.

7.8.5 Curvas de supervivencia para los eventos de interés :

La probabilidad acumulada de presentar una infección por RVH (síntomática ó asintomática) durante el período de seguimiento subsecuente, estimada mediante curvas de supervivencia construidas con el método de Kaplan-Meier fue de 42% a los 12 meses, 60% a los 18 meses y 68% a los 24 meses de edad, para el grupo de niños sin infección temprana y para los niños infectados tempranamente fue de 18%, 32% y 48% a los 12, 18 y 24 meses de edad, respectivamente. La diferencia entre ambas curvas de supervivencia es muy significativa (Logrank: $\chi^2 = 10.18$; $p = 0.001$). Figura 9.

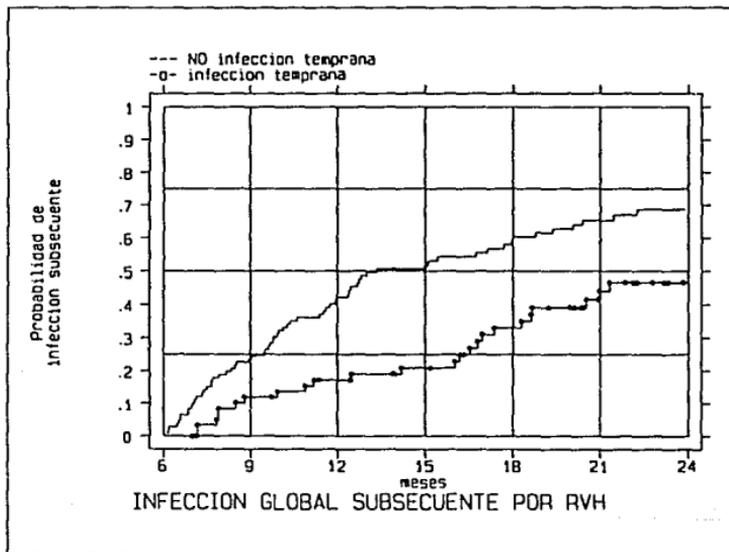


Figura 9. Infección subsecuente por RVH.

Así mismo, la probabilidad acumulada de presentar un episodio diarreico asociado a RVH en la fase subsecuente, estimada por curvas de sobrevida para el grupo de niños sin infección temprana por RVH, fue de 35% a los 12 meses, 45% a los 18 meses y 52% a los 24 meses de edad, en contraste, para los niños con infección temprana fue de 9%, 18% y 27% para los mismos períodos de edad, respectivamente. Ambas curvas de sobrevida son significativamente diferentes (Logrank: $\chi^2 = 7.62$; $p = 0.006$). Figura 10.

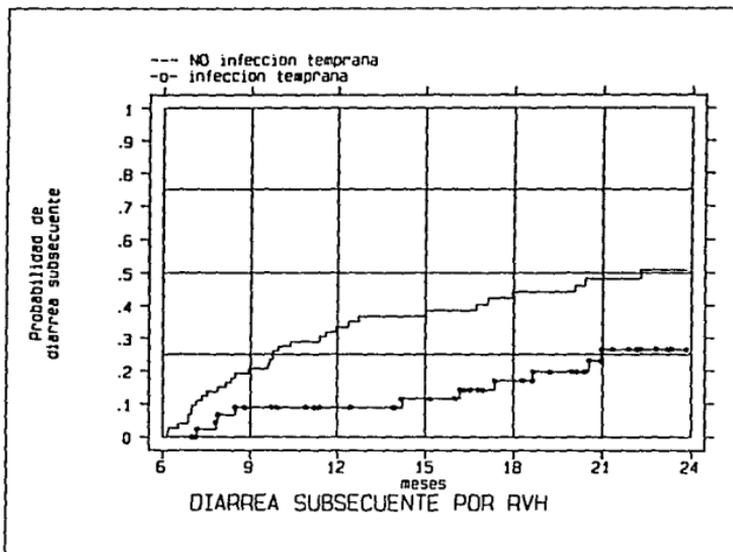


Figura 10. Diarrea subsecuente asociada a RVH.

De manera semejante, la probabilidad de padecer un cuadro diarreico asociado a RVH con gravedad >6 puntos (moderado-grave) después de la fase basal entre aquellos niños que ya habían padecido una infección temprana por el virus fue de 3% a los 12 meses y 8% a los 18 y 24 meses de edad, mientras que para aquellos niños que no habían presentado una infección temprana, esta misma probabilidad fue de 19% a los 12 meses y 26% a los 18 y 24 meses de edad. En este caso, la diferencia entre ambas curvas de sobrevivida también es significativa (Logrank: $\chi^2 = 6.17$; $p = 0.01$), Figura 11.

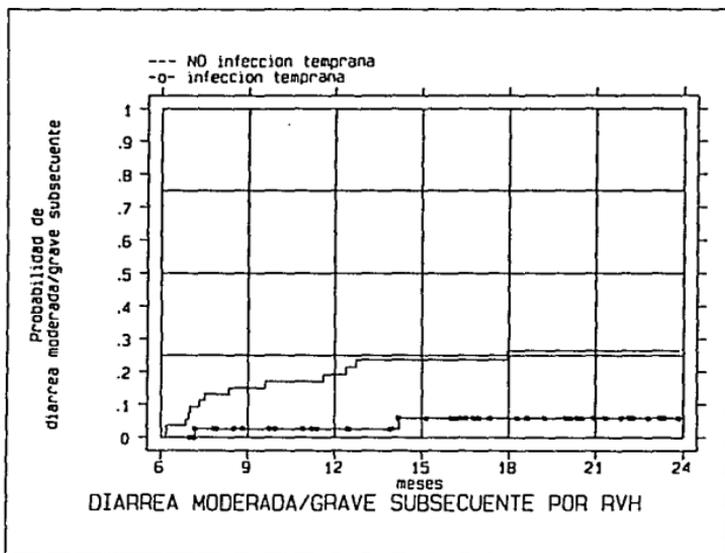


Figura 11. Diarrea moderada/grave subsecuente asociada a RVH.

7.9 Serotipos de RVH en la infección temprana y subsecuente :

En 43 (69,3%) de las 62 infecciones tempranas por RVH, se pudo determinar el serotipo participante; 9,7% de las cepas aisladas no fueron serotificables, 19,4% no pudieron ser serotificadas y en una de ellas (1,6%) no se realizó la búsqueda del serotipo involucrado. Las infecciones tempranas identificadas en este estudio fueron causadas primordialmente por los serotipos 3 (33,9%) y 1 (30,6%), con escasa participación del serotipo 4 (4,8%) y ninguna del serotipo 2, Tabla 18.

Tabla 18 SEROTIPOS DE LA INFECCION TEMPRANA POR RVH

SEROTIPO	INFECCION		TOTAL	
	Sintomática	Asintomática	No.	(%)
1	11	8	19	(30.6)
2	0	0	0	(0.0)
3	13	8	21	(33.9)
4	3	0	3	(4.8)
NT*	3	3	6	(9.7)
NV ^b	4	8	12	(19.4)
NP ^c	0	1	1	(1.6)
TOTAL	34	28	62	(100.0)

*NT No serotificable

^bNV No serotificada

^cNP No probada

No se encontró asociación entre alguno de los serotipos de RVH infectantes y la presencia de una infección temprana sintomática ó asintomática ($\chi^2 = 1.98$; $p = 0.37$).

De las 105 infecciones por RVH detectadas durante la fase subsecuente en ambos grupos de niños comparados, se pudo determinar el serotipo en 70 (66.7%) de ellas, esto se debió a que 11.4% de las cepas de RVH no fueron serotificables, 15.2% no pudieron ser serotificadas y 6.7% no se probaron. Nuevamente el serotipo 3 fue el más frecuente (31.4%) durante esta fase; sin embargo, en contraste con la fase temprana, el serotipo 2 fue el segundo en frecuencia (24.8%) y en cambio el serotipo 1 fue más bien escaso (5.7%) junto con el serotipo 4 que mantuvo una baja proporción de aislamientos (4.8%), Tabla 19.

Tabla 19 SEROTIPOS DE LA INFECCION SUBSECUENTE POR RVH

SEROTIPO	INFECCION		TOTAL	
	Sintomática	Asintomática	No.	(%)
1	3	3	6	(5.7)
2	15	11	26	(24.8)
3	17	16	33	(31.4)
4	2	3	5	(4.8)
NT ^a	3	9	12	(11.4)
NV ^b	6	10	16	(15.2)
NP ^c	2	5	7	(6.7)
TOTAL	48	57	105	(100.0)

^aNT No serotificable

^bNV No serotificada

^cNP No probada

Tampoco durante el período de seguimiento subsecuente se encontró asociación entre algún serotipo de RVH infectante y la presencia de infección asintomática ó asociada a diarrea ($\chi^2 = 0.62$; $p = 0.89$).

En la Tabla 20 se muestra la secuencia de serotipos de RVH aislados durante la infección temprana y subsecuente de un mismo niño; como se puede apreciar, solamente en 18 (64.3%) de las 28 infecciones subsecuentes se pudo definir el serotipo participante (1-,2-,3-,4- ó NT) tanto en la infección temprana como en la subsecuente. De esta manera, se puede apreciar que la

mayoría de estas infecciones subsecuentes, 16 de 18 (89% $IC_{95\%} = 75\% - 100\%$), son ocasionadas por un serotipo diferente del aislado durante la infección temprana; la mitad de las 18 infecciones subsecuentes se precedieron de una infección temprana asintomática ó asociada a diarrea.

Solamente en dos niños la infección temprana y subsecuente se debieron al mismo serotipo de RVH. En uno de ellos ocurrió una infección temprana asintomática por serotipo 3 a los 82 días de edad y a los 235 presentó diarrea leve asociada otra vez a serotipo 3; el otro niño presentó diarrea moderada asociada a serotipo 1 en la fase temprana (9 días), después tuvo una primera reinfección asintomática por serotipo 3 a los 237 días y nuevamente a los 334 días de edad presentó una segunda reinfección por serotipo 1 asociada a diarrea leve.

Tabla 20 SEROTIPOS DE RVH EN INFECCION TEMPRANA Y SUBSECUENTE

Infección temprana	Infección subsecuente						
	1	2	3	4	NT	NV	NP
1	1	3	4		1	2	
2							
3	1	5	1	1	1	1	2
4							
NT							
NV		1	1		1	2	
NP							

NT = No serotificable
 NV = No serotificado
 NP = No probado

Serotipo diferente = 89% $IC_{95\%} = 75\% - 100\%$

VIII. DISCUSION :

RVH es la causa más importante de diarrea aguda que induce con mayor frecuencia deshidratación grave en niños menores de 2 años de edad en todo el mundo (6-29). La prevención de esta enfermedad grave y potencialmente mortal es una prioridad dentro del Programa de Control de Enfermedades Diarreicas auspiciado por la OMS, cuyos objetivos principales son reducir la morbi-mortalidad debida a diarrea (2).

Es de gran interés conocer cuál es el efecto protector de la inmunidad adquirida en forma natural después de una infección por RVH en contra de infecciones repetidas y/o de la frecuencia y gravedad de su diarrea asociada, ya que esta información podría contribuir en el desarrollo de una vacuna y en la implementación de estrategias adecuadas de vacunación una vez que se cuente con una vacuna eficaz, lo cual es de importancia primordial, debido a que se ha considerado que la vacunación a gran escala podría ser la medida de control más adecuada en contra de la diarrea asociada a este virus (30).

Existen pocos estudios de cohortes incipientes que han intentado responder este importante cuestionamiento; sin embargo, sus resultados no han sido consistentes ni concluyentes y debido a que presentan problemas metodológicos existe la posibilidad de que se haya introducido sesgo en la obtención de los mismos (172-175). Por tal motivo, hasta ahora no se cuenta con una respuesta adecuada.

El presente estudio se desarrolló en dos comunidades periurbanas situadas al suroeste de la Ciudad de México, las cuales muestran un predominio de población joven, correspondiendo más de la cuarta parte a niños menores de 5 años de edad. Debido a que durante la selección de la muestra estudiada se logró incluir a más de la tercera parte de las madres embarazadas detectadas (38%) y dado que nuestros criterios de inclusión fueron poco estrictos, consideramos que la muestra reclutada de binomios madre-hijo es representativa de la población estudiada.

El seguimiento de la cohorte de 200 niños reclutados a lo largo de 14 meses se considera adecuado, ya que a pesar de que 35% de ellos no completaron sus 2 años de seguimiento y que 24% presentaron pérdidas transitorias durante el mismo, el seguimiento total obtenido, expresado en términos de persona-tiempo fue cercano a 80% (76.3%) que se considera conveniente para este tipo de estudios (192).

Así mismo, para efecto de los objetivos propuestos, en el estudio comparativo de niños con y sin infección temprana por RVH se incluyeron a 170 (85%) niños, de los cuales se logró un seguimiento superior a 80% (86%) que fue igual para los 2 grupos comparados; de los 30 niños excluidos 5 tuvieron infección temprana, por lo cual, las pérdidas fueron menores en el grupo expuesto tempranamente a RVH. De esta manera, la posibilidad de que las diferencias encontradas entre los grupos comparados pudiesen ser debidas a un seguimiento incompleto ó desigual ó bien que hayan sido debidas a mayores pérdidas ocurridas en el grupo expuesto tempranamente a RVH, como pudo suceder en otros estudios realizados previamente (172-174), es poco factible.

La vigilancia de episodios diarreicos fue activa y frecuente, a través de visitas domiciliarias efectuadas por promotoras de campo al menos una vez por semana, por tal motivo, creemos que la posibilidad de subregistro de episodios diarreicos es baja. Así mismo, la mayoría de los cuadros diarreicos (97.6%) se confirmaron médicamente y fueron evaluados clínicamente poco tiempo después de su inicio; es probable que esta detección temprana y vigilancia estrecha de los episodios diarreicos haya influido en la gravedad de los mismos y que su gravedad real se hubiese atenuado.

Lo anterior contrasta con el estudio realizado en Melbourne, Australia (172), en el cual la vigilancia de diarrea se efectuó mediante visitas domiciliarias ó llamadas telefónicas cada 3 meses, esperando a que las madres reportaran espontáneamente los episodios diarreicos, motivo por el cual no se evaluó la gravedad de todos los episodios; y también es diferente de lo realizado en los estudios de Africa Central (173) y Egipto (174) en los cuales no se evaluó la gravedad de la diarrea.

Se logró una colección de muestras fecales durante la presencia de diarrea y aún en ausencia de la misma superior a 85% y se investigó la existencia de RVH en todas ellas; por tal motivo, creemos que la posibilidad de omisión de la eliminación fecal de este virus es baja, sobre todo si consideramos la adecuada sensibilidad y especificidad del método de ELISA empleado para escrutinio de las mismas (84,185), por lo tanto, es probable que se hayan detectado la mayoría de las infecciones por RVH, tanto asociadas a un episodio diarreico, como asintomáticas.

En los estudios realizados por Georges-Courbot y colaboradores (173) y por Reves y colaboradores (174) no se investigó la presencia de infecciones asintomáticas en los grupos comparativos, en este estudio fue posible identificarlas debido a la colección regular de muestras fecales efectuada aún en ausencia de diarrea. Así mismo, la posible asociación errónea de infecciones por RVH con episodios diarreicos que pudo ocurrir en el estudio efectuado por Bishop y colaboradores (172), favorecida por la baja colección de muestras fecales (65%) y la pobre detección de RVH (35%) en las muestras diarreicas asociadas a seroconversión para este virus, se minimizó, al poder establecerse de una manera más cercana la relación entre eliminación fecal de RVH y la presencia ó no de diarrea en un corto lapso de tiempo.

Otras ventajas obtenidas de la detección fecal de RVH no asociada a diarrea, es que se pudo determinar la edad a la que ocurrieron las infecciones asintomáticas y que también se pudieron obtener especímenes fecales para definir el serotipo participante en las mismas y de esta manera, fue posible caracterizar los serotipos involucrados en una infección temprana ó en una subsiguiente, no importando que la infección hubiese sido asintomática ó asociada a diarrea, lo cual no se pudo lograr en otros estudios realizados con la intención de determinar el efecto protector de la inmunidad conferida por una infección por RVH (172-174).

La tasa global de diarrea detectada en este estudio, 3.2 episodios/niño-año ($IC_{95\%} = 3.05-3.35$), mostró una situación intermedia respecto a la obtenida en otros estudios de comunidad con cohortes de niños menores de 2 años de edad. Fue similar a la informada en países en desarrollo como Bangladesh (13) y Nigeria (125) (3 a 3.4 episodios/niño-año), aunque menor de la identificada en Guatemala (18) y en otro estudio en Bangladesh (14) (6.4 a 7.9 episodios/niño-año) y superó las tasas observadas en países desarrollados como Canada (16) y Estados Unidos (124) (1.2 episodios/niño-año).

En contraste, la tasa global de diarrea asociada a RVH, 0.3 episodios/niño-año ($IC_{95\%} = 0.25-0.34$) que correspondió a 9.4% del total de diarreas, fue semejante a la detectada en todos estos estudios (0.2 a 0.4 episodios/niño-año) con excepción de la observada en Guatemala (0.8 episodios/niño-año); estos resultados están en concordancia con la idea de que la incidencia de diarrea asociada a RVH es similar en países desarrollados y en desarrollo y que la proporción de diarreas asociadas a este virus es mayor donde la incidencia total de diarrea es baja y que es menor donde la incidencia global es elevada, lo cual puede ser debido al control de diarreas por otras causas que se ha logrado en los países desarrollados (30), ver Cuadro 2.

La relación enfermedad/infección estimada de manera global durante los 2 primeros años de edad fue de 0.50 ($IC_{95\%} = 0.43-0.57$), lo cual indica que la mitad de las infecciones por RVH ocurrieron de manera asintomática; esta proporción de infecciones no asociadas a diarrea es superior a la informada en estudios efectuados en Canadá (16) y Guatemala (18), 23% a 35% respectivamente, aunque menor de la encontrada en Costa Rica (48), donde se ha informado de un alto porcentaje de infecciones asintomáticas (87%) durante los 2 primeros años de edad. La detección de la eliminación asintomática de RVH es importante debido a que su participación en el mantenimiento y transmisión de la infección por este enteropatógeno se ha considerado muy relevante (31,34).

La otra mitad de las infecciones por RVH se asociaron a diarrea y más de la tercera parte de estos episodios, 38% ($IC_{95\%} = 28\%-48\%$), se calificaron con una gravedad >6 puntos (moderada-grave). Del tal forma, a pesar de que la mayoría de los episodios diarreicos detectados durante el estudio se consideraron como leves (78%), se pudo confirmar que la diarrea asociada a RVH se relaciona con mayor gravedad de los mismos, lo cual es congruente con lo previamente informado en otros estudios a nivel de comunidad como los de Black y colaboradores (13,14).

Al analizar la incidencia de infecciones por RVH de acuerdo a la edad, destaca el predominio de infecciones asintomáticas durante el primer trimestre, que drásticamente cambia a un predominio de infecciones sintomáticas en el segundo trimestre, observándose durante este mismo periodo el pico máximo de incidencia de infección por RVH que es seguido por una rápida declinación de la infección y diarrea asociada a este virus hasta el final del segundo año de edad. Consideramos estas observaciones como evidencias de que existe protección en contra de la infección y diarrea asociada a RVH durante el primer trimestre de edad, posiblemente debida a la transferencia de inmunidad pasiva de origen materno y que posteriormente parece ocurrir la adquisición de inmunidad natural conforme aumenta la edad.

La mayoría de estudios longitudinales con niños menores de 2 años analizan la incidencia de diarrea asociada a RVH por semestres de edad, de tal forma, identifican que el pico de mayor incidencia ocurre durante el segundo (16,121,122) e incluso el tercer semestre de vida (18,124); sin embargo, los escasos estudios que han analizado este mismo evento por trimestres muestran resultados semejantes a los nuestros, señalando que la mayor incidencia de diarrea asociada a RVH ocurre durante el segundo trimestre de vida (114,125); en algunos de estos estudios, el incremento en la incidencia de diarrea asociada a RVH se observó relacionado al período de destete, sin embargo, en ninguno de ellos se pudo establecer una asociación causal (16,18,121,125).

La infección neonatal por RVH fue poco frecuente, aproximadamente 4 de cada 100 niños presentaron infección por este virus durante el primer mes de edad, asociándose a diarrea solamente en la tercera parte de los casos. Aunque casi todos los niños (94%) nacieron en ambiente hospitalario y la mayoría permanecieron en un cunero (81%), su estancia promedio dentro del hospital fue menor de 48 horas; por lo tanto, estos posibles factores de riesgo para la adquisición de infección a edad temprana, previamente identificados, no parecieron participar de manera importante (68).

Aunque el presente estudio no se limitó a una vigilancia hospitalaria de la eliminación fecal de RVH durante el período neonatal, la baja incidencia de infección detectada durante este período de edad es congruente con lo informado en estudios de cuneros de países en desarrollo (58-61) y con lo encontrado por Mata y colaboradores en una cohorte de niños guatemaltecos (18) que muestran que la infección neonatal por RVH ocurre de manera esporádica en estas áreas geográficas, para lo cual hasta ahora no existe una explicación evidente.

Algunos estudios con niños menores de 5 años hospitalizados por diarrea aguda han señalado que la diarrea asociada a RVH no tiene un patrón estacional en la Ciudad de México (23,24); sin embargo, otro estudio semejante conducido por Espejo y colaboradores sí identificó una mayor prevalencia de la enfermedad durante los meses de otoño, sobre todo en el mes de octubre durante los 5 años estudiados. Nuestros resultados son congruentes con estas observaciones, ya que pudimos detectar una variación estacional con mayor incidencia de la infección y diarrea asociada a RVH en el otoño, que alcanzó su pico máximo durante los meses de octubre-noviembre de cada año; sin embargo, se debe señalar que existe la posibilidad de que ocurran brotes de infección y diarrea asociada a este virus fuera de este período, como el identificado en la primavera de 1988.

Recientemente se ha documentado que en Norte América ocurre una onda anual de diseminación de diarrea asociada a RVH que se origina en México y el suroeste de los Estados Unidos en noviembre y que termina en Nueva Inglaterra y en las provincias marítimas del Canadá en marzo (193); se desconocen cuales son los factores que condicionan esta diseminación anual de la enfermedad asociada a RVH que ocurre de oeste a este a través del norte de América y el porqué de su patrón estacional (194).

Se intentó determinar el serotipo de RVH en 95% de las infecciones identificadas, mediante un ensayo de ELISA que emplea anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína VP7 de la cápside externa, en 80% de las muestras se pudo detectar una reacción positiva, sin embargo, solamente en 66% se pudo definir el serotipo. El porcentaje de serotipificación de estudios previos en diferentes áreas geográficas con el empleo de un ensayo inmuno-enzimático similar varía de 49% a 88% (195-201).

Es probable que las muestras que reaccionaron con más de uno de los anticuerpos monoclonales probados (1 a 4), consideradas como no serotificables (NT), e incluso las que no mostraron reacción positiva con alguno de ellos ó no serotificadas (NV) pudiesen corresponder a serotipos diferentes de los probados, ó bien a nuevos serotipos de RVH; sin embargo, existen otras explicaciones alternativas.

La eficiencia de la prueba empleada está directamente relacionada al número de viriones estructuralmente intactos presentes en la muestra fecal, ya que las partículas incompletas no son capaces de unirse a los anticuerpos monoclonales que cubren la fase sólida y por tal motivo, no pueden ser detectadas ni serotificadas; así mismo, existen variaciones antigénicas dentro de un mismo serotipo que pueden dificultar su determinación. Finalmente, la sensibilidad del ensayo puede ser afectada por factores presentes en los extractos fecales, de los cuales, los más importantes parecen ser los coproanticuerpos producidos localmente y los anticuerpos de origen materno (195).

De las infecciones serotificadas, el serotipo 3 se aisló con mayor frecuencia (46%) seguido por una proporción semejante de serotipos 1 y 2 (23% cada uno) y una escasa participación del serotipo 4 (8%), destacando la aparente naturaleza cíclica de los brotes debidos a este virus con la presencia de serotipos predominantes cambiantes durante cada temporada de RVII.

Estudios realizados en África Central (196), Venezuela (197), Brasil (198), Japón (199), Europa (200) y Estados Unidos (201) son consistentes en su predominio de aislamiento de serotipo 1, con una participación divergente de los serotipos 2, 3 y 4; lo cual contrasta con la mayor participación de serotipo 3 encontrada por nosotros. Estos estudios se realizaron entre 1981 a 1988, la mayoría tienen un diseño transversal e incluyeron solamente a niños con diarrea aguda que requirieron atención hospitalaria (197,199-201) siendo pocos los estudios longitudinales que incluyeron a niños con infecciones asintomáticas (196,198).

Este predominio de serotipo 1 alrededor del mundo durante los 1980s ha generado la pregunta de si el serotipo 1 es el serotipo epidémico transitorio en la década de los 1980s ó si es realmente el serotipo que más comúnmente produce diarrea grave en niños (201); sobre todo porque se ha observado la existencia de brotes cíclicos con serotipos cambiantes a lo largo del tiempo, como en los estudios realizados en Australia (195), China (202) y Japón (203), con los cuales compartimos observaciones semejantes.

No se puede afirmar, pero tampoco se puede descartar, que en la población estudiada por nosotros hubiese ocurrido previamente un predominio de infección por serotipo 1 que después hubiera cambiado a serotipo 3, ya que al menos durante los 3 primeros brotes de infección por RVH este cambio sucesivo de serotipo 1 a serotipo 3 se pudo apreciar, ver Figura 8. Existe la evidencia en un estudio previo, realizado de mayo de 1984 a octubre de 1987 en la Ciudad de México, que incluyó a niños hospitalizados por diarrea aguda, de que el serotipo 1 se aisló con mayor frecuencia durante dicho período identificándose además la cocirculación de los serotipos 3 y 4 (204).

Hasta ahora no existe una interpretación definitiva del porque ocurren cambios secuenciales en la frecuencia relativa de serotipos de RVH de un brote epidémico a otro (195,202,203); sin embargo, creemos que en este estudio hay que considerar la posibilidad de presión de selección de tipo inmune que pudo favorecer la modulación de los cambios antigénicos de RVII. Debido a la posible protección serotipo-específica conferida por una primoinfección, se pudo favorecer que las infecciones posteriores se debieran a serotipos diferentes, a pesar de que el serotipo asociado a la primera infección se encontrase circulando de manera simultánea, ó bien que estos cambios en el predominio de serotipos de RVH se pudiesen deber al ingreso de nuevos niños susceptibles al estudio.

La existencia de diarrea asociada a RVH con otro enteropatógeno simultáneo se ha identificado previamente en estudios longitudinales con niños de Guatemala (18), Brasil (121) y una comunidad de indios americanos en Estados Unidos (114), con una frecuencia que varía de 11% a 50% del total de diarreas asociadas a este virus; de tal forma, la presencia de infecciones mixtas en 1 de cada 4 episodios diarreicos asociados a RVH encontrada en este estudio no es un evento infrecuente, debiéndose destacar que a pesar de que estas infecciones mixtas son frecuentes, no parecen asociarse a mayor gravedad de los episodios diarreicos ni tampoco parecen relacionarse con algún serotipo en particular ó con la presencia de primo ó reinfección por RVH.

La infección temprana por RVH ocurrió únicamente en la tercera parte de los niños estudiados; en la mitad de ellos se asoció a diarrea y en el resto sucedió de manera asintomática, 41% de los niños que presentaron diarrea tuvieron un episodio calificado de moderado a grave, 2 de los cuales requirieron hospitalización. Como se puede apreciar, la adquisición natural de una infección por RVH a edad temprana es un evento que puede favorecer deterioro clínico importante.

A pesar de que la infección temprana por RVH se presentó con la misma frecuencia durante el 1° ó 2° trimestre de edad, las infecciones ocurridas durante el 2° trimestre se asociaron con mayor frecuencia a diarrea, apreciándose un patrón semejante al mostrado en la Figura 6, que ilustra la mayor incidencia de infección sintomática durante el 2° trimestre de edad.

Se pudo apreciar que la alimentación al pecho materno ofrece protección en contra de la infección por RVH, ya sea asintomática ó asociada a diarrea, al menos durante los primeros 6 meses de edad que fue el período de lactancia evaluado; determinándose que los niños que no recibieron leche materna ó que fueron alimentados al pecho durante menos de 6 meses tuvieron un mayor riesgo de adquirir una infección a edad temprana.

Existen diversos estudios que han intentado conocer cuál es el efecto protector de la leche materna en contra de la infección y/ó diarrea asociada a RVH, sin embargo, la respuesta a esta importante pregunta es controvertida. En el período neonatal la alimentación al pecho se ha asociado con un menor riesgo de infección y con una menor excreción de RVH durante la misma (50,52,205), sin embargo, en otros estudios semejantes estas observaciones no se han confirmado (206).

En un estudio de casos y controles en niños menores de un año, Weinberg y colaboradores no identificó ningún efecto protector de la leche materna en contra de la diarrea asociada a RVH (207), lo mismo ocurrió en el estudio conducido por Gurwith y colaboradores en una cohorte de niños menores de 2 años (16); sin embargo, Duffy y colaboradores pudieron demostrar en una cohorte de niños seguidos durante una temporada de RVH que la ingesta de leche materna disminuye la gravedad de la diarrea asociada a este virus, aunque no observó disminución de su incidencia (138). Se debe señalar, que en ninguno de estos estudios se realizó un ajuste de los resultados para factores potenciales de confusión (16,138,207).

Los resultados obtenidos en el presente estudio son congruentes con la existencia de un efecto protector de la ingesta de leche materna en contra de la infección y diarrea asociada a RVH a edad temprana, durante los primeros 6 meses de edad, aún después de haberse ajustado a potenciales confusores. En base a esta información se justificaría una campaña de promoción de la alimentación al pecho materno, al menos durante los primeros 6 meses de edad, para prevenir la infección y diarrea asociada a RVH.

Se debe destacar que durante este estudio no se investigó si la alimentación al pecho materno ofrece protección al prolongarse después de los 6 meses de edad, así mismo, hasta ahora no se ha determinado cuáles son los posibles factores mediadores de la protección en leche materna y tampoco se ha investigado la posible participación que pudiesen tener los anticuerpos séricos transferidos por placenta durante los primeros 6 meses de vida, todo lo cual se planea realizar a corto plazo.

De manera semejante, se identificó que el bajo peso al nacer es un factor de riesgo para adquirir una infección temprana asociada a diarrea y que el pertenecer al sexo femenino ofrece una protección parcial, ya que las niñas, a diferencia de los niños, mostraron menor riesgo de presentar una infección asintomática pero no se observó que estuviesen protegidas en contra de una infección temprana asociada a diarrea.

En estudios previos realizados a nivel hospitalario, se ha identificado que el bajo peso al nacimiento es un factor de riesgo para la adquisición de enfermedad gastrointestinal grave asociada a RVH (65,66). Así mismo, algunas observaciones realizadas en niños menores de 1 año de edad señalan que los niños de sexo masculino han mostrado una mayor predisposición a ser infectados por RVH (208, 209), lo cual es congruente con nuestros resultados.

En general, los grupos de niños comparados con y sin infección temprana por RVH mostraron características muy semejantes en su fase basal, de alguna manera las diferencias identificadas entre ambos grupos correspondieron a los factores que participaron en la adquisición de una infección temprana. Estas diferencias fueron la menor duración de la alimentación al pecho materno y el bajo peso al nacer observado en los niños infectados tempranamente, y también, el que los niños sin infección temprana ocuparon una posición más tardía en la lista de nacimientos consecutivos de la madre y tuvieron una familia un poco más numerosa; en el análisis final se ajustó para el desequilibrio de las mismas.

Uno de los propósitos importante que se tomaron en cuenta al desarrollar el presente estudio fue el ajustar los resultados obtenidos en contra de posibles factores de confusión, lo cual no se había realizado en ninguno de los estudios previamente efectuados con la intención de determinar cuál era el efecto protector de la inmunidad conferida por una infección por RVH (172-175).

Por tal motivo, se estimó la participación de diversas variables que en otros estudios se habían identificado como posibles factores de riesgo ó protección para padecer diarrea aguda ó que pudiesen participar en la adquisición de una infección ó un episodio diarreico asociado a RVH (15,16,18,49,109-112,118,121,209). De esta manera, se determinó el sexo de los niños, su peso y condiciones al nacimiento, su estado nutricional, la duración de la alimentación con leche materna, la edad de introducción de biberón y alimentos sólidos, el tiempo de exposición a una temporada de mayor incidencia de infección por RVH, su asistencia a guardería ó su contacto con niños menores de 5 años de edad que asistían a algún sitio de reunión común, el tamaño y grado de hacinamiento de la familia, la condición socio-económica y hábitos higiénico-domésticos de la misma, el nivel educacional del jefe de familia y la madre, la actividad laboral de la madre fuera de su domicilio y la duración del seguimiento durante el periodo subsecuente.

Sabemos que la eficiencia con la cual se midieron estas variables pudo tener limitaciones que son inherentes al método empleado ó al instrumento de medición utilizado, lo cual pudo haber favorecido sesgos durante la estimación de las mismas; sin embargo, debemos señalar que para la medición de algunas de ellas empleamos los únicos instrumentos que parecían disponibles,

como podría ser el caso de la estimación del estado nutricional del niño y del nivel socio-económico y hábitos higiénico-domésticos de la familia.

Por otro lado, la intención de medir estas variables fue fundamentalmente la de controlar los resultados del efecto de una infección temprana por RVH y no necesariamente la de establecer asociaciones causales entre las variables confusoras con los eventos resultado ó de interés; consideramos que las asociaciones significativas obtenidas en este sentido deberán ser confirmadas posteriormente en estudios con objetivos particulares al respecto. Así mismo, debemos señalar que de existir la posibilidad de sesgo en la estimación de las variables confusoras, es probable que dicho sesgo actúe en el mismo sentido para los 2 grupos comparados, ya que la medición de estas variables se realizó de igual modo en todos los niños estudiados no importando a que grupo pertenecían.

Los resultados obtenidos del presente estudio son congruentes con la hipótesis de que la infección temprana por RVH, adquirida durante los primeros 180 días de edad, confiere una respuesta inmune protectora en contra de la incidencia y gravedad de infecciones repetidas y su diarrea asociada en niños menores de 2 años de edad.

Mediante modelos de regresión logística múltiple escalonada desarrollados para cada uno de los eventos sucesivos de interés (infección, diarrea y diarrea moderada-grave asociada a RVH), en los cuales se incluyeron a los grupos comparativos de niños con y sin infección temprana por RVH, que se ajustaron para la acción de posibles factores confusores y el desequilibrio de variables entre ambos grupos comparativos; se pudo observar que una infección temprana por RVH tiene un efecto protector en contra de infecciones sucesivas, sintomáticas y asintomáticas, (RM = 0.30; IC_{95%} = 0.13-0.65), de su diarrea asociada (RM = 0.32; IC_{95%} = 0.13-0.80) y de la gravedad de la misma (RM = 0.16; IC_{95%} = 0.03-0.89) al menos durante los 2 primeros años de edad.

Así mismo, empleando curvas de supervivencia construidas con el método de Kaplan-Meier, se encontró que la probabilidad acumulada de presentar una infección sucesiva por RVH, sintomática y asintomática (Logrank, p = 0.001), un episodio diarreico asociado (Logrank, p = 0.006) ó un episodio moderado-grave (Logrank, p = 0.01), durante el período de 6 a 24 meses de edad, es significativamente menor en el grupo expuesto tempranamente a RVH durante los primeros 180 días de edad.

Son 4 los estudios de cohortes incipientes que han intentado determinar cuál es el efecto protector de la inmunidad conferida por una infección por RVH, en contra de infecciones sucesivas y su diarrea asociada. El más conocido es el de Bishop y colaboradores, realizado en Melbourne Australia, con una cohorte de recién nacidos seguidos durante 3 años desde el nacimiento, en el cual se observó que una infección por RVH adquirida durante el período neonatal no protege en contra de infecciones sucesivas ni tampoco en contra de episodios diarreicos leves ó moderados, pero que sí ofrece un menor riesgo de diarrea grave (172).

En este estudio se aprecian diversos problemas metodológicos ya antes señalados, de los cuales destacan, un seguimiento diferente de los grupos comparativos de la cohorte, la posibilidad de subregistro de episodios diarreicos y la asociación errónea de los mismos con la infección por RVH, además de la falta de ajuste de los resultados en contra de factores de confusión. Así mismo, el efecto protector identificado en el estudio de Bishop y colaboradores, es debido a la infección de una cepa de RVH endémica en un cunero, a diferencia del efecto protector observado en el presente estudio que es debido a la infección de cepas de RVH adquiridas a nivel

de la comunidad.

En el estudio de Georges-Courbot y colaboradores, efectuado en la República de Africa Central, con una cohorte de niños seguidos desde el nacimiento hasta los 2 años de edad, se observó que los niños infectados por RVH durante los primeros 6 meses de edad presentaron posteriormente una menor frecuencia de diarrea asociada a este virus. Sin embargo, en este estudio ocurrió la pérdida de más del 50% de los niños incluidos en la cohorte, no se investigó la presencia de infecciones asintomáticas y los resultados no se ajustaron para potenciales confusores (173).

En el estudio informado por Reves y colaboradores, en una cohorte de niños egipcios seguidos desde el nacimiento, se observó que un episodio diarreico inicial por RVH no parece proteger en contra de otro cuadro diarreico subsecuente asociado a este virus; en este estudio tampoco se consideró la participación de infecciones asintomáticas, no se evaluó la gravedad de los episodios diarreicos y tampoco se realizó un ajuste para confusores (174).

Finalmente, en el estudio realizado en México por Cravioto y colaboradores, en una cohorte de niños seguidos durante un año desde su nacimiento, se observó que la diarrea asociada a RVH ocurre con menor frecuencia durante una reinfección que en una primoinfección, pero no se determinó si una primoinfección disminuye el riesgo de infecciones subsecuentes ó de su diarrea asociada (175).

Es de gran importancia destacar el efecto protector que ofrece una infección temprana por RVH en contra de episodios diarreicos subsecuentes y la gravedad de los mismos; sin embargo, también es importante señalar la protección que ofrece en contra de infecciones asintomáticas subsecuentes, ya que de esta manera, la adquisición de una infección temprana por RVH puede influir de manera más amplia en disminuir la diseminación y mantenimiento de este virus dentro de una comunidad (31,34).

Durante el desarrollo de los modelos de regresión logística múltiple realizados para investigar cuales eran los factores involucrados en la adquisición de la infección y diarrea asociada a RVH en el período subsecuente, se identificó a la duración del tiempo de seguimiento en este período como una variable que favorecía la detección de los mismos, motivo por el cual se realizó un ajuste para el diferente seguimiento de los niños comparados que la regresión logística no efectúa por sí misma, debido a que asume la existencia de un seguimiento similar para todos los individuos estudiados; de esta manera, se pudo superar esta limitante inherente al método de análisis utilizado (210).

El retraso en la introducción del hiberón, cualquiera que sea el líquido que se ofrezca en el mismo, disminuyó el riesgo de adquirir un episodio diarreico asociado a RVH durante el período subsecuente; la introducción de hiberón en la alimentación de un niño se ha considerado como una conducta de riesgo para la adquisición de diarrea asociada a RVH, sin embargo, son pocos los estudios que han observado esta asociación (118,121).

Por otro lado, se identificó que la mayor exposición durante la fase temprana a una temporada de alta incidencia de infección por RVH, es un factor que disminuye el riesgo de padecer posteriormente un episodio moderado-grave asociado a RVH. Es difícil dar una explicación clara para esta observación sin caer en el terreno especulativo, pero se debe señalar que en un estudio clínico controlado conducido por Ruuska y colaboradores (211), el efecto protector de la cepa bovina RIT 4237 en contra de episodios diarreicos graves asociados a RVH, se identificó únicamente en aquellos niños que la recibieron inmediatamente antes del inicio de

una temporada de infección por RVH; consideramos que estas observaciones apoyan la necesidad de que los resultados de estudios clínicos controlados que evalúan la eficiencia de candidatas a vacuna se deban ajustar a la variación estacional de la infección por RVH.

Durante el presente estudio no se observó ninguna asociación entre la condición socio-económica ó el nivel de higiene familiar con la adquisición de una infección por RVH ó su diarrea asociada; se podría considerar que esto se debió a que los instrumentos empleados para su medición no fueron los más adecuados para hacer evidente esta asociación, sin embargo, estas observaciones también podrían ser congruentes con el concepto de que la prevención de la diarrea asociada a RVH no parece depender del mejoramiento en el saneamiento ambiental ó la higiene, si no que más bien dependerá del uso a gran escala de una vacuna efectiva (30).

Al analizar el efecto que tiene una infección temprana sintomática ó asintomática, se pudo apreciar que el efecto protector de una infección por RVH adquirida a edad temprana parece depender fundamentalmente de su adquisición asociada a diarrea: del mismo modo, se observó que la protección parece ser más evidente cuando la infección temprana ocurre durante el segundo trimestre de edad, posiblemente porque en este mismo período la infección temprana por RVH se presenta con mayor frecuencia asociada a diarrea.

Así mismo, se pudo determinar que la mayoría de las infecciones subsecuentes (89% $IC_{95\%} = 75\%-100\%$) son debidas a serotipos diferentes de los identificados durante una infección temprana por RVH, lo cual sugiere que el efecto protector ofrecido por una infección temprana es serotipo-específico; estos resultados son congruentes con los de Chiba y colaboradores, quienes estudiaron 3 brotes consecutivos de diarrea asociada a RVH en un orfanato de niños japoneses observando que un título de anticuerpos serotipo-específicos contra RVH ofrece protección en contra de infecciones repetidas debidas al mismo serotipo (170). Por otro lado, no se encontró asociación entre algún serotipo infectante y la presencia de infección sintomática ó asintomática durante la fase temprana ni durante el período subsecuente, lo cual está de acuerdo con diversos estudios que tampoco han apreciado asociación entre serotipos de RVH y mayor patogenicidad (75-78,196).

Se debe destacar que la protección que ofrece una infección temprana por RVH solamente ocurre en la tercera parte de los niños menores de 2 años de edad y que la adquisición de una infección temprana se puede acompañar de enfermedad diarreica grave; por tal motivo, el interés de conocer cuál es el efecto protector de esta inmunidad adquirida en forma natural después de una infección por RVH en contra de infecciones repetidas y su diarrea asociada, esta relacionada fundamentalmente con la obtención de información que pudiese favorecer el desarrollo de medidas de control, dentro de las cuales destaca la obtención de una vacuna contra RVH.

Por tal motivo, en base a las observaciones obtenidas se podría considerar que una vacuna eficaz para la prevención de la diarrea asociada a RVH debería imitar la respuesta inmune natural inducida por una infección temprana sintomática; motivo por el cual, creemos que deberá ser muy inmunógena, aunque también deberá estar suficientemente atenuada para lograr guardar un equilibrio con el desarrollo de mínimos efectos colaterales.

Deberá incluir cuando menos a los 4 serotipos de RVH epidemiológicamente importantes ya que la inmunidad conferida por la infección temprana parece ser principalmente serotipo-específica; además de que se deben tomar en cuenta los cambios sucesionales que ocurren en el predominio de los serotipos durante los brotes de la infección por RVH y debido que, cualquiera de los serotipos de RVH puede inducir enfermedad diarreica.

Si recordamos que la alimentación al pecho materno ofrece protección en contra de la infección por RVH, al menos durante los primeros 6 meses de edad, existe la posibilidad de que la leche materna pudiese interferir con el efecto inmunógeno ó protector de una vacuna; a este respecto ya existen algunas evidencias (212), sin embargo, es necesario investigar de manera suficiente acerca de esta posible interferencia. Es probable que se requiera el desarrollo de una vacuna que supere esta interferencia ó bien, que la vacuna se administre inmediatamente después de que la alimentación con leche materna es suspendida, lo cual habitualmente ocurre en la comunidad estudiada durante el 2º trimestre de edad, durante el cual también se observó un efecto protector más evidente de una infección temprana.

Se debe señalar que la infección temprana por RVH no parece ofrecer una protección completa ya que se observaron infecciones y episodios diarreicos subsecuentes. Es probable que el motivo por el cual una infección temprana no ofreció protección contra reinfecciones se haya debido a que estas infecciones repetidas ocurrieron con un serotipo diferente del que causó la infección temprana; no obstante, no se puede descartar la posibilidad de que la protección conferida por una infección temprana sea poco duradera.

Dado que una infección temprana por RVH modifica la adquisición de la infección y diarrea asociada a este virus a edades posteriores, será conveniente que en los ensayos clínicos controlados que evalúen la eficiencia de futuros candidatos a vacuna se ajusten sus resultados en contra del posible efecto confusor que puede tener la presencia de una infección temprana, para así poder evitar la obtención de conclusiones equivocadas.

Creemos que la información obtenida en este estudio puede ser útil para ayudar a contestar algunas preguntas que actualmente limitan el desarrollo de una vacuna eficaz contra RVH, que podría indicar cuál sería el abordaje para la búsqueda de candidatos a vacuna, podría ayudar a lograr una mejor evaluación de la efectividad de los mismos en futuros estudios clínicos de campo y podría señalar las estrategias a seguir durante una campaña de vacunación, una vez que se hubiese obtenido una vacuna efectiva.

Consideramos que los resultados obtenidos pueden ser extrapolados a otras comunidades con condiciones semejantes a las incluidas en el presente estudio.

IX. CONCLUSIONES :

1. La incidencia de la diarrea asociada a RVH en las comunidades estudiadas, ubicadas al suroeste de la Ciudad de México, es similar a la observada en otros países, tanto desarrollos como en desarrollo; la mayor incidencia de la infección ocurre durante el segundo trimestre de edad, con un predominio de infecciones asintomáticas durante el primer trimestre que drásticamente cambia a una mayor incidencia de infecciones sintomáticas durante el segundo trimestre que posteriormente disminuyen conforme aumenta la edad.
2. La diarrea asociada a RVH se relaciona con mayor gravedad de los episodios diarreicos, lo cual no se modifica con la presencia de infecciones mixtas con otros enteropatógenos.
3. La infección y diarrea asociada a RVH se presentan con un patrón estacional, mostrando una mayor incidencia en el otoño que es más evidente en los meses de octubre y noviembre, aunque también pueden ocurrir brotes aislados fuera de esta temporada.
4. El serotipo 3 de RVH se identificó como el más frecuente, seguido de los serotipos 1 y 2 y una escasa participación del 4, habiéndose detectado la existencia de cambios secuenciales en el predominio de los serotipos durante cada brote de infección por RVH.
5. La alimentación con leche materna protege en contra de la infección y diarrea asociada a RVH durante los primeros 6 meses de edad (infección temprana).
6. El bajo peso al nacer es un factor de riesgo para adquirir una infección sintomática y el sexo femenino ofrece protección en contra de una infección asintomática por RVH durante los primeros 6 meses de edad (infección temprana).
7. La infección temprana por RVH, adquirida durante los primeros 6 meses de edad, confiere una respuesta inmune protectora en contra de la incidencia y gravedad de infecciones repetidas en niños menores de 2 años.
8. El efecto protector de una infección temprana por RVH es más evidente cuando ocurre asociada a diarrea y durante el segundo trimestre de edad.
9. La inmunidad adquirida en forma natural por una infección temprana por RVH parece ser serotipo-específica.
10. Ninguno de los serotipos de RVH (1-,2-,3- y 4-) se asocia a un mayor riesgo de diarrea.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, una vacuna eficaz para la prevención de la diarrea asociada a RVH deberá :

- a. Imitar la respuesta inmune natural inducida por una infección temprana por RVH asociada a diarrea.
- b. Incluir los antígenos de los 4 serotipos de RVH epidemiológicamente importantes.
- c. Ofrecerse al inicio del segundo trimestre de edad ó al suspenderse la alimentación con leche materna.

X. LITERATURA CITADA :

1. WHO Technical Report Series, No.288, 1964 (*Enteric infections: report of a WHO Expert Committee*).
2. Diarrhoeal Diseases Control Programme. Weekly epidemiological record, 1979;16:121-3.
3. Snyder JD, Merson MH. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. Bull WHO 1982;60:605-13.
4. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J Virol 1972;10:1075-81.
5. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH y Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet 1973;2:1281-3.
6. Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, et al. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. N Engl J Med 1976;294:965-72.
7. Rodriguez WJ, Kim HW, Arrobio JO, et al. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. J Pediatr 1977;91:138-93.
8. Evans DG, Olarte J, DuPont HL, et al. Enteropathogens associated with pediatric diarrhea en Mexico City. J Pediatr 1977;91:65-8.
9. Pickering LK, Evans DJ, Muñoz O, et al. Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and Mexico. J Pediatr 1978;93:383-8.
10. Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, et al. Pediatric viral gastroenteritis during eight years of study. J Clin Microbiol 1983;18:71-8.
11. Hjelt K, Krasilnikoff PA, Grauballe PC, et al. Nosocomial acute gastroenteritis in a paediatric department, with special reference to rotavirus infections. Acta Paediatr Scand 1985;74:89-95.
12. Hjelt K, Krasilnikoff PA, Grauballe PC, et al. Clinical features in hospitalized children with acute gastroenteritis. Does the rotavirus syndrome exist ?. Acta Paediatr Scand 1985;74:96-101.
13. Black RE, Merson MH, Huq I, et al. Incidence and severity of rotavirus and *Escherichia coli* diarrhoea in rural Bangladesh: Implications for vaccine development. Lancet 1981;1:141-3.
14. Black RE, Brown KH, Becker S, et al. Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. II. Incidence of diarrhea and association with known pathogens. Am J Epidemiol 1982;115:315-24.
15. Guerrant RL, Kirchoff LV, Shields DS, et al. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: Patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. J Infect Dis 1983;148:986-97.
16. Gurwith M, Wenman W, Hinde D, et al. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. J Infect Dis 1981;144:218-24.
17. Spencer HC. Diarrhea in non-hospitalized rural Salvadoran population: The role of enterotoxigenic *Escherichia coli* and rotavirus. Am J Trop Med Hyg 1980;29:246-53.

18. Mata L, Simhon A, Urrutia JJ, et al. Epidemiology of rotaviruses in a cohort of 45 Guatemalan mayan indian children observed from birth to the age of three years. *J Infect Dis* 1983;148:452-61.
19. Monto AS, Koopman JS. The Tecumseh study. XII. Enteric agents in the community, 1976-1981. *J Infect Dis* 1983;148:284-91.
20. Espejo RT, Calderón E, González N, et al. Rotavirus gastroenteritis in hospitalized infants and young children in Mexico City. *Rev Lat-amer Microbiol* 1978;20:239-46.
21. Muñoz O, Coello RP, Serafin AF, et al. Gastroenteritis infecciosa aguda. Etiología y su correlación con las manifestaciones clínicas y moco fecal. *Arch Invest Méd* 1979;10:135-45.
22. Ruiz-Gómez J, Alvarez MT, Silva AC, et al. Rotavirus. II. Virus relacionados con la gastroenteritis aguda en el niño. *Arch Invest Med* 1981;12:133-40.
23. Espinosa-Larios E, Colorado-Dominguez J, Padilla-Fierro R, et al. Frecuencia de gastroenteritis infecciosa aguda por rotavirus en niños de diversas poblaciones de la República Mexicana. *Bol Méd Hosp Infant Méx* 1983;40:188-91.
24. Alvarez-Muñoz MT, Ruiz-Gómez J, Palacios-Treviño J, et al. Frecuencia y tipos de rotavirus en relación con la edad de los pacientes y en las diferentes épocas del año. *Gac Méd Méx* 1983;119:330-3.
25. Ruiz-Palacios BR, Bojalil R y Male R. Characterization of seasonal patterns of enteropathogens in an endemic area. First step for a control program. American Society for Microbiology 87th annual meeting. Atlanta Ga. Abstract C-161, March 1987.
26. Cravioto A, Reyes RE, Ortega R, et al. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: Incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidem Inf* 1988;101:123-34
27. Konno T, Suzuki H, Katsushima N, et al. Influence of temperature and relative humidity on human rotavirus infection in Japan. *J Infect Dis* 1983;147:125-8.
28. Pitson GA, Grimwood K, Coulson BS, et al. Comparison between children treated at home and those requiring hospital admission for rotavirus and other enteric pathogens associated with acute diarrhea in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol* 1986;24:395-9.
29. Shukry S, Zaki AM, DuPont HL, et al. Detection of enteropathogens in fatal and potentially fatal diarrhea in Cairo, Egypt. *J Clin Microbiol* 1986;24:959-62.
30. DeZoysa I, Feachem RG. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: Rotavirus and cholera immunization. *Bull WHO* 1985;63:569-83.
31. Simhon A. Virology of rotaviruses and the epidemiology of diarrhea caused by rotaviruses. *Bol Of Sanit Panam* 1985;98:295-310.
32. Kraft LM. Observations on the control and natural history of epidemic diarrhea of infant mice. *Yale J Biol Med* 1958;31:121-37.
33. Kapikian AZ, Yolken RH, Greenberg HB, et al. Gastroenteritis viruses. In: Lennette EH y Schmidt NJ, eds. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*. Washington, DC., American Public Health Association, 1979, pp.927-95.
34. Pickering LK. Rotaviruses infection. *Pediatr Infect Dis* 1985;4(3 Suppl):S2-6.
35. Bartlett AV, Bednarz-Prashad AJ, DuPont HL y Pickering LK. Rotavirus gastroenteritis. *Ann Rev Med* 1987;38:399-415.

36. Kapikian AZ, Flores J, Hoshino Y, et al. Prospects for development of a rotavirus vaccine against rotavirus diarrhea in infants and young children. *Rev Infect Dis* 1989;11(3 Suppl):S539-46.
37. World Health Organization. Nomenclature of human rotaviruses: Designation of subgroups and serotypes. *Bull WHO* 1984;62:501-3.
38. Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HB, et al. Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J Infect Dis* 1984;149:694-702.
39. Riepenhoff-Talty M, Lee PC, Carmody RJ, et al. Age-dependent rotavirus-enterocyte interactions. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982;170:146-54.
40. Snodgrass DR, Angus KW y Gray EW. Rotavirus infection in lambs: Pathogenesis and pathology. *Arch Virol* 1977;55:263-74.
41. Holmes IH, Ruck BJ, Bishop RF y Davidson GP. Infantile enteritis viruses: Morphogenesis and morphology. *J Virol* 1975;16:937-43.
42. Esparza J, Gorziglia M, Gil F y Romero H. Multiplication of human rotavirus in cultured cells: An electron microscopic study. *J Gen Virol* 1980;47:461-72.
43. Davidson GP y Barnes GL. Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis. *Acta Paediatr Scand* 1979;68:181-6.
44. Kerzner B, Kelly MH, Gall DG, et al. Transmissible gastroenteritis: sodium transport in the intestinal epithelium during the course of viral enteritis. *Gastroenterology* 1977;72:457-61.
45. Sack DA, Chowdhury AMAK, Eusof A, et al. Oral rehydration in rotavirus diarrhoea: A double blind comparison of sucrose with glucose electrolyte solution. *Lancet* 1978;2:280-3.
46. Sinnott JT, Cancio MR. Rotavirus. *Infection Control* 1987;8:519-21.
47. Carlson JA, Middleton PJ, Szymanski MT, et al. Fatal rotavirus gastroenteritis. *Am J Dis Child* 1978;132:477-9.
48. Simhon A, Mata L, Vives M, et al. Low endemicity and low pathogenicity of rotaviruses among rural children in Costa Rica. *J Infect Dis* 1985;152:1134-42.
49. Wenman WM, Hinde D, Feltham S y Gurwith M. Rotavirus infection in adults. Results of a prospective family study. *N Engl J Med* 1979;301:303-6.
50. Totterdell BM, Chrystie IL y Banatvala JE. Rotavirus infections in a maternity unit. *Arch Dis Child* 1976;51:924-8.
51. Murphy AM, Albery MB y Crewe EV. Rotavirus infections of neonates. *Lancet* 1977;2:1149-50.
52. Chrystie IL, Totterdell BM y Banatvala JE. Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. *Lancet* 1978;1:1176-8.
53. Rodriguez WJ, Kim HW, Brandt CD, et al. Rotavirus: A cause of nosocomial infection in the nursery. *J Pediatr* 1982;101:274-7.
54. Grillner L, Broberger U, Chrystie I y Ransjö U. Rotavirus infections in newborns: An epidemiological and clinical study. *Scand J Infect Dis* 1985;17:349-55.
55. Tufvesson B, Polberger S, Svanberg L y Sveger T. A prospective study of rotavirus infections in neonatal and maternity wards. *Acta Paediatr Scand* 1986;75:211-5.
56. Pérez-Schael I, Daoud G, White L, et al. Rotavirus shedding by newborn children. *J Med Virol* 1984;14:127-36.

57. Al-Frayh AR, Ramia S, Bakir TM y Zaidi MA. Rotavirus shedding by neonates and possible modes of transmission. *J Trop Pediatr* 1987;33:246-8
58. Dean AG, Bowden DK, Easa D, et al. Rotavirus in newborn nurseries: Negative results from Honolulu and the New Hebrides. *Hawaii Med J* 1980;39:170-1.
59. Soemarto Y, Sebodo T, Ridho R, et al. Acute diarrhea and rotavirus infection in newborn babies and children in Yogyakarta, Indonesia, from June 1978 to June 1979. *J Clin Microbiol* 1981;14:123-9.
60. Saha MR, Bhattacharya SK, Mukherjee AK, et al. Prevalence of rotavirus infection among neonates in Calcutta. *Indian J Med Res* 1984;80:620-2.
61. Spencer E, Araya M, Sandino AM, et al. Faecal excretion of rotavirus and other enteropathogens in newborns of the high and low socio-economic stratum in Santiago, Chile. *Epidem Inf* 1988;101:425-36.
62. Steinhoff MC y Gerber MA. Rotavirus infection of neonates. *Lancet* 1978;1:775.
63. Appleton H, Buckley M, Robertson MH, et al. A search for faecal viruses in new-born and other infants. *J Hyg* 1978;81:279.
64. Champsaur H, Questiaux E, Prevot J, et al. Rotavirus carriage, asymptomatic infection, and disease in the first two years of life. I. Virus shedding. *J Infect Dis* 1984;149:667-74.
65. Dearlove J, Latham P, Dearlove B, et al. Clinical range of neonatal rotavirus gastroenteritis. *Brit Med J* 1983;286:1473-5.
66. Rotbart HA, Levin MJ, Yolken RH, et al. An outbreak of rotavirus-associated neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1983;103:454-9.
67. Rotbart HA, Nelson WL, Glode MP, et al. Neonatal rotavirus-associated necrotizing enterocolitis: Case control study and prospective surveillance during an outbreak. *J Pediatr* 1988;112:87-93.
68. Bishop RF, Cameron DJ, Veenstra AA y Barnes GL. Diarrhea and rotavirus infection associated with differing regimens for postnatal care of newborn babies. *J Clin Microbiol* 1979;9:525-9.
69. Konno T, Suzuki H, Imai A y Ishida N. Reovirus-like agent in acute epidemic gastroenteritis in Japanese infants: Fecal shedding and serologic response. *J Infect Dis* 1977;135:259-66.
70. Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, et al. Oral administration of human rotavirus to volunteers: Induction of illness and correlates of resistance. *J Infect Dis* 1983;147:95-106.
71. Pickering LK, Bartlett AV, Reves RR y Morrow A. Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers. *J Pediatr* 1988;112:361-5.
72. Vesikari T, Sarkkinen HK y Maki M. Quantitative aspects of rotavirus excretion in childhood. *Acta Pediatr Scand* 1981;70:717-21.
73. Saulsbury FT, Winkelstein JA y Yolken RH. Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. *J Pediatr* 1980;97:61-5.
74. Pickering LK, Evans DG, DuPont HL, et al. Diarrhea due to shigella, rotavirus and giardia in day care centers. Prospective study. *J Pediatr* 1981;99:51-6.
75. Yolken RH, Wyatt RG, Zissis G, et al. Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *N Engl J Med* 1978;299:1156-61.

76. Brandt CD, Kim HW, Yolken RH, et al. Comparative epidemiology of two rotavirus serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis. *Am J Epidemiol* 1979;110:243-54.
77. Uhnoo I y Svensson L. Clinical and epidemiological features of acute infantile gastroenteritis associated with human rotavirus subgroups 1 and 2. *J Clin Microbiol* 1986;23:551-5.
78. Steele AD, Bos P y Alexander JJ. Clinical features of acute infantile gastroenteritis associated with human rotavirus subgroups I and II. *J Clin Microbiol* 1988;26:2647-9.
79. Santosham M, Yolken RH, Quiroz E, et al. Detection of rotavirus in respiratory secretions of children pneumonia. *J Pediatr* 1983;103:583-5.
80. Cukor G y Blacklow NR. Human viral gastroenteritis. *Microbiol Rev* 1984;48:157-79.
81. Martín ML y Palmer EL. Electron microscopic identification of rotavirus group antigen with gold-labelled monoclonal IgG. *Arch Virol* 1983;78:279-85.
82. Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, et al. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1975;1:242-5.
83. Birch CJ, Lehmann NI, Mowher AJ, et al. Comparison of electron microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay, solid phase radioimmunoassay, and indirect immunofluorescence for detection of human rotavirus in feces. *J Clin Pathol* 1979;32:700-5.
84. Grauballe PC, Vestergaard BF, Meyling A y Genner J. Optimized enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human and bovine rotavirus in stools: Comparison with electron-microscopy, immunoelectro-osmophoresis, and fluorescent antibody techniques. *J Med Virol* 1981;7:29-40.
85. Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, et al. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J Clin Microbiol* 1981;13:976-81.
86. Alvarez-Muñoz MT, Guiscafre-Gallardo JP, Mondragón-Sánchez C, et al. Comparación de las técnicas de electroforesis del RNA viral. ELISA y fijación de complemento con la microscopía electrónica para demostrar rotavirus. *Arch Invest Méd* 1982;13:145-50.
87. Kok TW y Burrell CJ. Comparison of five enzyme immunoassays, electron microscopy, and latex agglutination for detection of rotavirus in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1989;27:364-6.
88. Miotti PG, Eiden J y Yolken RH. Comparative efficiency of commercial immunoassays for the diagnosis of rotavirus gastroenteritis during the course of infection. *J Clin Microbiol* 1985;22:693-8.
89. Knisley CV, Bednarz-Prashad J y Pickering LK. Detection of rotavirus in stool specimens with monoclonal and polyclonal antibody-based assay systems. *J Clin Microbiol* 1986;23:897-900.
90. Thomas EE, Puterman ML, Kawano E y Curran M. Evaluation of seven immunoassays for detection of rotavirus in pediatric stool samples. *J Clin Microbiol* 1988;26:1189-93.
91. Thouless ME, Beundo GM y Flewett TH. Serotyping and subgrouping of rotavirus strains by the ELISA test. *Arch Virol* 1982;73:219-30.
92. Shaw RD, Stoner-Ma DL, Estes MK y Greenberg HB. Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. *J Clin Microbiol* 1985;22:286-91.

93. Coulson BS, Unicomb LE, Pitson GA y Bishop RF. Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 1987;25:509-15.
94. Taniguchi K, Urasawa T, Morita Y, et al. Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-,2-,3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP7. *J Infect Dis* 1987;155:1159-66.
95. Gerna G, Sarasini A, Coulson BS, et al. Comparative sensitivities of solid-phase immune electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay for serotyping of human rotavirus strains with neutralizing monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1988;26:1383-7.
96. Unicomb LE, Coulson BS y Bishop RF. Experience with an enzyme immunoassay for serotyping human group A rotaviruses. *J Clin Microbiol* 1989;27:586-8.
97. Espejo R, Romero P, Calderón E y González N. Diagnóstico de rotavirus por electroforesis del RNA viral. *Bol Méd Hosp Infant* 1978;35:323-31.
98. Kasempimolporn S, Louisirirotehanakul S, Sinarachatanant P y Wasi C. Polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining for detection of rotavirus in stools from diarrheic patients in Thailand. *J Clin Microbiol* 1988;26:158-60.
99. Pacini DL, Brady MT, Budde CT, et al. Polyacrylamide gel electrophoresis of RNA compared with polyclonal-and monoclonal-antibody-based enzyme immunoassays for rotavirus. *J Clin Microbiol* 1988;26:194-7.
100. Beards GM. Polymorphism of genomic RNAs within rotavirus serotypes and subgroups. *Arch Virol* 1982;74:65-70.
101. Green KY, Sears JF, Taniguchi K, et al. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. *J Virol* 1988;62:1819-23.
102. Sethabutr O, Unicomb LE, Holmes IH, et al. Serotyping of human group A rotavirus with oligonucleotide probes. *J Infect Dis* 1990;162:368-72.
103. Wyatt RG, James WD, Bohl EH, et al. Human rotavirus type 2: Cultivation *in vitro*. *Science* 1980;207:189-91.
104. Sato K, Inaba Y, Shinosaki T, et al. Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Arch Virol* 1981;69:155-60.
105. Urasawa T, Urasawa S y Taniguchi K. Sequential passages of human rotavirus in MA-104 cells. *Microbiol Immunol* 1981;25:1025-35.
106. Wyatt RG, James HD, Pittman AL, et al. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J Clin Microbiol* 1983;18:310-7.
107. Ward RL, Bernstein DI, Young EC, et al. Human rotavirus studies in volunteers: Determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis* 1986;154:871-80.
108. Foster SO, Palmer EL, Gary GW, et al. Gastroenteritis due to rotavirus in an isolated pacific island group: An epidemic of 3,439 cases. *J Infect Dis* 1980;141:32-9.
109. Gurwith M, Wenman W, Gurwith D, et al. Diarrhea among infants and young children in Canada: A longitudinal study in three northern communities. *J Infect Dis* 1983;147:685-92.
110. Pickering LK, Bartlett AV y Woodward WE. Acute infectious diarrhea among children in day care: Epidemiology and control. *Rev Infect Dis* 1986;8:539-47.

111. Bartlett AV, Reves RR y Pickering LK. Rotavirus in infant- toddler day care centers: Epidemiology relevant to disease control strategies. *J Pediatr* 1988;113:435-41.
112. Denachy PH y Peter G. Risk factors associated with nosocomial rotavirus infection. *Am J Dis Child* 1985;139:935-9.
113. Hopkins RS, Gaspard GB, Williams FPI, et al. A community waterborne gastroenteritis outbreak: Evidence for rotavirus as the agent. *Am J Public Health* 1984;74:263-5.
114. Santosham M, Yolken RH, Wyatt RG, et al. Epidemiology of rotavirus diarrhea in a prospectively monitored american indian population. *J Infect Dis* 1985;152:778-83.
115. Linhares AC, Pinheiro FP, Freitas RB, et al. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune isolated south american indian community. *Am J Epidemiol* 1981;113:703-10.
116. Cubbit WD y Holzel H. An outbreak of rotavirus infection in a long stay ward of a geriatric hospital. *J Clin Pathol* 1980;33:306-8.
117. Hildreth C, Thomas M y Ridgeway GL. Rotavirus infection in an obstetric hospital. *Br Med J* 1981;282:231.
118. Konno T, Suzuki H, Imai A, et al. A long-term survey of rotavirus infection in Japanese children with acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 1978;138:569-76.
119. Hieber JP, Shelton S, Nelson JD, et al. Comparison of human rotavirus disease in tropical and temperate settings. *Am J Dis Child* 1978;132:853-8.
120. Wyatt RG, Yolken RH, Urrutia JJ, et al. Diarrhea associated with rotavirus in rural Guatemala: A longitudinal study of 24 infants and young children. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28:325-8.
121. Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, et al. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidem Inf* 1989;102:129-45.
122. Grinstein S, Gómez JA, Bercovich JA y Biscott EL. Epidemiology of rotavirus infection and gastroenteritis in prospectively monitored Argentine families with young children. *Am J Epidemiol* 1989;130:300-8.
123. Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WI, et al. Rotavirus gastroenteritis and weather. *J Clin Microbiol* 1982;16:478-82.
124. Rodriguez WI, Kim HW, Brandt CD, et al. Longitudinal study of rotavirus infection and gastroenteritis in families served by a pediatric medical practice: Clinical and epidemiologic observations. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:170-6.
125. Oyejide CO y Faghani AH. An epidemiological study of rotavirus diarrhoea in a cohort of Nigerian infants: II. Incidence of diarrhoea in the first two years of life. *Int J Epidemiol* 1988;17:908-12.
126. Centers for Disease Control. Viral agents of gastroenteritis: Public health importance and outbreak management. *MMWR* 1990;39:1-24.
127. Hung T, Chen G, Wang C, et al. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet* 1984;1:1139-42.
128. Fang ZY, Ye Q, Ho MS, et al. Investigation of an outbreak of adult diarrhea rotavirus in China. *J Infect Dis* 1989;160:948-53.
129. Peñaranda ME, Cubitt WD, Sinarachatanan P, et al. Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. *J Infect Dis* 1989;160:392-7.

130. Black RE, Merson MH, Taylor PR, et al. Glucose versus sucrose in oral rehydration solutions for infants and young children with rotavirus associated diarrhea. *Pediatrics* 1981;67:79-83.
131. Santosham M, Daum RS, Dillman L, et al. Oral rehydration therapy of infantile diarrhea. *N Engl J Med* 1982;306:1070-6.
132. Barnes GL, Doyle LW, Hewson PH, et al. A randomized trial of oral gammaglobulin in low-birth-weight infants infected with rotavirus. *Lancet* 1982;1:1371-3.
133. Feachem RG y Koblinsky MA. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: Promotion of breast-feeding. *Bull WHO* 1984;62:271-91.
134. McLean B y Holmes IH. Transfer of antirotaviral antibodies from mothers to their infants. *J Clin Microbiol* 1980;12:320-5.
135. Hjelt K, Grauballe PC, Nielsen OII, et al. Rotavirus antibodies in the mother and her breast-fed infant. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985;4:414-20.
136. Glass RI y Stoll BJ. The protective effect of human milk against diarrhea. A review of studies from Bangladesh. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989;351:131-6.
137. Glass RI, Stoll BJ, Wyatt RG, et al. Observations questioning a protective role for breast-feeding in severe rotavirus diarrhea. *Acta Paediatr Scand* 1986;75:713-8.
138. Duffy LC, Byers TE, Riepenhoff-Talty M, et al. The effects of infant feeding on rotavirus-induced gastroenteritis: A prospective study. *Am J Public Health* 1986;76:259-63.
139. World Health Organization. Programme for control of diarrhoeal diseases. Document WHO/CDD/88.28, 1988.
140. World Health Organization. Programme for control of diarrhoeal diseases. Document WHO/CDD/RES/89.11, 1989.
141. World Health Organization. Programme for control of diarrhoeal diseases. Document WHO/CDD/90.34, 1990.
142. Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, et al. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet* 1984;1:977-81.
143. Vesikari T, Isolauri E, Delem A, et al. Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic. *J Pediatr* 1985;107:189-94.
144. De Moy P, Zissis G, Butzler JP, et al. Failure of live, attenuated oral rotavirus vaccine. *Lancet* 1986;2:108.
145. Hanlon P, Hanlon L, Marsh V, et al. Trial of an attenuated bovine rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. *Lancet* 1987;2:1342-5.
146. Lanata CF, Black RE, Del Aguila R, et al. Protection of Peruvian children against rotavirus diarrhea of specific serotypes by one, two, or three doses of the RIT 4237 attenuated bovine rotavirus vaccine. *J Infect Dis* 1989;159:452-9.
147. Clark HF, Borian FE, Bell LM, et al. Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season. *J Infect Dis* 1988;158:570-87.
148. Gøthefors L, Wadell G, Juto P, et al. Prolonged efficacy of rhesus rotavirus vaccine in Swedish children. *J Infect Dis* 1989;159:753-7.

149. Vesikari T, Rautanen T, Varis T, et al. Rhesus rotavirus candidate vaccine. *Am J Dis Child* 1990;144:285-9.
150. Christy C, Madore HP, Pichichero ME, et al. Field trial of rhesus rotavirus vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis* 1988;7:645-50.
151. Flores J, Pérez-Schaef I, González M, et al. Protection against severe rotavirus diarrhoea by rhesus rotavirus vaccine in Venezuelan infants. *Lancet* 1987;1:882-4.
152. Glass RI. Are rotavirus vaccines coming of age? *J Diarrhoeal Dis Res* 1988;6:183-7.
153. Yolken RH, Wyatt RG, Kim HW, et al. Immunological response to infection with human reovirus-like agent: Measurement of anti-human reovirus-like agent immunoglobulin G and M levels by the method of Enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* 1978;19:540-6.
154. Riepenhoff-Talty M, Bogger-Goren S, Li P, et al. Development of serum and intestinal antibody response to rotavirus after naturally acquired rotavirus infection in man. *J Med Virol* 1981;8:215-22.
155. Davidson GP, Hogg RJ y Kirubakaran CP. Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. *Infect Immun* 1983;40:447-52.
156. Hjelt K, Grauballe PC, Schiotz PO, et al. Intestinal and serum immune response to a naturally acquired rotavirus gastroenteritis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985;4:60-6.
157. Grauballe PC, Hjelt K, Krasilnikoff PA, et al. ELISA for rotavirus-specific secretory IgA in human sera. *Lancet* 1981;2:588-9.
158. Riepenhoff-Talty M. Local and systemic antibody response to rotavirus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986;5:167-170.
159. Martin ML, Gary GW y Palmer EL. Comparison of hemagglutination-inhibition, complement fixation and enzyme linked immunosorbent assay for quantitation of human rotavirus antibodies. *Arch Virol* 1979;62:131.
160. McLean B, Sonza S y Holmes IH. Measurement of immunoglobulin A, G, and M class rotavirus antibodies in serum and mucosal secretions. *J Clin Microbiol* 1980;12:314-9.
161. Grimwood K, Lund JCS, Coulson BS, et al. Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children. *J Clin Microbiol* 1988;26:732-8.
162. Fonteyne J, Zissis G y Lambert JP. Recurrent rotavirus gastroenteritis. *Lancet* 1978;1:983.
163. Rodriguez WJ, Kim HW, Brandt CD, et al. Sequential enteric illnesses associated with different rotavirus serotypes. *Lancet* 1978;2:37.
164. Simhon A, Chrystie IL, Totterdell BM, et al. Sequential rotavirus diarrhoea caused by virus of same subgroup. *Lancet* 1981;2:1174.
165. Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB y Mascarenhas JDP. Reinfections and rotavirus serotypes in Belém, Brazil (preliminary report). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1988;30:101-6.
166. Friedman MG, Galil A, Sarov B, et al. Two sequential outbreaks of rotavirus gastroenteritis: Evidence for symptomatic and asymptomatic reinfections. *J Infect Dis* 1988;158:814-22.

167. Black RE, Greenberg HB, Kapikian AZ, et al. Acquisition of serum antibody to Norwalk virus and rotavirus and relation to diarrhea in a longitudinal study of young children in rural Bangladesh. *J Infect Dis* 1982;145:483-9.
168. Ryder RW, Singh N, Reeves WC, et al. Evidence of immunity induced by naturally acquired rotavirus and Norwalk virus infection on two remote Panamanian islands. *J Infect Dis* 1985;151:99-105.
169. Hjelt K, Grauballe PC, Paerregaard A, et al. Protective effect of preexisting rotavirus-specific immunoglobulin A against naturally acquired rotavirus infection in children. *J Med Virol* 1987;21:39-47.
170. Chiba S, Yokoyama T, Nakata S, et al. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet* 1986;2:417-21.
171. Zheng BJ, Lo SKF, Tam JSL, et al. Prospective study of community-acquired rotavirus infection. *J Clin Microbiol* 1989;27:2083-90.
172. Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E y Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med* 1983;309:72-6.
173. Georges-Courbot MC, Monges J, Beraud-Cassel AM, et al. Prospective longitudinal study of rotavirus infections in children from birth to two years of age in Central Africa. *Ann Inst Pasteur Virol* 1988;139:421-8.
174. Reves RR, Hossain MM, Midthun K, et al. An observational study of naturally acquired immunity to rotaviral diarrhea in a cohort of 363 Egyptian children. *Am J Epidemiol* 1989;130:981-8.
175. Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, et al. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am J Epidemiol* 1990;131:886-904.
176. Hamill PV, Drizd TA, Johnson CL, et al. Physical growth: National Center for Health Statistics percentiles. *Am J Clin Nutr* 1979;32:607-29.
177. Editorial. A measure of agreement on growth standards. *Lancet* 1984;1:142-3.
178. Gómez F. Desnutrición. *Bol Méd Hosp infant* 1946;3:543-51.
179. Ramos-Galván R. Somatometría pediátrica. *Arch Invest Méd* 1975;6,Sup 1:83-396.
180. Graham GG, MacLean WC, Kallman CH, et al. Growth standards for poor urban children in nutrition studies. *Am J Clin Nutr* 1979;32:703-10.
181. Bronfman M, Guiscafré H, Castro V, et al. II. La medición de la desigualdad: una estrategia metodológica, análisis de las características socioeconómicas de la muestra. *Arch Invest Méd* 1988;19:351-60.
182. Calva JJ, Velázquez FR, Guerrero ML y Villa A. Development of an instrument to classify children at different risk for diarrhea in the community. Abstract 6, VIIIth Annual Meeting of the International Clinical Epidemiology Network. Enero 20- 26, 1990. Puebla, México.
183. Calva JJ, Velázquez FR, Guerrero ML y Villa A. Development of an instrument to classify children at different risk for diarrhea in the community. Abstract 197, XIIth Scientific Meeting of the International Epidemiological Association. Agosto 5-9, 1990. Los Angeles, California, USA.

184. Calva JJ, Velázquez FR, Guerrero ML y Ruiz-Palcios GM. Does breast-feeding protect infants against diarrheal diseases ?. Abstract, IXth Annual Meeting of the International Clinical Epidemiology Network. Enero 20-25, 1991. Mombasa. Kenya.
185. Flewett TH, Arias CF, Avendaño LF, et al. Comparative evaluation of the WHO and DAKOPATTS enzyme-linked immunoassay kits for rotavirus detection. Bull WHO 1989;67:369-74.
186. Svennerholm A-M, Wiklund G. Rapid GM1-enzyme-linked- immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J Clin Microbiol 1983;17:596-600.
187. Svennerholm A-M, Wikström M, Lindblad M y Holmgren J. Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* heat-stable toxin (STa) and their use in a diagnostic ST ganglioside GM1- enzyme-linked-immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1986;24:585-90.
188. Ewing WH, Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co. 1986.
189. Morris GK, Patton CM. Campylobacter. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, et al. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1985;302-8.
190. Kahn HA. An introduction to epidemiological methods. New York Oxford, Oxford University Press, 1983.
191. Gardner MJ, Altman DG. Confidence intervals rather than P values: Estimation rather than hypothesis testing. Br Med J 1986;292:746-750.
192. Department of Clinical Epidemiology and Biostatistics, McMaster University. How to read clinical journals: III. To learn the clinical course and prognosis of disease. Can Med Assoc J 1981;124:869-72.
193. LeBaron CW, Lew J, Glass RI, et al. Annual rotavirus epidemic patterns in North America JAMA 1990;264:983-8
194. Blacklow NR y Greenberg HB. Viral gastroenteritis. N Engl J Med 1991;325:252-64.
195. Birch CJ, Heath RL y Gust ID. Use of serotype-specific monoclonal antibodies to study the epidemiology of rotavirus infection. J Med Virol 1988;24:45-53.
196. Georges-Courbot MC, Beraud AM, Beards GM, et al. Subgroups, serotypes, and electrophoretotypes of rotavirus isolated from children in Bangui, Central Africa. J Clin Microbiol 1988;26:668-71.
197. Flores J, Taniguchi K, Green K, et al. Relative frequencies of rotavirus serotypes 1,2,3, and 4 in Venezuelan infants with gastroenteritis. J Clin Microbiol 1988;26:2092-5.
198. Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JDP, et al. Epidemiology of rotavirus subgroups and serotypes in Belem, Brazil: A three year study. Ann Inst Pasteur Virol 1988;139:89-99.
199. Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N, et al. Occurrence of changes in human rotavirus serotypes with concurrent changes in genomic RNA electrophoretotypes. J Clin Microbiol 1988;26:2586-92.
200. Gerna G, Sarasini A, Arista S, et al. Prevalence of human rotavirus serotypes in some european countries 1981-1988. Scand J Infect Dis 1990;22:5-10.

201. Gouvea V, Ho M, Glass RI, et al. Serotypes and electropherotypes of human rotavirus in the USA: 1987-1989. *J Infect Dis* 1990;162:362-7.
202. Zheng BJ, Lam WP, Yan YK, et al. Direct identification of serotypes of natural human rotavirus isolates by hybridization using cDNA probes derived from segment 9 of the rotavirus genome. *J Clin Microbiol* 1989;27:552-7.
203. Urasawa S, Urasawa T, Taniguchi K, et al. Survey of human serotypes in different locales in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1989;160:44-51.
204. Padilla-Noriega L, Arias CF, López S, et al. Diversity of rotavirus serotypes in mexican infants with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1990;28:1114-9.
205. McLean BS y Holmes IH. Effects of antibodies, trypsin, and trypsin inhibitors on susceptibility of neonates to rotavirus infection. *J Clin Microbiol* 1981;13:22-9.
206. Totterdell BM, Chrystie IL y Banatvala JE. Cord blood and breast-milk antibodies in neonatal rotavirus infection. *Br Med J* 1980;1:828-30.
207. Weinberg RJ, Tipton G, Klish WJ, et al. Effect of breast-feeding on morbidity in rotavirus gastroenteritis. *Pediatrics* 1984;74:250-3.
208. Gomwalk NE, Gusham LT, Umoh UJ. Rotavirus gastroenteritis in pediatric diarrhoea in Jos, Nigeria. *J Trop Pediatr* 1990;36:52-5.
209. Dutta SR, Khalfan SA, Baig BH, et al. Epidemiology of rotavirus diarrhoea in children under five years in Bahrain. *Int J Epidemiol* 1990;19:722-7.
210. Ingram DD y Kleinman JC. Empirical comparisons of proportional hazards and logistic regression models. *Stat Med* 1989;8:525-38.
211. Ruuska T, Vesikari T, Delem A, et al. Evaluation of RIT 4237 bovine rotavirus vaccine in newborn infants: correlation of vaccine efficacy to season of birth in relation to rotavirus epidemic period. *Scand J Infect Dis* 1990;22:269-78.
212. Pichichero ME. Effect of breast-feeding on oral thesus rotavirus vaccine seroconversion: a metaanalysis. *J Infect Dis* 1990;162:753-5.

XI. ANEXOS

A N E X O 1

A CADA MADRE SE LE PEDIRÁ QUE FIRME LA SIGUIENTE HOJA DE
CONSENTIMIENTO

"ESTUDIO SOBRE EL EFECTO PROTECTOR DE UNA INFECCION
TEMPRANA POR ROTAVIRUS"

Sabía Usted que en México la causa más frecuente de muerte en niños menores de dos años es la diarrea?

Esto es debido a que no se toman las medidas higiénicas adecuadas en el cuidado de los niños o bien, por no proporcionarles la atención y tratamiento de manera oportuna.

Las enfermedades gastrointestinales (diarrea), son ocasionadas por diversos gérmenes (microbios). La frecuencia de los gérmenes es diferente según la época del año.

Este estudio se ha planeado para conocer el tipo de infecciones gastrointestinales que ocurren en la comunidad de San Pedro Mártir y San Andrés Totoltepec. También, para entender mejor la manera en que usted proteje a su hijo al alimentarlo al pecho.

Esta información que se obtenga puede ser muy útil para planear mejor los programas en su comunidad y evitar que los niños se enfermen gravemente de diarrea.

Si Usted ingresa al estudio se le pedirá:

- 1.- Recibir la visita de una trabajadora de campo y proporcionar información acerca de la salud y alimentación de su niño.
- 2.- Una muestra fecal cada semana.
- 3.- 5 ml. de sangre de cordón umbilical (de la placenta) al momento del nacimiento.
- 4.- 1 ml. de sangre del niño cada 4 meses durante el tiempo que dure en el estudio.
- 5.- Cada vez que el niño tenga diarrea, una nueva muestra de materia fecal.
- 6.- Si Usted brinda pecho a su hijo, una muestra de leche cada semana durante el primer mes, y posteriormente cada mes mientras dure la lactancia.

Las muestras de materia fecal y de sangre se analizarán en el laboratorio y al tener los resultados se le indicará el tratamiento más apropiado para su hijo si así lo requiere.

A N E X O . 1

QUE BENEFICIOS OBTIENE USTED
AL INGRESAR AL ESTUDIO

- 1.- Una promotora social la visitará semanalmente para averiguar el estado de salud de su hijo, esto permitirá la detección de los casos de diarrea.
- 2.- Cuando su hijo tenga diarrea, usted podrá contar con la atención de un médico que la visitará en su domicilio e indicará los cuidados necesarios para su hijo.
- 3.- Los análisis de laboratorio para identificar la causa de la diarrea de su hijo se efectuarán sin costo alguno para usted.
- 4.- Cuando se tenga en existencia usted podrá contar con sobres de hidratación oral en forma gratuita.
- 5.- Se llevará a cabo una vigilancia cada 2 meses de su hijo, controlandose así su crecimiento y desarrollo en forma adecuada y gratuita. Usted podrá recibir la orientación necesaria para el manejo de su hijo.

A N E X O 1

A C E P T A C I O N

Estoy de acuerdo en participar en el estudio en forma voluntaria. Todas mis dudas con respecto al estudio han sido contestadas satisfactoriamente y entiendo que en cualquier momento puedo renunciar al mismo sin detrimento de la atención médica que necesitamos mi hijo ó yo. También se me ha informado de este estudio. Por último, entiendo que se me otorgará una copia de esta forma.

Dr. Guillermo Ruiz-Palacios
Jefe,
Departamento de Infectología
Instituto Nacional de la Nutrición
"Salvador Zubiran"

Firma del participante
Nombre del participante:

Firma del testigo

C-
M-
FPP-

Hospital

Fecha:



INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRAN"
HISTORIA CLÍNICA DE DIARREAS

ESTUDIO: _____ MEDICO: _____ NIÑO: _____

NOMBRE: _____ EDAD: _____

DOMICILIO: _____

NOMBRE DE LA MADRE: _____ FECHAS _____

PATRÓN USUAL DE EVACUACIONES EN 24 HRS.: _____ IDENTIFICACION: _____

REPORTADO POR PROMOTORA: (1)-SI LUGAR DE CONSULTA: (1)-CLÍNICA INICIO: _____
(2)-NO (2)-CASA (2)-TERMINO: _____

LA MADRE CONSIDERA (1)-SI DESENLACE: (1)-VIVO EVOLUCION: (1)-MANEJO EN CASA
QUE EL NIÑO TIENE (2)-NO (2)-MUERTO (2)-HOSPITALIZACION
DIARREA: _____

NUMERO DE DIAS CON VOMITOS: _____ NUMERO DE DIAS CON DIARREA: _____

EVALUACIONES		1ra	2da	3ra	4ta	5ta
1.- FECHA	(DD/MM/AA)					
2.- FIEBRE	(°C)					
3.- VOMITOS	(Num/24 Hrs.)					
4.- EVACUACIONES	(Num/24 Hrs.)					
5.- DESHIDRATACION	(1, 2, 3)					
6.- PUS	(1)-SI (2)-NO					
8.- SANGRE	(1)-SI (2)-NO					
9.- SINTOMAS RESPIRATORIOS	(1)-SI (2)-NO					
10.- CUALES:	(RINORREA, TOS U OTROS)					

MANEJO DE EPISODIOS ANTES DE LA VISITA:

ANTIDIARREICOS/ANTICOLIBERIGICOS	SI (1) NO (2)	CUAL: _____	DOSIS: _____
SOLUCION HIDRATANTE COMERCIAL	SI (1) NO (2)	CUAL: _____	_____
SOLUCION HIDRATANTE CASERA	SI (1) NO (2)	CUAL: _____	_____
SUSPENSION TOTAL DE ALIMENTOS	SI (1) NO (2)	TIEMPO: _____	HORAS _____
SUSPENSION DE ALGUNOS ALIMENTOS	SI (1) NO (2)	CUALES: _____	_____
ALIMENTACION AL SENO MATERNO	SI (1) NO (2)		
SE ADMINISTRARON ANTIBIOTICOS	SI (1) NO (2)		

llene anexo

SEÑALES Y SINTOMAS	1	2	3
1.- ASPECTO GENERAL	1.- SEDIENTO 2.- ALERTA 3.- INQUIETO	1.- SEDIENTO 2.- LETARGICO 3.- IRRITABLE AL TACTO	1.- SONNOLIENTO 2.- EXT. FRIAS, SUD. CIAN. 3.- CONATOSO
2.- FONTANELA ANTERIOR	NORMAL	DEFINIDAS	MUNDIDAS
3.- OJOS	PRESENTES	AUSENTES	AUSENTES
4.- LAGRIMAS	HUMEDAS	SECAS	MUY SECAS
5.- MUCOSA	RETRACCION NORMAL	RETRACCION LENTA	RETRACCION MUY LENTA
6.- ELASTICIDAD EN LA PIEL	NORMAL	ESCASA Y CONCENTRADA	ANURIA
7.- CRINA	FREQ. Y VOL. NORMAL	RAPIDO Y DEBIL	RAPIDO, DEBIL O IMPER.
8.- PULSO RADIAL	NORMAL	PROFUNDA Y RAPIDA	PROFUNDA Y RAPIDA
9.- RESPIRACION	NORMAL	NORMAL Y BAJA	< 30% HV. O. NO RES.
10.- TENSION ARTERIAL	NORMAL		

PRESCRIPCION DEL MEDICO DEL ESTUDIO

¿ HA TENIDO EL NIÑO CONVULSIONES (1)-SI (2)-NO ¿ EL NIÑO TIENE ANTECEDENTES (1)-SI (2)-NO
 ESTE PERIODO DE DIARREA ? (1)-SI (2)-NO DE CONVULSIONES PREVIAS ? (1)-SI (2)-NO

DESCRIBA EL EPISODIO: _____

SE ADMINISTRARON ANTIBIOTICOS (1)-SI (2)-NO CUAL: _____

SE ADMINISTRARON ANTIDIARREICOS (1)-SI (2)-NO CUAL: _____

SE ADMINISTRO REHIDRATACION (1)-SI (2)-NO CUALES: _____

ANEXO: ADMINISTRACION DE ANTIBIOTICOS (antes de la visita)

NOMBRE GENERICO: _____ NOMBRE COMERCIAL: _____
 DOSIS: _____ mg/Kg/día DIAS DE ADMINISTRACION: _____

¿ QUIEN LO PRESCRIBIO ?

MEDICO PARTICULAR	1		¿ TIENE RECETA ? (1)-SI (2)-NO
MEDICO DEL CENTRO DE SALUD	2		¿ TIENE RECETA ? (1)-SI (2)-NO
MEDICO DEL HOSPITAL ASISTEN.	3		¿ TIENE RECETA ? (1)-SI (2)-NO
FARMACEUTICO	4		
FAMILIAR O VECINO	5		
MADRE	6		
OTRO	7		

¿ EN QUE FARMACIA LO COMPRO ? (DIRECCION): _____
 ¿ LO COMPRO CON (1)-SI (2)-NO ¿ POR CUANTOS DIAS LO PRESCRIBIERON ? _____
 RECETA MEDICA ? (2)-NO

LABORATORIO

LEUCOS EN RECES: (1)-SI (2)-NO PH: _____

EXAMEN DIRECTO: (1)-SI (2)-NO RESULTADO: _____

COPROCVULTIVO: (1)-SI (2)-NO RESULTADO: _____

COPROPASITOSCOPICO: (1)-SI (2)-NO RESULTADO: _____

OTROS: _____

ANTROPOMETRIA PESO: _____ Kg. TALLA: _____ cm.

OBSERVACIONES: _____

A N E X O 4

- | | No se pudo
observar |
|--|------------------------|
| 14. Cuáles de los siguientes animales se encuentran dentro o fuera de la casa? | |
| (1) Perros | |
| (2) Gatos | |
| (3) Aves de corral | |
| (4) Cerdos | |
| (5) Otros (cuales _____) | |
| Alguno (1) Ninguno (3) | __ |
| 15. La habitación es un "cuarto redondo"? | |
| (1) Sí | |
| (3) No | __ |
| 16. Tiene un cuarto aparte para preparar los alimentos? | |
| (3) Sí | |
| (1) No | __ |
| 17. Existe una toma de agua dentro de la casa? | |
| (3) Sí | |
| (1) No | __ |

=====

NACIMIENTO DEL NIÑO

8. DONDE NACIO SU BEBE? (1) DOMICILIO PARTICULAR (2) CLINICA (3) HOSPITAL
 (4) OTROS (especifique) _____ (1 Y 4 pasar a P.14) !__!
 !__!_!
9. EN QUE TIPO DE CLINICA U HOSPITAL NACIO O FUE ATENDIDO? (especifique) el nombre)
 (1) INSS _____ (2) ISSSTE _____
 (3) H. MILITAR _____ (4) DDF _____
 (5) PRIVADO _____ (6) SSA _____ !__!
10. DURANTE SU ESTANCIA EN LA CLINICA U HOSPITAL EL BEBE ESTUVO EN? (puede haber mas de una opcion):
 (1) CUNERO (2) CUARTO DE LA MADRE (3) INCUBADORA
 (4) NO APLICABLE (5) SE IGNORA !__!_!
11. CUANTOS DIAS SE QUEDO EL BEBE EN EL HOSPITAL
 (1) MENOS DE 24 HRS. (2) 1 DIA (3) 1-2 DIAS
 (4) 3-5 DIAS (5) 6 O MAS DIAS !__!
12. CUANTOS DIAS SE QUEDO LA MAMA EN EL HOSPITAL?
 (1) MENOS DE 24 HRS (2) 1 DIA (3) 1-2 DIAS
 (4) 3-5 DIAS (5) 6 O MAS DIAS !__!

=====

ALIMENTACION DEL LACTANTE

13. DURANTE LAS PRIMERAS HORAS DESPUES DEL NACIMIENTO, QUE ALIMENTOS TOMO EL BEBE? (puede haber mas de una opcion)
 (1) CALOSTRO (2) AGUA CON AZUCAR (3) AGUA
 (4) BIBERON CON FORMULA (5) NO SABE !__!_!
14. DURANTE LOS PRIMEROS TRES DIAS DESPUES DEL NACIMIENTO, QUE LE DIO DE COMER O BEBER AL BEBE? (puede haber mas de una opcion)
- | | NUMERO DE VECES/DIA | CANTIDAD (ONZAS) |
|-------------------------------|---------------------|------------------|
| (1) LECHE MATERNA _____ | ! | ! |
| (2) BIBERON CON FORMULA _____ | ! | ! |
| (3) AGUA CON AZUCAR _____ | ! | ! |
| (4) JUGO _____ | ! | ! |
| (5) AGUA DE ARROZ _____ | ! | ! |
| (6) AGUA _____ | ! | ! |
| (7) TE _____ | ! | ! |
| (8) ALIMENTOS SOLIDOS _____ | ! | ! |
| (9) NO SABE _____ | ! | ! |

15. COMO LO ALIMENTA ACTUALMENTE? (puede haber mas de una opcion)

A N E X O 5

- (1) PECHO (2) BIBERON LECHE MATERNA (3) BIBERON FORMULA
 (4) BIBERON OTROS (especifique) _____ !__!__!__!
 (5) ALIMENTOS SOLIDOS _____ !__!__!__!
16. SI LE DA BIBERON, LO HIERVE ANTES DE DARSELO?
 (1) SIEMPRE (2) EN OCASIONES (3) NUNCA
 (4) NO SE APLICA !__!
17. HIERVE EL AGUA PARA PREPARAR EL ALIMENTO DEL BEBE (formula, te etc.)
 (1) SIEMPRE (2) EN OCASIONES (3) NUNCA
 (4) NO SE APLICA !__!
18. CUANTO TIEMPO HIERVE EL AGUA?
 (1) -DE 10 MIN (2) 10 A 20 MIN (3) + DE 20 MIN
 (4) NO SE APLICA !__!
19. SI LE DA PECHO: TIENE ALGUN PROBLEMA PARA LACTAR?
 (1) SI (2) NO (3) NO SE APLICA !__!
 !
 N!/
 QUE TIPO DE PROBLEMA? _____ !__!
20. SI NO LE DA PECHO TUVO ALGUN PROBLEMA PARA LACTAR?
 (1) SI (2) NO (3) NO SE APLICA !__!
 !
 N!/
 QUE TIPO DE PROBLEMA? _____ !__!
21. TUVO HIJOS PREVIOS A ESTE?
 (1) SI (2) NO (pasar a la P. 25) !__!
22. LES HA DADO PECHO A LO NIÑOS PREVIOS?
 (1) A TODOS (2) A ALGUNOS (3) A NINGUNO !__!
23. CUANTOS MESES LE DIO PECHO AL ULTIMO HIJO QUE ALIMENTO?
 !__!__!
24. ESTA TOMANDO ACTUALMENTE ALGUN MEDICAMENTO LA MAMA?
 (1) SI (2) NO !__!
 N!/
 CUAL MEDICAMENTO? _____
25. ESTA TOMANDO ACTUALMENTE ALGUN MEDICAMENTO EL BEBE?
 (1) SI (2) NO !__!
 N!/
 CUAL MEDICAMENTO? _____

=====

HERPES

A N E X O 5

26. ALGUNA VEZ LA MADRE HA TENIDO FUEGOS? (HERPES)
 (1) SI (2) NO !__!

27. EN LOS ULTIMOS DOCE MESES CUANTAS VECES TUVO FUEGOS? (HERPES) !__!

28. ALGUNA VEZ SU ESPOSO HA TENIDO FUEGOS? (HERPES)
 (1) SI (2) NO (3) NO SABE !__!
 (4) NO SE APLICA (pase a P 31)

29. EN LOS ULTIMOS DOCE MESES CUANTAS VECES TUVO FUEGOS EL ESPOSO? (HERPES)!__!

30. A PARTE DE USTED Y SU ESPOSO, ALGUIEN MAS DE LOS QUE VIVEN EN ESTA CASA
 HA TENIDO FUEGOS? (HERPES)
 (1) SI (2) NO (3) NO SABE (4) NO SE APLICA !__!

! /
 NOMBRES _____

=====

HACINAMIENTO, VIVIENDA E HIGIENE DE LA CASA

31. CUANTOS DORMITORIOS HAY EN LA CASA?
 (1) 1 DORMITORIO (2) 2 DORMITORIOS (3) 3 DORMITORIOS !__!
 (4) 4 O MAS DORMITORIOS

32. EXISTE ALGUNO QUE NO TENGA VENTANAS?
 (1) SI (2) NO (pase a la P 35) !__!
 ! /
 NOMBRES

33. CUANTOS DORMITORIOS?
 (1) 1 DORMITORIO (2) 2 DORNITORIOS (3) 3 DORMITORIOS !__!
 (4) 4 O MAS DORMITORIOS

34. CUANTAS PERSONAS DUERMEN EN ESTOS DORMITORIOS? !__!

35. CUANTAS PERSONAS DUERMEN EN EL MISMO CUARTO DEL BEBE? (aparte de el) !__!

36. CUANTAS PERSONAS DUERMEN EN LA MISMA CAMA DEL BEBE? (aparte de el) !__!

37. DE QUE MATERIAL ES EL PISO DE LA CASA?
 (1) MOSAICO (2) TIERRA (3) CEMENTO !__!
 (4) OTROS

38. DE QUE MATERIAL SON LAS PAREDES DE LA CASA?

A N E X O 5

- | | | |
|-------------------------|----------------------------|------------------------------|
| (1) CARTON
(4) ADOBE | (2) MADERA
(5) LADRILLO | (3) LAMINA DE METAL
! _ ! |
|-------------------------|----------------------------|------------------------------|
39. TIENE UN CUARTO APARTE PARA PREPARAR LOS ALIMENTOS?
- | | | |
|--------|--------|-------|
| (1) SI | (2) NO | ! _ ! |
|--------|--------|-------|
40. CUAL ES EL LUGAR EN DONDE LA MAYORIA DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA "VAN AL BAÑO"?
- | | | |
|----------------|-----------|--------------|
| (1) K.C. | (A) COMUN | (B) FAMILIAR |
| (2) LETRINA | | |
| (3) AIRE LIBRE | | ! _ ! _ ! |
41. COMO OBTIENE EL AGUA PARA SU USO EN CASA? (puede haber mas de una opcion)
- | | | |
|--------------------------------------|--|-----------|
| (1) ENTUBADA -TOMA INTRADOMICILIARIA | | |
| (2) ENTUBADA -TOMA EXTRADOMICILIARIA | | |
| (3) PIPA | | |
| (4) OTROS _____ | | ! _ ! _ ! |
42. COMO ALMACENA AL AGUA PARA BEBER O PREPARAR ALIMENTOS
- | | | |
|--|---------------------------------|-------|
| (1) NO LA ALMACENA | (2) RECIPIENTE SIEMPRE CUBIERTO | |
| (3) RECIPIENTE OCASIONALMENTE CUBIERTO | (4) RECIPIENTE NUNCA CUBIERTO | ! _ ! |
43. COMO ALMACENA EL AGUA PARA OTROS USOS? (puede haber mas de una opcion)
- | | | |
|--------------------|-------------------|-----------|
| (1) NO LA ALMACENA | (2) CISTERNA | |
| (3) TANCO CERRADO | (4) TANCO ABIERTO | |
| (5) PILETA | (6) OTROS _____ | ! _ ! _ ! |
44. PARA LAVARSE LAS MANOS, TIENE QUE SALIR DE LA CASA?
- | | | | |
|-------------|--------------------|-----------|-------|
| (1) SIEMPRE | (2) OCASIONALMENTE | (3) NUNCA | ! _ ! |
|-------------|--------------------|-----------|-------|
45. CON QUE FRECUENCIA BAÑA A SU BEBÉ?
- | | | |
|-------------------------|-----------------------|-------|
| (1) + DE UNA VEZ AL DIA | (2) UNA VEZ AL DIA | |
| (3) CADA DOS DIAS | (4) CADA 3 DIAS O MAS | ! _ ! |
46. HAY ALGUN RECIPIENTE ESPECIAL PARA COLOCAR LA BASURA DENTRO DE LA CASA?
- | | | |
|--------|------------------------|-------|
| (1) SI | (2) NO (pasar a P. 49) | ! _ ! |
|--------|------------------------|-------|
47. EL RECIPIENTE ESTA TAPADO?
- | | | | |
|-------------|--------------------|-----------|-------|
| (1) SIEMPRE | (2) OCASIONALMENTE | (3) NUNCA | ! _ ! |
|-------------|--------------------|-----------|-------|
48. HAY ALGUN LUGAR ESPECIAL PARA COLOCAR LA BASURA FUERA DE LA CASA?
- | | | |
|--------|------------------------|-------|
| (1) SI | (2) NO (pasar a P. 51) | ! _ ! |
|--------|------------------------|-------|
49. EL RECIPIENTE ESTA TAPADO
- | | | | |
|-------------|--------------------|-----------|-------|
| (1) SIEMPRE | (2) OCASIONALMENTE | (3) NUNCA | ! _ ! |
|-------------|--------------------|-----------|-------|

A N E X O 5

50. COMO DESECHA LA BASURA? (puede haber mas de una opcion)

- | | |
|-----------------------|---------------------------|
| (1) CAMION RECOLECTOR | (2) LA ENTIERRA |
| (3) LA QUEMA | (4) LA TIRA AL AIRE LIBRE |

!_!_!_!

=====

NIVEL EDUCACIONAL

51. LA MAMA SABE LEER Y ESCRIBIR?

- | | |
|--------|--------|
| (1) SI | (2) NO |
|--------|--------|

!_!

52. HASTA QUE NIVEL ESCOLAR ESTUDIO LA MAMA? (cuantos años)

- | | |
|-----------------|------------------|
| (1) NO ESTUDIO | (2) PRIMARIA |
| (3) SECUNDARIA | (4) PREPARATORIA |
| (5) PROFESIONAL | (6) TECNICO |

!_!_!

53. SABE LEER Y ESCRIBIR EL ESPOSO?

- | | | |
|--------|--------|-------------------------------|
| (1) SI | (2) NO | (3) NO SE APLICA (pasar P.56) |
|--------|--------|-------------------------------|

!_!

54. HASTA QUE NIVEL ESCOLAR ESTUDIO EL ESPOSO? (cuantos años)

- | | |
|-----------------|------------------|
| (1) NO ESTUDIO | (2) PRIMARIA |
| (3) SECUNDARIA | (4) PREPARATORIA |
| (5) PROFESIONAL | (6) TECNICO |

!_!_!

=====

NIVEL SOCIOECONOMICO

Identifique primeramente al jefe de familia, es decir a la persona que de el sosten principal a la familia.

55. CUAL ES EL SALARIO MENSUAL DEL JEFE DE FAMILIA? _____

- | | |
|------------------------|------------------------------|
| (1) NO ESPECIFICA | (2) MENOS DEL SALARIO MINIMO |
| (3) SALARIO MINIMO | (4) 1-2 SALARIO MINIMO |
| (5) 3-4 SALARIO MINIMO | (6) 5 O MAS SALARIO MINIMO |

!_!

56. EL SALARIO ES FIJO?

- | | |
|--------|--------|
| (1) SI | (2) NO |
|--------|--------|

!_!

57. DE CUANTO ES EL GASTO FAMILIAR POR SEMANA? (sin incluir la renta) _____

- | | | |
|--------------------|-------------------|-------------------|
| (1) 1-2 DIAS S.M. | (2) 3-4 DIAS S.M. | (3) 5-7 DIAS S.M. |
| (4) 8-10 DIAS S.M. | (5) 11 O MAS S.M. | |

!_!

58. CUAL ES LA OCUPACION DEL JEFE DE FAMILIA? (especifique la posicion y el lugar de trabajo y si es Militar el rango) _____ !_!_!

A N E X O 5

59. CUANTAS PERSONAS APARTE DEL JEFE DE FAMILIA APORTAN DINERO PARA EL GASTO FAMILIAR?

(1) NINGUNA (2) 1 PERSONA (3) 2 O MAS PERSONAS

60. LA MAMA TIENE ALGUN EMPLEO FUERA DE CASA?

(1) SI (2) NO (pasar a la P. 63)

R!/
R!

(A) FIJO (B) OCASIONAL !__!__!

61. CUAL ES LA ACTIVIDAD QUE REALIZA? (especifique la posicion y el lugar de trabajo) _____

=====

EXPOSICION EN HERMANOS

62. CUANTOS HIJOS MENORES DE 5 AÑOS ASISTEN REGULARMENTE A GUARDERIA?

(1) NINGUNO (2) 1 HIJO (3) 2-3 HIJOS

(4) 4 O MAS HIJOS !__!__!

=====

GRACIAS POR AYUDARNOS A RESOLVER ESTE CUESTIONARIO

ENTREVISTA COMPLETA: _____

ENTREVISTA INCOMPLETA: _____ ----> ESPECIFIQUE _____

A JUICIO DEL ENTREVISTADOR LA COOPERACION DE LA ENTREVISTADA FUE:

(1) BUENA (2) REGULAR (3) MALA

Y LA CALIDAD DE LA INFORMACION FUE:

(1) BUENA (2) REGULAR (3) MALA

A N E X O 6

ANEXO PAG. 2

9. QUIEN CUIDABA DEL NIÑO, MIENTRAS LA MADRE TRABAJABA?

- (1) FAMILIAR
- (2) NO FAMILIAR

! _ _ !

! _ _ !

10. DONDE SE CUIDABA AL NIÑO, MIENTRAS LA MADRE TRABAJABA?

- (1) EN LA CASA DE LA MADRE
- (2) EN OTRA CASA
- (3) GUARDERÍA O EQUIVALENTE
- (4) OTRO CUAL? _____

! _ _ !

! _ _ !