

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS



“Epidemiología molecular de virus entéricos asociados con gastroenteritis en niños menores de cinco años en Tegucigalpa, Honduras”

TESIS SUSTENTADA POR:

JOSÉ JAFET ORTIZ QUINTERO

**PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**

TEGUCIGALPA M.D.C.

JUNIO 2012

HONDURAS C. A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA

JULIETA CASTELLANOS, M.Sc.

VICERRECTORA ACADÉMICA

RUTILIA CALDERÓN, Ph.D.

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

OLGA MARINA JOYA, Ph.D.

DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

MIRNA MARÍN, Ph.D.

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

MARITZA CANALES GIRÓN, M.Sc.

TEGUCIGALPA, M.D.C.

JUNIO 2012

HONDURAS C. A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

ASESOR DE TESIS

ANNABELLE FERRERA, Ph.D.

TERNA EXAMINADORA:

ANNABELLE FERRERA, Ph.D.

MARIBEL RIVERA, M.D.

FÉLIX ESPINOZA, Ph.D.

TEGUCIGALPA, M.D.C.

JUNIO 2012

HONDURAS C. A.

UDI-DEGT-UNAH

Esta tesis es dedicada a mi familia:

A mis padres, Arturo Ortiz y Benilda Quintero

A mis hermanos, Jasmin y Josael

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer primeramente a Dios por brindarme esta oportunidad, por darme sabiduría para poder finalizar con éxito este proyecto y por su gran misericordia y cuidados hacia mi persona.

Agradezco también muy especialmente a la **Dra. Annabelle Ferrera**, mi asesora de tesis, por sus consejos y constante apoyo en la ejecución de este proyecto de tesis.

Al equipo Teasdale-Corti Honduras-Canadá, **Dra. Ana Sánchez, Dra. Lourdes Enríquez, Dra. Maritza Canales, Dr. Gustavo Fontecha, Dra. Ada Zelaya, Dra. Vilma Espinoza y Dra. Doris Quan** por sus invaluable consejos, recomendaciones y palabras de ánimos que contribuyeron grandemente al desarrollo de esta investigación.

Agradezco también al **Dr. José Paulo G. Leite** y al equipo del Laboratorio de Virología Comparada del Instituto Fiocruz, por brindarme entrenamiento en técnicas de diagnóstico molecular de virus entéricos, lo cual fue fundamental para el desarrollo de esta tesis.

Así mismo, a mis compañeros de Maestría, **Cynthia Rodríguez, Lilian Sosa, David Martínez, Suyapa Mendoza, Carmen Galo, Jessy Espinoza, María Mercedes Rueda y María Concepción Medina**, gracias por compartir en esta etapa momentos de estudio y de preocupación pero también de alegrías y diversión. Con ustedes me sentí muy acompañado y animado en cada momento.

A mi familia y amigos por sus palabras de ánimos, apoyo incondicional y ayuda en muchos momentos.

A todos ustedes, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABLAS	ii
LISTA DE ANEXOS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2.....	4
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Diarreas y mortalidad infantil	4
2.2. Definición y causas de las diarreas	6
2.3. Situación actual de las diarreas virales.....	8
2.4. Agentes etiológicos virales más importantes	11
2.4.1. Rotavirus.....	11
2.4.2. Norovirus	16
2.4.3. Astrovirus.....	23
CAPÍTULO 3.....	28
3. METODOLOGÍA.....	28
3.1. Objetivo general	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
3.3. Hipótesis.....	29
3.4. Diseño de investigación	29
3.5. Periodo de Estudio	29
3.6. Población de Estudio.....	29

3.7.	Tamaño de muestra	30
3.8.	Selección de los participantes	31
3.9.	Colección de las Muestras.....	32
3.10.	Análisis de laboratorio	32
3.10.1.	Preparación de suspensiones fecales.....	32
3.10.2.	Detección de rotavirus del grupo A (RV-A).....	33
3.10.3.	Detección de astrovirus humanos (HAstV)	33
3.10.4.	Extracción de ácido ribonucleico (ARN).....	33
3.10.5.	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).....	34
3.10.6.	Transcripción reversa (RT) para rotavirus y norovirus.....	34
3.10.7.	Transcripción reversa (RT) para astrovirus	35
3.10.8.	Detección del gen VP7 de rotavirus.....	35
3.10.9.	Confirmación de astrovirus humanos por RT-PCR	37
3.10.10.	Detección de norovirus humanos por RT-PCR.....	38
3.10.11.	Secuenciación de nucleótidos y análisis filogenético	38
3.11.	Análisis de datos	40
3.11.1.	Manejo de los datos	40
3.11.2.	Análisis estadístico.....	40
3.12.	Consideraciones Éticas	41
3.13.	Consideraciones de Bioseguridad.....	41
CAPÍTULO 4.....		42
4.	RESULTADOS	42
CAPÍTULO 5.....		60
5.	DISCUSIÓN.....	60
CAPÍTULO 6.....		68

6. CONCLUSIONES.....	68
CAPÍTULO 7.....	70
7. RECOMENDACIONES	70
CAPÍTULO 8.....	71
8. REFERENCIAS	71
ANEXOS	80

UDI-DEGT-UNAH

LISTA DE FIGURAS

No.	Título de la Figura	Página
1.	Distribución de las causas de muerte en niños menores de cinco años.	5
2.	Clasificación de la diarrea infecciosa aguda.	7
3.	Representación esquemática de la estructura del virión de rotavirus.	11
4.	Organización genómica de los norovirus.	18
5.	Representación esquemática del genoma de los norovirus con las localizaciones de las regiones más utilizadas para la amplificación genómica y genotipificación del virus.	20
6.	Organización del genoma de astrovirus humano.	24
7.	Etiología viral según grupo de edad.	44
8.	Distribución de los agentes virales por mes de estudio en Tegucigalpa, Honduras.	46
9.	Comparación de aspectos socioeconómicos y ambientales entre infectados y no infectados por virus entéricos.	48
10.	RT-PCR para astrovirus humanos.	49
11.	Árbol filogenético de los genotipos de astrovirus circulantes en Tegucigalpa.	51
12.	RT-PCR para norovirus humanos.	52
13.	Árbol filogenético de los genotipos circulantes de norovirus en Tegucigalpa.	55
14.	Árbol filogenético de las variantes del genotipo GII.4 de norovirus circulantes en Tegucigalpa.	56
15.	PCR para el gen VP7 de rotavirus.	57

LISTA DE TABLAS

No.	Nombre de la tabla	Página
1.	Características de los virus asociados a gastroenteritis en humanos.	8
2.	Resultados de indicadores de la vigilancia de gastroenteritis por rotavirus, Honduras 2005-2009	10
3.	Estudios de epidemiología molecular de astrovirus en Latinoamérica.	27
4.	Prevalencia de virus entéricos en niños menores de cinco años con diarrea aguda en Tegucigalpa, Honduras.	42
5.	Distribución por grupo de edad de los agentes virales identificados en niños menores de cinco años con diarrea aguda en Tegucigalpa.	43
6.	Distribución según género de los agentes virales identificados en niños menores de cinco años con diarrea aguda en Tegucigalpa.	45
7.	Distribución por mes de estudio de los agentes virales identificados en niños menores de cinco años con diarrea aguda en Tegucigalpa.	45
8.	Aspectos clínicos del cuadro diarreico con etiología viral presentado en los niños menores de cinco años en Tegucigalpa, Honduras.	47
9.	Distribución de los agentes virales identificados en niños menores de cinco años con diarrea aguda en Tegucigalpa de acuerdo a su estado hospitalizado o ambulatorio.	47
10.	Genotipos de astrovirus humanos detectados en la ciudad de Tegucigalpa en niños menores de cinco años.	50
11.	Genotipos de norovirus detectados en la ciudad de Tegucigalpa en niños menores de cinco años.	53
12.	Genotipos de rotavirus del grupo A detectados en la ciudad de Tegucigalpa en niños menores de cinco años durante octubre 2010 – julio 2011.	58
13.	Infección por rotavirus en niños vacunados y no vacunados.	59

LISTA DE ANEXOS

No.	Nombre del anexo	Páginas
1.	Flujograma de trabajo.	79
2.	Solicitud de aprobación ética.	80
3.	Consentimiento informado.	81
4.	Ficha de recolección de datos.	85
5.	Aprobación del comité de ética.	87
6.	Aplicación al comité de bioseguridad.	88
7.	Mapa del área de estudio.	94
8.	Procedimientos operativos estándar (POEs).	95
9.	Agradecimiento al donante.	118

UDI-DEGT-UNVAL

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
AdV	Adenovirus
CME	Criomicroscopía electrónica
DA	Diarrea aguda
dATP	Desoxiadenina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanidina trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DLP	Del inglés “Double Layer Particle” – Partículas virales de capa doble
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraácetico
EIE	Ensayo inmunoenzimático
GA	Gastroenteritis aguda
HAV	Virus de hepatitis A, del inglés “Hepatitis A Virus”
HAstV	Del inglés “Human Astrovirus” - Astrovirus humanos
IFN- γ	Interferón gamma
IME	Inmunomicroscopía electrónica
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
ME	Microscopía electrónica
NLV	Del inglés Norwalk-like virus – Virus semejantes al Norwalk
Nm	Nanómetro
Nt	Nucleótido
NSP	Proteínas no estructurales
NoV	Norovirus

ORF	Del inglés “Open Reading Frame” – Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Del inglés “Polymerase Chain Reaction” - Reacción en cadena de la polimerasa
Poli(A)	Secuencia repetitiva de nucleótidos de adenina
RpRd	ARN polimerasa dependiente de ARN
RV	Rotavirus
RV-A	Rotavirus del grupo A
UTR	Del inglés “Untranslated Region” – Región no traducida
VLP	Del inglés “Virus-like Particles” – Partículas semejantes a virus

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas representan un problema muy grande de salud pública; en la actualidad continúan siendo las primeras causas de morbilidad a nivel mundial [Kosek et al., 2003] y una de las principales causas de mortalidad en países en desarrollo [Boschi-Pinto et al., 2008]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que estas enfermedades ocasionan cerca de 2 millones de muertes al año, ocupando el segundo lugar entre las causas de muerte por enfermedades infecciosas en todo el mundo, después de las infecciones respiratorias agudas como la neumonía [World Health Organization (WHO), 2008]. La mayoría de estas muertes ocurren en niños menores de cinco años de edad y en países en desarrollo [Kosek et al., 2003]. En Honduras, las enfermedades diarreicas se encuentran entre las causas principales de muertes y enfermedad severa entre niños menores de cinco años. Entre los años 2000 y 2004 se registraron en el país medias anuales de 222,000 visitas médicas, 4,390 hospitalizaciones y 162 muertes hospitalarias por diarrea en niños menores de cinco años en instituciones sanitarias públicas [Solorzano Girón et al., 2006].

Las diarreas de origen infeccioso pueden ser causadas por una gran variedad de microorganismos patógenos que incluye bacterias, parásitos y virus. Entre los virus, se ha descrito a rotavirus como el principal agente etiológico de las diarreas en niños menores de 5 años a nivel mundial [Parashar et al., 2006]. Así mismo, virus como norovirus, astrovirus, adenovirus 40/41, entre otros, han sido descritos como patógenos entéricos; sin embargo, su papel en las gastroenteritis virales ha sido subestimado debido a que las

herramientas diagnósticas no han estado del todo disponibles para ser utilizadas en los servicios de salud, principalmente en países en desarrollo. La aplicación de herramientas diagnósticas con enfoque molecular como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) ha demostrado la importante contribución que tienen estos agentes virales en la ocurrencia de diarrea aguda tanto en niños como en adultos.

En Honduras, varios estudios han sido orientados a evaluar la prevalencia de algunos agentes causantes de diarreas [Figuerola et al., 1992], y en el caso de las gastroenteritis víricas se ha estudiado extensamente la epidemiología molecular de rotavirus proporcionando información muy importante sobre este patógeno [Bourdett-Stanziola et al., 2008; Ferrera et al., 2007]. En el marco de la posible introducción de la vacuna contra rotavirus, la Secretaría de Salud de Honduras implementó en el 2005 la vigilancia centinela de gastroenteritis por rotavirus, lo que ha permitido tener una visión más clara del papel de rotavirus como un agente importante que ocasiona cuadros severos de gastroenteritis en niños menores de cinco años [Secretaría de Salud Honduras, 2007]. Posteriormente y siguiendo las recomendaciones de la OMS, en 2009, se introdujo al esquema nacional de vacunación la vacuna contra rotavirus aplicable a los niños entre 2 y 6 meses de edad. Esta medida cambia enormemente la panorámica del país en varios aspectos, principalmente en la reducción de atenciones médicas por cuadros severos de gastroenteritis en niños menores de cinco años, lo que incide directamente en una reducción de la mortalidad infantil. Sin embargo, y como lo apuntan investigadores de la región, la introducción de esta vacuna conlleva también a un cambio en los perfiles epidemiológicos de los virus entéricos, y por lo tanto resulta de suma importancia hacer una evaluación sobre estos aspectos. No obstante, Honduras presenta deficiencia de

estudios con enfoque molecular sobre otros agentes etiológicos virales responsables de diarreas infantiles, y más importante aún, datos que evalúen el comportamiento epidemiológico del rotavirus después de la vacunación.

El objetivo del presente estudio es por consiguiente la caracterización epidemiológica y molecular de rotavirus del grupo A, norovirus y astrovirus humanos, en muestras fecales diarreicas en niños menores de 5 años en Tegucigalpa, Honduras.

Los datos obtenidos en esta investigación podrían contribuir a llenar en parte el vacío de conocimiento relacionado con la etiología de las diarreas virales al determinar que rotavirus del grupo A, norovirus y astrovirus humanos son agentes etiológicos virales causantes de gastroenteritis en la población infantil en Tegucigalpa. Prueba de ello es que las prevalencias encontradas, 13% y 5% para norovirus y astrovirus respectivamente, resultan importantes, y en el caso de norovirus es casi similar a la de rotavirus (14%).

El perfil epidemiológico de norovirus y astrovirus establece que son causantes de brotes epidémicos en la población en general, que son fuente reconocida de infecciones nosocomiales de gastroenteritis y que pueden afectar en una alta proporción a individuos inmunocomprometidos. Por lo tanto, el hecho de demostrar la circulación de estos dos agentes virales, sugiere la necesidad de adicionarlos al programa de vigilancia de gastroenteritis existente en el país. Por otro lado, la realización de investigación en este tema ayudaría a dilucidar el impacto de estos virus entéricos en las gastroenteritis infantiles a nivel nacional y su rol en la ocurrencia de brotes; esta información permitiría establecer medidas de prevención y control adecuadas para las gastroenteritis virales.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Diarreas y mortalidad infantil

Durante la cumbre del Milenio de las Naciones Unidas celebrada en la ciudad de Nueva York en el año 2000, los países miembros con el propósito de reducir las desigualdades entre las diferentes poblaciones del mundo firmaron la Declaración de la Cumbre del Milenio [United Nations (UN), 2000]. Desde esta cumbre, la comunidad internacional ha elevado a niveles sin precedentes su compromiso con el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) mediante su apoyo a iniciativas internacionales, nacionales y locales. Honduras al igual que otros países de la región es signatario de la Declaración de la Cumbre del Milenio de las Naciones Unidas, en la que se señala el compromiso del país para lograr la meta del objetivo 4 de los ODM que es “Reducir en dos terceras partes, entre 1990 y 2015, la mortalidad de los niños menores de cinco años” [United Nations (UN), 2010].

En el mundo, cerca de nueve millones de niños menores de cinco años mueren anualmente [The United Nations Children’s Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO), 2009]. Estimaciones de las causas de muerte en niños, demuestran que la neumonía, las enfermedades diarreicas y la malaria continúan siendo las causas principales de muerte a nivel mundial (Figura 1); en conjunto suman un estimado del 40% de todas las muertes de niños alrededor del mundo cada año [World Health Organization (WHO), 2008].

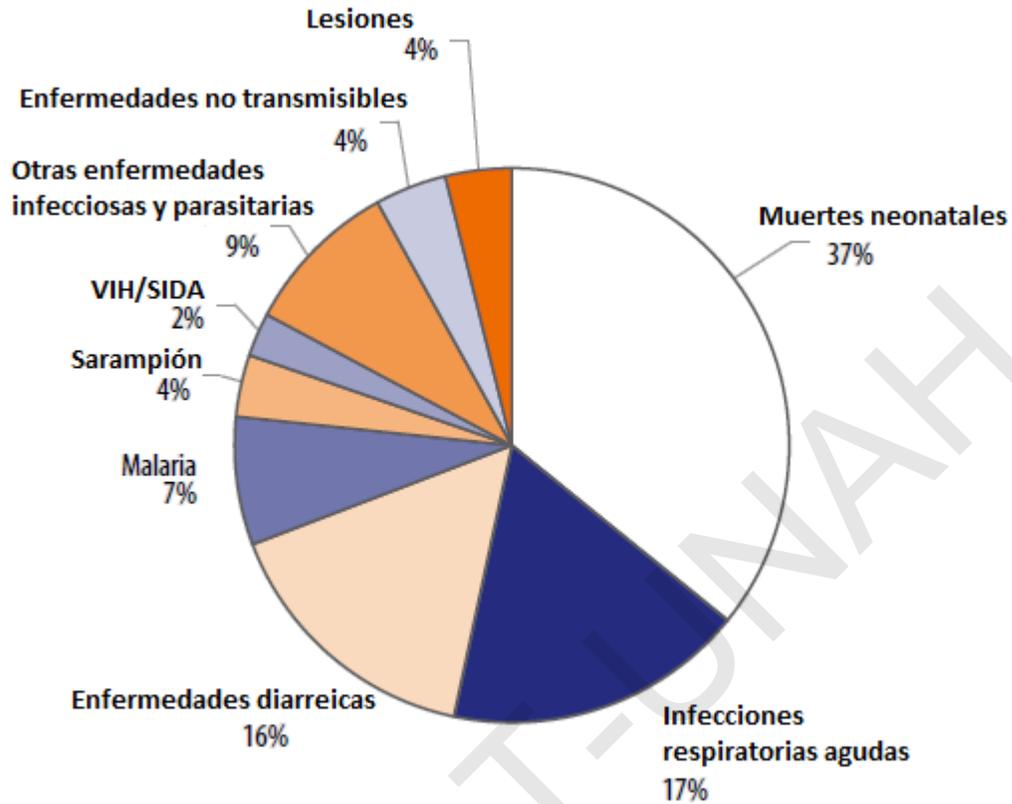


Figura 1. Distribución de las causas de muerte en niños menores de cinco años. Adaptado de [World Health Organization (WHO), 2008].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la mortalidad infantil se ha reducido a nivel mundial, de 100 muertes por cada 1000 nacidos vivos en 1992 a 72 muertes por cada 1000 nacidos vivos en 2008. Sin embargo, esta reducción no se está llevando a cabo lo suficientemente rápido como para cumplir con la meta propuesta en los ODM para el 2015. La OMS sugiere que es necesario retomar la atención de las enfermedades diarreicas como una de las causas principales de muerte en niños menores de cinco años [United Nations (UN), 2010].

2.2. Definición y causas de las diarreas

La OPS define diarrea como la ocurrencia de tres o más evacuaciones líquidas o semilíquidas por día (o más evacuaciones de lo normal para un individuo) [Organización Panamericana de la Salud (OPS), 2007]. La diarrea es una consecuencia de la disfunción en el transporte de agua y electrolitos a nivel del intestino delgado. Como resultado de esta alteración se produce un aumento de la frecuencia, cantidad y volumen de las heces, así como un cambio en su consistencia. Los mecanismos patogénicos que ocasionan diarrea dependen de los agentes causales que la producen.

La diarrea infecciosa aguda es aquella que tiene una duración menor de 14 días; se clasifica de manera práctica en diarrea acuosa y diarrea con sangre y es causada por un gran número de virus, bacterias y protozoos (Figura 2). La diarrea acuosa, que es la de interés en este documento, puede ser secretora u osmótica. La diarrea osmótica es aquella que se produce por un incremento de carbohidratos en el lumen intestinal, como consecuencia de lesiones en las vellosidades intestinales y por la invasión de los enterocitos de la vellosidad. La necrosis de la porción superior de las vellosidades da lugar a que en un periodo de 12-40 horas, los enterocitos de las criptas, que son enterocitos secretores, cubran la vellosidad y den lugar a áreas donde hay secreción de líquidos y la absorción está disminuida o ausente. Este mecanismo de producción de diarrea osmótica es el que provocan la mayoría de agentes virales, principalmente los rotavirus.

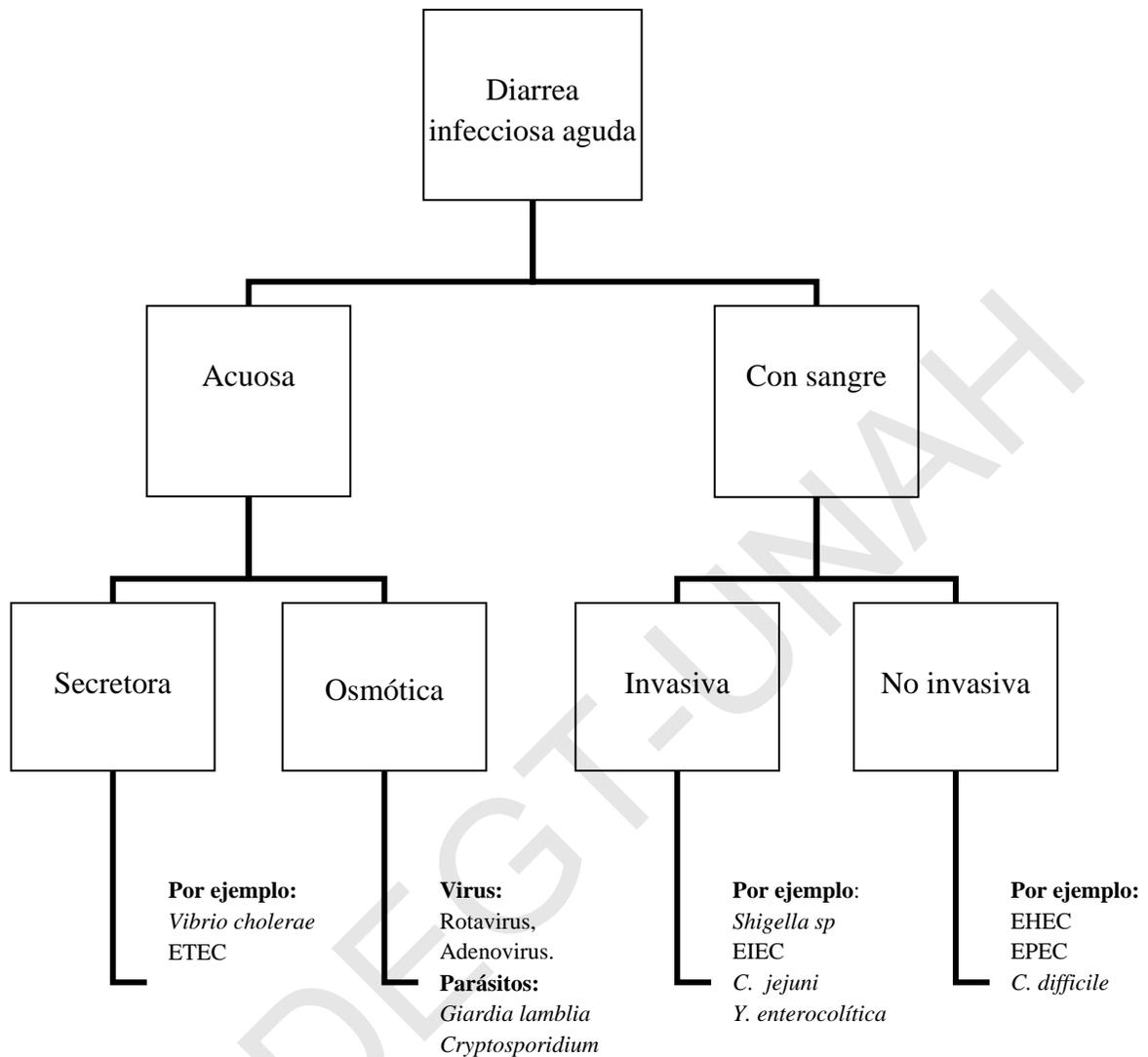


Figura 2. Clasificación de la diarrea infecciosa aguda.

La mayoría de patógenos que causan diarrea infecciosa aguda comparten como modo de transmisión la vía fecal-oral. La infección se puede diseminar a través de agua y alimentos contaminados o por el contacto directo persona a persona como resultado de una higiene deficiente [The United Nations Children’s Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO), 2009].

2.3. Situación actual de las diarreas virales

Las enfermedades diarreicas continúan siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, principalmente en países en desarrollo [Kosek et al., 2003]. En países industrializados, las enfermedades diarreicas son responsables de una alta morbilidad debido a brotes de gastroenteritis en todos los grupos de edad [Glass et al., 2000]. A partir de la década de los 1940s, los investigadores han considerado a los virus como potenciales agentes de gastroenteritis, y en décadas posteriores se han asociado diferentes virus con gastroenteritis (Tabla 1) [Wilhelmi et al., 2003].

Tabla 1. Características de los virus asociados a gastroenteritis en humanos.

	Rotavirus	Norovirus	Astrovirus	Adenovirus	Coronavirus
Ácido Nucleico	dsRNA ^a	ssRNA ^b	ssRNA	dsDNA ^c	ssRNA
Tamaño	70-80 nm	35-39 nm	28-30 nm	80-110 nm	120-160 nm
Envoltura	No	No	No	No	Sí
Familia	<i>Reoviridae</i>	<i>Caliciviridae</i>	<i>Astroviridae</i>	<i>Adenoviridae</i>	<i>Coronaviridae</i>

^a Ácido ribonucleico bicatenario

^b Ácido ribonucleico monocatenario

^c Ácido desoxirribonucleico bicatenario

Las gastroenteritis virales agudas presentan dos patrones epidemiológicos: gastroenteritis esporádica y la gastroenteritis epidémica. Los casos esporádicos de diarrea afectan principalmente a la población infantil, ocurren a nivel mundial y se debe sobre todo a las infecciones por rotavirus del grupo A, astrovirus y adenovirus entéricos. Por otro lado, los

casos epidémicos de gastroenteritis virales se atribuyen básicamente a norovirus y sapovirus; estos virus se transmiten por agua, alimentos contaminados y por contacto de persona a persona, afectan a individuos de todas las edades y son muy comunes en países industrializados [Glass et al., 2000].

Investigaciones realizadas en Honduras sobre la etiología de las gastroenteritis agudas en población infantil determinaron que rotavirus era el agente causal más prevalente [Figuroa et al., 1992; Melgar-Cano and Moncada, 2003]. Estudios realizados entre 2003-2007 en niños menores de 5 años revelaron prevalencias de hasta 43% de rotavirus identificando a G1 como el genotipo más común. Durante un brote de rotavirus en 2006, se demostró un incremento en la prevalencia del genotipo G2[P4] y se reportaron nuevos genotipos en la población (G4[P8], G9[P8] y G2[P10]), evidenciando la gran variabilidad de rotavirus circulante [Bourdett-Stanziola et al., 2008; Ferrera et al., 2007].

En el 2005, la Secretaría de Salud de Honduras a través de la Dirección General de Vigilancia de la Salud (DGVS), en coordinación con el Programa Ampliado de Inmunizaciones (PAI) y con asistencia de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) implementó la vigilancia centinela de gastroenteritis por rotavirus y casos de invaginación intestinal en niños menores de 5 años. Este sistema de vigilancia de gastroenteritis ha permitido establecer que rotavirus es el principal agente etiológico de las gastroenteritis severas en niños menores de cinco años (Tabla 2) [Secretaría de Salud Honduras, 2008]. En febrero de 2009, luego de realizar evaluaciones sobre la factibilidad, aspectos logísticos, económicos, entre otros [Constela et al., 2006; Secretaría de Salud Honduras, 2008], se introdujo la vacuna contra rotavirus (Rotarix, GlaxoSmithKline Biologicals) al esquema nacional de vacunación para la población entre 2 – 4 meses de

edad, rango que posteriormente se amplió a 2 – 7.5 meses para mejorar la captación de infantes. Hasta septiembre de 2009, la cobertura nacional de vacunación contra rotavirus fue inferior al 75% con una cobertura de primeras y segundas dosis del 61.4% y 50%, respectivamente.

Tabla 2. Resultados de indicadores en la vigilancia de las gastroenteritis por rotavirus, Honduras año 2005-2009.

Indicadores	Años				
	2005	2006	2007	2008	2009
No. de admisiones por diarrea en menores de 5 años	2,472	4,992	5,465	4,250	3,554
No. de niños menores de 5 años que cumplen el criterio de sospechoso	940	4,678	5,326	4,096	3,423
No. de niños con ficha epidemiológica y muestra de heces	602	2,699	2,665	1,928	1,731
No. de muestras positivas para rotavirus	78	1,193	1,080	696	801
Porcentaje de positividad	13	44	41	36	46

Fuente: Dirección General de Vigilancia de la Salud, Boletín epidemiológico No. 45.

El contar con información confiable acerca de la magnitud, patrones y tendencias de las causas de muerte de los niños menores de cinco años de edad podría ayudar a las autoridades encargadas de la toma de decisiones a evaluar las necesidades, priorizar las intervenciones y monitorear el progreso de las intervenciones anteriores [Boschi-Pinto et al., 2008].

2.4. Agentes etiológicos virales más importantes

2.4.1. Rotavirus

Estructura y clasificación. *Rotavirus* es un género de la subfamilia *Sedoreovirinae* pertenecientes a la familia *Reoviridae* [International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2011]. Los rotavirus (RV) son virus no envueltos cuyo virión (70-80 nm de diámetro) consta de una cápside icosaédrica de tres capas que envuelve el genoma compuesto de 11 segmentos de ácido ribonucleico de cadena doble (dsRNA). Cada una de las seis proteínas estructurales (VP1-4, VP6-7) y de las seis proteínas no estructurales (NSP1-6) son codificadas por un único segmento del genoma, a excepción de las proteínas NSP5 y NSP6 las cuales son codificadas en una superposición del marco de lectura del segmento 11. La capa interna del virión de RV está compuesta principalmente de la proteína VP2 que encierra las proteínas VP1 y VP3, las cuales están asociadas con el genoma viral. La capa media del virión de RV está formada enteramente de trímeros de la proteína VP6, antígeno que determina el grupo y subgrupo de rotavirus. Finalmente la capa externa de la cápside consiste de las proteínas VP7 y VP4 (Figura 3).

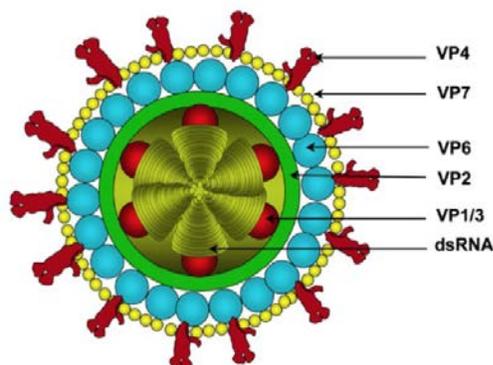


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del virión de rotavirus [Ruiz et al., 2009]

En base a la serología de la VP6, los rotavirus han sido clasificados en 7 grupos principales (A-G). Las cepas humanas pertenecen principalmente al grupo A (RV-A); sin embargo, los grupos B y C también se han asociado con infecciones humanas [Estes, 2001]. Así mismo, se han reconocido hasta la fecha cuatro subgrupos (SG) de RV-A: I, II, I+II y no I-no II; estos SG son definidos de acuerdo con la presencia o ausencia de dos diferentes epítomos que son reactivos con uno, ambos o ninguno de los anticuerpos monoclonales 255/60 y 631/9 [Lopez et al., 1994; Tang et al., 1997]. Según esta clasificación, los aislados humanos son generalmente del subgrupo SGII [Iturriza-Gómara et al., 2001].

Dentro de RV-A se pueden reconocer diferentes serotipos y genotipos, determinados por ensayos serológicos usando anticuerpos monoclonales y por análisis moleculares del ARN viral, respectivamente. Los antígenos que definen el genotipo de RV-A incluyen las dos proteínas estructurales que forman la cápside externa del virión, VP4 y VP7. Estas proteínas inducen la formación de anticuerpos neutralizantes durante el curso de la infección. Como son dos antígenos los que definen el genotipo, la designación genotípica tiene dos componentes y se expresa como G(X)P[Y]. La característica genotípica dada por VP7 se especifica como el genotipo G debido a que VP7 es una glicoproteína. La característica genotípica proporcionada por VP4 se especifica como genotipo P porque esta proteína es sensible a proteasa.

Epidemiología. Los rotavirus del grupo A son la causa más común de diarrea severa en niños menores de cinco años a nivel mundial. Se estima que produce cerca de 114 millones de episodios de gastroenteritis, 24 millones de visitas médicas, 2.4 millones de hospitalizaciones, y es responsable de aproximadamente 611,000 muertes cada año

[Parashar et al., 2006]. Interesantemente, la tasa de morbilidad de rotavirus es similar tanto en países desarrollados como en países en desarrollo, a diferencia de la mortalidad atribuida a rotavirus la cual está restringida básicamente a los países en desarrollo donde ocurren más del 90% de las muertes [Chandran et al., 2010; Parashar et al., 2006]. De forma específica en América Latina, rotavirus provoca un estimado de 10 millones de casos de gastroenteritis, 2 millones de visitas médicas, 75,000 hospitalizaciones y 15,000 muertes anuales [Bryce et al., 2005].

El principal reservorio de rotavirus es el tracto gastrointestinal del ser humano enfermo. Sin embargo, se conoce también que rotavirus es un patógeno animal, capaz de producir diarrea en animales domésticos y de granja lo que podría representar un potencial de transmisión zoonótica [Martella et al., 2010]. Los rotavirus se transmiten por la vía fecal-oral a través del contacto directo persona-persona o a través de fomites. Rotavirus presenta una baja dosis infectiva y una elevada tasa de excreción.

Manifestaciones clínicas. Después de un periodo de incubación de 1-3 días [Bernstein, 2009], la infección por rotavirus presenta síntomas comunes a muchos patógenos entéricos como ser: diarrea acuosa, vómitos y fiebre [Staat et al., 2002]. La infección por rotavirus no es de tipo invasiva ni tampoco suele presentar una respuesta inflamatoria exacerbada, por lo que no ocasiona heces disentéricas. Característicamente, rotavirus produce un cuadro clínico de mayor gravedad que el resto de virus entéricos, con mayor necesidad de hospitalización como consecuencia del grado de deshidratación que suelen presentar los individuos infectados [Chandran et al., 2010].

Patogénesis. El principal sitio de replicación de rotavirus son los enterocitos maduros sobre las vellosidades del intestino delgado. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el modo en que rotavirus produce la diarrea acuosa asociada a su infección, entre ellos está la inducción de diarrea osmótica secundaria a la pérdida de la capacidad de absorción epitelial, los efectos de la enterotoxina viral NSP4, y el rol activo del sistema nervioso entérico [Greenberg and Estes, 2009; Lundgren and Svensson, 2001]. Se ha considerado como mecanismo principal de inducción de diarrea la disminución de la absorción debido al daño y/o destrucción del enterocito. La alteración de la absorción intestinal da como resultado el tránsito de carbohidratos, lípidos y proteínas no digeridas hacia el colon; estas macromoléculas son activas osmóticamente, por lo cual el colon no es capaz de absorber suficiente agua desencadenando una diarrea osmótica. Sin embargo, este mecanismo no es aceptado como uno inductor de la diarrea en vista que los daños histopatológicos no siempre correlacionan con la presencia de diarrea [Kohler et al., 1990; Ramig, 2004]. Recientemente se ha descrito otro mecanismo, el que establece que la enterotoxina viral NSP4 altera la permeabilidad de la mucosa intestinal al debilitar las uniones entre células, alterar el citoesqueleto de las células infectadas, aumentar la secreción de iones cloruro, y estimular la motilidad gástrica a través del sistema nervioso entérico, lo que desencadena una diarrea acuosa profusa [Ramig, 2004].

Inmunología. Una primera infección por rotavirus induce una respuesta inmune local y sistémica al serotipo causal (inmunidad homotípica) y a un alto porcentaje de otros serotipos (inmunidad heterotípica), lo que confiere protección contra infecciones subsecuentes. Esta protección incrementa con cada nueva infección y reduce la severidad de la diarrea [Velazquez et al., 1996]. La protección contra las infecciones por rotavirus se

ha asociado básicamente a la presencia de anticuerpos específicos contra rotavirus del tipo IgA en la superficie de la mucosa gastrointestinal. Así mismo, se ha propuesto que estos anticuerpos adquiridos de forma natural pueden ser utilizados como marcador de la protección de las infecciones subsecuentes [Velazquez et al., 2000].

Vacunas. El gran impacto de la infección por rotavirus en la morbilidad y mortalidad infantil evidencia la necesidad del desarrollo e introducción de vacunas eficaces y seguras contra esta infección. En los últimos años, dos vacunas contra las infecciones severas de rotavirus obtuvieron su licencia y recientemente la OMS ha recomendado su incorporación a los programas nacionales de inmunización; RotaTeq y Rotarix.

RotaTeq (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) es una vacuna oral pentavalente para la prevención de la gastroenteritis por rotavirus. Contiene cinco rotavirus vivos reordenados cuyas cepas originales se aislaron de personas y bovinos. La vacuna se basa en la creación de una nueva cepa de rotavirus que contiene una única proteína de cápside de origen humano en la superficie viral, con el resto de proteínas estructurales provenientes de una cepa bovina (WC3). Cuatro de los rotavirus reordenados expresan una de las proteínas exteriores de la cápside G1, G2, G3 o G4 de la cepa original del rotavirus humano y la proteína de fijación P7[5] de la cepa original del rotavirus bovino. El quinto virus reordenado expresa la proteína de fijación P1A[8] de la cepa original del rotavirus humano y la proteína exterior de la cápside G6 de la cepa original del rotavirus bovino.

Rotarix (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) es una vacuna oral monovalente compuesta por una cepa viva atenuada de rotavirus humano (G1P [8]). El uso de esta vacuna se fundamenta en que la primera infección desarrolla protección heterotípica debido a la reacción cruzada entre los serotipos. Un estudio realizado en

Finlandia y 11 países latinoamericanos demostró que la eficacia de la vacuna contra la gastroenteritis severa fue un 85% ($p < 0.001$) después de recibir dos dosis orales, y las hospitalizaciones por diarrea de cualquier causa se redujo hasta en un 42% [Ruiz-Palacios et al., 2006].

Epidemiología molecular. Hasta la fecha se han reportado en mamíferos y aves al menos 23 genotipos G y 32 genotipos P [Matthijnssens et al., 2010], de los cuales 12 tipo G y 15 tipos P han sido identificados en aislados humanos [Linhares et al., 2011]. Teóricamente, es posible muchas combinaciones G/P dentro del sistema binario utilizado para la clasificación de RV-A. Sin embargo, solo un número limitado de combinaciones de genotipos G/P son encontradas en humanos de forma frecuente, como ser: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8] [Castello et al., 2004; Gentsch et al., 2005; Santos and Hoshino, 2005]. Es importante resaltar que las diferencias observadas en la prevalencia de los genotipos circulantes de rotavirus responden a cambios geográficos y climáticos, entre otros. Así mismo, es característico observar un surgimiento periódico de nuevas cepas de rotavirus; recientemente se reportó el surgimiento del genotipo G12 en combinación con P [8] o P [6] [Uchida et al., 2006].

2.4.2. Norovirus

Estructura y clasificación. Los norovirus (NoV) fueron los primeros virus descritos como agentes etiológicos de casos de gastroenteritis aguda, siendo detectados por inmunomicroscopía electrónica (IME) a partir de material fecal de niños en una escuela primaria en la ciudad de Norwalk, Ohio, Estados Unidos de América [Wilhelmi et al., 2003]. Los Norwalk-like virus fueron clasificados en la familia *Caliciviridae* después de

estudios de caracterización del genoma viral donde fueron identificadas características compartidas con otros virus pertenecientes a esta familia, tales como: a) presencia de una cola de Poli(A) en el extremo 3' del genoma viral; b) una proteína VPg unida al extremo 5' del genoma; c) tres marcos de lectura abierta (ORF) que codifican una poliproteína no estructural, una proteína principal y otra menor de la cápside viral [Green et al., 2000; Jiang et al., 1993b]. La denominación *Caliciviridae* deriva de la palabra latina "cáliz", que significa taza, estructura en la criomicroscopía electrónica (CME) de estos virus que presentan simetría icosaédrica sin envoltura de 27-35 nm de diámetro [Prasad et al., 1999]. Posteriormente, el género Norwalk-like virus fue renombrado como Norovirus teniendo al virus Norwalk como virus prototipo del género. La familia *Caliciviridae* está constituida por cinco géneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Sapovirus* y *Norovirus* [International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2011]. El género *Norovirus* está dividido en cinco genogrupos (G): GI, GII, GIII, GIV y GV, basado en el análisis de la secuencia de aminoácidos que codifican para la proteína VP1 de la cápside. Los NoV identificados en humanos han sido clasificados filogenéticamente como pertenecientes a los GI, GII y GIV, pero dentro de estos genogrupos también han sido detectados NoV que infectan otros mamíferos como los porcinos, clasificados como GII/11, GII/18 y GII/19 [Zheng et al., 2006].

El genoma de los NoV está constituido por un ARN de cadena sencilla de polaridad positiva de aproximadamente 7700 nucleótidos (nt) organizado en tres ORFs, una región no traducible (UTR) en la extremidad 3' y 5' y una cola de Poli(A) en la extremidad 3'. Se observa también un RNA subgenómico de aproximadamente 2300 nt que contiene las ORF 2 y 3, y una UTR en el extremo 3'. El ORF 1 de aproximadamente 5000 nt codifica

una poliproteína no estructural de 200 kiloDalton (kDa) que es procesada proteolíticamente originando las proteínas p48, Nucleósido Trifosfatasa (NTPasa), p20, VPg, proteasa y RNA polimerasa RNA dependiente (RpRd). Los ORF 2 y 3, localizados en el extremo 3' del genoma codifican para las proteínas de la cápside denominadas VP1 y VP2. En el extremo 5' del RNA genómico y sub-genómico se encuentra la proteína VPg unida covalentemente. Esta proteína, de 15 kDa actúa, probablemente, en la síntesis de nuevas moléculas de RNA viral (Figura 4) [Hardy, 2005].

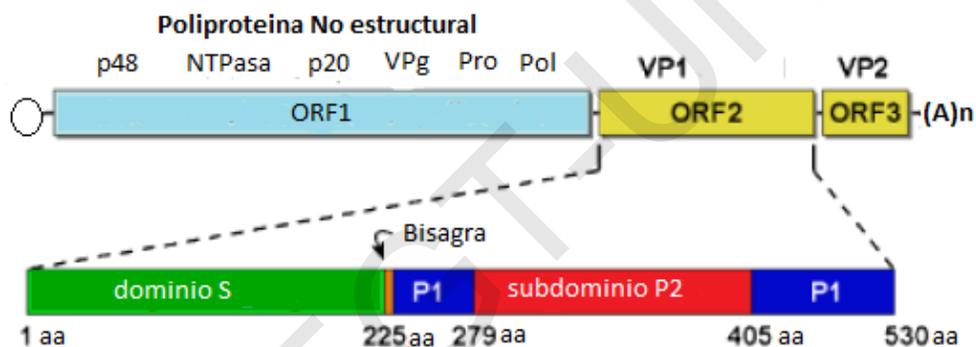


Figura 4. Organización genómica de los norovirus. p48: proteína amino terminal; NTPasa: proteína nucleósido trifosfatasa; p20: proteína p20; VPg: proteína de unión al genoma; Pro: proteasa; Pol: RNA polimerasa; VP1: proteína principal de la cápside; VP2: proteína menor de la cápside; círculo blanco: VPg; (A)n: cola Poli(A); aa: aminoácido; ORF: “Open Reading Frame” (Marco de Lectura Abierto). Adaptado de [Donaldson et al., 2008].

Después de la caracterización molecular del genoma de los NoV, fue posible la expresión de la proteína de la cápside VP1 en un sistema de expresión utilizando el baculovirus como vector de expresión, generando “virus-like particles” (VLP) constituidas por una

cápside morfológica y antigénicamente similar a las partículas virales, pero sin la presencia del genoma viral [Leite et al., 1996]. Utilizando estas VLPs para la inmunización de diferentes animales fue posible obtener altos niveles de anticuerpos poli y monoclonales para desarrollar ensayos inmunoenzimáticos (EIE). Este tipo de ensayo presenta la ventaja de no presentar reactividad cruzada con otros virus entéricos.

La técnica más ampliamente usada para la detección de los norovirus a partir de muestras fecales derivadas de casos esporádicos o epidémicos es la PCR precedida de una transcripción reversa (RT-PCR). Sin embargo, en los últimos años se ha implementado la PCR en tiempo real para el diagnóstico de norovirus [Kageyama et al., 2003; Nordgren et al., 2008]. La sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas de detección de los norovirus tales como la IME, EIE y la RT-PCR han sido evaluadas y en todos los casos la RT-PCR se presenta como la técnica más sensible y específica para la detección de los NoV, superada únicamente por la RT-PCR en tiempo real. Los EIE pueden ser utilizados para el tamizaje de casos de gastroenteritis agudas; sin embargo, la detección debe ser complementada con una RT-PCR para el análisis de las muestras negativas por los EIE [Castriciano et al., 2007; de Bruin et al., 2006].

Diferentes regiones del genoma viral han sido utilizadas en el diseño de iniciadores para realizar la detección mediante la amplificación genómica, siendo la región de la RpRd la más frecuentemente utilizada debido a la conservación de los nucleótidos entre las diferentes estirpes de los NoV [Beuret et al., 2002]. En este gen los pares de iniciadores más utilizados están dirigidos a las regiones denominadas A y B (Figura 5). Las regiones denominadas región C y D están localizadas en el gen VP1 que codifica para la proteína principal de la cápside y por ser una región hipervariable permite el genotipaje de la

estirpe analizada a través de la secuenciación del amplicón obtenido en la reacción de RT-PCR [Vinje et al., 2004].

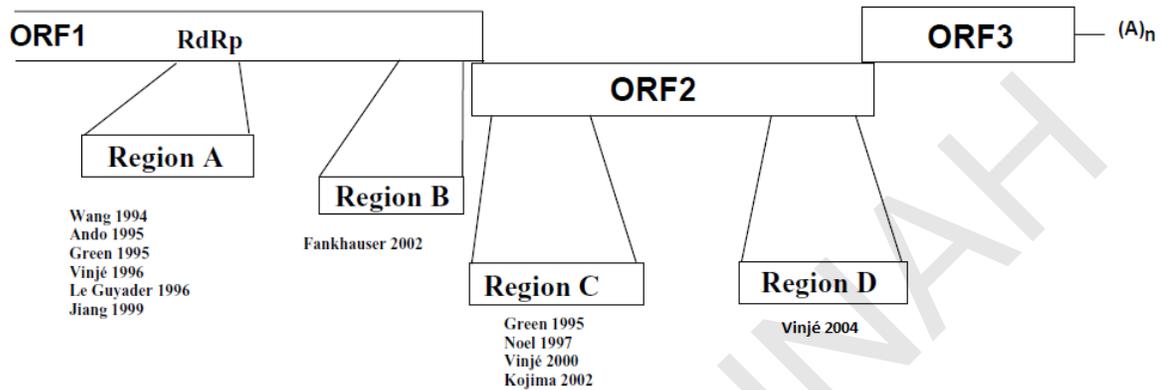


Figura 5. Representación esquemática del genoma de los NoV con las localizaciones de las regiones más utilizadas para la amplificación genómica y genotipificación del virus. Adaptado de [Vinje et al., 2004].

Epidemiología. Los norovirus humanos son la causa principal de gastroenteritis epidémica no bacteriana a nivel mundial [Fankhauser et al., 1998]; así mismo, causan un gran número de casos endémicos de gastroenteritis aguda. Se estima que los norovirus son responsables de cerca de 64,000 episodios de diarrea que requieren hospitalización y 900,000 visitas a clínicas en niños de países industrializados, y más de 200,000 muertes de niños menores de cinco años en países en desarrollo [Patel et al., 2008]. Los brotes de gastroenteritis por norovirus afectan a personas de todas las edades y suelen ocurrir en instituciones como cruceros, escuelas, hospitales, guarderías, restaurantes entre otros [Centers for Disease Control and Prevention, 2011].

Los norovirus se describen como agentes muy contagiosos, poseen una dosis infectiva muy baja, un estimado de 18 partículas virales [Teunis et al., 2008] y una tasa de

excreción de más de 1×10^{10} copias de ARN por gramo de heces. Aún cuando las personas se han recuperado de los síntomas de la infección, éstas pueden seguir expulsando partículas virales hasta por algunas semanas [Tu et al., 2008]. La vía principal de transmisión de los norovirus es la ruta la fecal-oral por la ingestión de agua o alimentos contaminados; también se observa transmisión por contacto de persona-persona, fómites o aerosoles [Marks et al., 2003]. La infección causada por la ingestión de agua ocurre por la contaminación de la fuente de agua de consumo o diferentes cuerpos de aguas recreacionales, originando brotes de gastroenteritis en individuos que entran en contacto con estas aguas [Patel et al., 2009]. Diferentes tipos de alimentos han sido identificados como fuentes de brotes de gastroenteritis causados por los norovirus; los bivalvos, especialmente las ostras, son los principales alimentos involucrados en esos brotes debido al consumo crudo de estos organismos filtradores, pero también se han asociado ensaladas, algunas frutas y jamones [Boxman et al., 2006].

Manifestaciones clínicas. La enfermedad suele iniciar después de un periodo de incubación de 24-48 horas [Patel et al., 2009]. Los síntomas principales incluyen náuseas, vómitos y diarrea acuosa; se puede presentar también dolor abdominal, anorexia, malestar general y fiebre de bajo grado. Algunas personas experimentan únicamente vómitos y diarrea [Centers for Disease Control and Prevention, 2011]. En adultos inmunocompetentes, la resolución de los síntomas se da generalmente después de 12-72 horas de su inicio. En niños, ancianos y pacientes hospitalizados los síntomas pueden ser más severos y prolongarse hasta por 4-6 días [Kirkwood and Streitberg, 2008].

Patogénesis. La ausencia de un sistema de cultivo celular y la falta de un modelo animal para reproducir la infección por norovirus humanos han limitado el entendimiento de la

patogénesis de este grupo de virus; la información disponible relacionada con la patogénesis de norovirus proviene principalmente de estudios con voluntarios [Wobus et al., 2006]. Los análisis histológicos de las biopsias de voluntarios humanos que se enfermaron después de la administración de una cepa de norovirus (Norwalk; GI.1 o Hawaii; GII.1) demostraron una mucosa intestinal intacta con cambios histológicos específicos que incluyen: ampliación y embotamiento de las vellosidades, acortamiento de las microvellosidades, incremento de la vacuolización citoplásmica, y edema intercelular. Además de los cambios en el enterocito, la infección por norovirus resulta en una infiltración inflamatoria moderada dentro de la lámina propia [Dolin et al., 1975; Schreiber et al., 1973; Schreiber et al., 1974].

Epidemiología molecular. La caracterización molecular de norovirus ha detectado un grado importante de diversidad entre este grupo de virus. Los norovirus utilizan las mutaciones y recombinación homóloga como mecanismos de variación [Bull and White, 2011]. Esta diversidad se ve más evidenciada en la cápside que en la región de la RdRp y es por esta razón que la caracterización molecular del ORF2 presenta mayor utilidad en la asignación del genotipo [Vidal et al., 2006]. La comparación entre análisis filogenéticos del ORF1 y ORF2 permite la identificación de la presencia de recombinación del ARN de norovirus lo que resulta importante en la asignación del genotipo del virus y en la caracterización de cepas zoonóticas [Bull et al., 2007; Siebenga et al., 2009].

A pesar de la reconocida importancia de norovirus como causante de brotes y casos esporádicos de gastroenteritis, la información acerca de norovirus en Latinoamérica y específicamente en Centro América es limitada. Los estudios realizados en niños con casos esporádicos de diarrea aguda revelan prevalencias de norovirus que oscilan entre el

8-17.4% con predominancia del genogrupo II y específicamente del genotipo GII.4 [Bucardo et al., 2008; Gonzalez et al., 2011; Rivera et al., 2011; Xavier et al., 2009].

2.4.3. Astrovirus

Estructura y clasificación. Los astrovirus humanos (HAstV) fueron descritos por primera vez como causa de gastroenteritis en humanos en 1975, al ser detectados mediante microscopía electrónica en las heces de niños con diarrea [Madeley and Cosgrove, 1975]. El término astrovirus hace mención a un grupo de virus pequeños (35-40 nm de diámetro), no envueltos, con simetría icosaédrica y espículas bien definidas [Madeley and Cosgrove, 1975] pertenecientes a la familia *Astroviridae* [Monroe et al., 1993]. La familia *Astroviridae* se divide en dos géneros: *Mamastrovirus*, que incluye los astrovirus humanos y de otros mamíferos, y *Avastrovirus*, que incluye los astrovirus aviares [International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2011; Kapoor et al., 2009].

Análisis moleculares demuestran que los HAstV poseen un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva, poliadenilado de aproximadamente 6.8 kb [Krishna, 2005; Monroe et al., 1993]. El genoma de los astrovirus está organizado en tres marcos de lectura abiertos (ORFs), denominados como ORF1a, ORF1b y ORF2; así como también regiones no traducibles (NTRs) en los extremos 5' y 3' [Jonassen et al., 2001; Willcocks et al., 1994]. ORF1a y ORF1b se encuentran localizados en el extremo 5' del genoma y codifican proteínas no estructurales, una serina proteasa y una polimerasa de ARN dependiente de ARN, respectivamente. El ORF2 localizado en el extremo 3' del genoma codifica una poliproteína precursora de la cápside (Figura 6) [Jiang et al., 1993a].

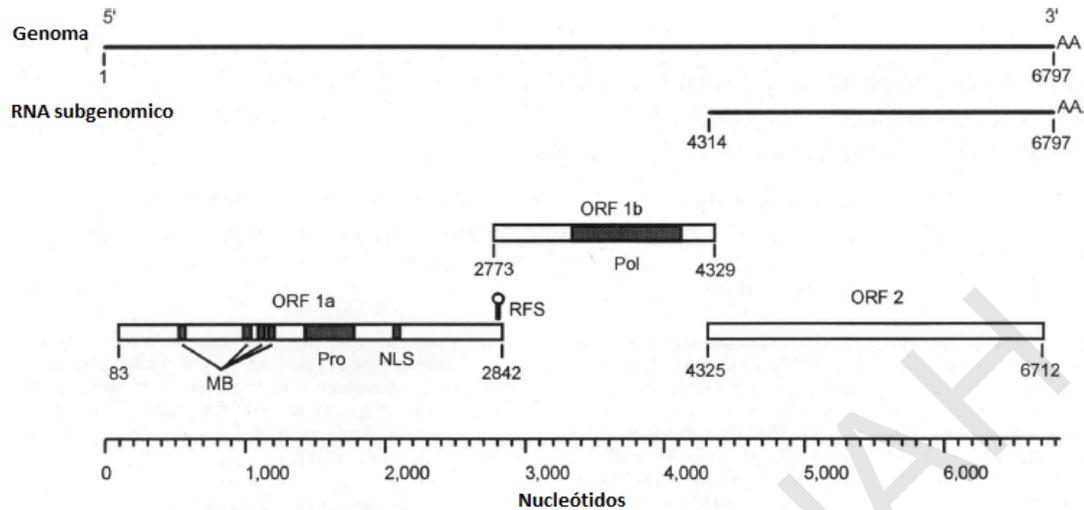


Figura 6. Organización del genoma de astrovirus humano. Modificado de [Jiang et al., 1993a].

Herramientas como los anticuerpos monoclonales, inmunofluorescencia, neutralización y microscopía inmunoelectrónica ha permitido agrupar a los astrovirus humanos en ocho serotipos clásicos (HAstV-1 al HAstV-8); todos ellos se han asociado con gastroenteritis [Cunliffe et al., 2002]. Así mismo, análisis filogenéticos de una región de 348 pb del ORF2 del genoma de astrovirus permiten definir ocho genotipos, demostrando a su vez una fuerte correlación entre los genotipos y los serotipos, por tal razón se suele referir como genotipos para especificar el tipo de HAstV infectante [Noel et al., 1995]. En general, HAstV-1 es el genotipo más prevalente, mientras que los genotipos 7 y 8 de HAstV se consideran raros; esta distribución puede variar según región geográfica y estación climatológica [Wang et al., 2001]. A partir de 2008, se han descrito nuevos grupos de astrovirus asociados a gastroenteritis en humanos, AstV-MLB1 [Finkbeiner et al., 2009a], AstV-VA1 [Finkbeiner et al., 2009b] y HMO-AstV [Kapoor et al., 2009], lo que demuestra la gran diversidad de astrovirus y sugiere una reestructuración en la familia

Astroviridae que incluya estas nuevas especies así como las descritas en otros mamíferos [De Benedictis et al., 2011].

Epidemiología. Los astrovirus humanos tienen una distribución mundial, presentan básicamente un perfil endémico. Sin embargo, se han reportado brotes de gastroenteritis en escuelas, centros geriátricos, hospitales y guarderías [Belliot et al., 1997; Silva et al., 2001]. El reservorio de HAstV es el ser humano, el mecanismo de transmisión más frecuente es por contacto directo a través de la vía fecal-oral y la transmisión nosocomial suele ser frecuente [Roman Riechmann et al., 2004]. Aunque se conoce que astrovirus presenta una infección específica de especie, el surgimiento de nuevos genotipos muy relacionados filogenéticamente con genotipos animales no descarta la posibilidad de un potencial de transmisión zoonótica [De Benedictis et al., 2011].

Los astrovirus tienen un periodo de transmisibilidad que coincide con el tiempo que dura la infección (3-4 días); durante este periodo se eliminan partículas virales en heces. Los niños menores de dos años, los ancianos y los individuos inmunocomprometidos presentan mayor susceptibilidad a la infección [Moser and Schultz-Cherry, 2005].

Manifestaciones clínicas. La enfermedad ocasionada por astrovirus se caracteriza por diarrea acuosa, dolor abdominal, vómitos, náuseas, cefalea, fiebre de bajo grado, anorexia y malestar general. Estos síntomas se suelen presentar 2-3 días después de la infección, aunque también son comunes las infecciones asintomáticas. En personas inmunocompetentes la enfermedad suele ser autolimitada y dura entre 2-4 días [Moser and Schultz-Cherry, 2005].

Patogenia. A pesar de los avances en el estudio de astrovirus, los mecanismos por los cuales estos inducen diarrea no son del todo claros. Sebire y colaboradores en el 2004 reportaron los hallazgos histopatológicos de la infección por astrovirus en un niño que recibió trasplante de médula ósea; sus conclusiones más importantes fueron que las anormalidades morfológicas eran relativamente menores y no específicas y en particular la respuesta inflamatoria era moderada [Sebire et al., 2004]. Estos resultados sugieren que astrovirus no provoca un incremento de muerte celular por lo que la destrucción del epitelio intestinal no parece ser el mecanismo que induce la diarrea. En los modelos animales se observa una atrofia de las vellosidades intestinales e infiltrados inflamatorios en la lámina propia, dando lugar a la disminución de la actividad de las disacaridasas y producción de diarrea osmótica [Moser and Schultz-Cherry, 2005; Wilhelmi et al., 2003].

Inmunología. El comportamiento en la prevalencia de la enfermedad sugiere la existencia de inmunidad específica de grupo. Observaciones clínicas y estudios con voluntarios humanos indican un rol importante de la respuesta humoral y sugieren que los anticuerpos neutralizantes son importantes en el control de la infección. El hecho que la infección sintomática incida mayormente en los niños menores de dos años y ancianos, hace pensar que los anticuerpos adquiridos en la infancia protegen de la enfermedad en la edad adulta. Así mismo, estudios de biopsias intestinales humanas sugieren que la inmunidad celular, específicamente las células CD4+, pueden estar también involucradas en la respuesta contra astrovirus [Koci, 2005]. Recientemente se ha demostrado que la proteína de la cápside de astrovirus suprime el sistema del complemento al inhibir la vía clásica de activación en el primer componente, C1, lo que podría explicar la ausencia de inflamación asociada con la gastroenteritis que induce astrovirus [Bonaparte et al., 2008].

Epidemiología molecular. Herramientas como la RT-PCR ha permitido evaluar la epidemiología molecular de astrovirus en muchas regiones del mundo, estableciendo frecuencias que oscilan entre el 2-17% (Tabla 2), lo que demuestra que astrovirus es una de las causas principales de diarrea aguda en niños menores de cinco años.

Tabla 3. Algunos estudios de epidemiología molecular de astrovirus en Latinoamérica.

País	Población de estudio	Prevalencia	Tipos detectados	Referencia
Argentina	Niños menores de 3 años, ambulatorios y hospitalizados. (n=1,070)	3.7%	HAstV-1 (41%) HAstV-4 (25%) HAstV-2 (13%) HAstV-3 (13%) HAstV-5 (8%)	[Espul et al., 2004]
Brasil	Niños menores de 10 años, ambulatorios y hospitalizados. (n=379)	5.3%	HAstV-1 (30%) HAstV-4 (10%) HAstV-2 (5%)	[Soares et al., 2008]
Brasil	Niños hospitalizados. (n=318)	13.5%	HAstV-1 (71%) HAstV-2 (17%) HAstV-8 (9%) HAstV-4 (3%)	[Victoria et al., 2007]
México	Niños menores de 5 años. (n=355 sintomáticos)	5.4%	HAstV-1 (29%) HAstV-3 (25%) HAstV-8 (17%) HAstV-2 (13%) HAstV-4 (13%)	[Mendez-Toss et al., 2004]
Chile	Niños menores de 3 años (n=456)	16.5%	HAstV-1 más prevalente	[Gaggero et al., 1998]

CAPITULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1. *Objetivo general*

Caracterizar epidemiológica y molecularmente a rotavirus del grupo A, norovirus y astrovirus humanos, en muestras fecales diarreicas en niños menores de 5 años en Tegucigalpa, Honduras.

3.2. *Objetivos específicos*

1. Determinar la frecuencia y distribución de tres agentes infecciosos virales importantes causantes de diarrea en niños menores de 5 años que asisten a los centros de salud seleccionados para el estudio.
2. Caracterizar molecularmente a norovirus y astrovirus humanos detectados en Tegucigalpa, Honduras.
3. Identificar los genotipos G y P de rotavirus circulantes en la población de estudio.
4. Evaluar la relación entre la vacunación contra rotavirus y la reducción en la ocurrencia de casos de diarrea en niños menores de cinco años en Tegucigalpa.

3.3. Hipótesis

1. Los rotavirus del grupo A son la principal causa de gastroenteritis aguda en niños menores de cinco años en Tegucigalpa, Honduras; sin embargo, a raíz de la incorporación de la vacuna contra rotavirus en el año 2009 se observará una menor prevalencia a la descrita en años anteriores.
2. Diferentes genotipos de norovirus y astrovirus humanos contribuyen de forma importante a las gastroenteritis agudas en los niños hondureños menores de 5 años.

3.4. Diseño de investigación

El diseño de este estudio fue de tipo prospectivo de corte transversal, con visitas diarias a los centros de salud seleccionados en las ciudades de Tegucigalpa y Comayagüela del Municipio del Distrito Central en Honduras.

3.5. Periodo de Estudio

El estudio se realizó durante los meses de octubre 2010 a julio 2011. El tiempo de estudio fue 40 semanas aproximadamente; involucró básicamente las dos estaciones climáticas presentes en el país: estación húmeda y estación seca, lo que permitió evaluar la frecuencia de los agentes virales en estudio en ambas estaciones.

3.6. Población de Estudio

Por ser las gastroenteritis pediátricas el objeto de estudio de esta investigación, la población seleccionada fueron los niños menores de cinco años que asistieron a los

centros de salud seleccionados en busca de atención médica con un cuadro de gastroenteritis aguda. En este estudio, un cuadro de gastroenteritis aguda se definió como la ocurrencia de tres o más evacuaciones líquidas o semilíquidas en las últimas 24 horas acompañado o no de fiebre y vómitos y con menos de catorce días de duración.

El estudio se llevó a cabo en tres centros asistenciales del Municipio del Distrito Central. Los centros asistenciales se escogieron a conveniencia tomando en cuenta el número de casos de diarrea atendidos en el año anterior, la ubicación del centro, la accesibilidad y seguridad para el investigador. Se escogieron dos hospitales, el Hospital Materno Infantil ubicado en el Boulevard Suyapa de Tegucigalpa y el Hospital de Especialidades del Instituto Hondureño de Seguridad Social (IHSS) ubicado en el Barrio la Granja de Comayagüela. El tercer centro asistencial seleccionado fue el centro de salud Alonso Suazo ubicado en el Barrio Morazán de Tegucigalpa (Para más detalle ver mapa en anexo No. 7).

3.7. *Tamaño de muestra*

Por ser un estudio de corte transversal, para calcular el tamaño de la muestra se aplicó la siguiente fórmula [Mateu and Casal, 2003]:

$$n = \frac{z^2 (PO)}{d^2}$$

$$n = \frac{1.96^2 ([0.12] [0.88])}{0.05^2}$$

$$n = 162$$

Donde:

n = tamaño de muestra

z = es el valor de la desviación normal, igual a 1.96 para un nivel de confianza del 95%

P = Prevalencia de la característica en la población.

$Q = 1 - P$

d = Precisión o margen de error (Valor estándar 5%).

Para el cálculo de muestra se utilizó la prevalencia esperada de norovirus en casos esporádicos de diarrea aguda que es de un 12% [Patel et al., 2008].

Por lo tanto para este estudio la meta era recolectar una muestra de 162 niños menores de cinco años con gastroenteritis aguda. Sin embargo, por la dificultad experimentada para la captación de muestras se definió posteriormente una muestra a conveniencia de al menos 100 niños.

3.8. Selección de los participantes

Los participantes fueron seleccionados al azar entre los niños que asistían a la consulta en la jornada matutina en los diferentes centros asistenciales. Con ayuda del personal médico y de enfermería se invitó a los padres o encargados de todo aquel niño menor de cinco años que cumplía con la definición de caso para este estudio. Sin embargo, solo fueron tomados como participantes aquellos niños cuyos padres o encargados otorgaron consentimiento informado por escrito, completaron la ficha de recolección de datos y proveyeron la muestra de heces del niño (Anexo No. 3 y 4 respectivamente).

Para la solicitud del consentimiento informado, el investigador y/o encuestador explicó detalladamente al padre, madre o encargado del niño lo referente a las gastroenteritis agudas y el propósito del estudio. Así mismo, dio a conocer los beneficios, riesgos y garantías que tendrán como participantes de este estudio. Hay que hacer notar que el

investigador y/o encuestador hizo saber a los padres o encargados que la participación era libre y voluntaria y que su información sería manejada de forma confidencial.

3.9. Colección de las Muestras

El investigador, o en su defecto una persona capacitada, entrevistó al padre/madre o encargado del niño y completó un cuestionario a fin de recolectar información relevante para el estudio, como ser: datos demográficos, número de episodios de diarrea, sintomatología asociada a la diarrea, estado de inmunización contra rotavirus, historia de lactancia, fuentes de agua, uso de antibióticos, entre otros.

Se recolectaron en frascos estériles cerca de 5 gramos ó mililitros de heces y fueron transportadas en frío al Laboratorio Teasdale-Corti de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas para ser procesadas y realizar la detección de rotavirus del grupo A. Posteriormente, dos alícuotas se trasladaron al Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología para realizar los estudios virológicos restantes (Anexo 1).

3.10. Análisis de laboratorio

3.10.1. Preparación de suspensiones fecales

Se prepararon suspensiones fecales al 10% en tampón Tris-HCl 0.01 M con 0.0015 M de CaCl₂ pH 7.2, clarificadas por centrifugación (3,500 rpm durante 20 minutos) y almacenadas a -20°C hasta su utilización.

3.10.2. Detección de rotavirus del grupo A (RV-A)

Se realizó un tamizaje para rotavirus del grupo A utilizando una prueba inmunocromatográfica (Rota-Strip, Coris Bioconcept, Belgium); se siguieron las instrucciones del fabricante para determinar especímenes positivos para rotavirus. Este ensayo se basa en la utilización de un sistema homogéneo inmunocromatográfico con partículas de oro y utiliza un anticuerpo monoclonal específico para la proteína VP6 de rotavirus del grupo A [Wilhelmi et al., 2001].

3.10.3. Detección de astrovirus humanos (HAstV)

Todas las muestras fueron tamizadas para astrovirus humanos mediante un ensayo inmunoenzimático (RIDASCREEN Astrovirus, R-Biopharm, Germany) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.10.4. Extracción de ácido ribonucleico (ARN)

El genoma viral fue extraído a partir de 140 µl de suspensión fecal utilizando un método comercial (QIAamp viral RNA mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En este método, la muestra se mezcló con un portador de ARN y un tampón de lisis; las condiciones de lisis permiten que el ARN viral sea adsorbido en una membrana de sílica durante los pasos de centrifugación. Después de realizar lavados con diferentes tampones, el ARN es recuperado en un tampón que contiene inhibidores de ribonucleasas. El ARN viral extraído fue almacenado a -20°C hasta realizar la transcripción reversa.

3.10.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

El ARN extraído de las muestras positivas para rotavirus fue analizado en un sistema discontinuo de gel de poliacrilamida, que consta de un gel separador al 7.5% y un gel concentrador al 4%. Se aplicó 20 µl de ARN (mezclado con el tampón de carga) y se corrió durante dos horas a 100 voltios a temperatura ambiente. La tinción del gel se realizó con un primer paso de fijación con etanol 10% - ácido acético 0.5% durante 30 minutos, posteriormente se sumergió el gel en una solución de nitrato de plata 0.011 M durante 30 minutos. Se lavó dos veces con agua destilada y se procedió a sumergir el gel con la solución reveladora (NaOH 3% - formaldehído 0.75%) hasta el apareamiento de las bandas. La solución reveladora se interrumpió con ácido acético al 5% y posteriormente con etanol al 10%. Finalmente, el gel se deshidrató y se evaluaron los patrones de electroferotipo de cada muestra.

3.10.6. Transcripción reversa (RT) para rotavirus y norovirus

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó utilizando un iniciador aleatorio (Random primers 3 µg/µl, Invitrogen) de forma similar a como lo describen Ferreira y colaboradores [Ferreira et al., 2008]. Se mezclaron 2 µl de DMSO y 10 µl de ARN, se calentó a 97 °C por 7 minutos y rápidamente se enfrió en hielo por 2 minutos. Para un volumen de 50 µl de reacción se utilizó: 4 µl de dNTPs 2.5 mM (Promega), 10 µl del tampón de PCR 5X (Promega), 5 µl de MgCl₂ 25 mM (Promega), 1 µl de Transcriptasa reversa (SuperScript III 200 U/µl, Invitrogen) y 2 µl de iniciador aleatorio 50 ng/µl (Random primers 9 A₂₆₀ units, Invitrogen). La mezcla fue incubada en un termociclador (Perkin Elmer) a 25 °C por 5 minutos, 50 °C por 1 hora y 70 °C durante 20 minutos. El ADNc sintetizado se almacenó a -20 °C hasta el momento de su análisis.

3.10.7. Transcripción reversa (RT) para astrovirus

La síntesis del ADN complementario (ADNc) para astrovirus se realizó con un método comercial (GoScript Reverse Transcription System, Promega, Madison, WI) en un volumen final de reacción de 20 μ l, se utilizó: 4 μ l de tampón de reacción, 1 μ l de iniciador aleatorio, 1.6 μ l de cloruro de magnesio, 1 μ l de dNTPs, 0.5 μ l de RNasin, 1 μ l de transcriptasa reversa, 3 μ l de ARN viral como templete y el resto de agua libre de nucleasas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.10.8. Detección del gen VP7 de rotavirus

Todas las muestras positivas para RV-A en el ensayo de tamizaje fueron analizadas molecularmente para detectar el gen VP7. Para esto, se mezclaron 5 μ l de ARN con 0.79 μ l del iniciador Beg9 (25 pmol/ μ l) y 3.21 μ l de agua; esta mezcla se incubó a 94 °C por 2 minutos y luego se colocó en hielo durante 2 minutos. A la mezcla anterior se adicionó 6 μ l de la mezcla de transcripción reversa, 1.5 μ l de tampón 10X, 1.5 μ l dNTPs 10 mM, 1.8 μ l MgCl₂ 25 mM y 0.5 μ l de Transcriptasa reversa (Superscript III, Invitrogen); se incubó a 42 °C durante 60 minutos y adicionalmente a 95 °C por 5 minutos.

La mezcla de PCR consenso para la detección del gen VP7 consistió de 5 μ l del producto de transcripción reversa en un volumen final de 50 μ l de la mezcla de reacción. Las concentraciones finales fueron: 1X tampón para PCR (GoTaq Flexi Buffer, Promega), 0.1 mM de desoxinucleótidos, 0.12 pmol/ μ l del iniciador End9, 1.2 mM de cloruro de magnesio y 0.05 U/ μ l de ADN polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega). Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C, 45 °C y 72 °C durante 1 minuto a cada temperatura, con una extensión final a 72

°C durante 7 minutos. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción con bromuro de etidio.

Para la caracterización del gen VP7 se utilizaron iniciadores específicos para los genotipos G1, G2, G3 y G4 de rotavirus en conjunto con el iniciador Rvg9 [Gouvea et al., 1990]. La mezcla de PCR consistió de 1.5 µl del producto del PCR consenso en un volumen final de 50 µl de la mezcla de reacción. Las concentraciones finales fueron: 0.9X tampón para PCR (GoTaq Flexi Buffer, Promega), 0.1 mM de desoxinucleótidos, 0.4 µM del iniciador Rvg9 y 0.2 µM del resto de los iniciadores, 1.2 mM de cloruro de magnesio y 0.05 U/µl de ADN polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega). Se utilizaron las condiciones de amplificación descritas para el PCR consenso. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción con bromuro de etidio.

3.10.9. Detección y caracterización del gen VP4 de rotavirus

Todas las muestras positivas para RV-A en el ensayo de tamizaje fueron analizadas molecularmente para caracterizar el gen VP4. Esta caracterización se realizó en dos etapas; la etapa de detección del gen VP4 correspondió a un PCR consenso en el cual se utilizaron los iniciadores 4Con3 y 4 Con2 para amplificar un fragmento de 876 pb correspondiente a una región del gen VP4 de rotavirus [Gentsch et al., 1992]. La mezcla de PCR para la detección del gen VP4 consistió de 2.5 µl del producto de transcripción reversa en un volumen final de 25 µl de la mezcla de reacción. Las concentraciones finales fueron: 1X tampón para PCR (GoTaq Flexi Buffer, Promega), 0.2 mM de desoxinucleótidos, 0.4 µM de cada iniciador, 2 mM de cloruro de magnesio y 0.06 U/µl de ADN polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega). Se utilizaron las siguientes

condiciones de amplificación: 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 48 °C por 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto, con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción con bromuro de etidio.

Para la caracterización del gen VP4 se utilizaron iniciadores específicos para los genotipos P[4], P[6], P[8] y P[9] de rotavirus [Gentsch et al., 1992]. La mezcla de PCR consistió de 1 µl del producto del PCR consenso en un volumen final de 25 µl de la mezcla de reacción. Las concentraciones finales fueron: 1X tampón para PCR (GoTaq Flexi Buffer, Promega), 0.2 mM de desoxinucleótidos, 0.4 µM de cada iniciador, 2 mM de cloruro de magnesio y 0.06 U/µl de ADN polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega). Se utilizaron las condiciones de amplificación descritas para el PCR consenso. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción con bromuro de etidio.

3.10.10. Confirmación de astrovirus humanos por RT-PCR

Las muestras positivas para astrovirus humanos en el ensayo inmunoenzimático, así como un 10% de las muestras negativas fueron analizadas por PCR. Se utilizaron los iniciadores Mon269 y Mon270 para amplificar un fragmento de 449 pares de bases (pb) correspondiente a una región del ORF2 del genoma de astrovirus. La mezcla consistió de 10 µl de ADNc en un volumen final de 25 µl de la mezcla de reacción. Las concentraciones finales fueron: 1X tampón para PCR (GoTaq Flexi Buffer, Promega), 0.2 mM de desoxinucleótidos, 0.8 µM de cada iniciador, 2 mM de cloruro de magnesio y 0.06 U/µl de ADN polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega). Se utilizaron las

condiciones de amplificación descritas por Noel y colaboradores [Noel et al., 1995]. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción con bromuro de etidio.

3.10.11. Detección de norovirus humanos por RT-PCR

La totalidad de las muestras fueron analizadas por PCR para detectar norovirus humanos. Se utilizaron iniciadores degenerados Mon432/Mon434 y Mon431/Mon433 para amplificar un fragmento de 213 pares de bases (pb) correspondiente a la región B del ORF1. La mezcla consistió de 5 µl de ADNc en un volumen final de 25 µl de la mezcla de reacción. Las concentraciones finales fueron: 1X tampón para PCR (GoTaq Flexi Buffer, Promega), 0.2 mM de desoxinucleótidos, 0.3 µM de cada iniciador, 1.6 mM de cloruro de magnesio y 0.06 U/µl de ADN polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega). Se utilizaron las condiciones de amplificación descritas por [Beuret et al., 2002]. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción con bromuro de etidio.

3.10.12. Secuenciación de nucleótidos y análisis filogenético

Los productos de RT-PCR de 213 pb y 449 pb correspondientes a norovirus y astrovirus respectivamente, fueron cuantificados utilizando Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), se ajustó la concentración a 30 ng/µl, se embalaron en tubos de 1.5 mL de tapón de rosca y finalmente se enviaron a Macrogen (Nueva York, USA, <http://www.macrogenusa.net/>) para su purificación y posterior secuenciación. Los productos de RT-PCR fueron secuenciados en ambas direcciones usando los mismos iniciadores de la reacción de amplificación

Análisis filogenético de astrovirus. Las secuencias fueron editadas con Sequencher versión 5.0 (Gene Codes Corporation, Miami, USA) a fin de obtener una secuencia consenso. Estas secuencias consenso de los aislados de astrovirus se introdujeron en BLAST con el fin de buscar homología con secuencias de referencia en la base de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y poder asignarles de esa forma el genotipo. La alineación se realizó en BioEdit versión 7.1.3 [Hall, 1999], se incluyeron los cinco aislados de este estudio, ocho secuencias de referencia (HAstV-1 – 8) y secuencias de HAstV aisladas en otros países de América Latina disponibles en GenBank. Finalmente, para evaluar la historia evolutiva de los aislados se construyó un árbol filogenético con el algoritmo del vecino más cercano (Neighbor-Joining) que son árboles basados en distancia [Saitou and Nei, 1987]; estas distancias evolutivas se calcularon con el método de Kimura-2-parametros [Kimura, 1980] y se aplicó un bootstrap de 1,000 replicas utilizando el programa Mega 5 [Tamura et al., 2011].

Análisis filogenético de norovirus. Las secuencias fueron editadas con Sequencher versión 5.0 (Gene Codes Corporation, Miami, USA) a fin de obtener una secuencia consenso. Para la asignación del genogrupo, el genotipo y la variante para las cepas agrupadas en el genotipo GII.4 de norovirus, se utilizó una herramienta de genotipificación desarrollada por la Red Electrónica Global de Vigilancia para Norovirus (Noronet, <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool/>), en la cual se introducen las secuencias de cualquier región del genoma de norovirus y el programa las clasifica utilizando métodos filogenéticos en base al ORF1 o al ORF2 [Kroneman et al., 2011].

La alineación se realizó en BioEdit versión 7.1.3 [Hall, 1999]; se incluyeron las secuencias de los aislados de este estudio, un juego de secuencias de referencia que

representan los principales genotipos de los genogrupos I y II, y secuencias de la región B de norovirus aisladas en otros países de América Latina disponibles en GenBank. Finalmente, para evaluar la historia evolutiva de los aislados se construyeron dos árboles filogenéticos, uno para evidenciar de forma general la distribución de los genotipos y otro específico para mostrar las variantes del genotipo GII.4; se siguieron los mismos parámetros utilizados para el árbol filogenético de astrovirus.

3.11. Análisis de datos

3.11.1. Manejo de los datos

La información obtenida de cada participante fue manejada de forma confidencial y se le asignó un código a cada participante a fin de proteger su identidad. Se creó un registro electrónico en Microsoft Excel y se tuvo también un libro de registro como respaldo. Los datos obtenidos del cuestionario así como los resultados de los análisis de laboratorio se introdujeron en una base de datos en Microsoft Excel y fue analizada en EpiInfo versión 3.5.1.

3.11.2. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en el software EpiInfo versión 3.5.1. Se determinaron medidas de tendencia central para las variables discretas, frecuencias para variables cualitativas y se calculó la prevalencia de los agentes virales en estudio.

Se realizó la comparación de proporciones entre variables y mediante las pruebas de Chi cuadrado o Fisher se evaluó la significancia estadística, considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. La prueba de elección se determinó en base a las características de la muestra.

3.12. Consideraciones Éticas

El protocolo de investigación de este estudio fue aprobado por el Comité de investigación y Bioética del Instituto Hondureño de Seguridad Social (Anexo 2 y 5 respectivamente).

La presente investigación representó un riesgo mínimo para los participantes, debido a que la recolección de la muestra se realizó con método no invasivo. Se tomó consentimiento informado de los padres o tutores de los niños que participaron en el estudio. Se garantizó la confidencialidad de la información; las fichas de recolección de datos y los consentimientos informados permanecen bajo llave y su acceso es restringido a los investigadores.

3.13. Consideraciones de Bioseguridad

El estudio fue sometido al Comité de Bioseguridad de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Escuela de Microbiología para su evaluación en relación al cumplimiento de las normas de bioseguridad establecidas (Anexo 6).

La manipulación de las muestras, así como los procedimientos se desarrollaron en un laboratorio con nivel de bioseguridad tipo II, en vista que los agentes virales en estudio representan un riesgo mínimo de infección. Se elaboraron y siguieron los procedimientos operativos estándar para cada etapa del estudio, desde la recolección de la muestra hasta los análisis moleculares (Anexo 8). Una vez que se prepararon las suspensiones fecales, las muestras fueron esterilizadas por autoclave y posteriormente desechadas.

CAPITULO 4

4. RESULTADOS

Prevalencia de los tres agentes virales en estudio

Un total de 100 muestras fecales de niños menores de cinco años con diarrea aguda fueron analizadas para rotavirus del grupo A, norovirus y astrovirus humanos. Del total de las muestras analizadas, el 31% resultaron positivas para alguno de los tres agentes virales en estudio. La tabla 4 muestra las frecuencias individuales de cada agente viral, las cuales fueron: rotavirus 14 (14.0 %), norovirus 13 (13.0 %) y astrovirus humanos 5 (5.0 %).

Tabla 4. Prevalencia de virus entéricos en niños menores de cinco años con diarrea aguda en Tegucigalpa, Honduras.

Virus entérico	n=100	%
Etiología viral	31	31.0
Rotavirus	14	14.0
Norovirus	13	13.0
Astrovirus	5	5.0
Coinfecciones	1	1.0

Sobre el total de las muestras positivas, se detectó RV-A en un 45.2% (14/31), NoV en un 41.9% (13/31) y HAstV en un 16.1% (5/31). No se detectaron infecciones mixtas entre RV-A y los demás agentes virales. Sin embargo, en una de las muestras se identificó una coinfección entre HAstV y NoV, lo que representa un 20% de las muestras positivas para HAstV.

Asociación entre grupo de edad y agente viral identificado

Como se muestra en la tabla 5, al menos un agente viral se detectó en todos los grupos de edad. En el grupo de 49-60 meses solo se identificó rotavirus. La prevalencia de virus entéricos fue más alta (48.4%) en el grupo de edad de 13-24 meses. Rotavirus afectó principalmente a la población de 37-48 meses (30%), mientras que norovirus y astrovirus afectaron en una mayor proporción al grupo de 13-24 meses (25.8% y 9.7%, respectivamente). En promedio, el 75% de los casos de gastroenteritis viral se identificaron en la población menor de 24 meses (Figura 7); sin embargo, este resultado no fue estadísticamente significativo ($p=0.3051$).

Tabla 5. Distribución por grupo de edad de los agentes virales identificados en niños menores de cinco años con diarrea aguda en Tegucigalpa.

Grupo de edad (Meses)	Etiología viral No. (%)	Rotavirus No. (%)	Norovirus No. (%)	Astrovirus No. (%)	Muestras analizadas
≤ 12	9 (25.0 %)	5 (13.9 %)	3 (8.3 %)	1 (2.8 %)	36
13 – 24	15 (48.4 %)	4 (12.9 %)	8 (25.8 %)	3 (9.7 %)	31
25 – 36	3 (20.0 %)	1 (6.7 %)	1 (6.7 %)	1 (6.7 %)	15
37 – 48	4 (40.0 %)	3 (30.0 %)	1 (10.0 %)	0 (0.0 %)	10
49 – 60	1 (12.5 %)	1 (12.5 %)	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	8
Total	32	14	13	5	100

De las 14 muestras positivas para RV-A el 35.7% corresponde a menores de 12 meses, mientras que el 61.5% y 60% de muestras positivas de norovirus y astrovirus, respectivamente, corresponde a niños entre 13-24 meses.

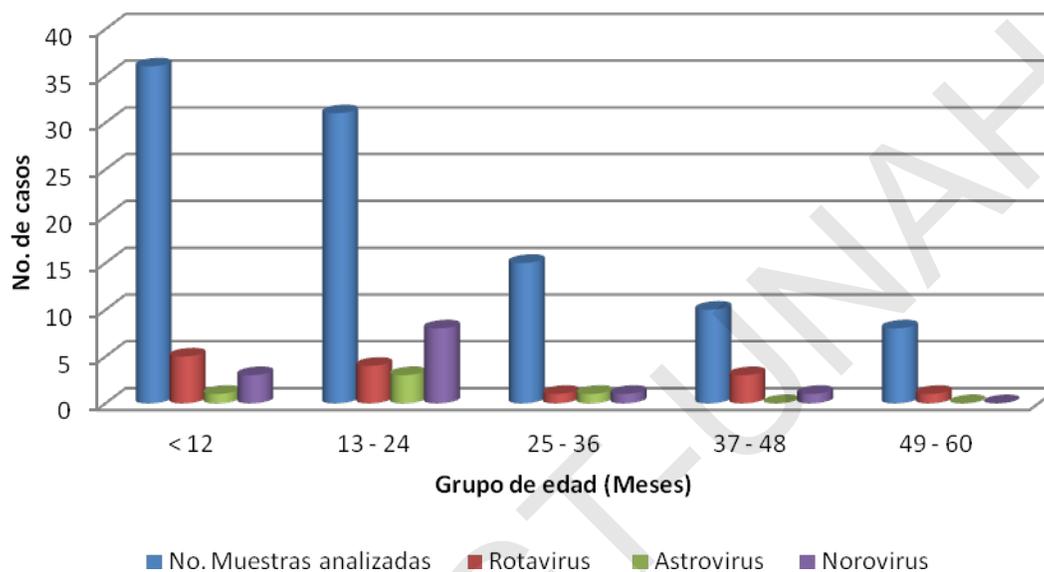


Figura 7. Etiología viral según grupo de edad.

Asociación entre género y agente viral identificado

En este estudio solo se determinó asociación estadísticamente significativa relacionada a género en la infección por rotavirus ($p=0.0421$); este virus fue detectado en un 19.35% en niños y un 5.26% en niñas. En la infección por norovirus se observó que los niños resultaron más infectados que las niñas (16.12% y 7.89%, respectivamente, $p=0.1905$); mientras que en la infección con astrovirus se observó que las niñas se infectaron con mayor frecuencia que los niños (7.89% y 3.22%, respectivamente, $p=0.2793$); no obstante, estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución según género de los agentes virales identificados en niños menores de cinco años con diarrea aguda en Tegucigalpa.

Género	No. muestras analizadas	No. muestras positivas (%)		
		Rotavirus	Norovirus	Astrovirus
Masculino	62	12 (19.35)	10 (16.12)	2 (3.22)
Femenino	38	2 (5.26)	3 (7.89)	3 (7.89)
Total	100	14 (14.0)	13 (13.0)	5 (5.0)

Distribución mensual de los agentes virales asociados a gastroenteritis en Tegucigalpa

El porcentaje más alto (56.3%; 9/16) de infección por rotavirus se observó en el mes de febrero del 2011. (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución por mes de estudio de los agentes virales identificados en niños menores de cinco años con diarrea aguda en Tegucigalpa.

Mes de Admisión	No. muestras analizadas	Rotavirus	Norovirus	Astrovirus
Octubre	2	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)
Noviembre	5	0 (0%)	3 (60%)	0 (0%)
Diciembre	4	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
Enero	4	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
Febrero	16	9 (56.3%)	0 (0%)	1 (6.3%)
Marzo	18	3 (16.7%)	1 (5.6%)	1 (5.6%)
Abril	11	1 (9.1%)	2 (18.2%)	0 (0%)
Mayo	14	0 (0%)	3 (21.4%)	0 (0%)
Junio	24	0 (0%)	3 (12.5%)	1 (4.2%)
Julio	2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Por otro lado, norovirus fue más frecuente en el mes de noviembre del 2010 (60%; 3/5) mientras que astrovirus lo fue en el mes de octubre del mismo año (50%, 1/2).

El 93% de los casos de rotavirus y un 40% de los de astrovirus se detectaron en el primer trimestre del año, mientras que el 61.5% de los casos positivos de norovirus se detectaron en el segundo trimestre (Figura 8).

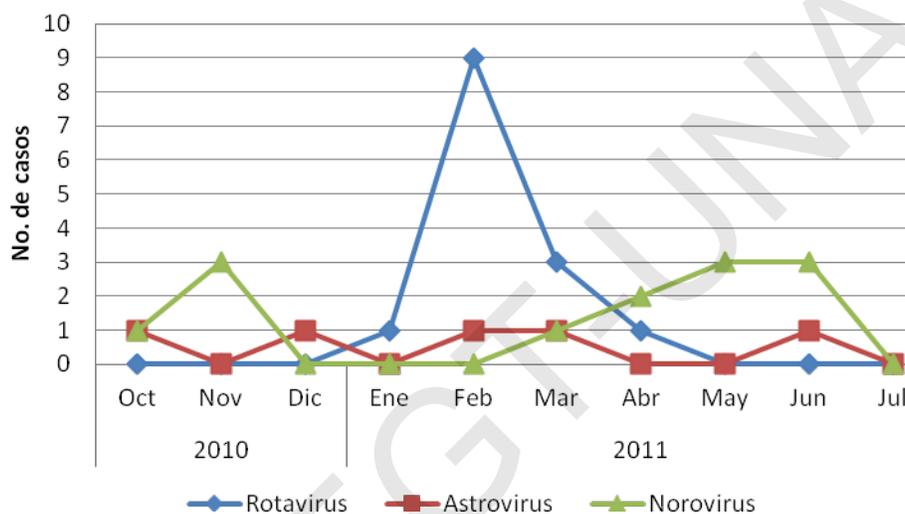


Figura 8. Distribución de de los agentes virales por mes de estudio en Tegucigalpa, Honduras.

Aspectos clínicos de las diarreas de etiología viral

Como se muestra en la tabla 8, los síntomas más asociados a un cuadro diarreico de etiología viral fueron: diarrea (100%) con una media de 7 evacuaciones en las últimas 24 horas, vómitos (84%), fiebre (74%) y deshidratación (48%). En general, los síntomas son comunes entre cada agente etiológico, pero la infección por rotavirus parece ser más severa en vista de que mostró un porcentaje mayor de hospitalizaciones secundarias a deshidratación.

Tabla 8. Aspectos clínicos del cuadro diarreico con etiología viral presentado en los niños menores de cinco años en Tegucigalpa, Honduras.

Síntoma	Etiología viral	Rotavirus	Norovirus	Astrovirus
Diarrea acuosa	31 (100%)	14 (100%)	13 (100%)	5 (100%)
No. evacuaciones	3 – 20 (Media = 7)	3 – 20 (Media =8)	3 – 10 (Media =6)	5 – 10 (Media =7)
Vómitos	26 (84%)	12 (86%)	11 (85%)	4 (80%)
Fiebre	23 (74%)	11 (79%)	9 (69%)	3 (60%)
Deshidratación	15 (48%)	7 (50%)	7 (54%)	1 (20%)
Hospitalización	12 (39%)	6 (43%)	5 (38%)	1 (20%)

En la presente investigación se incluyeron 82 niños ambulatorios y 18 niños hospitalizados. En 12 de los 18 (66.67%) niños hospitalizados se detectó un enteropatógeno viral, que corresponde a rotavirus y norovirus en un 50% y 41.7%, respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Distribución de los agentes virales identificados en niños menores de cinco años con diarrea aguda en Tegucigalpa de acuerdo a su estado hospitalizado o ambulatorio.

Participante	Rotavirus	Norovirus	Astrovirus	No. muestras analizadas
Ambulatorio	8	8	4	82
Hospitalizado	6	5	1	18
Total	14	13	5	100

Asociación de factores socioeconómicos en la ocurrencia de diarrea de etiología viral

Utilizando una ficha epidemiológica se recolectó información pertinente sobre las condiciones socioeconómicas que pueden influir en la ocurrencia o diseminación de gastroenteritis de origen viral. Entre los participantes en los cuales se detectó alguno de los tres agentes virales en estudio, el tipo de piso de las viviendas fue bastante heterogéneo (cemento=32%, ladrillo=29%, cerámica=26%, otro=3%); el 71% reportó el uso de servicio sanitario para la disposición de excretas, mientras que un 23% empleaba letrina y solamente un 6% reportó fecalismo al aire libre.

Por otra parte, el 74.4% tiene acceso a agua potable y servicio de recolección de desechos proporcionado por la Alcaldía del Municipio del Distrito Central. No obstante, un 19.4% reportó utilizar agua de cisterna en vista de no tener acceso a agua potable. Solo un 6.5% de los padres o encargados reportaron consumir agua no tratada. Los participantes en los cuales se identificó al menos un agente viral provenían de 26 barrios o colonias de Tegucigalpa y Comayagüela en el Distrito Central, localizados principalmente en el área periférica de la ciudad en las zonas sureste y oeste.

No se observó diferencias significativas entre infectados y no infectados por virus entéricos en relación a los factores socioeconómicos y ambientales ($p > 0.05$) (Figura 9).

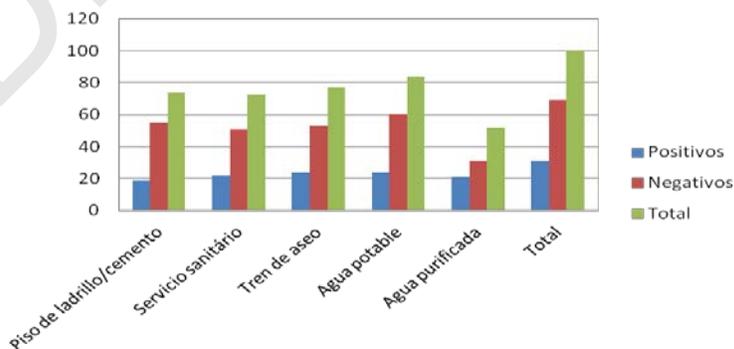


Figura 9. Comparación de aspectos socioeconómicos y ambientales entre infectados y no infectados por virus entéricos.

Detección molecular de astrovirus

Las 100 muestras fueron tamizadas para astrovirus humanos mediante un ensayo inmunoenzimático (Ridascreen Astrovirus, r-Biopharm), y se detectaron 5 (5%) muestras positivas. La totalidad de muestras positivas más un 10% de muestras negativas fueron analizadas molecularmente, obteniéndose un 100% de concordancia en la RT-PCR con las muestras previamente positivas en el inmunoensayo (Figura 10).

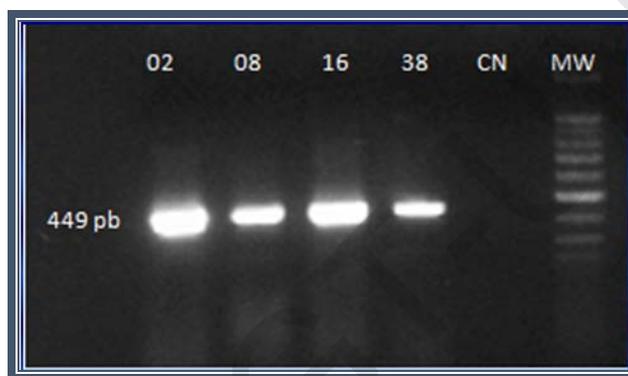


Figura 10. RT-PCR para astrovirus humanos. La detección de un fragmento de 449 pb es considerado positivo para astrovirus. Carriles 1-4: corresponde a muestras positivas para astrovirus humanos, CN: control negativo y MW: marcador de peso molecular de 100 pb.

Determinación de genotipos de astrovirus

Por secuenciación se determinó el genotipo de las 5 cepas de astrovirus detectadas en población infantil de Tegucigalpa. Se determinó la circulación de 3 de los 8 genotipos clásicos de astrovirus en esta población, siendo el genotipo 1 y 8 los más frecuentes (Tabla 10).

Tabla 10. Genotipos de astrovirus humanos detectados en la ciudad de Tegucigalpa en niños menores de cinco años.

Código	Genotipo	Genero	Edad (Meses)
AVH-01	HAstV-1	M	13
AVH-02	HAstV-1	F	18
AVH-03	HAstV-2	F	17
AVH-04	HAstV-8	M	9
AVH-05	HAstV-8	F	36

Análisis filogenético

El árbol filogenético de la figura 11 demuestra las relaciones evolutivas de las cepas de astrovirus hondureñas con las cepas de referencia y otras cepas de astrovirus de países de América Latina. Las cepas de astrovirus hondureñas comunicadas en este estudio se agruparon en tres genotipos distintos; HAstV-1, HAstV-2 y HAstV-3. En el caso de las cepas que corresponden a HAstV-1 se observó que se agruparon en un mismo grupo (cluster) junto con cepas de Argentina y Brasil con una divergencia máxima en la secuencia de nucleótidos del 2.4%; este grupo presenta una alta homología con la cepa de referencia (~96.6%). En el genotipo 8 de astrovirus se observó una distribución más homogénea ya que todas las cepas se agruparon en un mismo grupo junto con la cepa de referencia; las cepas hondureñas de HAstV-8 presentaron una divergencia promedio en la secuencia de nucleótidos del 2.6% con la cepa de referencia y un 1.05% con una cepa brasileña. Interesantemente la única cepa hondureña de HAstV-2 formó un grupo independiente, presentó una divergencia en la secuencia de nucleótidos del 6.6% con a la cepa de referencia del tipo 2 de astrovirus humano.

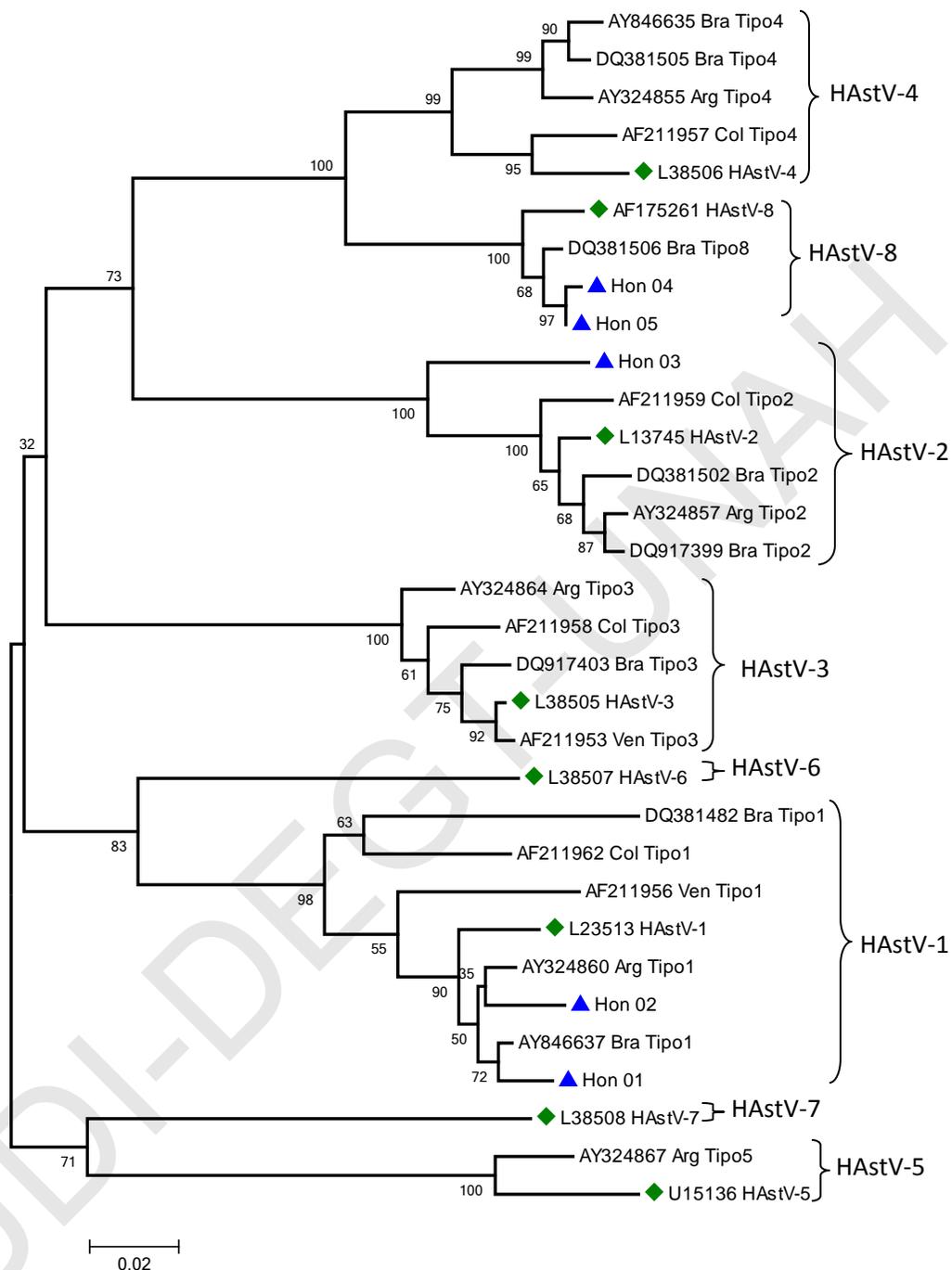


Figura 11. Árbol filogenético basado en una región parcial del gen de la cápside que muestra las relaciones filogenéticas de las cepas de astrovirus detectadas en niños menores de cinco años en Tegucigalpa, Honduras. Las abreviaturas para los países son las siguientes: Hon: Honduras, Arg: Argentina, Bra: Brasil, Col: Colombia, Ven: Venezuela.

Los rombos de color verde denotan las cepas de referencia: número de acceso en Genbank y genotipo de astrovirus. Los valores de bootstrap se encuentran en los nodos del árbol, mientras que los genotipos se hallan a la derecha.

Detección y caracterización molecular de norovirus

De las 100 muestras analizadas para norovirus por RT-PCR se detectaron 13 muestras positivas (Figura 12).



Figura 12. RT-PCR para norovirus humanos. La detección de un fragmento de 213 pb se considera positiva para norovirus. Carriles 40, 60 y 80: corresponden a muestras positivas para norovirus, Carriles: 50, 70, 90, 100, 14, 22, 23 y 25: corresponde a muestras negativas para norovirus, CP: control positivo, CN: control negativo y MW: marcador de peso molecular (50, 150, 300, 500, 750 y 1000 pb).

Se secuenció la totalidad de las cepas de norovirus detectadas en esta investigación y con ayuda de la herramienta de genotipificación de la Red Electrónica Global de Vigilancia para Norovirus (Noronet, <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool/>) se logró asignarle el genogrupo al 100% de estas muestras, mientras que el genotipo solo pudo ser asignado al

84.6% de ellas. El 92% de las muestras positivas por NoV pertenecen al genogrupo II (GII) y el 8% al genogrupo I (GI); en esta investigación no se detectó la circulación del genogrupo IV. En la tabla 11 se resumen los genogrupos, genotipos y variantes del GII.4 encontrados en la ciudad de Tegucigalpa.

Tabla 11. Genotipos de norovirus humanos detectados en la ciudad de Tegucigalpa en niños menores de cinco años.

Código	Genogrupo	Genotipo	Variante
NVH-01	II	GII.4	2010
NVH-02	II	GII.16	n/a
NVH-03	II	GII.16	n/a
NVH-04	II	GII.16	n/a
NVH-05	II	GII.4	2006b
NVH-06	II	GII.4	2006b
NVH-07	II	GII.*	n/a
NVH-08	II	GII.4	2006b
NVH-09	II	GII.4	2006b
NVH-10	II	GII.4	2006b
NVH-11	II	GII.4	2006b
NVH-12	II	GII.4	2006b
NVH-13	I	GI.*	n/a

* No fue posible asignar el genotipo.

Entre las muestras positivas para NoV el genotipo más prevalente fue GII.4 (61.5%) seguido de GII.16 (23.1%); a un 15.4% no fue posible asignársele el genotipo en base a la región de la RdRp.

Análisis filogenéticos

Se escogieron nueve de las trece cepas secuenciadas para elaborar un árbol filogenético con el fin de evidenciar las relaciones evolutivas de las cepas hondureñas de norovirus. Esta selección se realizó utilizando como parámetros la caracterización completa de la cepa hasta genotipo y que la longitud de la secuencia estuviese de acuerdo con las demás cepas utilizadas. Como se muestra en la figura 13, las cepas hondureñas de norovirus se agruparon únicamente en dos genotipos dentro del GII.

En relación a las cepas pertenecientes al genotipo GII.4 se puede observar que la mayoría de ellas se agruparon en mismo grupo junto con cepas brasileñas de norovirus. Sin embargo, dentro de este grupo se distinguen dos linajes; uno en el cual se agrupan las cepas 8, 9, 10 y 11 con una divergencia máxima del 1% en su secuencia de nucleótidos y otro que agrupa la cepa hondureña 6 y la mayoría de las cepas brasileñas con una divergencia máxima entre ellas del 3.1% en su secuencia de nucleótidos. Se observó que la cepa hondureña 1 se agrupó junto con una cepa de referencia GII.4 con la cual comparte un 94.3% de homología.

Las cepas hondureñas 03 y 04 de norovirus presentaron un divergencia del 4.7% en la secuencia de nucleótidos con la cepa de referencia del genotipo GII.16.

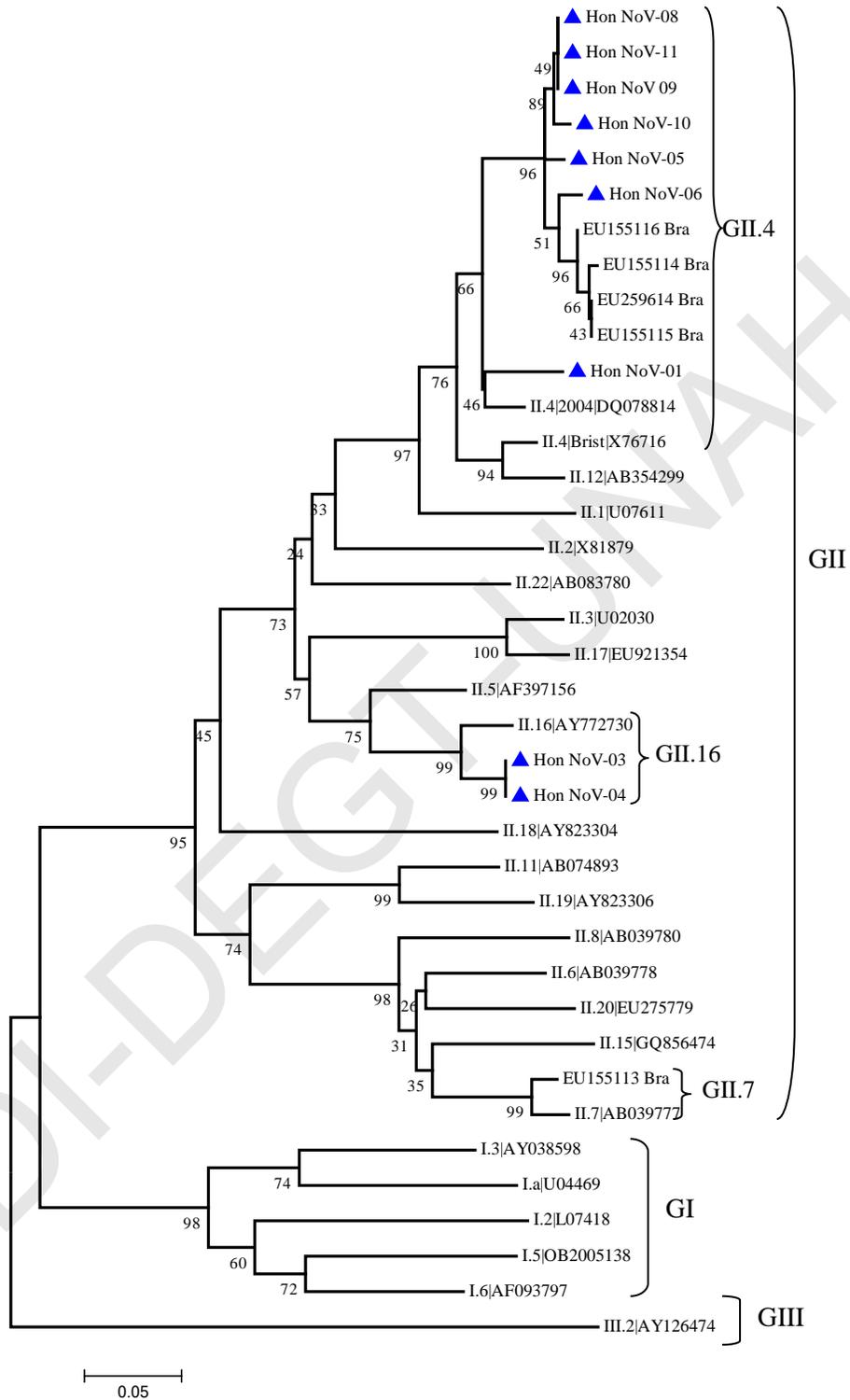


Figura 13. Árbol filogenético basado en una región parcial del gen de la ARN polimerasa ARN dependiente que muestra las relaciones filogenéticas de cepas de norovirus detectadas

en niños menores de cinco años en Tegucigalpa, Honduras. La nomenclatura de las cepas es la siguiente: genotipo|número de acceso en Genbank. Los valores de bootstrap se encuentran en los nodos del árbol, mientras que los genogrupos y genotipos se hallan a la derecha.

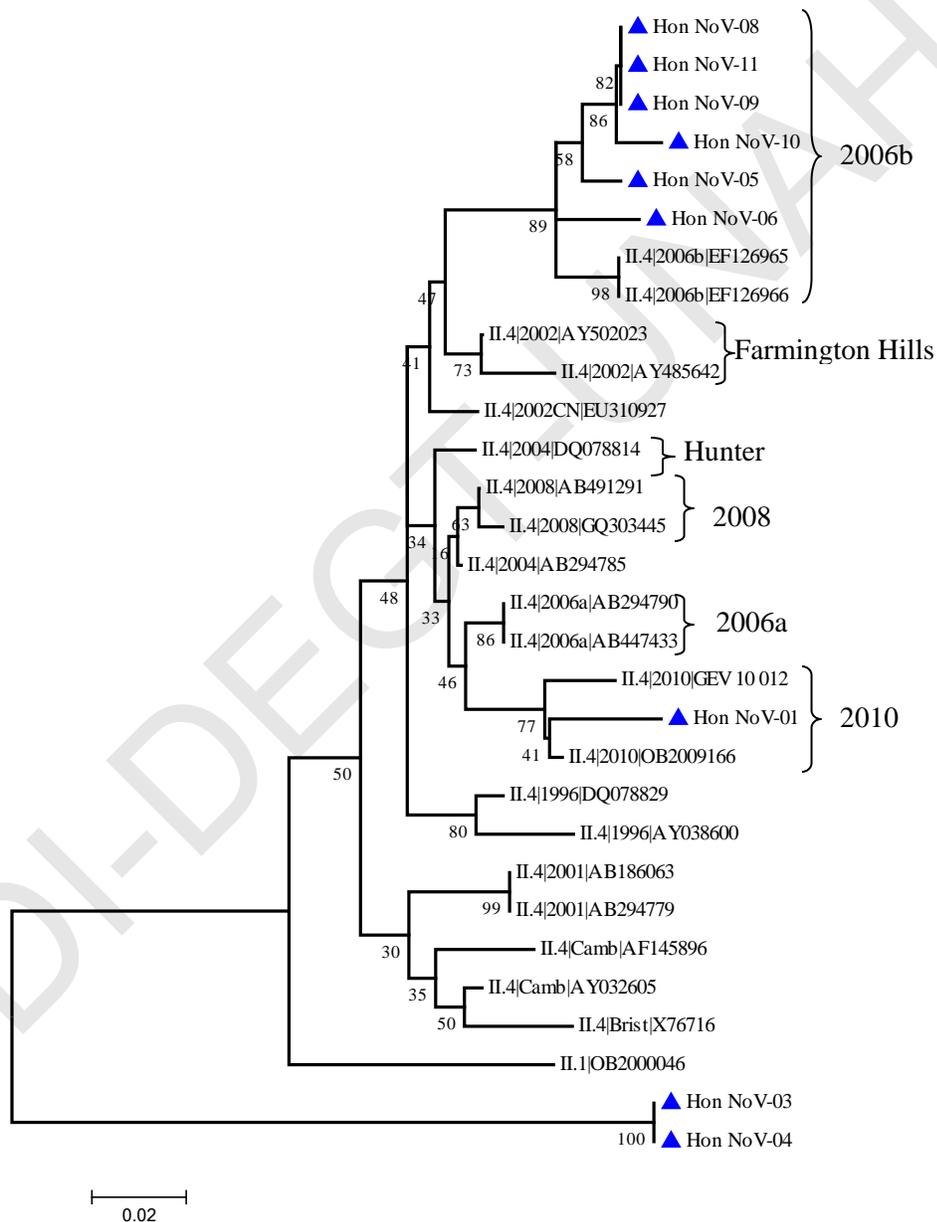


Figura 14. Árbol filogenético basado en una región parcial del gen de la ARN polimerasa ARN dependiente que muestra las relaciones filogenéticas de variantes de norovirus del

genotipo GII.4 detectadas en niños menores de cinco años en Tegucigalpa, Honduras. La nomenclatura de las cepas es la siguiente: genotipo|variante|número de acceso en Genbank. Los valores de bootstrap se encuentran en los nodos del árbol, mientras que las variantes se hallan a la derecha.

En la figura 14 se representa la historia evolutiva de las variantes del genotipo GII.4 detectadas en la ciudad de Tegucigalpa. Se observó que las cepas de norovirus de este genotipo se agrupan básicamente en dos variantes: 2006b y 2010. De las cuales el 88% son de la variante 2006b.

Detección y caracterización molecular de rotavirus

Con la prueba inmunocromatográfica se detectó rotavirus del grupo A en 14 (14%) de las 100 muestras estudiadas, las cuales fueron analizadas por RT-PCR, lográndose un 100% de concordancia entre la prueba inmunocromatográfica y la RT-PCR (Figura 15).

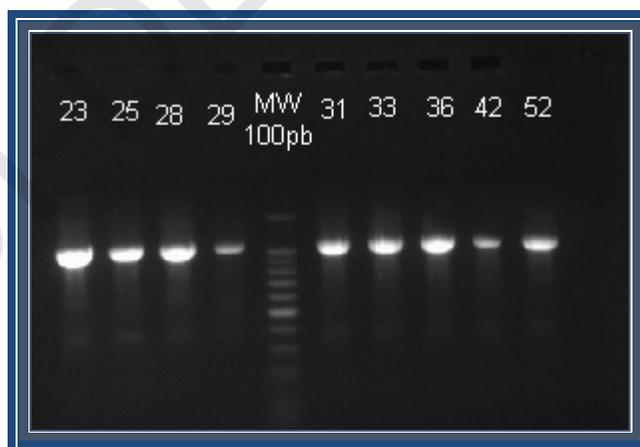


Figura 15. PCR para gen VP7 de rotavirus. La detección de un fragmento de 1062 pb es considerado positivo para rotavirus del grupo A. Carriles 1-4 y 6-10: corresponde a muestras positivas para rotavirus del grupo A, MW: marcador de peso molecular de 100 pb.

En el 92% de las muestras positivas para rotavirus se identificó el genotipo G2P[4] además de la circulación de los genotipos G3P[4] y G3P[8] (Tabla 12). En los niños vacunados que presentaron infección sintomática de rotavirus se detectó únicamente el genotipo G2P[4].

Tabla 12. Genotipos de rotavirus del grupo A detectados en la ciudad de Tegucigalpa en niños menores de cinco años durante Octubre 2010 – Julio 2011.

Código	Genotipo	Edad (meses)	Estado de inmunización contra RV-A
RVH-01	G2P[4]	14	Vacunado
RVH-02	G2P[4]	10	Vacunado
RVH-03	G2P[4]	5	No vacunado
RVH-04	G2P[4]	57	No vacunado
RVH-05	G2P[4]	6	Vacunado
RVH-06	G2P[4]	41	No vacunado
RVH-07	G2P[4]	18	No vacunado
RVH-08	G2P[4]	14	No vacunado
RVH-09	G2P[4]	39	No vacunado
RVH-10	G2P[4]	9	No vacunado
RVH-11	G2P[4]	12	Vacunado
RVH-12	G3P[8]	22	No vacunado
RVH-13	G2P[4], G3P[4]	46	No vacunado
RVH-14	G2P[4]	34	No vacunado

Asociación entre la vacunación contra rotavirus y la ocurrencia de infección

Rotavirus fue detectado en 4 (7%) de los niños vacunados contra rotavirus y en 10 (25%) de los niños no vacunados. Los niños vacunados infectados por rotavirus eran todos menores de 24 meses (Tabla 13).

Tabla 13. Infección por rotavirus en niños vacunados y no vacunados.

Estado inmunización contra RV-A	No presento infección con RV-A	Presento Infección con RV-A	Total
No Vacunado	30	10	40
Vacunado	56	4	60
Total	86	14	100

El hecho de que el niño esté vacunado contra rotavirus demostró tener un efecto protector contra la infección por rotavirus del grupo A (RR=0.8036, p=0.0096).

Electroferotipos de rotavirus

En 9 de las muestras positivas por rotavirus se encontró un electroferotipo largo de distribución de segmentos; mediante esta técnica no se evidenció coinfección entre genotipos.

CAPITULO 5

5. DISCUSION

En Honduras el problema de la morbimortalidad de la diarrea infantil ha sido por largo tiempo una situación de salud no resuelta; este estudio provee información valiosa sobre la etiología de las diarreas agudas en niños menores de cinco años en Tegucigalpa. Los resultados obtenidos demuestran que rotavirus del grupo A continúa siendo la causa principal de gastroenteritis aguda infantil, aunque con una prevalencia menor a la reportada en años anteriores, similar a lo observado en otros países de la región Centroamericana [Yen et al., 2011]. Además, esta investigación representa hasta donde tenemos conocimiento, el primer estudio molecular de la presencia de norovirus y astrovirus humanos como agentes diarreicos en la población infantil hondureña.

La prevalencia obtenida de rotavirus (14%) en este estudio fue menor a la reportada en años anteriores como lo demuestra un estudio de casos y controles que incluyó 521 niños menores de cinco años entre junio del 2000 y junio del 2002, el cual demostró que RV era el agente causal más frecuente con un 42.8% de prevalencia [Melgar-Cano and Moncada, 2003]. De forma similar, el Sistema de Vigilancia de las gastroenteritis por rotavirus de la Secretaría de Salud de Honduras reportó entre el 2006-2008 porcentajes de positividad de rotavirus entre el 36-46% [Secretaría de Salud Honduras, 2008]. Es importante mencionar que las prevalencias reportadas en estos estudios corresponden al periodo previo a la introducción de la vacuna contra rotavirus que fue en el año 2009. Aún y cuando la población estudiada es pequeña, la prevalencia documentada en este estudio sugiere que la introducción de la vacuna contra rotavirus ha ayudado a reducir el número de casos de

gastroenteritis infantil aguda, lo que coincide con los hallazgos encontrados en estudios posteriores a la vacunación en Latinoamérica.

En un estudio realizado en Brasil por Gurgel y colaboradores en el 2009, reportaron que después de la introducción de la vacuna en el 2006 hubo una reducción en el número global de consultas y hospitalizaciones por diarrea en la región noreste de ese país suramericano, especialmente en niños pequeños, los autores atribuyeron este descenso a la vacunación y a la implementación de medidas de saneamiento [Gurgel et al., 2009]. Richardson y colaboradores en el 2010 informaron que después de la introducción de la vacuna contra rotavirus se observó un descenso significativo en el número de muertes relacionadas a diarrea en niños mexicanos y sugieren que puede deberse a la vacunación contra rotavirus [Richardson et al., 2010]. En Centroamérica, de Palma y colaboradores condujeron un estudio entre enero del 2007 a junio del 2009 con el objetivo de evaluar la efectividad de la vacuna monovalente de rotavirus contra casos severos de gastroenteritis en El Salvador y llegaron a la conclusión que la vacuna monovalente (Rotarix) contra rotavirus es altamente efectiva para prevenir el número de admisiones de diarrea por rotavirus en niños menores de 2 años [de Palma et al., 2010]. Es importante subrayar que en este estudio rotavirus fue detectado principalmente en los niños no vacunados y se determinó que el hecho de estar vacunado contra rotavirus tiene un efecto protector ($RR=0.8036$, $p=0.0096$) en el desarrollo de un cuadro sintomático de infección por este agente. Sin embargo, para poder evaluar de una forma más consistente y poder concluir el rol de la vacunación contra rotavirus en la reducción de la morbimortalidad asociada a este agente en nuestro país se requiere de un estudio más amplio que involucre un mayor número de muestra que sea representativa de la población infantil nacional.

Es importante determinar los genotipos circulantes de rotavirus en la etapa post vacunación, a fin de identificar cambios en los patrones de distribución de estos virus y poder correlacionar a la vez si la vacuna está brindando una protección efectiva a la población infantil o si los genotipos que infectan una cierta población en un momento dado están evadiendo la respuesta inmune inducida por la vacuna. En este sentido, los resultados de este estudio demuestran una predominancia del genotipo G2P[4], el cual se detectó en el 92% de los casos positivos por rotavirus. Este hallazgo está en congruencia a lo reportado por otros investigadores en América Latina; por ejemplo, en Brasil en el 2009 se reportó un 96% de casos de rotavirus del genotipo G2P[4] después de implementada la vacunación por rotavirus [Carvalho-Costa et al., 2009]. En general, el incremento del genotipo G2P[4] en la etapa post vacunación se ha reportado por diferentes grupos de investigación en los últimos años, llegando a la conclusión que la vacuna monovalente de rotavirus parece ser menos efectiva en la prevención de la diarrea causada por rotavirus del grupo A del genotipo G2P[4], el cual no comparte ninguno de los antígenos de superficie con la cepa de la vacuna [Ruiz-Palacios et al., 2006]. El incremento en la prevalencia de este genotipo y la reducida protección que tiene la vacuna hacia éste puede representar un problema inminente de salud, ya que en los últimos años este tipo de rotavirus se ha asociado con la ocurrencia de brotes; en nuestro país en el año 2006 ocurrió un brote importante de gastroenteritis por rotavirus debido a este genotipo [Ferrera et al., 2007]. Esto resalta la importancia de la vigilancia de las gastroenteritis por rotavirus y la detección de los genotipos circulantes y la necesidad de desarrollar medidas preventivas eficientes contra estos virus.

Aún y cuando el resultado de la prevalencia de rotavirus y la observada efectividad de la vacuna en la población infantil son muy alentadores es importante retomar el problema de las gastroenteritis agudas ya que en los últimos años se ha observado un incremento en el número de otros agentes virales asociados a este importante problema de salud.

Diferentes autores han evaluado la dinámica de la etiología de la gastroenteritis viral en la etapa post vacunación de rotavirus y definen a norovirus como un agente emergente e importante en la ocurrencia de casos esporádicos y epidémicos y establecen la importancia de investigar o establecer un sistema de vigilancia para estos virus [Fioretti et al., 2011; Lin et al., 2010; Rivera et al., 2011]. En un estudio realizado en Nicaragua (2007-2008) con el fin de determinar si la vacuna pentavalente RV5 disminuía el número de casos de infección por RV Bucardo y colaboradores concluyen que la introducción de la vacunación reduce la transmisión de RV en la comunidad y recomiendan se dé un seguimiento de NoV en la etapa post vacunación al determinar en aguas residuales una elevada prevalencia de NoV en comparación con rotavirus [Bucardo et al., 2011].

En esta investigación se determinó una prevalencia de norovirus del 13% en casos esporádicos en niños menores de cinco años, la cual es comparable a la reportada en Nicaragua (12%) [Bucardo et al., 2008] y Venezuela (13%) [Gonzalez et al., 2011], y menor a la que se reporta en Perú (17.4%) [Rivera et al., 2011]. A pesar que el cuadro de gastroenteritis por NoV se suele referir como moderado y de rápida recuperación, es de especial interés el alto porcentaje (38.5%) de los casos positivos por NoV que necesitaron ser hospitalizados, a diferencia de lo reportado en Nicaragua (15%) en 2008 [Bucardo et al., 2008].

En este estudio el 92.3% de los casos positivos por NoV se agruparon en el genogrupo II, lo que concuerda con lo reportado en otros países como Venezuela [Rivera et al., 2011] y en general a nivel mundial. Si bien no se ha podido establecer la causa de esta marcada predominancia del genogrupo II, está demostrado que la excreción viral para el GII es 100 veces mayor que para el GI, lo que facilitaría su diseminación en el ambiente [Chan et al., 2006].

La literatura establece que los NoV son virus con mucha variabilidad genética. Interesantemente, las cepas circulantes en niños de Tegucigalpa corresponden únicamente a los genotipos GII.4 y GII.16 incluidas en el genogrupo II que es el más frecuente en la región y a nivel mundial [Bucardo et al., 2008; Xavier et al., 2009], a diferencia de otros estudios en América Latina que reportaron la circulación de un mayor número de genotipos [Fioretti et al., 2011]. El análisis filogenético de las cepas hondureñas de NoV permitió agruparlas junto con cepas brasileñas y de referencia observándose una baja divergencia en la secuencia de nucleótidos. Es importante hacer notar la dificultad en la obtención de secuencias de NoV de otros países Latinoamericanos; esta dificultad radica principalmente en la utilización de diferentes protocolos para la caracterización molecular de NoV basados en diferentes regiones del genoma del virus y sugiere la necesidad de consensuar dichas metodologías con el objetivo de facilitar la comparación entre los resultados obtenidos en cada país.

Un único genotipo, GII.4, se ha asociado con todas las epidemias de gastroenteritis por NoV a nivel mundial. Este genotipo utiliza diferentes mecanismos de variación y da como resultado el surgimiento de nuevas variantes antigénicas. Diferentes variantes epidémicas de NoV han surgido en los últimos 15 años; en 1995-1996, 2002, 2004, 2006, 2007-2008 y en 2009 [Bull and White, 2011]. Dentro del genotipo GII.4, se detectó en Tegucigalpa la

circulación de dos variantes; 2006b y 2010. La variante 2006b es una descendiente de la cepa de NoV denominada como Farmington Hills 2002, dicha variante circuló entre 2006-2010 y se convirtió en predominante durante 2007. Las variantes de NoV pueden variar de acuerdo a la región geográfica; en Brasil por ejemplo recientemente se reportó la circulación de las variantes 2004, 2006a y 2006b del genotipo GII.4 [Fioretti et al., 2011].

Por otro lado, la frecuencia obtenida de astrovirus humanos (5%) es comparable a la reportada en otros países latinoamericanos [Espul et al., 2004; Mendez-Toss et al., 2004; Soares et al., 2008]; sin embargo, según la literatura estas frecuencias pueden oscilar de acuerdo a la región geográfica y la época del año en que se realice la detección [Victoria et al., 2007]. En este estudio se detectó la circulación de tres genotipos de astrovirus: HAstV-1, HAstV-2 y HAstV-8, siendo los más frecuentes los tipos 1 y 8; no se observó un predominio claro de alguno de los tres genotipos a diferencia a lo reportado en la literatura de países de la región [Espul et al., 2004; Soares et al., 2008; Victoria et al., 2007]. El análisis filogenético de las cepas hondureñas de astrovirus humanos demuestra una alta homología (96.6%) con cepas de HAstV-1 y HAstV-8 detectadas en países latinoamericanos y las cepas de referencia, a diferencia de la cepa hondureña HAstV-2 que formó un grupo independiente con una homología del 93.4% con la cepa de referencia (Figura 11).

Diversos estudios establecen que es frecuente la asociación de rotavirus con otros enteropatógenos, principalmente otros agentes virales como astrovirus [Mendez-Toss et al., 2004; Victoria et al., 2007]; no obstante, este estudio no reveló infecciones mixtas entre estos dos virus, con la excepción de una coinfección entre norovirus y astrovirus humanos.

La asociación entre edad y agente viral revelada en este estudio es congruente a lo que se reporta en estudios anteriores en el país y en la literatura global. Rotavirus y norovirus se manifestaron prácticamente en todos los grupos de edad, principalmente en niños menores de dos años. De forma similar, los astrovirus humanos fueron detectados en niños entre los 9-36 meses de edad, el 80% de ellos menores de dos años; lo anterior coincide con reportes que establecen que la prevalencia de astrovirus está relacionada con la edad [Giordano et al., 2004; Moser and Schultz-Cherry, 2005; Victoria et al., 2007]. Recordemos que la lactancia es una época de inmunidad a muchos agentes patógenos debido a los anticuerpos maternos obtenidos de la madre. Una vez terminada esta etapa, el infante inicia el proceso de reacción a los agentes patógenos, sin mucho éxito protector, lo que aumenta la posibilidad sobretodo de infección por HAstV, como lo demuestran los resultados de nuestra investigación descritos en la tabla 5.

Consecuentemente, los bajos niveles de frecuencia en niños mayores de dos años se puede atribuir posiblemente a la adquisición de inmunidad protectora contra estos virus entéricos, resultado de la exposición a estos virus desde edades tempranas [Moser and Schultz-Cherry, 2005]. Se ha documentado que el sistema inmune juega un rol importante en la protección a la infección por rotavirus y astrovirus humanos; se destaca la importancia de la respuesta inmune humoral en la protección a la infección con astrovirus [Koci, 2005].

Entre otros factores asociados a la susceptibilidad a la infección por virus entéricos, se menciona al género. En el caso de rotavirus se ha observado una diferencia significativa con este factor, siendo los niños más susceptibles que las niñas. Sin embargo, en nuestro estudio no se pudo establecer dicha relación probablemente por el número de muestras

recolectadas. Algunos autores han propuesto que la infección por astrovirus no está relacionada con el género de los individuos infectados [Cruz et al., 1992; Soares et al., 2008], lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio ya que no se observó una diferencia significativa entre género y la infección por astrovirus.

En relación a otras variables como el nivel socioeconómico, se observó que la mayoría de los casos provenían de áreas urbanas de clase media-baja, lo que podría sugerir que la infección de virus entéricos es más prevalente en niños que viven en áreas pobres como lo menciona Cruz et al. [Cruz et al., 1992]. No obstante, para poder establecer que el nivel socioeconómico está relacionado con la infección por astrovirus u otros patógenos entéricos, se necesitan estudios comparativos que incluyan participantes de diferentes sectores de la ciudad. Por otro lado, se menciona que las variables socioeconómicas no son determinantes en la ocurrencia o no de infecciones por virus entéricos, debido a que muestran prevalencias similares en países desarrollados y en vías de desarrollo, como es el caso de norovirus [Patel et al., 2008].

El hecho que la diarrea aguda continúe siendo un problema de salud pública en el país, hace imperante la necesidad de vigilar e investigar su etiología para poder establecer medidas de prevención adecuadas. La información obtenida en este estudio, es un avance en la comprensión de la diversidad de agentes etiológicos virales responsables de la diarrea infantil aguda. A partir de esta información se puede plantear la necesidad de desarrollar estudios de investigación que abarquen un mayor periodo de estudio e involucre más centros asistenciales para obtener una mejor representación de la importancia de estos tres agentes virales en la ocurrencia de gastroenteritis aguda.

CAPITULO 6

6. CONCLUSIONES

1. Se reporta por primera vez en Honduras la prevalencia de norovirus y astrovirus humanos en niños menores de cinco años con diarrea aguda; se describen los genotipos circulantes de los mismos, lo que sugiere una diversidad importante de agentes virales asociados a gastroenteritis aguda.
2. Se demostró que rotavirus continúan siendo el agente más prevalente asociado a gastroenteritis aguda en niños menores de cinco años, que mantiene su pico de infección típico durante el primer trimestre del año y que afecta principalmente a los niños menores de un año; sin embargo, la reducción en su prevalencia en comparación a años anteriores sugiere un buen desempeño de la vacuna en esta población.
3. Las técnicas de tamizaje utilizadas en el estudio de rotavirus y astrovirus demostraron buena concordancia con una técnica más sensible como lo es la RT-PCR, por lo que su aplicación a nivel de campo o en laboratorios donde no se cuenta con la infraestructura para desarrollar análisis moleculares ayudaría a evidenciar la prevalencia nacional de estos dos agentes virales en la población infantil hondureña; sin embargo, sería prudente evaluar sistemáticamente la calidad analítica de estos ensayos.

4. Se logró estandarizar dos métodos de detección molecular para norovirus y astrovirus respectivamente, lo que capacita al laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología de la UNAH para apoyar al sistema de salud nacional en el estudio o investigación de brotes de gastroenteritis aguda, permitiendo de esta manera abordar de una forma más adecuada dichos brotes.

En resumen, los resultados de este estudio demuestran que rotavirus del grupo A, norovirus y astrovirus humanos son patógenos importantes asociados con gastroenteritis aguda en niños menores de cinco años en Tegucigalpa, Honduras.

CAPITULO 7

7. RECOMENDACIONES

- Como se observa en los resultados, la etiología viral determinada en la población en estudio es relativamente alta. Si consideramos la disponibilidad y eficacia de las pruebas de tamizaje utilizadas para estos agentes virales en la presente investigación sería útil aplicarlas como diagnóstico de rutina para pacientes con gastroenteritis y así poder abordar más rápidamente al paciente y evitar prescribir terapia antimicrobiana innecesaria.
- La alta prevalencia encontrada de norovirus, sugiere que el virus podría circular en otros grupos de edad y desencadenar brotes de gastroenteritis. Las metodologías diagnósticas estandarizadas en este estudio podrían apoyar en la caracterización de estos brotes a fin de identificar el agente causal.
- En relación a rotavirus, los resultados evidencian una disminución en su prevalencia en la población infantil; sin embargo, resulta importante estudiar esta infección en otros grupos de edad, así como también estudiar otros grupos de rotavirus (RV-B, RV-C), que en los últimos años la literatura reporta constantes asociaciones de casos de gastroenteritis a estos grupos de rotavirus. Por otra parte, es importante ampliar los estudios de rotavirus en animales para evaluar posibles eventos de infecciones con potencial zoonótico en nuestro país.
- De forma general, es importante continuar la caracterización molecular de NoV y HAstV en casos de gastroenteritis infantil con el fin de determinar el impacto real de estos agentes en nuestro país y determinar sus variantes genotípicas circulantes.

CAPITULO 8

8. REFERENCIAS

- Belliot G, Laveran H, Monroe SS. 1997. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J Med Virol* 51(2):101-106.
- Bernstein DI. 2009. Rotavirus overview. *Pediatr Infect Dis J* 28(3 Suppl):S50-53.
- Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Luthi TM. 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol* 68(4):1925-1931.
- Bonaparte RS, Hair PS, Banthia D, Marshall DM, Cunnion KM, Krishna NK. 2008. Human astrovirus coat protein inhibits serum complement activation via C1, the first component of the classical pathway. *J Virol* 82(2):817-827.
- Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. 2008. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ* 86(9):710-717.
- Bourdett-Stanziola L, Jimenez C, Ortega-Barria E. 2008. Diversity of human rotavirus G and P genotypes in Panama, Costa Rica, and the Dominican Republic. *Am J Trop Med Hyg* 79(6):921-924.
- Boxman IL, Tilburg JJ, Te Loeke NA, Vennema H, Jonker K, de Boer E, Koopmans M. 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol* 108(3):391-396.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. 2005. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 365(9465):1147-1152.
- Bucardo F, Lindgren PE, Svensson L, Nordgren J. 2011. Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. *PLoS One* 6(10):e25962.
- Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Paniagua M, Lindgren PE, Espinoza F, Svensson L. 2008. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol* 46(8):2573-2580.
- Bull RA, Tanaka MM, White PA. 2007. Norovirus recombination. *J Gen Virol* 88(Pt 12):3347-3359.
- Bull RA, White PA. 2011. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol* 19(5):233-240.
- Carvalho-Costa FA, Araujo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins CM, Boia MN, Leite JP. 2009. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* 15(1):95-97.
- Castello AA, Arvay ML, Glass RI, Gentsch J. 2004. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. *Pediatr Infect Dis J* 23(10 Suppl):S168-172.
- Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, Smieja M, Lee C, Jang D, Portillo E, Chernesky M. 2007. Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *J Virol Methods* 141(2):216-219.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep* 60(RR-3):1-18.

- Constela D, Rivera M, Rheingans RD, Antil L, Vásquez ML. 2006. Evaluación económica de una eventual incorporación de la vacuna anti-rotavirus en el calendario de vacunación infantil en Honduras. *Rev Med Hondur* 74:19-29.
- Cruz JR, Bartlett AV, Herrmann JE, Caceres P, Blacklow NR, Cano F. 1992. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J Clin Microbiol* 30(5):1140-1144.
- Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Thindwa BD, Greensill J, Holmes JL, Bresee JS, Monroe SS, Glass RI, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. 2002. Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol* 67(4):563-566.
- Chan MC, Sung JJ, Lam RK, Chan PK, Lee NL, Lai RW, Leung WK. 2006. Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 12(8):1278-1280.
- Chandran A, Fitzwater S, Zhen A, Santosham M. 2010. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. *Biologics* 4:213-229.
- De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. 2011. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol* 11(7):1529-1544.
- de Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. 2006. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods* 137(2):259-264.
- de Palma O, Cruz L, Ramos H, de Baires A, Villatoro N, Pastor D, de Oliveira LH, Kerin T, Bowen M, Gentsch J, Esposito DH, Parashar U, Tate J, Patel M. 2010. Effectiveness of rotavirus vaccination against childhood diarrhoea in El Salvador: case-control study. *BMJ* 340:c2825.
- Dolin R, Levy AG, Wyatt RG, Thornhill TS, Gardner JD. 1975. Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response. *Am J Med* 59(6):761-768.
- Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. 2008. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* 225:190-211.
- Espul C, Martinez N, Noel JS, Cuello H, Abrile C, Grucci S, Glass R, Berke T, Matson DO. 2004. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J Med Virol* 72(1):75-82.
- Estes MK. 2001. Rotaviruses and their replication. In: Griffin DE, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 1747-1785.
- Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. 1998. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 178(6):1571-1578.
- Ferreira MS, Xavier MP, Fumian TM, Victoria M, Oliveira SA, Pena LH, Leite JP, Miagostovich MP. 2008. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol* 80(2):338-344.
- Ferrera A, Quan D, Espinoza F. 2007. Increased prevalence of genotype G2P(4) among children with rotavirus-associated gastroenteritis in Honduras. *Int Journal Antimicrob Agents* 29:S435-S436.
- Figueroa M, Padilla N, Gutierrez H. 1992. Rotavirus en las diarreas infantiles de Honduras. *Rev Med Hondur* 1(1):14-20.

- Finkbeiner SR, Le BM, Holtz LR, Storch GA, Wang D. 2009a. Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children. *Emerg Infect Dis* 15(3):441-444.
- Finkbeiner SR, Li Y, Ruone S, Conrardy C, Gregoricus N, Toney D, Virgin HW, Anderson LJ, Vinje J, Wang D, Tong S. 2009b. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J Virol* 83(20):10836-10839.
- Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier Mda P, Leite JP, Miagostovich MP. 2011. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(8):942-947.
- Gaggero A, O'Ryan M, Noel JS, Glass RI, Monroe SS, Mamani N, Prado V, Avendano LF. 1998. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 36(12):3691-3693.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(6):1365-1373.
- Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. 2005. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis* 192 Suppl 1:S146-159.
- Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Paez Rearte M, Nates SV. 2004. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a Public Hospital in Cordoba city, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 46(2):93-96.
- Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS. 2000. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S254-261.
- Gonzalez GG, Liprandi F, Ludert JE. 2011. Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. *J Med Virol* 83(11):1972-1982.
- Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28(2):276-282.
- Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S322-330.
- Greenberg HB, Estes MK. 2009. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* 136(6):1939-1951.
- Gurgel RG, Bohland AK, Vieira SC, Oliveira DM, Fontes PB, Barros VF, Ramos MF, Dove W, Nakagomi T, Nakagomi O, Correia JB, Cunliffe N, Cuevas LE. 2009. Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. *Gastroenterology* 137(6):1970-1975.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Hardy ME. 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 253(1):1-8.

- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2011. *Virus Taxonomy: 2011 Release*.
- Iturriza-Gómara M, Cubitt D, Desselberger U, Gray J. 2001. Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *J Clin Microbiol* 39(10):3796-3798.
- Jiang B, Monroe SS, Koonin EV, Stine SE, Glass RI. 1993a. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22):10539-10543.
- Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. 1993b. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195(1):51-61.
- Jonassen CM, Jonassen TO, Saif YM, Snodgrass DR, Ushijima H, Shimizu M, Grinde B. 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J Gen Virol* 82(Pt 5):1061-1067.
- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 41(4):1548-1557.
- Kapoor A, Li L, Victoria J, Oderinde B, Mason C, Pandey P, Zaidi SZ, Delwart E. 2009. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J Gen Virol* 90(Pt 12):2965-2972.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16(2):111-120.
- Kirkwood CD, Streitberg R. 2008. Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *J Clin Virol* 43(3):346-348.
- Koci MD. 2005. Immunity and resistance to astrovirus infection. *Viral Immunol* 18(1):11-16.
- Kohler T, Erben U, Wiedersberg H, Bannert N. 1990. [Histological findings of the small intestinal mucosa in rotavirus infections in infants and young children]. *Kinderarztl Prax* 58(6):323-327.
- Kosek M, Bern C, Guerrant RL. 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* 81(3):197-204.
- Krishna NK. 2005. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunol* 18(1):17-26.
- Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Penaranda S, Oberste MS, Vinje J, Koopmans M. 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol* 51(2):121-125.
- Leite JP, Ando T, Noel JS, Jiang B, Humphrey CD, Lew JF, Green KY, Glass RI, Monroe SS. 1996. Characterization of Toronto virus capsid protein expressed in baculovirus. *Arch Virol* 141(5):865-875.
- Lin CY, Chiu NC, Lee HC, Chuang CK, Lin SP, Yeung CY. 2010. The emerging importance of norovirus as the etiology of pediatric gastroenteritis in Taipei. *J Microbiol Immunol Infect* 43(2):105-110.
- Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A, Bardach AE, Glujovsky D, Aruj PK, Mazzoni A, Rodriguez JA, Rearte A, Lanzieri TM, Ortega-Barria E, Colindres R. 2011. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*.

- Lopez S, Espinosa R, Greenberg HB, Arias CF. 1994. Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virology* 204(1):153-162.
- Lundgren O, Svensson L. 2001. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect* 3(13):1145-1156.
- Madeley CR, Cosgrove BP. 1975. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2(7932):451-452.
- Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO. 2003. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect* 131(1):727-736.
- Martella V, Banyai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 140(3-4):246-255.
- Mateu E, Casal J. 2003. Tamaño de la muestra. *Rev Epidem Med Prev* 1:8-14.
- Matthijnssens J, Rahman M, Ciarlet M, Zeller M, Heylen E, Nakagomi T, Uchida R, Hassan Z, Azim T, Nakagomi O, Van Ranst M. 2010. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. *Emerg Infect Dis* 16(4):625-630.
- Melgar-Cano R, Moncada W. 2003. Evaluación terapéutica de *Saccharomyces boulardii* en pacientes con diarrea líquida aguda: estudio de casos y controles. *Rev Med Post UNAH* 8(1):82-88.
- Mendez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, Guiscafre H, Cedillo R, Munoz O, Herrera I, Lopez S, Arias CF. 2004. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol* 42(1):151-157.
- Monroe SS, Jiang B, Stine SE, Koopmans M, Glass RI. 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J Virol* 67(6):3611-3614.
- Moser LA, Schultz-Cherry S. 2005. Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunol* 18(1):4-10.
- Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33(4):797-801.
- Nordgren J, Bucardo F, Dienus O, Svensson L, Lindgren PE. 2008. Novel light-upon-extension real-time PCR assays for detection and quantification of genogroup I and II noroviruses in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 46(1):164-170.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2007. Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus: guía práctica. Washington, D.C.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12(2):304-306.
- Patel MM, Hall AJ, Vinje J, Parashar UD. 2009. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 44(1):1-8.
- Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 14(8):1224-1231.
- Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286(5438):287-290.
- Ramig RF. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 78(19):10213-10220.

- Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, Esparza-Aguilar M, Johnson B, Gomez-Altamirano CM, Parashar U, Patel M. 2010. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med* 362(4):299-305.
- Rivera FP, Ochoa TJ, Ruiz J, Medina AM, Ecker L, Mercado E, Gil AI, Huicho L, Lanata CF. 2011. Norovirus prevalence in 'pathogen negative' gastroenteritis in children from periurban areas in Lima, Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.
- Roman Riechmann E, Wilhelmi de Cal I, Cilleruelo Pascual ML, Calvo Rey C, Garcia Garcia ML, Sanchez-Fauquier A. 2004. [Nosocomial gastroenteritis and asymptomatic rotavirus and astrovirus infection in hospitalized children]. *An Pediatr (Barc)* 60(4):337-343.
- Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Cheuvart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, Lopez P, Macias-Parra M, Ortega-Barria E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavia-Ruz N, Salmeron J, Ruttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nunez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Saez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckenoghe A, Clemens R, De Vos B, O'Ryan M. 2006. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 354(1):11-22.
- Ruiz MC, Leon T, Diaz Y, Michelangeli F. 2009. Molecular biology of rotavirus entry and replication. *ScientificWorldJournal* 9:1476-1497.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4):406-425.
- Santos N, Hoshino Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 15(1):29-56.
- Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. 1973. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med* 288(25):1318-1323.
- Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. 1974. The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis* 129(6):705-708.
- Sebire NJ, Malone M, Shah N, Anderson G, Gaspar HB, Cubitt WD. 2004. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a pediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Pathol* 57:1001-1003.
- Secretaría de Salud Honduras. 2007. Plan Estratégico para la Introducción de la Vacuna contra Rotavirus en Honduras: Junio 2004 a Diciembre 2010. Tegucigalpa, Honduras.
- Secretaría de Salud Honduras. 2008. Manual de lineamientos técnicos y operativos de vacunación contra el rotavirus. Tegucigalpa, Honduras.
- Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinje J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, Halperin T, Rasool NB, Hewitt J, Greening GE, Jin M, Duan ZJ, Lucero Y, O'Ryan M, Hoehne M, Schreier E, Ratcliff RM, White PA, Iritani N, Reuter G, Koopmans M. 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis* 200(5):802-812.

- Silva AM, Leite EG, Assis RM, Majerowicz S, Leite JP. 2001. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(8):1069-1073.
- Soares CC, Maciel de Albuquerque MC, Maranhao AG, Rocha LN, Ramirez ML, Benati FJ, Timenetsky Mdo C, Santos N. 2008. Astrovirus detection in sporadic cases of diarrhea among hospitalized and non-hospitalized children in Rio De Janeiro, Brazil, from 1998 to 2004. *J Med Virol* 80(1):113-117.
- Solorzano Girón JO, Molina IB, Turcios-Ruiz RM, Quiroz Mejia CE, Amendola LM, de Oliveira LH, Andrus JK, Stupp PW, Bresee JS, Glass RI. 2006. Burden of diarrhea among children in Honduras, 2000-2004: estimates of the role of rotavirus. *Rev Panam Salud Publica* 20(6):377-384.
- Staat MA, Azimi PH, Berke T, Roberts N, Bernstein DI, Ward RL, Pickering LK, Matson DO. 2002. Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 21(3):221-227.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10):2731-2739.
- Tang B, Gilbert JM, Matsui SM, Greenberg HB. 1997. Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis. *Virology* 237(1):89-96.
- Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. 2008. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol* 80(8):1468-1476.
- The United Nations Children's Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO). 2009. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. Geneva.
- Tu ET, Bull RA, Kim MJ, McIver CJ, Heron L, Rawlinson WD, White PA. 2008. Norovirus excretion in an aged-care setting. *J Clin Microbiol* 46(6):2119-2121.
- Uchida R, Pandey BD, Sherchand JB, Ahmed K, Yokoo M, Nakagomi T, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA, Nakagomi O. 2006. Molecular epidemiology of rotavirus diarrhea among children and adults in Nepal: detection of G12 strains with P[6] or P[8] and a G11P[25] strain. *J Clin Microbiol* 44(10):3499-3505.
- United Nations (UN). 2000. United Nations Millennium Declaration 2000. New York.
- United Nations (UN). 2010. The Millennium Development Goals Report, 2010. New York.
- Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. 1996. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med* 335(14):1022-1028.
- Velazquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. 2000. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis* 182(6):1602-1609.
- Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich MP. 2007. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 79(7):939-944.
- Vidal R, Roessler P, Solari V, Vollaire J, Jiang X, Matson DO, Mamani N, Prado V, O'Ryan ML. 2006. Novel recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *J Clin Microbiol* 44(6):2271-2275.

- Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. 2004. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods* 116(2):109-117.
- Wang QH, Kakizawa J, Wen LY, Shimizu M, Nishio O, Fang ZY, Ushijima H. 2001. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *J Med Virol* 64(3):245-255.
- Wilhelmi I, Colomina J, Martin-Rodrigo D, Roman E, Sanchez-Fauquier A. 2001. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples compared with standard enzyme immunoassay and latex agglutination techniques. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20(10):741-743.
- Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9(4):247-262.
- Willcocks MM, Brown TD, Madeley CR, Carter MJ. 1994. The complete sequence of a human astrovirus. *J Gen Virol* 75 (Pt 7):1785-1788.
- Wobus CE, Thackray LB, Virgin HWt. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 80(11):5104-5112.
- World Health Organization (WHO). 2008. The global burden of disease: 2004 update. Geneva.
- Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MS, Victoria M, Miranda V, Silva MF, Strina A, Barreto ML, Miagostovicht MP, Leite JP. 2009. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res* 42(5):438-444.
- Yen C, Armero Guardado JA, Alberto P, Rodriguez Araujo DS, Mena C, Cuellar E, Nolasco JB, De Oliveira LH, Pastor D, Tate JE, Parashar UD, Patel MM. 2011. Decline in rotavirus hospitalizations and health care visits for childhood diarrhea following rotavirus vaccination in El Salvador. *Pediatr Infect Dis J* 30(1 Suppl):S6-S10.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346(2):312-323.

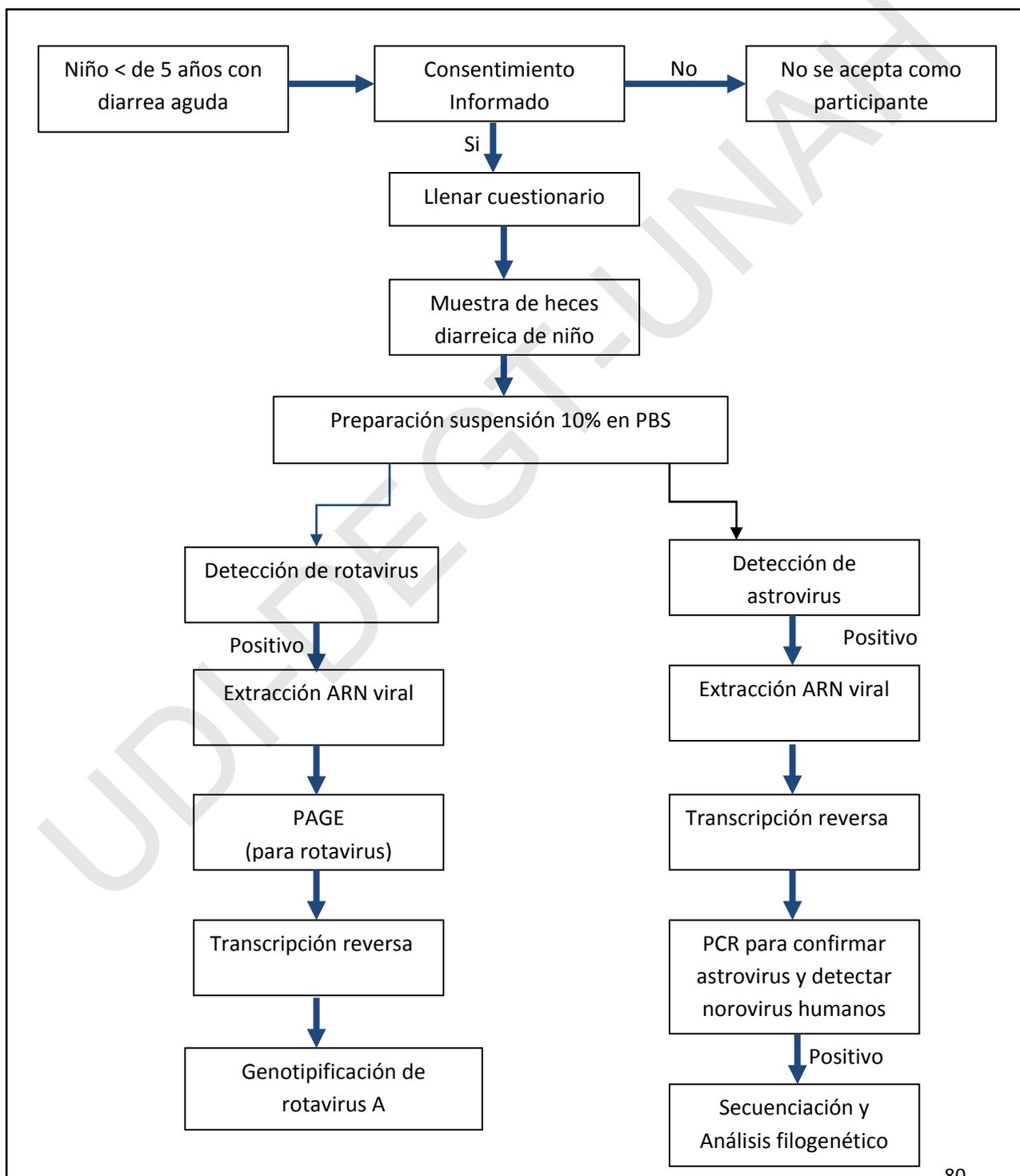
ANEXOS

UDI-DEG-TIC-UNA-H

ANEXOS

Anexo 1. Flujograma de Trabajo

“Epidemiología molecular de virus entéricos asociados a gastroenteritis en niños menores de 5 años en Tegucigalpa, Honduras”



Anexo 2: Solicitud de aprobación ética

Tegucigalpa M.D.C. 7 de Septiembre del 2010

Dr. Rogelio García
Gerente Docencia e Investigación
Instituto Hondureño de Seguridad Social
Presente

Estimado Dr. García:

Es un placer dirigirme a Ud. deseándole éxitos en sus delicadas funciones.

La Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras está coordinando a través de mi persona un estudio sobre la **Etiología de Diarreas Agudas en Niños Menores de 5 Años en el Distrito Central, Francisco Morazán**, el cual está siendo financiado en parte por la Red de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (NeTropica) y por la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (Proyecto Teasdale-Corti, Canadá-Honduras).

Debido a la magnitud e importancia que representa la enfermedad diarreica aguda en niños menores de 5 años, a la escasa información de la prevalencia de virus, bacterias y parásitos entéricos productores de diarrea infantil y a la falta de estudios de ETEC, incluyendo toxinas y factores de colonización más frecuentes involucrados en esta patología, el estudio propuesto es de sumo interés ya que pretende llenar el vacío de conocimiento existente.

Estaremos investigando los principales agentes etiológicos antes mencionados mediante pruebas microbiológicas tradicionales y pruebas moleculares aplicando técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex, PAGE, secuenciación, entre otras.

Por lo anterior, estamos solicitando que esta investigación sea considerada por los miembros del Comité para su aprobación ética.

Le adjunto un resumen del Proyecto, la ficha epidemiológica y la hoja de consentimiento informado para una información más detallada.

Agradeciendo de antemano su pronta colaboración al desarrollo del presente estudio, queda de Ud.

Atentamente,

Dra. Annabelle Ferrera, Ph.D.
Biología Molecular
Escuela de Microbiología, UNAH

Anexo 3: Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR COMO VOLUNTARIO EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACION

“Etiología de las diarreas aguda en niños menores de 5 años en Tegucigalpa, Honduras”

Dra. Annabelle Ferrera¹, Dra. Lourdes Enríquez¹, Dra. Maribel Rivera²,
Dr. Jafet Ortiz³, Lic. Jessy del Carmen Espinoza³, Br. Jessy Cabrera⁴.

¹ Catedrática Escuela de Microbiología, UNAH; ² Infectóloga Pediatra, IHSS; ³ Estudiante Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, UNAH; ⁴ Estudiante en Servicio Social, Escuela de Microbiología,

Nombre del Participante: _____ Código: _____

PROPÓSITO DEL ESTUDIO:

¿Qué es la diarrea aguda?

La diarrea es un síndrome clínico que se caracteriza por la ocurrencia de tres o más evacuaciones líquidas o semilíquidas en las últimas 24 horas y con menos de catorce días de duración. A menudo se acompaña de otros signos y síntomas clínicos, como vómito y fiebre. Una diarrea aguda puede llegar a causar una deshidratación y desequilibrio de los electrolitos.

La diarrea aguda de origen infeccioso es causada por una diversidad de microorganismos, que en forma general incluyen: virus, bacterias y protozoos. El cuadro clínico puede ser muy parecido pero es importante determinar el agente causante de la enfermedad para poder establecer un mejor control de la misma.

¿CUÁL ES EL PROPÓSITO DE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN?

El propósito de este estudio es investigar cuales son los diferentes microorganismos que están provocando diarrea en los niños menores de 5 años a fin de poder proporcionar información a los médicos de los servicios de Pediatría y a la Secretaría de Salud para que implemente nuevas políticas de prevención y control y así garantizar una mejor salud para los niños hondureños.

¿POR QUÉ EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS?

En este estudio se decidió incluir a los niños menores de 5 años por ser el grupo de la población más afectada y más vulnerable por este tipo de enfermedad.

Los niños que participarán en el estudio serán escogidos de entre los niños que asisten con un cuadro de diarrea a los Centros de Salud “Alonso Suazo” y “Villa Adela”, así como también al Hospital de Especialidades del Seguro Social y al Hospital Escuela.

¿QUÉ SIGNIFICA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN?

Como en este estudio se trabajará con niños menores de 5 años, necesitamos su autorización para poder tomarlo como participante. En caso que decida que su niño puede participar en el estudio, lo que se hará es lo siguiente:

Primero, usted va a responder verbalmente una serie de preguntas sobre su hijo que le vamos a hacer en forma de una entrevista. Estas son preguntas de naturaleza general. Por ejemplo: el nombre, la edad, si es niño o niña, la sintomatología que presenta, la severidad de los síntomas, estado de vacunación. Así mismo, se incluyen preguntas sobre las condiciones de su casa.

Posteriormente cada participante proporcionará una muestra de heces, para lo cual se le proporcionará una bolsa plástica estéril y un frasco para que introduzca dicha bolsa.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS DE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN?

Este estudio tiene varios beneficios:

Para Usted: Porque le vamos a hacer pruebas de laboratorio al niño para microorganismos entéricos causantes de diarreas (por ejemplo, Rotavirus, *Escherichia coli*, *Giardia lamblia*); en caso que sus resultados sean positivos, le vamos a entregar una copia de los resultados de laboratorio, lo que guiará al médico para su tratamiento. También se le dará información o indicaciones sobre cómo prevenir estas infecciones.

Para la comunidad: Con este estudio se van a obtener información científica muy importante sobre los virus, bacterias y parásitos que causan diarreas en los niños menores de 5 años y se podrán introducir nuevas políticas de prevención de vigilancia y control de este tipo de enfermedades.

ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CONLLEVA UN “RIESGO MÍNIMO”

Debido a que la muestra a recolectar de su hijo es una muestra de heces, este estudio se denomina de “Riesgo Mínimo” (o sea de riesgo físico muy pequeño); sin embargo, usted podría sentirse apenado/a al responder algunas preguntas en la entrevista o al proporcionar la muestra de heces.

¿QUÉ SE LE VA A HACER A LAS MUESTRAS DE HECES?

La muestra de heces de su hijo/a va a ser usada únicamente para estudiar microorganismos entéricos causantes de diarreas. Estas pequeñas cantidades de heces no tienen ningún valor comercial y no pueden ser vendidas, ni pueden ser usadas para nada más que para estudios de laboratorio. Su muestra de heces va a ser tratada con confidencialidad. Sin embargo, debido a la importancia de hacer estudios posteriores relacionados a estos agentes, le solicitamos permiso para poder usar la muestra de su niño en estudios futuros.

PROTECCIÓN DE LA CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN, MUESTRAS DE HECES Y ANÁLISIS DE LABORATORIO

Toda información personal y médica que se obtenga o produzca en este estudio de investigación es estrictamente confidencial. Se va a respetar su privacidad en todo momento y su identidad nunca va a ser revelada o compartida con personas ajenas al estudio a menos que usted haya dado su autorización de compartirla con su médico o enfermera. Toda su información, sus muestras y sus análisis estarán guardados en lugares seguros y protegidos de personas no autorizadas. Se le va a asignar un código privado (en la forma de un número) para identificar todos los documentos y

muestras de heces. Sólo los investigadores y/o entrevistadores van a saber cuál es su código privado.

En caso que usted tenga más preguntas sobre el estudio, puede contactar a la Doctora Annabelle Ferrera llamando al número de teléfono: 232-5836 o visitándola en la Escuela de Microbiología, UNAH localizado en el Edificio CB 4to piso, Boulevard Suyapa, Tegucigalpa.

CONSENTIMIENTO

Entiendo que mi hijo(a) menor de edad ha sido invitado/a a participar en el estudio de investigación titulado “Etiología de diarrea aguda en niños menores de 5 años”.

Yo doy testimonio que los entrevistadores me han explicado en detalle todos los aspectos del estudio en forma verbal y escrita.

Yo entiendo completamente que el estudio es sobre virus, bacterias y parásitos entéricos, porque estos microorganismos han causado muchos casos de diarrea en los últimos años.

Yo aquí doy testimonio que he aceptado en nombre de mi hijo la invitación a participar en el estudio, quien podrá también expresar su deseo de participar en el estudio. Yo he tomado esta decisión basado en la información que he recibido y/o leído. Yo he tenido la oportunidad de recibir los detalles adicionales que he querido sobre el estudio y entiendo que puedo hacer preguntas en el futuro.

Yo entiendo que mi participación es LIBRE Y VOLUNTARIA, que puedo rehusar a contestar algunas preguntas y dar información sobre algunos aspectos que no me hagan sentirme cómodo.

Yo entiendo que los investigadores me contactarán en un centro asistencial y que me harán preguntas personales sobre mi hijo, sobre su salud, su historia pasada en relación a diarreas y las condiciones de nuestra vivienda y daré una muestra de heces de mi hijo a los investigadores la cual será analizada en el laboratorio de Biología Molecular o el laboratorio Teasdale-Corti de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Escuela de Microbiología de la UNAH, para saber si la diarrea es ocasionada por un virus, bacteria o parásito entérico.

Yo entiendo que únicamente si mis resultados fueren positivos para alguno de los microorganismos causantes de diarrea tengo derecho a tener una copia de mis resultados de laboratorio para mi propio registro o para dárselos a mi médico.

Yo entiendo que si tengo más preguntas sobre el estudio, puedo contactar a la Doctora Annabelle Ferrera llamando al número de teléfono: 232-5836 o visitándola en la Escuela de Microbiología, UNAH localizado en el Edificio CB 4to piso, Boulevard Suyapa, Tegucigalpa.

Yo entiendo que recibiré una copia firmada del formato de consentimiento para mi propio registro.

Divulgación de la información de los registros médicos:

Yo _____ aquí autorizo la divulgación de la información de mis registros médicos a los investigadores que hacen parte del estudio “Etiología de diarrea aguda en niños menores de 5 años” para el propósito de la investigación siempre y cuando se mantenga la privacidad.

Yo he leído y entendido la información contenida en este documento.

Yo acepto voluntariamente participar en este estudio de investigación.

Nombre del padre, madre o responsable	Firma	Fecha
---------------------------------------	-------	-------

Persona Autorizada que Acepta la Participación	Firma de la Persona Autorizada que Acepta la Participación	Fecha
--	--	-------

Anexo 4: Ficha de recolección de datos
FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

Unidad de Salud:

Centro de Salud Alonso Suazo () Centro de Salud Villa Adela () IHSS () Hospital
Escuela ()

Datos Generales:

Nombre _____ Expediente _____

Fecha de nacimiento _____ Edad: _____ (años) _____
(meses)

Sexo: M () F () Tipo Sanguíneo: ABO () Rh ()

Domicilio:

Fecha de inicio de la diar _____ No. de evacuaciones al día _____

Evacuaciones con sangre: NO () SI () Vómitos: NO () SI () No. de vómitos al día _____

Fiebre: NO () SI () Temperatura máxima _____ °C No cuantificada ()

Deshidratación: NO () SI () Choque () Hospitalización NO () SI () Centro _____

Manejo: Sales de rehidratación oral NO () SI ()

En casa (plan A) () En centro de salud (plan B) En hospital (plan B ó C) ()

Hidratación endovenosa NO () SI () Centro _____

Uso de antibióticos: NO () SI () _____ Otro _____

(Nombre ó tipo) (Describa tipo de medicamento)

¿Recibió vacuna contra Rotavirus?

NO () SI () Número de dosis: Una () Dos () Fecha _____

Cuadros diarreicos en el año: Una () Dos () Tres () Más de cuatro ()

Otras enfermedades en los últimos 6 meses: Si () ¿Cuáles? _____ No ()

Alimentación:

Lactancia materna NO () SI () No aplica ()

Lactancia artificial: NO () SI () No aplica ()

Lactancia mixta NO () SI () No aplica () Comida sólida: NO () SI ()

Persona que cuida al niño(a):

madre () padre () abuela () tía () vecina () empleada () Guardería o similar ()

Vivienda:

Tipo de piso: Tierra () Cemento () Ladrillo () Cerámica ()

Disposición de excretas: Servicio sanitario () Letrina () Defecación al aire libre ()

Basura: Tren de aseo () Queman la basura () Botan la basura en solar baldío ()

Agua: Potable () Pozo () Compra a Cisterna ()

Ingiere: Agua purificada () Agua clorada () Agua hervida () Ningún tratamiento ()

Procedencia de los alimentos: Mercado () Supermercado () Pulpería ()

Otros _____

Medidas Higiénicas: Baña al niño todos los días ()

lavado de alimentos antes de consumirlos ()

Lavado de manos antes de comer () lavado de manos después de ir al baño ()

Uso de pañales desechables () Otros _____

Otra familiar con diarrea: Si () ¿Quién? _____ No ()

Otros niños viviendo en la casa: Si () ¿Cuántos? _____ No ()

Animales: Si () ¿Cuáles? _____ No ()

Completado por: _____

Fecha y Hora: _____

Anexo 5: Aprobación del Comité de Ética



IHSS
Instituto Hondureño de Seguridad Social

TEGUCIGALPA 8 DE OCTUBRE DEL 2010

**DRA. LOURDES ENRIQUEZ
DRA. ANNABELLE FERRERA
MAESTRIA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONOTICAS,
ESCUELA DE MICROBIOLOGIA DE LA UNAH.**

Informo a usted que el comité de investigación y el comité de bioética dependientes de la Gerencia de Docencia e Investigación del IHSS, ha aprobado sin ninguna enmienda el protocolo de investigación :

“ ETIOLOGIA DE LAS DIARREAS AGUDAS EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS EN EL DISTRITO CENTRAL, FRANCISCO MORAZAN, HONDURAS”

A realizar por los Doctores: Annabelle Ferrera, Lourdes Enriquez, Maribel Rivera, Jafet Ortiz, Jessy del Carmen Galeas, Jessy Cabrera y Ada Mena.

Deseándole muchos éxitos en la realización del estudio y muy orgullosos de incluir siempre al IHSS.

Atentamente,



DR. LUIS ROGELIO GARCIA
GERENTE NACIONAL DE DOCENCIA E INVESTIGACION IHSS

UN SEGURO PARA TODOS... MAS SEGURO

Hospital de Especialidades Barrio la Granja tel. 225-0111 ext. 111



Anexo 6: Aplicación al comité de Bioseguridad
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS
COMITÉ DE BIOSEGURIDAD
FORMULARIO DE EVALUACIÓN

Si tiene alguna consulta o requiere asistencia para completar este formulario, favor contactar a la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ al teléfono (504) 2252 0282 o al correo electrónico <adazelaya@yahoo.com>

Datos Generales	
<p>Nombre de proyecto: “Epidemiología molecular de virus entéricos asociados con gastroenteritis en niños menores de cinco años en Tegucigalpa, Honduras”</p>	<p>Departamento o unidad ejecutora: Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología, UNAH.</p>
<p>Alumno (s) responsable de la investigación: José Jafet Ortiz, Q.F.</p>	<p>Profesor (s) responsable: Annabelle Ferrera, Ph.D.</p>
<p>Laboratorio (s) en que se llevará a cabo la investigación: 1.- Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Microbiología, UNAH. 2.- Laboratorio Teasdale – Corti, Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología, UNAH.</p>	<p>Instituciones participantes: 1.- UNAH 2.- IHSS 3.- Hospital Escuela 4.- Centro de Salud Villa Adela 5.- Centro de Salud Alonso Suazo</p>

Naturaleza de la Investigación	
<p>Nombre de los agentes infecciosos que manipulará: Rotavirus humanos, calicivirus humanos y astrovirus humanos.</p> <p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) impresas de los microorganismos que manipulará? Si <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>	<p>¿En que nivel de riesgo están clasificados Los agentes infecciosos que manipulará? 1 <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 4</p> <p>¿Cuál es el nivel de bioseguridad con que trabaja el laboratorio en el que desarrollará la investigación? 1 <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 4</p>
<p>¿Utilizará reactivos químicos? Si <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>Enumere las sustancias químicas que utilizará con mayor frecuencia</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Soluciones tampón de PBS y TRIS-HCl 2. Kits comerciales de reactivos para ELISA e inmunocromatografía (incluye soluciones tampón, peroxidasa como sustrato y ácido sulfúrico 1N como solución de parada) 3. Kit comercial para extracción de ARN (Las soluciones tampón contienen tiocianato de guanidinio). 4. Etanol, acetona, ácido acético, hidróxido de sodio, formaldehído, metanol, glicerol, nitrato de plata. 5. Agarosa, acrilamida 6. Bromuro de etidio 	<p>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) de los reactivos químicos que utilizará? Si <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>

<p>¿En que estado manipulará el o los agentes infecciosos?</p> <p>Cultivos puros en placa <input type="checkbox"/> Cultivos en <input type="checkbox"/></p> <p>ADN / ARN <input checked="" type="checkbox"/> Cultivo de tejidos <input type="checkbox"/></p>	
<p>Tipo de muestras que manipulará</p> <p>Tejidos <input type="checkbox"/></p> <p>Sangre <input type="checkbox"/></p> <p>Orina <input type="checkbox"/></p> <p>Animales <input type="checkbox"/></p>	<p>Heces <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Otros líquidos biológicos <input type="checkbox"/></p> <p>Muestras ambientales* <input type="checkbox"/></p> <p>Cultivos puros <input type="checkbox"/></p> <p>Otras _____</p> <p>*Tipo de muestras ambientales</p> <p>_____</p>
<p>Describe las técnicas que utilizará:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Se realizaran pruebas inmunocromatográficas y de ELISA para la detección de rotavirus del grupo A y astrovirus humanos respectivamente; se seguirán las instrucciones del fabricante para determinar especímenes positivas para estos virus. 2. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se determinarán los electroferotipos de rotavirus del grupo A, los cuales serán comparados posteriormente con los genotipos encontrados. 3. Todas las muestras positivas para los diferentes virus serán caracterizadas en genotipos mediante una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) usando cebadores dirigidos a regiones de genes específicos de cada uno de los virus en estudio. Los productos de PCR serán analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando bromuro de etidio como marcador. 4. Los productos obtenidos de la RT-PCR serán purificados utilizando un kit comercial, para su posterior secuenciación. 	

CONTROLES PRIMARIOS			
Controles de Ingeniería			
¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con cabina de seguridad biológica? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con autoclave dentro del laboratorio? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con campana de seguridad química? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con espacio adecuado para realizar la investigación? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia? <hr/> <hr/>		
Equipo de Protección Personal (EPP)			
¿Qué tipo Equipo y materiales de protección personal usará en su investigación? Gabacha <input checked="" type="checkbox"/> Guantes <input checked="" type="checkbox"/> Cabina de bioseguridad <input checked="" type="checkbox"/> Mascarilla quirúrgica <input type="checkbox"/> Mascarilla N95 <input type="checkbox"/> Lentes <input checked="" type="checkbox"/>			
Procedimientos Operativos Estándar (POE)			
¿Cuenta con los POE's siguientes?	Si	No	No aplica
1.- Toma de muestras	X		
2.- Manejo de desechos bioinfecciosos	X		
3.- Transporte de muestras	X		
4.- Uso de la CSB	X		
5.- Almacenamiento de muestras	X		
6.- Puesta y quitado de EPP	X		
7.- Limpieza de derrames	X		

8.-Otro			
Controles Administrativos			
	Si	No	No aplica
1.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la CSB?	X		
2.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso del autoclave?	X		
3.- ¿Ha recibido entrenamiento para puesta y quitado de EPP?	X		
4.- ¿Ha recibido entrenamiento para limpieza de derrames?	X		
5.- ¿Ha sido vacunado contra la Hepatitis B?	X		
6.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la campana de seguridad química?	X		
7.- ¿Conoce las características químicas de los reactivos que utilizará en la investigación	X		
8.- Otros			

Este formulario será remitido la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ, Dra. Ada Zelaya quien, en conjunto con el **Comité de Bioseguridad de la Escuela de Microbiología** de la UNAH, tendrá a su cargo asegurarse de que el proyecto sea implementado con las normas de seguridad biológica apropiadas para el nivel de riesgo. **La aprobación del proyecto por el Comité de Bioseguridad es requisito obligatorio antes de comenzar el trabajo con sustancias infecciosas, químicas o radioactivas.**

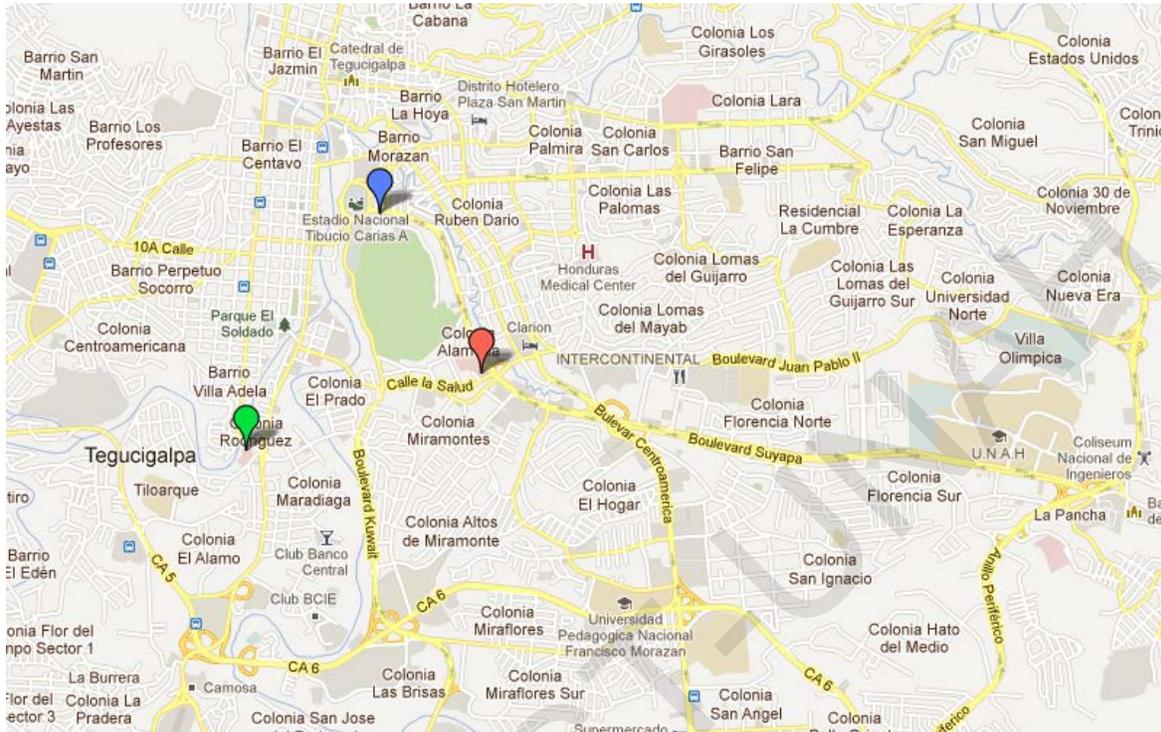
Para uso exclusivo del Comité de Bioseguridad. Escuela de Microbiología. UNAH

Fecha de Aprobación (dd/mm/aaaa)	Nombre de quien Aprobó	Firma de quien Aprobó

Nota. A los aplicantes se les informa que el Oficial de Bioseguridad del proyecto Teasdale-Cortí Honduras - Canadá y el Comité de Bioseguridad de la Escuela de Microbiología están con toda la disposición de apoyarles para el cumplimiento de la bioseguridad en sus investigaciones.

UDI-DEGT-UNAH

Anexo 7: Mapa del área de estudio



Indicadores

Verde = Hospital de Especialidades del IHSS

Rojo = Hospital Materno Infantil

Azul = Centro de Salud Alonso Suazo

Nota: Elaborado utilizando Google map



Anexo 8: Procedimientos operativos estándar
Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias / Escuela de Microbiología
Laboratorio de Biología Molecular

Procedimiento Operativo Estándar para la toma y transporte de muestras fecales	Código:	Página
	POE-LBM-JO-01 Versión 1	1/3
Elaborado por: José Jafet Ortiz, Q.F. Fecha: 18 de febrero de 2011	Revisado por: Annabelle Ferrera, Ph.D. Aprobado por: Ada Zelaya, M.Sc.	

1. Objetivo:

Este POE tiene como objetivo establecer normas para la recolección y transporte de muestras fecales.

2. Campo de aplicación:

Este POE será aplicado en los centros asistenciales seleccionados para el estudio para la recolección de muestras fecales e incluye el transporte de las mismas desde los centros asistenciales involucrados en el estudio hacia el Laboratorio Teasdale-Corti de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

3. Definiciones:

La hielera es un contenedor debidamente rotulado provisto de Ice packs y destinado únicamente para el transporte de muestras bioinfecciosas.

4. Siglas:

En el texto de este POE se usan las siguientes siglas:

UNAH Universidad Nacional Autónoma de Honduras
 POE Procedimiento Operativo Estándar
 EPP Equipo de Protección Personal

5. Condiciones generales:

No aplica

6. Condiciones específicas:

Este POE de recolección y transporte de muestras solo será aplicado una vez que se ha obtenido por escrito el consentimiento informado de los padres o tutores.

7. Condiciones de Bioseguridad:

Para efecto de este POE se deberán cumplir los siguientes puntos:

- Usar el EPP adecuado (gabacha, guantes).
- La muestra será recolectada por el padre o tutor en una bolsa plástica, la cual colocará dentro de un frasco (empaque primario) y será entregada a los investigadores.
- Este frasco será entregado a los investigadores y serán colocados dentro de una hielera provista de Ice packs.
- La recepción de las muestras se realizará sobre una mesa con papel absorbente y se desinfectará al final de la recolección.
- Utilizar desinfectante de manos después que se reciba una muestra.
- La hielera será llevada por la persona encargada de la recolección de muestras en transporte público directamente al laboratorio para el procesamiento de las muestras.
- Las muestras serán procesadas inmediatamente en el laboratorio, aplicando los POEs de elaboración de suspensiones fecales y para la detección de rotavirus del grupo A.
- Los frascos serán reutilizados, se deberá seguir el POE de manejo de desechos bioinfecciosos para su correcto tratamiento.

8. Equipos:

- Hielera
- Ice packs

9. Material:

- Bolsas plásticas
- Frascos de vidrio o plásticos
- Viñetas
- Marcador indeleble
- Guantes
- Pipetas de transferencia

10. Procedimiento:

- Una vez que se haya obtenido el consentimiento informado de los participantes en el estudio se procederá a dar la explicación al participante de cómo obtener la muestra de heces.
- Se le proporcionará al padre, madre o encargado una bolsa plástica y un frasco de vidrio debidamente rotulado.
- Para este estudio la definición de caso propuesta plantea que se deberán recolectar muestras fecales diarreicas.
- Se le solicitará al encargado del niño que coloque la bolsa plástica bajo el pañal a fin de evitar complicaciones o derrames en la recolección de la muestra.
- Una vez el niño haya defecado se le retirará la bolsa plástica y se introducirá dentro del frasco debidamente rotulado.
- Ese frasco se colocara dentro de una hielera que contiene “Ice packs”
- Una vez que transcurra el tiempo de recolección de muestras y que no se exceda de un número máximo de seis frascos con muestras fecales, la hielera será transportada hacia el laboratorio Teasdale-Corti para el procesamiento de las muestras.

11. Responsabilidades:

La recolección de las muestras así como el transporte hacia el laboratorio donde serán procesadas es responsabilidad de los investigadores que figuran en el protocolo del estudio o en su defecto por una persona capacitada para ejercer dicha función.



Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias / Escuela de Microbiología
Laboratorio de Biología Molecular

Procedimiento Operativo Estándar para la elaboración de suspensiones fecales	Código:	Página 1/3
	POE-LBM-JO-02 Versión 1	
Elaborado por: José Jafet Ortiz, Q.F. Fecha: 18 de febrero de 2011	Revisado por: Annabelle Ferrera, Ph.D. Aprobado por: Ada Zelaya, M.Sc.	

1. Objetivo:

Este POE tiene como objetivo establecer normas para la elaboración de suspensiones fecales.

2. Campo de aplicación:

Este POE será aplicado en el laboratorio de Teasdale-Corti y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología de la UNAH para la elaboración de suspensiones fecales.

3. Definiciones:

No aplica.

4. Siglas:

En el texto de este POE se usan las siguientes siglas:

UNAH Universidad Nacional Autónoma de Honduras

POE Procedimiento Operativo Estándar

EPP Equipo de Protección Personal

mL Mililitro

M Molaridad

HCl Acido clorhidrico

CaCl₂ Cloruro de calcio

5. Condiciones generales:

No aplica

6. Condiciones específicas:

Este POE se aplicará una vez que la muestra de heces se encuentre en el Laboratorio Teasdale-Corti. En el laboratorio Teasdale-Corti solo se tomará la alícuota de heces necesaria para cada muestra. Mientras que en el Laboratorio de Biología Molecular se realizará la suspensión, se separarán y se almacenarán los sobrenadantes.

7. Condiciones de Bioseguridad:

Para efecto de este POE se deberán cumplir los siguientes puntos:

- Usar el EPP adecuado (gabacha, guantes, mascarilla, gafas).
- El proceso de separación de la muestra se realizará dentro de la cámara de seguridad biológica.
- Descartar las pipetas de transferencia y/o aplicadores en solución de hipoclorito de sodio al 1% (1).

8. Equipos:

- Vortex
- Centrifuga

9. Material:

- Tubo de centrifuga de fondo cónico de poliestireno de 15 mL
- Pipetas de transferencia
- Aplicadores de madera
- Solución tampón Tris/HCl 0.01M con 0.0015M de CaCl₂ pH7.2
- Frascos para almacenamiento de 5 mL debidamente rotulados.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL para almacenamiento de alícuota de heces.
- Frasco para descarte de material contaminado con hipoclorito de sodio al 1%.

10. Procedimiento:

- Colocar aproximadamente 0.5g de la muestra de heces fecales en un tubo de centrífuga de fondo cónico de poliestireno de 15 mL.
- En caso de que la muestra sea líquida: adicionar 0.5 mL de la muestra.
- Adicionar suficiente solución tampón Tris/HCl 0.01M con 0.0015M de CaCl₂ pH 7.2 para completar el volumen a 5 mL.
- Tapar los tubos y homogenizar vigorosamente en vortex durante 20 segundos.
- Centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm a temperatura ambiente (siguiendo el procedimiento adecuado de centrifugación).
- Transferir 4 mL del sobrenadante a un frasco debidamente rotulado y descartar el residuo en un recipiente para descarte de material contaminado conteniendo solución de hipoclorito de sodio al 1% para posteriormente ser lavado.
- Las suspensiones fecales deberán ser almacenadas en un congelador a -20°C.
- Para aquellas muestras cuya cantidad sea inferior a 0.5 g se disminuirá proporcionalmente la cantidad de heces y solución tampón a fin de obtener una suspensión al 10%.
- También se tomará una alícuota de la muestra de heces y se almacenará a -20°C.

11. Responsabilidades:

La preparación de suspensiones fecales será realizada por los investigadores del proyecto o una persona capacitada para ello.

12. Referencias Bibliográficas:

1. Public Health Agency of Canada, 2001. Material Safety Data Sheets: Rotavirus, Norwalk virus.



Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias / Escuela de Microbiología
Laboratorio de Biología Molecular

Procedimiento Operativo Estándar para la detección de rotavirus del grupo A	Código:	Página 1/3
	POE-LBM-JO-03 Versión 1	
Elaborado por: José Jafet Ortiz, Q.F. Fecha: 18 de febrero de 2011	Revisado por: Annabelle Ferrera, Ph.D. Aprobado por: Ada Zelaya, M.Sc.	

1. Objetivo:

Este POE tiene como objetivo establecer normas para la aplicación de la prueba Rota-Strip de Coris Bioconcept para la detección de Rotavirus del grupo A.

2. Campo de aplicación:

Este POE será aplicado en el laboratorio de Teasdale-Corti y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología de la UNAH para la detección de Rotavirus del grupo A en muestras fecales.

3. Definiciones:

Rota – Strip es una prueba inmunocromatográfica basada en un sistema de membrana homogéneo con partículas de oro coloidal. La especificidad se debe a un anticuerpo monoclonal conjugado con partículas de oro y específico de los antígenos VP6 del rotavirus humano grupo A.

4. Siglas:

En el texto de este POE se usan las siguientes siglas:

UNAH Universidad Nacional Autónoma de Honduras
 POE Procedimiento Operativo Estándar
 EPP Equipo de Protección Personal
 mL Mililitro

5. Condiciones generales:

Este POE se aplicará de forma simultánea con el POE-LBM-JO-02 cuando se estén preparando las suspensiones fecales.

6. Condiciones específicas:

- Procure no tocar la nitrocelulosa con los dedos.
- No utilizar los reactivos de otro estuche diferente al que se encuentra en uso.
- No sumergir la varilla por arriba de la línea colocada debajo de la flecha azul ya que esto podría diluir el conjugado a base de oro coloidal en la solución tampón.

7. Condiciones de Bioseguridad:

Para efecto de este POE se deberán cumplir los siguientes puntos:

- Usar el EPP adecuado (gabacha, guantes).
- La técnica se realizará sobre un mesón cubierto con papel absorbente y será desinfectado al final del procedimiento.
- Desechar los guantes, los aplicadores, tubos de ensayo y varillas sensibilizadas de acuerdo a los POEs de eliminación de desechos correspondientes.

8. Equipos:

- Cronómetro

9. Material:

- Tubos de ensayo de 5 mL
- Gradilla
- Kit de la prueba inmunocromatográfica
- Pipetas de transferencia
- Aplicadores de madera

10. Procedimiento:

- Indicar el número de la muestra en un tubo de ensayo limpio. Colocar los tubos rotulados en una gradilla.
- Añadir 15 gotas de la solución tampón de dilución en cada tubo.

- Introducir el aplicador o asa de siembra que contiene la muestra fecal en el tubo. Para muestras líquidas se recomiendan dos asadas y para muestras sólidas se recomienda una sola asada.
- Agitar para homogenizar la solución y dejar reposar 1 a 2 minutos.
- Sumergir la varilla sensibilizada en el sentido indicado por la flecha azul.
- Dejar incubar 10 minutos.
- Leer e interpretar los resultados.

11. Responsabilidades:

La realización de esta prueba de tamizaje para Rotavirus del grupo A será llevada a cabo por los investigadores del proyecto o una persona capacitada para ello.

12. Referencias Bibliográficas:

- Coris BioConcept. Inserto de la prueba Rota-Strip.

13. Anexo:

No aplica.



Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias / Escuela de Microbiología
Laboratorio de Biología Molecular

Procedimiento Operativo Estándar para el tratamiento de los derrames en el laboratorio	Código:	Página
	POE-LBM-JO-04 Versión 1	1/4
Elaborado por: José Jafet Ortiz, Q.F. Fecha: 30 de marzo de 2011	Revisado por: Annabelle Ferrera, Ph.D. Aprobado por: Ada Zelaya, M.Sc.	

1. Objetivo:

Este POE tiene como objetivo establecer normas para el tratamiento adecuado de los derrames en el laboratorio.

2. Campo de aplicación:

Este POE será aplicado en los laboratorios Teasdale-Corti de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas y el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

3. Definiciones:

MSDS: es un documento que da información detallada sobre la naturaleza de una sustancia química o un agente infeccioso, tal como sus propiedades físicas y químicas, información sobre salud, seguridad y riesgos al medio ambiente que estos puedan causar, así como la forma de manejarlos en caso de ocurrir un accidente.

Material bioinfeccioso: material que contiene un agente patógeno que podría representar un riesgo a la salud.

4. Siglas:

En el texto de este POE se usan las siguientes siglas:

UNAH Universidad Nacional Autónoma de Honduras

POE Procedimiento Operativo Estándar

EPP Equipo de Protección Personal

MSDS Hoja de datos de seguridad de materiales

HCl Ácido clorhídrico

NaHCO₃ Bicarbonato de sodio

5. Condiciones generales:

Los derrames de sustancias químicas, no sólo afectan a las operaciones de laboratorio, sino que pueden suponer un riesgo para las personas, los equipos y las instalaciones. En la mayor parte de los casos, los derrames se deben a pequeñas cantidades de productos y pueden ser controlados y eliminados por el mismo personal del laboratorio de acuerdo con la hoja de seguridad de la sustancia química involucrada.

6. Condiciones específicas:

Se deberán tener al alcance las MSDS de los agentes infecciosos con los que se trabaja y las MSDS de las sustancias químicas que se utilizan en el laboratorio a fin de conocer la forma adecuada de actuar ante un derrame.

7. Condiciones de Bioseguridad:

Para efecto de este POE se deberán cumplir los siguientes puntos:

- Usar el EPP adecuado (gabacha, guantes, mascarilla, gafas, etc.) a fin de evitar exposición a los agentes o sustancias involucrados en el derrame.
- Se deberá contar con un kit diseñado especialmente para el manejo de un derrame, el cual deberá contener: paños o papel absorbente, pinzas, recogedores, solución de hipoclorito de sodio 1%, soluciones neutralizantes comunes (ácido clorhídrico y bicarbonato de sodio).

8. Equipos:

- Recogedores, Pinzas

9. Material:

- Bolsas plásticas para desechos de sustancias bioinfecciosas.

- Paños o papel absorbente
- Solución de hipoclorito de sodio al 1% como agente desinfectante
- Soluciones de HCl 0.1N y NaHCO₃ al 3% como agentes neutralizantes comunes (en caso de derrame de bases o ácidos respectivamente).

10. Procedimiento:

En caso de derrame de material bioinfeccioso:

- Cubrir el derrame con un paño o papel absorbente.
- Verter hipoclorito de sodio 1% sobre este material absorbente y dejar actuar durante 30 minutos aproximadamente
- Retirar el paño o papel absorbente y descartar en el recipiente de material bioinfeccioso.
- En caso de existir fragmentos de vidrio estos se manipularan con recogedor y/o pinza y se depositarán en el contenedor de punzocortantes.
- El material infeccioso obtenido del derrame se tratará en autoclave o se sumergirá en solución de hipoclorito de sodio 1% para su desinfección.

En caso de derrame de sustancias químicas:

- Colocar sobre el derrame el material absorbente adecuado considerando la naturaleza de la sustancia química implicada.
- Neutralizar la sustancia química de acuerdo a lo especificado en la MSDS.
- Lavar la superficie afectada con agua y jabón.

11. Responsabilidades:

El tratamiento de los derrames en el laboratorio es responsabilidad del personal de laboratorio que efectúa la operación en la cual se llevó a cabo el incidente o en su defecto por el encargado del laboratorio, ya que son estos los que están más familiarizados con los agentes y/o sustancias involucradas. Bajo ningún motivo este procedimiento se realizará por el personal de limpieza.



Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias / Escuela de Microbiología
Laboratorio de Biología Molecular

Procedimiento Operativo Estándar para el manejo de desechos bioinfecciosos	Código:	Página 1/3
	POE-LBM-JO-05 Versión 1	
Elaborado por: José Jafet Ortiz, Q.F. Fecha: 30 de marzo de 2011	Revisado por: Annabelle Ferrera, Ph.D. Aprobado por: Ada Zelaya, M.Sc.	

1. Objetivo:

Este POE tiene como objetivo establecer normas para el manejo de los desechos bioinfecciosos.

2. Campo de aplicación:

Este POE será aplicado en el laboratorio Teasdale-Corti de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas y el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

3. Definiciones:

Los desechos bioinfecciosos son todos aquellos que pueden contener agentes infecciosos, y se subdividen en tres tipos: infecciosos, patológicos y punzocortantes.

4. Siglas:

En el texto de este POE se usan las siguientes siglas:

UNAH Universidad Nacional Autónoma de Honduras

POE Procedimiento Operativo Estándar

EPP Equipo de Protección Personal

CSB Cámara de Seguridad Biológica

5. Condiciones generales:

No aplica

6. Condiciones específicas:

Se deberá cumplir con la normativa y/o sugerencias establecidas por el Comité de Bioseguridad de la Escuela de Microbiología de la UNAH.

7. Condiciones de Bioseguridad:

Para efecto de este POE se deberán cumplir los siguientes puntos:

- Utilizar el EPP adecuado (gabacha, guantes).

8. Equipos:

- Autoclave

9. Material:

- Bolsas plásticas autoclavables
- Cinta indicadora de temperatura

10. Procedimiento:

- Las muestras que contengan material bioinfeccioso serán manipuladas dentro de la CSB.
- Todo material bioinfeccioso será descartado en bolsas plásticas de color rojo autoclavables (especiales para desechos bioinfecciosos).
- Una vez finalizados los procedimientos en la CSB, sacar la bolsa que contiene los desechos bioinfecciosos y llevar a autoclave.
- Seguir el POE específico para utilizar la autoclave.
- Finalizado el proceso de autoclavado, desechar como desechos comunes.
- En caso de tratarse de material reutilizable que contiene material bioinfeccioso, este será autoclavado antes de ser sometido a lavado.
- Si el material a descartar es del tipo punzocortante, este deberá ser colocado en un recipiente de plástico duro (o el contenedor destinado para este fin), deberá ser autoclavado y se desechará todo el recipiente.



Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias / Escuela de Microbiología
Laboratorio de Biología Molecular

Procedimiento operativo estándar para el almacenamiento de muestras	Código:	Página 1/3
	POE-LBM-JO-06 Versión 1	
Elaborado por: José Jafet Ortiz, Q.F. Fecha: 30 de marzo de 2011	Revisado por: Annabelle Ferrera, Ph.D. Aprobado por: Ada Zelaya, M.Sc.	

1. Objetivo:

Este POE tiene como objetivo establecer normas para el almacenamiento de muestras.

2. Campo de aplicación:

Este POE será aplicado el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

3. Definiciones:

Para este POE una muestra puede ser: orina, suero, suspensiones fecales y material genético (ADN o ARN).

4. Siglas:

En el texto de este POE se usan las siguientes siglas:

POE Procedimiento Operativo Estándar

EPP Equipo de Protección Personal

ADN Acido desoxiribonucleico

ARN Acido ribonucleico

5. Condiciones generales:

Las muestras serán almacenadas en el área gris del Laboratorio de Biología Molecular. Los congeladores deberán estar rotulados con la viñeta de material bioinfeccioso y se deben mantener a una temperatura de -20 °C.

6. Condiciones específicas:

- Bajo ninguna circunstancia se almacenaran muestras sin rotular, ya que esto puede generar confusiones al momento de requerir una muestra específica para su análisis.
- Se evitará almacenar muestras en gradillas que no posean una tapa y en caso de necesitarlo solo se hará de forma temporal y por un periodo no mayor a las 24 horas.
- Se evitará mantener almacenado especímenes que ya no son necesarios.

7. Condiciones de Bioseguridad:

Para efecto de este POE se deberán cumplir los siguientes puntos:

- Usar el EPP adecuado (gabacha, guantes).
- Las muestras serán almacenadas en viales debidamente rotulados y colocadas dentro de un empaque secundario.

8. Equipos:

- Congeladores a -20°C

9. Material:

- Viñetas
- Cajas especiales para congelamiento
- Tubos para microcentrífuga con capacidad de 1.5 mL, preferiblemente con rosca.

10. Procedimiento:

- Rotular los viales que contienen las muestras, especificar: código de la muestra, tipo de muestra, fecha y responsable.
- Colocar los viales de forma secuencial dentro de las cajas para congelamiento, no colocar más viales de los que la caja puede contener.
- Rotular adecuadamente las cajas para congelamiento, especificar: nombre del proyecto, tipo de muestras, número de caja, fecha.
- Colocar la caja de forma ordenada dentro del congelador a -20°C .

11. Responsabilidades:

El almacenamiento de muestras es responsabilidad del personal del laboratorio encargado de la recolección de las muestras y/o que realiza los diferentes procesos de separación, extracción o preparación de muestras.

12. Referencias Bibliográficas:

No aplica.

13. Anexo:

No aplica.

UDI-DEGT-UNAH



Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias / Escuela de Microbiología
Laboratorio de Biología Molecular

Procedimiento Operativo Estándar para la identificación cualitativa de astrovirus en muestras de heces	Código:	Página
	POE-LBM-JO-07 Versión 1	1/3
Elaborado por: José Jafet Ortiz, Q.F. Fecha: 30 de marzo de 2011	Revisado por: Annabelle Ferrera, Ph.D. Aprobado por: Ada Zelaya, M.Sc.	

1. Objetivo:

Este POE tiene como objetivo establecer normas para la aplicación de la prueba RIDASCREEN Astrovirus de r-Biopharm para la identificación cualitativa de astrovirus en muestras fecales.

2. Campo de aplicación:

Este POE será aplicado en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología de la UNAH.

3. Definiciones:

El test RIDASCREEN Astrovirus es un enzimoimmunoensayo para la identificación cualitativa de astrovirus en muestras de heces.

4. Siglas:

En el texto de este POE se usan las siguientes siglas:

UNAH Universidad Nacional Autónoma de Honduras

POE Procedimiento Operativo Estándar

EPP Equipo de Protección Personal

mL Mililitro

5. Condiciones generales:

No aplica

6. Condiciones específicas:

No aplica

7. Condiciones de Bioseguridad:

Para efecto de este POE se deberán cumplir los siguientes puntos:

- Usar el EPP adecuado (gabacha, guantes).
- La técnica se realizará sobre un mesón cubierto con papel absorbente y será desinfectado al final del procedimiento.
- Desechar los aplicadores, tubos para microcentrífuga y puntas en un recipiente con cloro al 1% para su posterior lavado.

8. Equipos:

- Cronómetro
- Micropipetas de 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l y multicanal de 250 μ l
- Lector de ELISA

9. Material:

- Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL
- Gradilla
- Kit de la prueba RIDASCREEN Astrovirus
- Aplicadores de madera

10. Procedimiento:

1. Atemperar la microplaca (PLATE) y los reactivos a temperatura ambiente (20-25 °C).
2. Diluir 1:10 el tampón de lavado (WASH) con agua destilada.
3. Diluir 1:11 las muestras de heces con el tampón de dilución de muestras (DILUENT 1).
4. Colocar las tiras de micropocillos necesarias en el marco del soporte.
5. Añadir 2 gotas o 100 μ l de control positivo (CONTROL +), control negativo (DILUENT 1) o muestra diluida.
6. Añadir 2 gotas o 100 μ l de conjugado 1 (CONJUGATE 1) y mezclar bien.

7. Incubar el producto 60 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).
8. Realizar 5 lavados con 300 µl de tampón de lavado cada uno.
9. Añadir 2 gotas o 100 µl de conjugado 2 (CONJUGATE 2).
10. Incubar el producto 30 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).
11. Realizar 5 lavados con 300 µl de tampón de lavado cada uno.
12. Añadir 2 gotas o 100 µl de sustrato (SUBSTRATE).
13. Incubar la solución 15 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) y en la oscuridad.
14. Añadir 1 gota o 50 µl de reactivo de parada (STOP).
15. Realizar una medición fotométrica a 450 nm. Es opcional utilizar una longitud de onda de referencia > 600 nm.

Control de Calidad

O.D. Control negativo = < 0.2

O.D. Control positivo = > 0.5

* Si no se alcanzan estos valores la prueba deberá repetirse.

Calculo del valor límite

- Valor limite = O.D. Control negativo + 0.15

Resultado de la prueba

- Positivo = O.D. Muestra es un 10% superior al valor limite calculado.
- Equivoco = O.D. Muestra en un rango del 10% por encima o por debajo del valor limite
- Negativo = O.D. Muestra más de un 10% por debajo del valor limite calculado.

11. Responsabilidades:

La realización de esta prueba de tamizaje para astrovirus será llevada a cabo por los investigadores del proyecto o una persona capacitada para ello.

12. Referencias Bibliográficas:

- r-Biopharm. Inserto de la prueba RIDASCREEN Astrovirus.



Universidad Nacional Autónoma de Honduras
Facultad de Ciencias / Escuela de Microbiología
Laboratorio de Biología Molecular

Procedimiento Operativo Estándar para la extracción y purificación de ARN viral	Código:	Página
	POE-LBM-JO-08 Versión 1	1/3
Elaborado por: José Jafet Ortiz, Q.F. Fecha: 30 de marzo de 2011	Revisado por: Annabelle Ferrera, Ph.D. Aprobado por: Ada Zelaya, M.Sc.	

1. Objetivo:

Este POE tiene como objetivo establecer normas para la aplicación del kit QIAamp Viral RNA de QIAGEN para la extracción y purificación de ARN viral.

2. Campo de aplicación:

Este POE será aplicado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Microbiología de la UNAH.

3. Definiciones:

No aplica.

4. Siglas:

En el texto de este POE se usan las siguientes siglas:

UNAH Universidad Nacional Autónoma de Honduras

POE Procedimiento Operativo Estándar

EPP Equipo de Protección Personal

mL Mililitro

5. Condiciones específicas:

Antes de empezar:

- Equilibrar a temperatura ambiente (15-25°C) las muestras y el buffer AVE.

- Preparar el buffer AW1 y el buffer AW2 según instrucciones del fabricante.
- Adicionar el carrier RNA (reconstituido en el buffer AVE) al buffer AVL de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6. Condiciones de Bioseguridad:

Para efecto de este POE se deberán cumplir los siguientes puntos:

- Usar el EPP adecuado (gabacha, guantes).
- La técnica se realizará en cámara aséptica la cual será desinfectada con solución de hipoclorito de sodio 0.5% y luz ultravioleta antes y después de ser usada.

7. Equipos:

- Cronómetro
- Micropipetas de 100 µl y 1000 µl
- Vortex
- Microcentrífuga

8. Material:

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL
- Gradilla
- Puntas para Micropipetas de acuerdo al volumen utilizado.
- Kit QIAamp Viral RNA
- Agua libre de nucleasas
- Etanol absoluto frío

9. Procedimiento:

- Pipetear **560 µl del buffer AVL** conteniendo el carrier de ARN dentro de un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
- Adicionar **140 µl de la muestra** (plasma, suero, orina, sobrenadante de cultivo de células o fluidos corporales libre de células) al buffer AVL-carrier ARN en el tubo de microcentrífuga. Mezclar en **vortex** 15 segundos.
- **Incubar a temperatura ambiente** (15 – 25°C) durante 10 minutos.

- **Centrifugar brevemente** el tubo para remover residuos en la tapa.
- Adicionar **560 µl de etanol** (96-100%) a la muestra, y mezclar en **vortex** 15 segundos. Después de mezclar, **centrifugar brevemente** el tubo.
- Cuidadosamente aplicar **630 µl de la solución del paso 5 a la columna** “sin mojar el borde”. Cerrar la tapa y **centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto**. Colocar la columna en un **nuevo tubo colector** y descartar el tubo conteniendo el filtrado.
- Cuidadosamente abrir la columna y **repetir el paso 6**.
- Cuidadosamente abrir la columna, y adicionar **500 µl del buffer AW1**. Cerrar la tapa, y **centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto**. Colocar la columna en un **nuevo tubo colector** y descartar el tubo conteniendo el filtrado.
- Cuidadosamente abrir la columna, y adicionar **500 µl del buffer AW2**. Cerrar la tapa y **centrifugar a máxima velocidad (14000 rpm) durante 3 minutos**.
- **Es recomendable** colocar la columna en un nuevo tubo colector y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Para eliminar cualquier residuo del buffer AW2.
- Colocar la columna en un **nuevo tubo de microcentrífuga** de 1.5 ml. Descartar el tubo colector anterior que contiene el filtrado. Cuidadosamente abrir la columna y adicionar **60 µl del buffer AVE** (equilibrado a temperatura ambiente). Cerrar la tapa, e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Almacenar el ARN a -20°C ó a -70°C hasta su uso.

10. **Referencias Bibliográficas:**

- QIAGEN. Inserto del kit QIAamp Viral RNA.

Anexo 9: Agradecimiento al donante

Este proyecto de tesis ha sido posible gracias a una beca de estudio e investigación otorgada por el Programa Teasdale-Corti Honduras-Canadá, 2007-2012 “*Fortaleciendo Capacidades para Lograr la Meta No. 6 del Milenio en Honduras: Combatiendo las Enfermedades Infecciosas*”. Dicho proyecto opera con fondos del programa Teasdale-Corti para Alianzas para la Investigación en Salud Mundial de la agencia Canadiense **Iniciativa para la Investigación en Salud Mundial** (www.ghri.ca).

[This thesis project has been possible thanks to a study and research scholarship granted by the Honduras-Canada Teasdale-Corti Project 2007-2012 “*Increasing Capacity to Achieve Millennium Development Goal # 6 in Honduras: Combating Infectious Diseases*”, funded by the Teasdale-Corti Global Health Research Partnership Program of the **Global Health Research Initiative** (GHRI), Canada (www.ghri.ca).]