

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA.**

**UNAN-LEÓN.**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS.**

**BIOANÁLISIS CLÍNICO.**



***Tesis para optar al Título de Licenciadas en Bioanálisis Clínico.***

***Frecuencia de Rotavirus en niños menores de 5 años, con diarrea aguda, atendidos en el Hospital Victoria Motta de la ciudad de Jinotega entre Abril y Junio del 2010.***

**Autores: Bra. Angélica del Carmen Castro Blandón**

**Bra. Cristel Elizabeth Escoto Acuña**

**Tutor: Dr. Filemón Bucardo Rivera  
Profesor titular  
Dpto. de Microbiología y Parasitología  
UNAN -León**

**León, Noviembre del 2010**

## ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>No de página</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>Problema</b>	<b>4</b>
<b>Justificación</b>	<b>5</b>
<b>Objetivos</b>	<b>6</b>
<b>Marco teórico</b>	<b>7</b>
<b>Diseño Metodológico</b>	<b>13</b>
<b>Resultados</b>	<b>17</b>
<b>Discusión</b>	<b>20</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>22</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>23</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>24</b>
<b>Anexos</b>	<b>28</b>

## **RESUMEN**

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en niños  $\leq 5$  años con diarrea aguda, atendidos en el Hospital Victoria Motta de la ciudad de Jinotega entre Abril y Junio del 2010, con el objetivo de determinar la frecuencia de Rotavirus (RoV) y caracterizar mediante análisis genéticos las cepas circulantes. Un total de 107 muestras diarreicas fueron examinadas mediante ELISA (Proscpect), para investigar la presencia de antígenos de rotavirus. Los resultados revelan una prevalencia del 17% (18/107), los niños en edades  $\geq 24$  meses fueron los más afectados con 24%, seguido por los niños en edades 7-12 meses con 19% y 13 - 23 meses con 17%. Los niños  $\leq 6$  meses fueron menos afectados con 5 %. Las características clínicas predominantes en los niños positivos a RoV fueron diarrea líquida (89%), vómito (83%) y más de 8 deposiciones en las últimas 24 horas (44%). La mayoría (67%) de los infectados tenían deshidratación severa y requirieron rehidratación por vía intravenosa (plan C). De los 18 pacientes RoV-positivos, 8 habían completado el esquema de vacunación (3 dosis), 4 tenían 2 dosis y 6 no tenían datos de inmunización. Para investigar si el genotipo de RoV circulando en la población estudiada era diferente a los genotipos presentes en la vacuna (G1, G2, G3, G4 y P[8]) se seleccionaron de forma aleatoria un total de 7 muestras, los resultados indican que todas las muestras analizadas pertenecen al genotipo G1. Los análisis de los genotipos P, revelan que todas las 7 muestras fueron negativas a los genotipos predominantes a nivel mundial (P[4], P[6], P[8] y P[9]). Este estudio revela que los niños inmunizados con la vacuna anti-rotavirus pueden ser susceptibles a las infecciones con cepas de rotavirus ausentes en la vacuna.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios, por su bondad en concedernos la vida, el entendimiento y la oportunidad de ayudar al prójimo con nuestros conocimientos, el cual gracias a su voluntad y benevolencia ha querido que se realizara este trabajo.*

*A nuestras familias que nos han brindado todo el apoyo moral e incondicional y económico, en especial a nuestras madres que nos acompañaron en cada una de las etapas de este proceso.*

*A nuestro tutor, Dr. Filemón Bucardo que nos sirvió de guía para realizarlo de la manera más eficientemente posible, por dedicarnos su tiempo y sus conocimientos para la creación de nuestra tesis.*

*Este estudio fue financiado con el proyecto Ecología Viral de las ayudas postdoctorales de la VIP, UNAN-León .*

*A Lic. Patricia Blandón quien gentilmente nos ayudo al procesamiento de las muestras y a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron la realización de nuestro trabajo.*

*Y a todos los pequeños pacientitos que aportaron lo más importante para hacer realidad esta investigación.*

## **DEDICATORIA**

***El presente trabajo investigativo está dedicado a nuestras queridas y tiernas madres por quienes nos hemos inspirados para continuar con nuestros estudios y sobre todo para culminarlos, al presentárenos como un ejemplo de personas fuertes y luchadoras contra cualquier adversidad que se presente siempre y cuando se tenga fe y esperanza en la voluntad de nuestro Dios y señor.***

## **INTRODUCCIÓN**

La enfermedad diarreica aguda es uno de los principales problemas de salud en Nicaragua, siendo la infección con Rotavirus (RoV) la causa más importante de diarrea severa<sup>1</sup>. En estudios realizados en algunos países tal como en El Salvador, se estimó que la proporción de hospitalización de niños menores de 5 años por rotavirus es 1:56 y la mortalidad de 1:531<sup>2</sup>.

El pico de incidencia de la infección por RoV ocurre entre los 6 y 24 meses de edad, siendo este grupo etario el de mayor riesgo de sufrir diarrea severa y hospitalización. La diarrea por RoV ocurre principalmente durante los meses otoño e invierno en los países de clima templado, pero en Nicaragua esta ocurre en los meses de verano, con el pico de incidencia entre Enero y Abril.<sup>3</sup>

La sintomatología típica de la infección por RoV es diarrea severa (más de 8 evacuaciones al día) acompañada de vómito y puede, o no, cursar con fiebre (37.8°C -39°C). La diarrea por RoV es autolimitada, con una duración promedio de aproximadamente 5 días. La gran mortalidad asociada a esta enfermedad es debida a la deshidratación severa que provoca la infección, por tanto, la recomendación principal en este padecimiento es la de rehidratar y mantener el balance electrolítico del paciente.<sup>4</sup>

La infección con RoV puede ser producida por cualquiera de los 4 principales serotipos (G1P [8]), G2P [4], G3P [8] y G4P [6], pero el de mayor prevalencia a nivel global es el serotipo 1 (G1P [8]).<sup>5</sup>

El aumento súbito de los casos de diarrea puede estar asociado con introducción de un nuevo patógeno, cambios genéticos en las cepas endémicas o condiciones higiénicas-sanitarias deficientes.<sup>4</sup>

Dado que la infección por rotavirus tiene un fuerte impacto en la salud de la población infantil, diversos esfuerzos se han realizado para desarrollar una vacuna segura y eficaz. La primera vacuna comercializada en Estados Unidos fue Rotashield, la cual tenía buena eficacia, pero resultó poco segura al utilizarse en los países en desarrollo por su asociación con el incremento de casos de invaginación en niños vacunados.<sup>6</sup>

Actualmente hay dos vacunas en el mercado, ambas son administradas de forma oral. **Rotarix** es una vacuna monovalente (G1P[8]), atenuada por sucesivos pases celulares, de una cepa de rotavirus aislada de un niño con diarrea. En contraste, **RotaTeq**, es una vacuna polivalente (G1, G2, G3, G4 y P[8]) obtenida por recombinación genética de RoV de una cepa de origen bovino y varias cepas de origen humano. Esta vacuna es la que se administra en el esquema de vacunación de Nicaragua.<sup>7</sup>

Ambas vacunas demostraron seguridad y eficacia en los ensayos clínico. Sin embargo, se sugiere que la presión inmunológica producida por estas vacunas dará lugar a la selección de aquellas cepas para las cuales la vacuna es menos eficaz. Además la velocidad de mutación de los RoV es alta ( $9 \times 10^{-5}$ ), y la acumulación de mutaciones puede dar lugar a variantes genéticas que escapan a la inmunidad producida por las vacunas.

Con este estudio pretendemos conocer la frecuencia de RoV y reconocer si existe alguna cepa resistente a la vacuna que administra el programa nacional de inmunización en niños  $\leq 5$  años en Jinotega.

## **ANTECEDENTES**

En Nicaragua por lo regular en los meses de Enero-Marzo se han registrado las mayores epidemias de RoV<sup>3,8</sup>. Por ejemplo, entre Febrero y Abril de 2005 se observó un incremento súbito de consultas por diarrea y deo como resultado 52 muertes, el patógeno identificado durante ese brote fue RoV G4P[8] mutante.<sup>9</sup>

Antes del 2006, RoV causaba numerosas muertes y cada año era el principal responsable de las hospitalizaciones de niños  $\leq$  de 5 años con diarrea aguda.<sup>1</sup>

Desde la introducción de la vacuna anti-RoV, en el esquema de vacunación de Nicaragua en el 2006, se ha producido una reducción sustancial de las muertes infantiles por enfermedades diarreicas agudas. Según datos del MINSA la cobertura de la vacuna anti-RoV es 85%.<sup>10</sup>

La reducción de la mortalidad general para el 2008 fue prácticamente del 36% en comparación al 2005. En el menor de 1 año la reducción fue del 27% y 1- 4 años la reducción fue del 44.8%.<sup>10</sup>



## **PROBLEMA**

¿Cuál es la frecuencia de Rotavirus en niños menores de 5 años con diarrea aguda, que son atendidos en el Hospital Victoria Motta de la ciudad de Jinotega?

## **JUSTIFICACIÓN.**

Aunque se ha reducido los casos de infección por RoV desde la introducción de la vacuna en el 2006, se necesita una vigilancia continua para comprender mejor el impacto de la vacuna sobre la ecología viral. Durante la introducción de una cepa vacunal en una comunidad pueden emerger cepas resistentes a la inmunidad producida por la vacuna debido a los mecanismos de evolución de estos virus.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar la frecuencia y tipificar Rotavirus en niños menores de 5 años con diarrea aguda, que son atendidos en el Hospital Victoria Motta de la ciudad de Jinotega; 2010.

### **Objetivos Específicos**

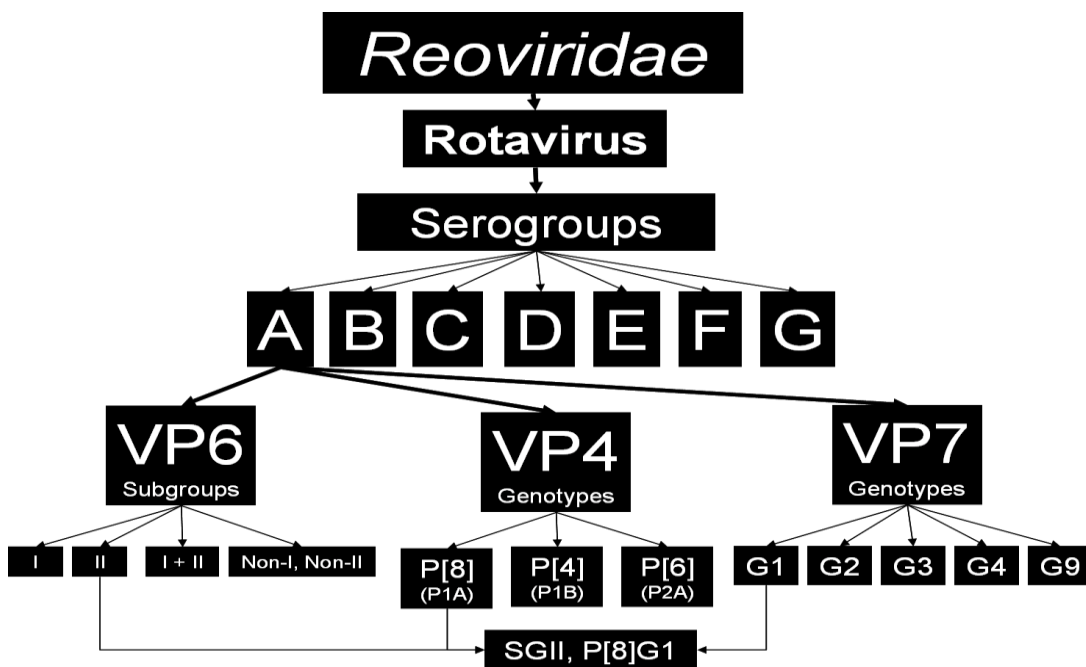
- Describir características clínicas y epidemiológicas de la población en estudio.
- Determinar la frecuencia de Rotavirus en la población en estudio.
- Identificar los genotipos de Rotavirus en las cepas circulantes.

## MARCO TEÓRICO

Los rotavirus (del [latín](#). *rota*: rueda) tienen una apariencia característica parecido a una rueda, cuando es visualizado mediante microscopio electrónica<sup>11</sup>. Los RoV humanos fueron inicialmente descritos por Ruth Bishop en 1973 en Australia<sup>12</sup>.

### **ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN:**

El género RoV pertenece a la familia Reoviridae, miden alrededor de 70 nm carecen de envoltura y están cubiertos por una doble cápside. El genoma viral consiste en 11 segmentos de ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena que codifica proteínas estructurales y no estructurales respectivamente. Los RoV se dividen en siete grupos (A-G) basándose en las propiedades antigénicas de la proteína VP6. Estos grupos, a su vez, se dividen en subgrupos y serotipos según las proteínas VP4 (serotipo P) y VP7 (serotipo G). Los grupos A, B y C son patógenos humanos, siendo el grupo A, el causante de casi todos los brotes de diarrea asociada a RoV, tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo<sup>13,14</sup>.



En la capa más externa se encuentran las proteínas VP4 y VP7 que tienen actividad neutralizante y definen la clasificación binaria de los RoV del grupo A en serotipos y genotipos. Hasta el presente se han determinado 16 serotipos G (por glicoproteína) y 27 genotipos P (por proteasa), de los cuales 11 genotipos G y 12 genotipos P son humanos.<sup>5,15</sup>

## ***TRANSMISIÓN***

La transmisión de los RoV es de tipo fecal-oral, pero las vías respiratorias podrían estar también involucradas, como ocurre con el virus de influenza y del sarampión<sup>16,17</sup>. La posibilidad de transmisión por el aire es cada vez más factible<sup>4</sup>. La manera más común de contagio es de persona a persona, pero también se transmite a través de alimentos u objetos contaminados, y a través de pequeñas gotas transmitidas por el aire, por vómitos o fómites.<sup>4</sup>

Este virus es muy estable en el ambiente, pudiendo sobrevivir por largos períodos de tiempo sobre superficies de objetos contaminados. El período de incubación en general es de 24 - 48 horas. La dosis infectante se presume que es de 10 - 100 partículas virales infecciosas. Una persona con RoV excreta una gran cantidad de partículas virales: en el orden de  $(10^8-10^{10})$  partículas infecciosas /ml de heces.<sup>18</sup>

## ***MANIFESTACIONES CLÍNICAS***

La infección por RoV se manifiesta después de una incubación inferior a 48 horas y se mantiene durante un período de tiempo entre 3 y 8 días, las dos características que se muestran durante la infección son los vómitos acompañados por las diarreas. El vómito aparece como primer síntoma acompañado de un estado febril ligero; éstos van cediendo durante las 24 horas siguientes de la enfermedad, la diarrea aparece como segundo síntoma y puede durar entre 5 y 7 días. Pueden aparecer otros síntomas como dolores abdominales y síntomas respiratorios. Las heces no tienen sangre ni leucocitos. Puede producirse una deshidratación que progresa con rapidez sobre todo en los lactantes.<sup>19</sup>

## **PATOGENESIS**

La replicación de RoV tiene lugar en el citoplasma de las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado y la porción más afectada es el yeyuno, aunque puede extenderse a través de la mucosa intestinal sin afectar el colon.<sup>20, 21</sup>

Los enterocitos de la parte superior de las vellosidades son células diferenciales que tienen funciones tanto digestivas como de hidrólisis de los disacáridos, y funciones de absorción como el transporte de agua y electrólitos mediante los cotransportadores glucosa y aminoácidos.<sup>22</sup>

La infección viral selectiva de estas células conduce a la lisis de ellas y su contenido se excreta junto con las partículas de virus en las heces fecales para producir un desequilibrio en la relación entre absorción y secreción del líquido intestinal, malabsorción de carbohidratos complejos sobre todo lactosa<sup>22</sup>.

Los enterocitos de la cripta madura son reemplazados por las células de la cripta secretoria, las cuales son células indiferenciadas que no poseen ribete en cepillo de enzimas hidrolíticas y que ejercen una secreción neta de agua y electrólitos, por lo que se reducen los niveles de sodio y potasio intracelularmente por pérdida de la actividad de la adenosintrifosfatasa y del transporte de sodio acoplado a la glucosa. Estos niveles retornan a la normalidad después de 4 a 8 semanas a partir de la infección.<sup>23</sup>

También, recientemente, se han identificado otros mecanismos de patogenicidad del RoV que son la actividad citotóxica de la proteína no estructural NSP4 que se produce en la fase inicial del ciclo de replicación viral y la activación del sistema nervioso entérico (SNE)<sup>24</sup>. Ambos mecanismos producen una diarrea sin producir alguna alteración histopatológica. En el primer mecanismo, la enterotoxina (NSP4) altera la homeostásis del calcio, ocasionando un aumento del calcio

intracitoplasmático que activa los canales de cloro, y aumenta la secreción de cloro, acompañado por agua, a la luz intestinal <sup>20</sup>. En el segundo mecanismo, el SNE que controla los movimientos del intestino y la absorción y secreción de líquidos, produce una diarrea secretora cuando es estimulado por el virus <sup>24</sup>.

## **INMUNIDAD**

Los RoV producen una infección local que afecta principalmente las células maduras de las vellosidades intestinales. El período de incubación (1-3 días) es relativamente corto por lo que induce una inmunidad parcial y poco duradera. Este tipo de infección es similar a la producida por los virus respiratorios y contrasta con la inmunidad producida por los virus sistémicos, como el polio, rubéola, varicela y sarampión, que tienen un período de incubación más largo (7-14 días), y producen una inmunidad que dura toda la vida <sup>25</sup>. La inmunidad de la mucosa constituye una defensa muy importante en las infecciones intestinales producida por el RoV <sup>26,27</sup>.

La infección comienza con la unión de los RoV a receptores específicos en las células epiteliales. Luego los virus se replican y hacen contacto con las células M que los transportan a las Placas de Peyer donde son presentados por los macrófagos, las células B y otras células presentadoras de antígenos (células dendríticas) a las células vírgenes (Th0). Después de haber sido activadas estas células (Th2), ellas inician la expansión clonal de las células B virus específicas y de las células precursoras de los linfocitos T citotóxicos (LTCp) <sup>25</sup>. Las células B virus específicas y las LTCp penetran los nódulos linfáticos, llegan al sistema circulatorio vía el ducto torácico para luego regresar al lugar de origen donde fueron estimulados o a sitios asociados a respuesta efectora en la lámina propia del intestino. Se sabe que este regreso a lámina propia es selectivo y mediado por receptores en los linfocitos T (integrinas) y en células endoteliales (glicoproteína) <sup>28</sup>. En esta zona, tanto la secreción de IgA por las células B diferenciadas (células plasmáticas) como la diferenciación de las LTCp en linfocitos T citotóxicos CD8 efectores son inducidas por citocinas<sup>25</sup>. Las citocinas que inducen la secreción de IgA específica por las células plasmáticas son las interleucinas (IL-4, IL-5 y IL-6).

La diferenciación de las células B virus específicas en células IgA secretoras (IgA-s) es un proceso que toma de 3 - 5 días después del período de incubación<sup>26</sup>. La IgA dimérica se ubica en la superficie baso lateral de la vellosidad, adquiere la fracción secretora en el citoplasma y es excretada al lumen intestinal. El mecanismo por el cual la IgA elimina al virus es mediante su unión con el antígeno VP4 (interferencia conformacional) bloqueando la unión del virus a los receptores celulares y, por ende, su entrada a la célula. También se ha postulado que la IgA puede actuar intracelularmente<sup>26</sup>. El interferon y la interleucina IL-2 son las citocinas que promueven la maduración de los CTLp a CTL efectoras. La CTL específicas y efectoras residen en la vellosidad intestinal mientras que las células B específicas y las CTLp permanecen en la lámina propia. Así que, mientras las Placas de Peyer son el principal lugar para la inducción de la respuesta inmune, la lámina propia es el principal lugar para la maduración de las células específicas transformándose en efectoras.<sup>26</sup>

## **MECANISMO DE EVOLUCIÓN**

Los mecanismos de evolución del RoV involucrado son: Re-arreglo genético, recombinaciones o mutaciones puntuales.

La naturaleza segmentada del genoma de RoV ha constituido la base fundamental para el estudio de las propiedades moleculares de las proteínas virales, su caracterización y sus funciones.<sup>29</sup> También constituye la base del mecanismo más común de evolución del RoV, denominado rearreglo genético (intercambio de genes entre cepas) y es la base para el desarrollo de la primera vacuna que ha salido al mercado (Rotashield) y de otras en desarrollo<sup>30, 31</sup>.

El genoma evoluciona ya sea por mutación puntual o por reorganización de los segmentos entre diferentes cepas. Este último mecanismo consiste en el intercambio de segmentos genómicos entre dos cepas al infectar una misma célula, los virus resultantes podría entonces contener segmentos derivados de ambas cepas parentales<sup>5</sup>.



## VACUNAS

**Rotarix** es una vacuna monovalente (G1P1 [8]), obtenida por atenuación mediante pases celulares sucesivos de una cepa de origen humano. Esta cepa fue aislada de un niño con diarrea en Cincinnati – Estados Unidos. La vacunación con esta cepa simula la infección natural, que induce protección contra la diarrea grave en posteriores infecciones, tanto por la misma cepa (homotípica) como por cepas distintas (heterotípica), por que comparte epítopes neutralizantes contra la mayoría de los RoV humanos aislados en pacientes con gastroenteritis severa por RoV.<sup>5</sup>

Esta vacuna se administra por vía oral (1 ml), en 2 dosis comenzando a las 6 semanas de edad, debiendo respetarse un intervalo de 4 semanas entre las dosis. El esquema de vacunación debe haberse completado a las 24 semanas de edad.<sup>7</sup> Es una vacuna liofilizada que se almacena a 2 - 8° C, y se reconstituye con buffer de Carbonato de calcio. Tiene replicación intestinal y el virus se elimina en la materia fecal del 15 y el 50% de los niños vacunados, durante aproximadamente 7 días.<sup>7</sup>

**RotaTeg** es una vacuna pentavalente (G1, G2, G3, G4 y P1 [8]) obtenida por recombinación genética de RoV de una cepa de origen bovino y varias cepas humanas. La vacuna proporciona protección homotípica contra cada una de las cepas humanas incluidas en ella. G1, G2, G3, G4, y P 1 [8]<sup>32</sup>

Se administra por vía oral, en 3 dosis a partir del primer mes de vida con 1 o 2 meses de intervalos, no necesita ser reconstituida, contiene un buffer líquido para neutralizar la acidez estomacal. Se presenta en estado líquido y se almacena en temperaturas de 2 a 8° C.<sup>32</sup>

Todos los serotipos son un “reasociado” de genes humanos - bovinos (WC3), no tiene replicación intestinal, habiéndose observado eliminación por materia fecal en el 9% de los vacunados con la primera dosis, siendo despreciable con las dosis posteriores<sup>32</sup>.

## DISEÑO METODOLÓGICO

**Tipo de Estudio:** Descriptivo de corte transversal.

**Área de Estudio:** El estudio se realizó en Jinotega, ubicado a 168 km de la ciudad capital, Managua. El departamento cuenta con una población aproximada de 331,000 habitantes de los cuales 41,134 viven en el casco urbano de la ciudad, el 11% son niños  $\leq 5$  años, tiene una extensión total de 1,119.00 km<sup>2</sup> y una altitud de la cabecera municipal 1,003.87 metros sobre el nivel del mar, una temperatura media: 18 - 32°C.<sup>33</sup>



**Lugar de Estudio:** El hospital Victoria Motta, brinda atención médica en las áreas de Emergencia, Ginecología, Labor y Parto, Cirugía, Medicina Interna, Pediatría, Neonato, Ortopedia, Consulta Externa, Odontología, Farmacia, Laboratorio Clínico. Cuenta con un personal médico de 55 recursos, 48 enfermeras, 10 técnicos de laboratorio y 8 farmacéuticos. Cuenta con un total de 248 camas disponibles para la población asignada.

**Muestra:** Estuvo constituida por 107 niños  $\leq 5$  años atendidos con diarrea aguda.

**Muestreo:** No probabilístico por conveniencia.

**Fuente de información:** Primaria, obtenida mediante entrevista a los padres de los niños, los registros médicos y datos de laboratorio;(Anexo 1).

**Criterios de inclusión:**

- Pacientes  $\leq 5$  años.
- Niños que asistieron al Hospital Victoria Motta, por presentar diarrea y deshidratación clasificada en A,B ó C.
- Niños cuyos padres o responsables estuvieron de acuerdo en que sus hijos formaran parte del estudio.

**Criterios de exclusión:**

- Niños  $\geq 5$  años.
- Los niños cuyos padres no permitieron que fueran parte del estudio.
- Niños que asistieron al hospital los días domingos, y días de semana después de las 6 pm hasta 6 am.

**Recolección de la información:**

Una vez que fueron identificados los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión, se les explicó a los padres o responsables los objetivos del estudio y la forma de recolección de la muestra; igualmente se solicitó que firmaran el consentimiento informado (Anexo 2).

Posteriormente a través de la entrevista directa se procedió a llenar la ficha previamente elaborada, conteniendo datos generales, clínicos, epidemiológicos, manejo de deshidratación, así como también del expediente del paciente.

### **Recolección de la muestra:**

A cada paciente se le recolecto de 5 a 10 ml de heces, en frasco plásticos estériles, debidamente identificados con el nombre, fecha de la toma de muestra. Las deposiciones de características meramente líquidas fueron recolectadas con pañales descartables y gasas estériles, las cuales se depositaron en frascos estériles, una vez obtenida la muestra.

Las muestras se recolectaron diariamente de lunes a sábado de las 6 am a las 6 pm, y fueron guardadas a -20°C, hasta su posterior traslado cada 15 días. Las muestras fueron transportadas en termos provistos de refrigerantes a T° de 4°C, para asegurar la calidad de la muestra, hacia el laboratorio del Departamento de Microbiología y Parasitología de la facultad de Ciencias Medicas, complejo docente de la salud (Campus Medico) donde fueron procesadas para su respectivo análisis.

### **Procesamiento de las muestras:**

Las muestras de heces fueron diluidas 1/10 (vol/vol) en PBS. A partir de esta dilución se realizó la detección de antígenos para RoV.

### **Método de detección para Rotavirus:**

En resumen, se colocaron 100 ul de muestra diluida por pocillo, los pocillos estaban sensibilizados con anticuerpos anti-rotavirus, posteriormente se añadió 100 ul de conjugado a cada pocillo. Después de 1 hora de incubación a 25°C, se hicieron 6 lavados, luego se añadió 100 ul de sustrato a cada pocillo y se incubo nuevamente a 25°C por 10 minutos. La lectura se hizo a 450 nm. Una muestra es considerada positiva cuando la lectura de absorbancia es superior al valor de corte (absorbancia del control negativo más 0.1). En cada análisis se colocó un control positivo y control negativo. (Anexo 3)

## **Caracterización Molecular:**

**Extracción del ARN.** Se extrajo ARN Viral de las suspensiones de heces siguiendo las instrucciones del fabricante, del kit QIAamp ARN viral Mini Kit de (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un total de 60 ul del dsRNA viral se recogió y se almacenó a -20°C hasta que se realizó la Transcripción reversa. (Anexo 4)

**Transcripción Reversa (RT);** Un total de 28 ul de dsRNA se mezcló con 50 pmol del hexadeoxynucleotid [pd(N)6]. Esta mezcla se desnaturizó a 97°C durante 5 minutos, y rápidamente se enfrió en hielo durante 2 minutos, se adicionó una RT-PCR bead (de cuentas Amersham Biosciences, Reino Unido). La RT se llevó a cabo durante 30 minutos a 42°C para producir el cDNA que se utilizó para la genotipificación. (Anexo 5)

**G y P multiplex genotyping.** Los genotipos G1, G2, G3, G4 y G9 fueron investigados siguiendo una modificación del método descrito por Gouvea et al. 1990.<sup>34</sup> Los genotipos P [4], P [6], P [8] y P [9] fueron investigados siguiendo una modificación del método descrito Gentsch et al 1992 (Anexo 5)

## **Análisis de resultados.**

Se realizó una base de datos en el programa SPSS versión 14.0. Los datos fueron procesados y analizados en el mismo programa, calculando % y frecuencia, la correlación entre variables se realizó utilizando tablas de 2 x 2, el OR se calculó manualmente.

## **Confidencialidad**

Toda información obtenida de los participantes fue confidencial. Las identidades individuales no fueron utilizadas. Cada participante tuvo una identificación única y todas las muestras fueron marcadas con un código único. Solamente los autores del estudio tuvieron acceso a esta información, la cual fue almacenada en computadoras que permanecen en la oficina del coordinador del estudio en el departamento de microbiología.

## RESULTADOS

**Características Epidemiológicas.** La prevalencia de RoV en niños  $\leq 5$  años con diarrea aguda que asistieron al Hospital Victoria Motta de Jinotega, entre Abril y Junio del 2010 fue del 17%. Los niños en edades  $\geq 24$  meses fueron los más afectados con 24% (OR = 1.75), seguido por los niños en edades 7-12 meses con 19% y 13 - 23 meses con 17%. Los niños  $\leq 6$  meses fueron menos afectados con 5 %. No se observaron diferencias significativas entre la presencia de RoV y el sexo o la procedencia. La mayoría de los niños investigados que fueron positivos a RoV eran del municipio de Jinotega (89%), de los municipios restantes, se encontraron casos positivos en Wiwili y Yali. La mayoría de los niños (63%) recibían lactancia materna y, el mayor porcentaje de RoV-positivo se observó en los no lactantes con 21% . (Tabla. No.1)

**Tabla No. 1.** Características epidemiológicas de los pacientes infectados con Rotavirus, en el Hospital Victoria Motta de Jinotega, entre Abril y Junio del 2010. (n=107)

Variable	No.	RoV-positivos	Odds Ratio	P value
<b>Sexo</b>				
Femenino	46	8(17%)	1.07	0.44
Masculino	61	10(16%)	0.93	0.8913
<b>Procedencia</b>				
Rural	56	10(18%)	1.16	0.7643
Urbano	51	8(16%)	0.85	0.7643
<b>Edad en Meses</b>				
0-6	19	1(5%)	0.23	0.2425
7-12	32	6(19%)	1.21	0.7277
13-23	35	6(17%)	1.03	0.9507
$\geq 24$	21	5(24%)	1.75	0.3397
<b>Lactancia Materna*</b>				
No	38	8(21%)	1.9	0.2377
Si	65	8(12%)	0.52	0.2377

\*En 4 casos no se obtuvo información sobre lactancia materna

**Características Clínicas.** En relación a las características clínicas se observó que los pacientes RoV-positivos tenían una mayor tendencia al vómito, en comparación a los pacientes RoV-negativo (OR = 3.67). Sin embargo las nauseas fueron más común en los pacientes RoV-negativos. No se observaron diferencias en relación a fiebre, pérdida de apetito y calambre abdominal entre pacientes RoV-positivos y RoV-negativos. En relación al plan de rehidratación se observa que la mayoría de los RoV-positivos se clasificaron en plan C (67%), mientras que la mayoría los RoV-negativos, se clasificaron en plan B (67%). El análisis de OR revela una mayor tendencia a la severidad en los pacientes RoV-positivos (OR = 6.06). [Tabla No.2] De los 18 pacientes RoV-positivos, 8 habían completado el esquema de vacunación (3 dosis), 4 tenían 2 dosis y 6 no tenían datos de inmunización. [Tabla No.3]

**Tabla No. 2.** Características Clínicas de los niños con Rotavirus, en el Hospital Victoria Motta de Jinotega, entre Abril y Junio del 2010. (n=107)

Variable	RoV-positivo (n=18)	RoV-negativo (n=89)	Odds Ratio	P value
<b>Signos y Síntomas</b>				
Nauseas	3 (17%)	27 (30%)	0.45	0.2396
Vómito	16 (83%)	61 (68%)	3.67	0.0796
Fiebre	13 (72%)	72 (81%)	0.61	0.4061
Perdida de apetito	8 (44%)	45 (50%)	0.78	0.6359
Calambre abdominal	5 (28%)	19 (21%)	1.41	00.5509
Distención abdominal	5 (28%)	10 (11%)	3.03	0.0652
<b>Plan de Rehidratación</b>				
A	2 (11%)	7 (8%)	1.46	0.6509
B	4 (22%)	60 (67%)	0.13	0.0003
C	12 (67%)	22 (25%)	6.06	0.0004
<b>No. Evacuaciones en las últimas 24 h.</b>				
0 – 3	3 (17%)	12 (13%)	1.28	0.7227
4 - 7	7 (39%)	43 (49%)	0.68	0.4648
≥ 8	8 (44%)	34 (38%)	1.29	0.6209

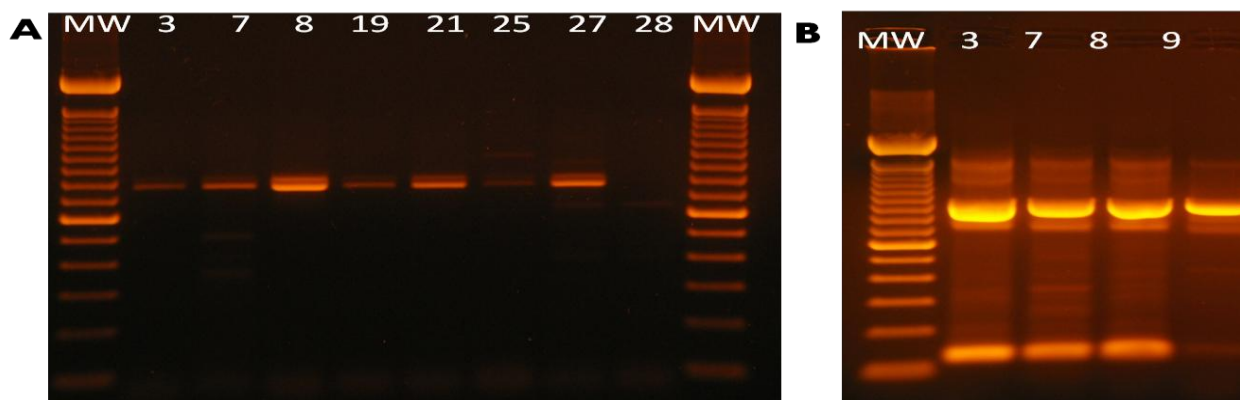
**Tabla No.3.** Frecuencia de gastroenteritis por Rotavirus en niños que han recibido la vacuna anti-RoV

Estado de inmunización	No. De Casos	RoV-positivo (%)
0 Dosis	7	2 (29)
1 dosis	6	0 (0)
2 dosis	24	4 (17)
3 dosis	58	8 (14)
Sin datos*	12	4 (33)
Total	107	18 (17)

\*No presento tarjeta de vacunación

**Caracterización Molecular.** Para investigar si el genotipo de RoV circulando en la población estudiada era diferente a los genotipos presentes en la vacuna (G1, G2, G3, G4 y P [8]) se seleccionaron de forma aleatoria un total de 7 muestras, las cuales fueron analizadas mediante el RT-PCR descrito por Gouvea, que permite la identificación simultanea de los genotipos G1, G2, G3, G4 y G9. Los resultados indican que todas las muestras analizadas pertenecen al genotipo G1 (Fig. 1, panel A). Los análisis para identificar los genotipos P, revelaron que todas las muestras fueron negativas para los genotipos P[4], P[6], P[8] y P[9]. Sin embargo, todas las muestras presentan el gen VP4 cuando se analiza con primers genéricos indicando que el genotipo P en esas muestras es diferente a los investigados en este estudio (Fig. 1, panel B).

**Figura 1.** Panel A, identificación de G1 en niños RoV-positivos. Panel B, identificación del gen VP4 en RoV-positivos y negativos a P[4], P[6], P[8] y P[9].





## DISCUSIÓN

Rotavirus es el principal agente etiológico viral, causante de diarrea severa en niños  $\leq 5$  años en todo el mundo, con especial importancia en los países sub-desarrollados<sup>35</sup>. Después de la introducción de una vacuna contra RoV el resultado esperado sería una disminución dramática de casos de diarrea asociados con este patógeno. La vacuna contra RoV fue introducida en el esquema de vacunación de Nicaragua en octubre del 2006. El ensayo clínico previo a la introducción de esa vacuna, realizado en 11 países, reveló una eficacia del 98% contra la gastroenteritis severa de cualquier tipo y una eficacia del 74% contra la diarrea severa asociada a RoV de los genotipos G1 – G4<sup>32</sup>.

En un estudio realizado en niños hospitalizados en León, entre el 2001 y 2003, se encontró que el 40% fueron RoV-positivos. En contraste con el presente estudio, encontramos que de los 107 niños investigados el 17%(18) fueron positivos a RoV. Sugiriendo un efecto positivo de la vacuna contra la diarrea severa. Resultados similares fueron observados en Brasil donde se encontró que después de la introducción de la vacuna la infección con RoV disminuyó en un 38%<sup>36</sup>.

La observación que la vacuna de rotavirus tiene limitaciones ante la infección con cepas de rotavirus poco comunes, no es nueva. En este estudio encontramos 8 niños con el esquema de vacunación completo y con diarrea severa asociada a rotavirus. Este hallazgo podría estar asociado a la presencia de cepas no incluidas en la vacuna e indica que es necesario continuar con la vigilancia epidemiológica de las cepas circulantes y en el futuro la reformación de esta vacuna.

En cuanto a la edad de los niños en estudio el grupo más afectado fueron los  $\geq 24$  de meses (24%), en cambio otros estudios realizados en Nicaragua previo a la introducción de la vacuna y en otros países indican que el grupo más afectado es el de 7 a 12 meses<sup>4, 37, 38</sup>. Es decir que la infección severa con rotavirus ocurre en ausencia de lactancia materna, la cual es más común en los primeros 6 meses de

vida. Los niños  $\leq 6$  meses presentaron el porcentaje más bajo de infección, en este grupo de edad solo 1 caso fue positivo y este no recibía lactancia materna. Según el estudio realizado por Uhnoo et al.<sup>39</sup> las infecciones por RoV ocurren predominantemente en niños  $\geq 6$  meses debido a la protección inmunológica por los anticuerpos IgA específicos presentes en la leche materna.<sup>38,39,40, 41</sup>

En relación con las características clínicas, los niños en estudio que fueron positivos a RoV presentaron una mayor tendencia a tener vómito (83%), diarrea líquida (89%) y más de 8 deposiciones en las últimas 24 horas (44%). La mayoría (67%) de los RoV-positivos tenían deshidratación severa y requirieron de rehidratación por vía intravenosa (plan C), estas observaciones son características de la diarrea por RoV. En algunos estudios se resalta la mayor tendencia de los RoV a producir deshidratación severa cuando se compara con cualquiera de los otros agentes involucrados en la producción de diarreas ya sean bacterias, parásitos o agentes indeterminados.<sup>4, 37</sup>

Al analizar los resultados de la caracterización molecular mediante PCR, se observó que el genotipo predominante fue G1. El genotipo G1 es predominante a nivel mundial y las 2 vacunas contra RoV contienen este genotipo. Dado que en este estudio los niños vacunados contra RoV se infectaron con la cepa G1 podríamos pensar que puede tratarse de una cepa mutante que escapa a la respuesta inmunológica inducida por la vacuna. Otro dato relevante es que todas las cepas analizadas fueron negativas a P[4], P[6], P[8] y P[9]. El genotipo P[8] es predominante a nivel mundial y las 2 vacunas contra RoV contienen este genotipo. Una de las posibles explicaciones a la presencia de RoV en niños vacunados es que la cepa encontrada contiene un antígeno P desconocido y por tanto no es reconocido por el sistema inmune y le confiere a esta cepa la capacidad de infección y de producir diarrea severa.

## **CONCLUSIONES**

1. El porcentaje de niños  $\leq 5$  años con diarrea aguda asociada a RoV en este estudio fue del 17%.
2. Los porcentajes de niños infectados con rotavirus en ambos sexos fueron similares, siendo el 17% para el sexo femenino y el 16% para el masculino. Los niños  $\geq$  de 24 meses de edad resultaron ser los más afectados (24%).
3. Los niños RoV-positivo tenían una mayor tendencia a presentar vómito. El mayor número de niños infectados requirieron rehidratación intravenosa.
4. El genotipo de la cepa de RoV encontrada en este estudio fue G1P[?]. Los genotipos P [4], P [6], P [8] y P [9] no fueron encontrados.
5. Este estudio revela que los niños inmunizados con la vacuna anti-rotavirus pueden ser susceptibles a las infecciones con rotavirus, sin embargo, la muestra analizada es pequeña y el periodo de estudio es limitado, por tanto, estos resultados deben ser interpretados con precaución.

## **RECOMENDACIONES**

1. Continuar la vigilancia epidemiológica y caracterización molecular de las cepas de RoV que causan diarrea aguda en niños  $\leq 5$  años, en nuestro país.
2. Secuenciar el gen VP4 de la cepa encontrada en este estudio para definir su genotipo

## BIBLIOGRAFIA

1. Espinoza F. Rotavirus in Pediatric Gastroenteritis in Nicaraguan Children. Published and printed by Karolinska University Press. Stockholm, 2004.
2. [Guardado JA](#), [Clará W AW](#), [Turcios RM](#), [Fuentes RA](#), “et al”. Rotavirus in El Salvador: an outbreak, surveillance and estimates of disease burden, 2000-2002. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, San Salvador, El Salvador. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Oct; 23(10 Suppl):S156-60.
3. [Becker-Dreps S](#), [Paniagua M](#), et al. Changes in Childhood Diarrhea Incidence in Nicaragua Following 3 Years of Universal Infant Rotavirus Immunization. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Sep 24.
4. Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock 2000. Rotaviruses, p. 1787-1833. *In* B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus(eds), *Virology*, vol. 2. Raven Press, New York.
5. Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, “et al”. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996; 174:S30-36.
6. Kapikian AZ. [A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal.](#) Novartis Found Symp. 2001; 238:153-71; discussion 171-9. Review.
7. Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006; 354:11–22.
8. Espinoza F, Bucardo F, Paniagua M, Svensson L, Hallander H, and Bondeson K. 2006. Shifts of rotavirus g and p types in Nicaragua 2001-2003. *Pediatr Infect Dis J* 25:1078-80.

9. [Bucardo F](#), [Karlsson B](#), [Nordgren J](#), et al. Mutated G4P[8] rotavirus associated with a nationwide outbreak of gastroenteritis in Nicaragua in 2005. Department of Microbiology, National Autonomous University of Nicaragua, León, Nicaragua. [J Clin Microbiol](#). 2007 Mar; 45 (3):990-7.
10. Ministerio de Salud. Análisis de los principales eventos notificados a través de la vigilancia epidemiológica hasta la semana 42 del 2008. Managua, 21 de octubre 2008.
11. Flewett T H, Bryden A S, Davies H, Woode G N, and J. C. Bridger 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*. 2:61-63
12. Bishop R F, Davidson G, Holmes I H, and Ruck B. J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*: 1281-1283.
13. Clark B, McKendrick M. A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis*. 2004; 17:461-9.
14. Wilhelmi I, Román E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9:247-62.
15. Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*. 2005 Sep 1; 192 Suppl 1:S146-59.
16. Zheng BJ, Chang RX, Ma GZ, Xie JM, Liu Q, Liang XR, "et al". Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *J Med Virol* 1991; 34:29-37.
17. Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis* 1991;13:448-461.
18. Nordgren J, Bucardo F, Svensson L, Lindgren PE. [Novel light-upon-extension real-time PCR assay for simultaneous detection, quantification, and genogrouping of group A rotavirus](#). *J Clin Microbiol*. 2010 May;48(5):1859-65.

19. Hjelt K, Krasilnikoff PA, Grauballe PC, Rasmussen SW: Clinical features in hospitalized children with acute gastroenteritis. *Acta Pediatric Scand* 1985; 74:96-101.
20. Lundgren O, Svensson L. [Pathogenesis of rotavirus diarrhea](#). *Microbes Infect*. 2001 Nov;3(13):1145-56.
21. Theil KW, Birch, CJ. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 1978; 39:213-20.
22. Nabuurs MJ. Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhea. *Vet O* 1998; 20(30):542-5.
23. Tolia UK, Dubais RS. Update of oral rehydration: its place in treatment of acute gastroenteritis. *Pediatr Ann* 1985; 14:295-303.
24. Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. [Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea](#). *Science*. 2000 Jan 21; 287(5452):491-5.
25. Offit PA. Correlates of protection against rotavirus infection and disease. In *Gastroenteritis viruses*. Novartis Foundation Symposium 238. Ed. by John Wiley & Sons, LTD, Chichester, England 2001; pp: 106-124.
26. [Ward R](#). Mechanisms of protection against rotavirus infection and disease. [Pediatr Infect Dis J](#). 2009 Mar; 28 (3 Suppl):S57-9.
27. Jaimes MC, Rojas OL, González AM, Cajiao I, Charpillienne A, Pothier P, “et al”. Frequencies of virus-specific CD4+ and CD8+ lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. *J Virol* 2002; 76:4741-4749.
28. Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME., Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin a antibodies. *Proc Nat. Acad Sci USA*; 1992; 89:6901-6905
29. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Pérez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis* 1996; 174:S65-72.

30. Clark HF, Offit PA, Ellis RW, Eiden JJ, Krah D, Shaw AR, Pichichero M, "et al". The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis* 1996; 174:S73-80.
31. Flores J, Pérez-Schael I, Boeggeman E, "et al". Genetic relatedness among human rotaviruses. *J med Virol* 1985; 17:135-143.
32. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, et. Al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med*. 2006 Jan 5; 354(1):23-33.
33. Censos Nacionales, 2005. VIII Censo de la Población y IV de Vivienda. Nicaragua, octubre 2006.
34. Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. [Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses.](#) *J Clin Virol*. 2004 Dec; 31(4):259-65.
35. Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006 Feb;12(2):304-6.
36. Carvalho F, et al. Rotavirus Genotype Distribution after Vaccine Introduction, Rio de Janeiro, Brazil. January 2009. Vol. 15, No. 1.
37. Pastora Linares, Johana. Estudio clínico epidemiológico de las infecciones por Rotavirus en Niños menores de 5 años con Diarrea Aguda atendidos en la unidades de salud de la ciudad de León Febrero 2000- Marzo 2001. UNAN LEON
38. Espinoza F, Paniagua M, Hallander H, Svensson L, and Strannegard O. Rotavirus – infection in Young Nicaraguan Children *Pediatr Infect Dis J*. 1997; 16(6): 564-71.
39. Uhnooll I, W. G. Svensson L, et al. Aetiology and epidemiology of acute gastroenteritis in Swedish Children. *J. Inft Dis*, 1986. 13: p. 73-89.
40. Bucardo, Filemón. Caracterización molecular de Rotavirus del grupo A en muestras de niños hospitalizados con diarrea severa. León Nicargua. 2003.
41. Clark HF, O. P., Glass RI and Ward RL. 2004. Rotavirus Vaccines. In: Plotkin S, Orenstein W, eds. *Vaccines*. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2004:1327-1345



# ***Anexos***

ANEXO 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA (UNAN) -LEON  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
Estudio Ecología Viral - Jinotega 2010

Fecha de la toma de muestra \_\_/\_\_/\_\_\_\_/

Código campo \_\_/\_\_/ JINOTEGA.

Código de laboratorio (identificador): /\_/\_/\_/

**DATOS GENERALES.**

Nombres y Apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento: \_\_/\_\_/\_\_/ Sexo: M\_\_ F\_\_

Edad (Años) /\_/ meses: /\_/ peso (Kg):/\_\_\_\_\_/

Procedencia: Urbana/\_\_/ Rural /\_\_/

Dirección: \_\_\_\_\_

Localidad \_\_\_\_\_

**DATOS CLINICOS Y EPIDEMIOLOGICOS:**

Fecha de inicio de Diarrea/\_\_/\_\_/\_\_/ Evacuaciones en la últimas 24 hrs: /\_\_/

Características de las Heces: Liquida/\_\_/ semiformada: /\_\_/

**Signos y Síntomas asociados:** Nauseas./\_\_/ Vómito/\_\_/ Fiebre ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ):/\_\_/ Pérdida de

Apetito /\_\_/ Calambre Abdominal /\_\_/ Distensión Abdominal/\_\_/

**Clasificación de la Diarrea y Manejo de la deshidratación:**

Leve: /\_\_/ Moderado: /\_\_/ Severo: /\_\_/ Rehidratación Plan A: /\_\_/ B: /\_\_/ C: /\_\_/

**Niños menor de 2 años recibiendo pecho materno:** SI: /\_\_/ Exclusivo: /\_\_/ Mixto: /\_\_/

Frecuencia en el día: /\_\_/

NO: /\_\_/

**En el hogar algún familiar del enfermo ha tenido Diarrea en los últimos 4 días?**

SI: /\_\_/ NO: /\_\_/; en respuesta si, pregunte parentesco: /\_\_\_\_\_/

**Tratamiento Antibiótico:** Si /\_\_/ NO /\_\_/; **en caso de respuesta si complete lo siguiente**

Tipo TMSulfa: /\_\_/ Amoxicilina: /\_\_/ Ampicilina: /\_\_/ otros: /\_\_\_\_\_ /

Tiempo total de tratamiento: /\_\_\_\_\_/ Días.

**Tratamiento antiparasitario:** /\_\_\_\_\_ /

**Tratamiento Medicina Natural:** /\_\_\_\_\_ /

**Vacunas de ROTA:** Si: /\_\_/ Dosis /\_\_\_\_\_ /

No: /\_\_/

**OBSERVACIONES (Datos del BPCD)**

---

---

---

**RESULTADOS DE LABORATORIO:**

**Rotavirus**

**ELISA : POSITIVO: /\_\_/ NEGATIVO: /\_\_/**

**Absorbancia /\_\_\_\_\_ nm/**

**RT- PCR: Positivo: /\_\_/ Negativo /\_\_/**

**Genoprupo: \_\_\_\_\_**

**Firma del encuestador:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_

## ANEXO 2

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA  
UNAN-LEON  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
ESTUDIO DE ROTAVIRUS- JINOTEGA 2010.**

Código de laboratorio (identificador): /\_/\_/\_/\_/

### CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Mediante la firma de este documento, YO, \_\_\_\_\_

Doy mi consentimiento voluntariamente para donar una muestra de heces de mi hijo (a) y ser entrevistado por personal de salud colaboradora del estudio de DIARREA 2010; que se desarrolla en el departamento de Microbiología de la UNAN- LEON. Yo entiendo que la entrevista está relacionada con la sintomatología clínica, así como, con las características epidemiológicas de la enfermedad diarreica aguda.

Yo entiendo que fui elegido para participar en este estudio como porque mi hijo presenta la sintomatología clínica de la enfermedad diarreica aguda y la donación de una muestra de heces contribuirá al entendimiento del comportamiento clínico, epidemiológico y fisiopatológico de los principales microorganismos que causan la DIARREA en Nicaragua, así como , al establecimiento de mejores metodología de diagnostico y tipificación Molecular, lo cual permitirá en el futuro el fortalecimiento de los programas de prevención de las enfermedades diarreicas agudas.

Se me ha informado que los responsables de este estudio no están obligados a cubrir los costos médicos de esta enfermedad y que los resultados de los análisis del laboratorio me serán proporcionados por el personal de salud que colaboran con este estudio en el caso de que yo lo solicitara y que puedo solicitar información adicional en el Departamento de Microbiología de la UNAN-LEON. CON EL Dr. Filemón Bucardo (Tel: 2311 2000 ext. 2078).

He concedido libremente una muestra de heces y esta entrevista al colaborador de este estudio. Se me ha notificado que es totalmente voluntario y que aun después de iniciado puedo rehusarme a responder cualquier pregunta o decidir darla por terminado en cualquier momento. Se me ha dicho que las respuestas a las preguntas no serán reveladas a nadie y que en ningún informe de este estudio se me identificara jamás en forma alguna.

Firma del entrevistado \_\_\_\_\_ fecha \_/\_/\_

Firma del entrevistador \_\_\_\_\_ fecha \_/\_/\_

## ANEXO 3

### **Procedimiento para la identificación de Rotavirus en muestras de heces**

Añada 1ml de diluyente de muestras a un recipiente adecuadamente etiquetado y utilízelo para preparar una dilución o suspensión al 10% de muestras fecales añadiendo aproximadamente 0,1g de sólidas (porción pequeña del tamaño de un guisante) aproximadamente 100pl de heces líquidas empleando pipetas de transferencia. Mezcle bien y deje la pipeta de transferencia en el recipiente para su uso posterior.

Haga girar los hisopos rectales en 1ml de diluyente de muestras mientras aprieta el hisopo contra el lateral del recipiente a fin de liberar la materia fecal. Mezcle bien.

Las suspensiones fecales conservadas previamente en formalina deben diluirse más en diluyente de muestras de ProSpecT Rotavirus para preparar una suspensión al 10% de heces antes del análisis.

Las muestras suspendidas/diluidas en el diluyente de muestras del ensayo ProSpecT Rotavirus pueden almacenarse a 2-8 °C durante un máximo de 8 días antes de su análisis.

NOTA: Las muestras fecales preparadas en los diluyentes de muestras de los ensayos ProSpecT Astrovirus, ProSpecT Adenovirus y ProSpecT Norovirus también pueden analizarse con la prueba ProSpecT Rotavirus. No se ha validado el uso de otros diluyentes de muestras.

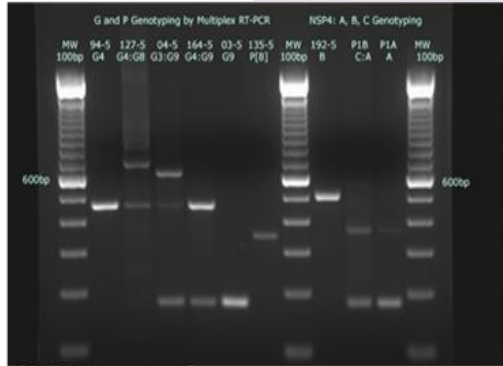
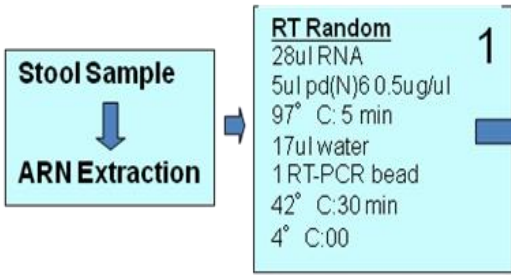
## Procedimiento

1. Abra la bolsa de papel de aluminio, extraiga el número requerido de tiras de microplaca y colóquelas en un soporte de tiras de microplaca. Utilice un pocillo para el control negativo y un pocillo para el control positivo. Si va utilizar menos del pocillo, separe el número requerido de pocillos de una tira y vuelva a poner los pocillos no utilizados en la bolsa de papel de aluminio con desecante. VUELVA A CERRAR BIEN LA BOLSA PARA EVITAR LA ENTRADA DE HUMEDAD Y ALMACENELA A 2-8 °C
2. Añada 2 gotas (o 100  $\mu\text{l}$ ) de cada muestra diluida, control negativo o control positivo a micropocillos distintos. Cada tanda analítica debe incluir al menos un control negativo y un control positivo.
3. Tras añadir todas las muestras y controles, añada 2 gotas (o 100  $\mu\text{l}$ ) de conjugado a cada micropocillo.
4. Cubra la placa e incube los micropocillos a 20-30 °C durante 60 +/- 5 minutos
5. Vacíe los pocillos mediante agitación o aspiración. Lave todos los pocillos llenándolos por completo con tampón de lavado diluido ( $\sim 350\text{-}400 \mu\text{l}$  por pocillo). Después de cada lavado, extraiga todo el líquido de los pocillos mediante agitación o aspiración. Lleve a cabo 5 lavados. Tras el lavado final, extraiga el contenido de la placa golpeándola suavemente contra toallitas de papel limpias o mediante aspiración. Si se está utilizando un lavador automatizado, éste debe programarse para que lleve a cabo 5 ciclos de lavado. Los lavadores deben calibrarse correctamente para asegurar un completo llenado y vaciado de los micropocillos entre un lavado y otro. Tras el lavado final, coloque la placa boca abajo y golpéela

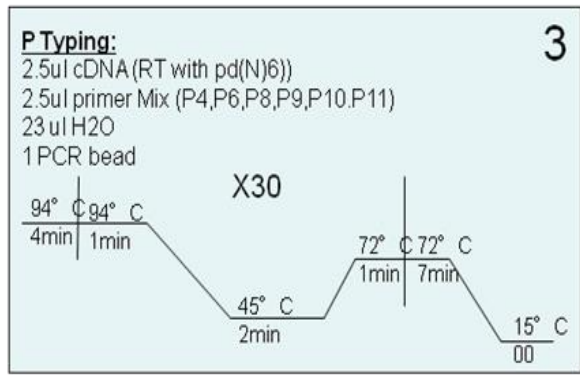
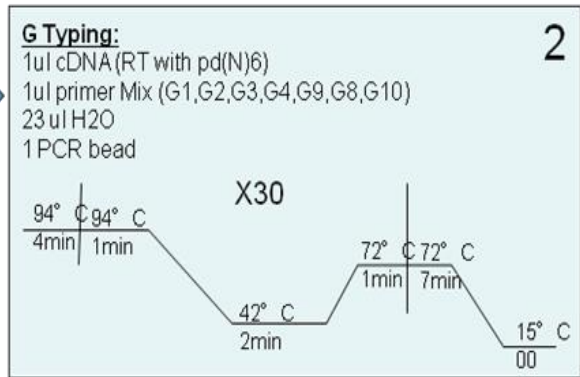
suavemente sobre papel absorbente a fin de eliminar los últimos restos de tampón de lavado.

6. Añada 2 gotas (o 100  $\mu\text{l}$ ) de sustrato a cada micropocillo.
7. Cubra la placa e incube los micropocillos a 20-30 °C durante 10 minutos.
8. Los micropocillos pueden leerse visualmente inmediatamente después de la segunda incubación (consulte las secciones 9 y 10).
9. También puede detener la reacción con el sustrato añadiendo 2 gotas (o 100  $\mu\text{l}$ ) de solución de parada a cada micropocillo. Asegure una mezcla homogénea en los micropocillos antes de leer los resultados. El producto coloreado es estable durante un máximo 30 minutos tras la adición de la solución de parada.
10. Lea la absorbancia espectrofotométricamente a 450nm (consulte las secciones 9 y 10)

ROTAVIRUS GENOTYPING



Primer	Amplicon (bp)
<b>G-typing (a)</b>	
1st round	
VP7-F	
VP7-R	1st round
	Con-3
	876
2nd round	
G1	2nd round
G2	P[4]
G3	P[6]
G4	P[8]
G8	P[9]
G9	P[10]
G10	P[11]
VP7-R	Con-3
	312
<b>P-typing (b)</b>	
	...



Single locus PCR es carried out with Gouvea Primers