



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA-LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.
CARRERA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO.



Monografía para optar a título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico:

Ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección de virus gastrointestinales en muestras diarreicas de niños menores de 5 años.

Autoras:

- ❖ Br. María José de los Ángeles Poveda Arvizú.
- ❖ Br. Dina Gabriela Sequeira Pérez.
- ❖ Br. Cyntia Valeria Pérez Morales.

Tutor:

- ❖ MSc. Fredman González Hernández.
Dpto. Microbiología y Parasitología
Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León

15 Noviembre 2023

¡Todas y todos juntos vamos adelante!



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA-LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.

CARRERA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO.



Monografía para optar a título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico:

Ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección de virus gastrointestinales en muestras diarreicas de niños menores de 5 años.

Autoras:

- ❖ Br. María José de los Ángeles Poveda Arvizú.
- ❖ Br. Dina Gabriela Sequeira Pérez.
- ❖ Br. Cyntia Valeria Pérez Morales.

Tutor:

- ❖ MSc. Fredman González Hernández.
Dpto. Microbiología y Parasitología
Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León

Octubre 2023

¡A la Libertad por la Universidad!



Índice

Abreviaciones:	1
Introducción	2
Antecedentes	4
Planteamiento del problema	7
Justificación	8
Objetivos	9
Objetivo general.....	9
Objetivo específico:.....	9
Marco teórico	10
Epidemiología	10
Norovirus.....	10
Rotavirus:.....	12
Sapovirus	14
Astrovirus	15
Reacción en cadena de la polimerasa PCR	16
Secuenciación de ADN y el advenimiento de la PCR	18
Análisis de productos PCR – Southern Blotting	18
PCR en tiempo real.....	19
PCR múltiple	20
Diseño de cebadores para PCR multiplex.....	21
Temperatura de annealing (Ta):	22
ADN Polimerasa	23
Descripción del Ensayo y Resultados de la Optimización Extracción:	23
Etiología viral de la diarrea	25
Causas	26
Diseño Metodológico	27
1. Tipo de estudio:	27
2. Área de estudio:.....	27
3. Unidad de análisis:	27
4. Recolección y procesamiento de la muestra:	28
5. Consideraciones éticas:	34
Resultados	35



Características sociodemográficas y clínicas	35
La duración de los síntomas clínicos	37
Detección de virus gastrointestinales en las muestras diarreicas:	38
Características demográficas según etiología viral detectada	40
Características clínicas según etiología viral detectada:	42
Coinfecciones:.....	43
Discusión	44
Conclusión	47
Recomendaciones	48
Bibliografía	49
Anexos	53
Operacionalización de las variables:	53
Encuesta	55



Dedicatoria

Podríamos describir tantos sucesos que vivimos a lo largo de todo este tiempo, y las veces que Dios estuvo ahí para hacernos saber que no estábamos solas. Es por eso que este estudio se lo dedicamos ante todo a Dios quién es el responsable de nuestra existencia y que a pesar de que somos un individuo imperfecto, nos ama y siempre está con nosotras.

A nuestra familia principalmente a nuestros padres, José Manuel y Karla, Ruth y Eddy, Delia y Adrián que han sido esa pieza fundamental en este camino de aventuras, propósitos y metas, por su inquebrantable apoyo, amor y sacrificio a lo largo de este camino. A nuestros hermanos y a cada una de esas personas que creyeron en nuestras capacidades y nunca dudaron que lo podíamos lograr, a los que nos apoyaron y estuvieron presentes en los momentos buenos y en los no tan agradables.

Así mismo nos dedicamos este estudio a nosotras que a lo largo de este arduo y apasionante viaje, ha sido un camino lleno de desafíos, descubrimientos y crecimiento personal. Cada página escrita es un testimonio de nuestra dedicación, perseverancia y amor por el conocimiento.

A través de las noches en vela, los momentos de duda y la constante búsqueda de respuestas, hemos encontrado fortaleza en nuestra propia determinación. Esta tesis es un recordatorio de que, a pesar de los obstáculos, podemos alcanzar nuevas alturas y seguir aprendiendo.

Que este logro sea un punto de partida para futuras aventuras y un tributo a la pasión y la curiosidad que nos impulsen a seguir explorando el mundo del conocimiento.

Cyntia Pérez, Dina Sequeira y María José Poveda.



Agradecimiento

- ❖ Agradecemos a Dios que es quien nos ayudó en todo este proceso, el cual no ha sido nada fácil, en medio de debilidades, enfermedades, tristezas y decepciones él nos fortalece con su presencia en nuestras vidas, nos daba cada día fé y esperanzas de saber que llegaríamos hasta el final. Hoy nos sentimos contentas y agradecidas con nuestro padre celestial quien es nuestro amparo, fortaleza y nuestro pronto auxilio en medio de las tribulaciones.
- ❖ Agradecemos a nuestros padres quienes han sido un pilar fundamental y nuestro deseo de superación ya que siempre estuvieron para nosotras en cada paso, nos impulsaron y nos brindaron su apoyo cada día para que llegásemos hasta el final de esta etapa. Agradecemos a nuestros hermanos, amistades, maestros, licenciados y colegas que han sido parte de nuestra formación a lo largo de los años creyendo en nuestras capacidades y que en los momentos que necesitamos su ayuda siempre estuvieron ahí.
- ❖ Agradecemos a nuestro tutor MSc, Fredman González quien ha sido parte de nuestra formación desde el día uno que llegamos a la universidad que con amor y paciencia nos ha guiado hasta este último momento. Ha sido una fuente invaluable de conocimiento y motivación a lo largo de los años. Podríamos describir tantas cosas que aprendimos de él, pero en pocas palabras podemos decir que sus valores, carácter, inteligencia, su alegría, entusiasmo y su capacidad de hacernos ver las cosas de otra perspectiva y siempre encontrar lo positivo y lo relevante a todo; son las características que nos ayudaron a llegar hasta este momento donde siempre recordaremos la pasión y devoción de sus enseñanzas.



Resumen

“Ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección de virus gastrointestinales en muestras diarreicas de niños menores de 5 años.”

Br. María José de los Ángeles Poveda Arvizú. Br. Dina Gabriela Sequeira Pérez. Br. Cyntia Valeria Pérez Morales. Tutor: MSc. Fredman González Hernández. Facultad de Ciencias Médicas UNAN-León departamento de microbiología y parasitología, carrera de Bioanálisis Clínico.

Introducción: Como una de las principales causas de gastroenteritis viral se destacan los rotavirus, norovirus, Astrovirus y Sapovirus. (1) Existen diferentes metodologías para la detección de virus gastrointestinales, sin embargo, no todas tienen un nivel de especificidad y sensibilidad alto y muchas veces solo pueden detectar la presencia de un único patógeno a la vez, en cambio los ensayos de PCR pueden ser múltiples y con una misma muestra podemos detectar diferentes virus que causan diarrea en una sola reacción.

Objetivos: Objetivo general: Aplicar un PCR multiplex en tiempo real para la detección de virus gastrointestinales en episodios diarreicos de niños menores de 5 años del sector de salud Perla María Norori. Objetivo específico: 1-Describir las características clínicas y demográficas de los casos de diarrea de la población en estudio. 2-Detectar la presencia de los virus gastrointestinales en muestras diarreicas en niños de la ciudad de León. 3-Asociar la etiología viral detectada a las características clínicas y demográficas de la población en estudio.

Metodología: Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, en el sector de salud Perla María Norori, donde se desarrolló en las instalaciones del laboratorio del centro de investigación de enfermedades infecciosas (CEI) en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-León, e incluyó muestras diarreicas de los proyectos de investigación que se ejecutan en el CEI.

Resultados: mostramos la utilidad del Ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección de virus gastrointestinales en muestras diarreicas de niños menores de 5 años. Un total de 301 muestras fueron analizadas para la detección de virus



gastrointestinales, el 55% fueron varones y la edad más prevalente fue el rango de 0-5 meses con 118 niños que representan el 39%. La frecuencia de los signos y síntomas clínicos como diarrea fue del 100% ya que fue considerado como criterio de inclusión, fiebre fue reportado en el 37% (n=110) de los niños y 55 niños sufrieron vómito (18%). N = 87 (29%) fueron positivas para virus gastrointestinales, en las cuales se logró determinar un total de 102 virus, habiendo presencia de coinfecciones en 14 de las 87 muestras diarreicas. La etiología de los virus detectados utilizando el PCR multiplex en tiempo real se muestra Rotavirus y Norovirus los más frecuentes. 14 niños mostraron coinfecciones virales con un total de 28 virus detectados por PCR múltiple en tiempo real.



Abreviaciones:

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

PCR: Reacción en cadena polimerasa

GA: Gastroenteritis aguda.

GEA: Gastroenteritis aguda.

NoV: Norovirus

µl: Microlitro

e.q: Equivalente

pmol: Pico mol

ADNc: ADN complementario

mPCR: PCR multiplex

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico

Fc: Fragmento cristizable

Fab: Fragmento de unión del anticuerpo

dNTP: Nucleótidos que sirven para generar las nuevas cadenas de ADN

RT: Transcripción Reversa.

Pb: Pares de bases.



Introducción

Según la Organización mundial de la salud (OMS) Las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, se estima que existen alrededor de 1700 millones de casos de diarrea infantil, de los cuales 525,000 mueren anualmente. (2) Como una de las principales causas de gastroenteritis viral se destacan los rotavirus, norovirus, astrovirus y sapovirus. (1)

Estos virus pueden causar infecciones esporádicas como epidémicas a nivel mundial, siendo de mayor influencia Norovirus causando más de un millón de hospitalizaciones y 200 mil muertes. (3) Con los rotavirus se reconocen tres grupos distintos (A, B y C), siendo el grupo A la primera causa de diarrea a nivel mundial y ocasionando alrededor de 600.000 defunciones al año. Los Astrovirus existen hasta la fecha 8 serotipos descritos siendo el 1 el más abundante y el 7 el menos frecuente. (4)

Las principales sintomatologías clínicas de estos virus originan infecciones intestinales que incluye la presencia de diarrea acuosa, calambres estomacales, náuseas o vómitos y a veces fiebre, la deshidratación grave y la pérdida de líquidos son las principales causas de muerte por diarrea (2) afectando a una persona o a un grupo de personas que hayan ingerido los gérmenes que logran tener diferentes vías de entrada a su organismo como directamente del alimento, agua o por medio de objetos (5) siendo el grupo más afectado los niños en edades escolares quienes mayormente lo transmiten a los adultos.

Las técnicas moleculares han revolucionado el diagnóstico microbiológico y a pesar de su elevado coste, representan una interesante alternativa a los métodos convencionales debido a su rapidez y a su elevada sensibilidad y especificidad.

Una forma rápida y muy precisa de diagnosticar ciertas enfermedades infecciosas, cambios genéticos o encontrar signos de una enfermedad en las fases más tempranas de la infección como trabajadores de la salud utilizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ya que los anticuerpos son proteínas que el sistema



inmunitario produce para atacar a sustancias extrañas como los virus y las bacterias, con estas pruebas de PCR pueden detectar una enfermedad cuando hay sólo una cantidad muy pequeña de patógenos en su cuerpo. (6)

En los últimos años, el PCR en tiempo real ha surgido como un método altamente reproducible y sensible para la detección de virus, probando ser más sensible que los métodos utilizados como el microscopio electrónico y el PCR convencional. (3) Por tanto, se reproduce in vitro el proceso fisiológico de la duplicación del ADN en las células, amplificando exponencialmente una secuencia específica de ADN bicatenario. (7)

El presente estudio pretende aplicar un ensayo de PCR en tiempo real que esté disponible en el departamento de microbiología y parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-LEÓN, para la detección de la etiología viral causante de diarrea en niños menores de 5 años de la ciudad de León, caracterizando sus sintomatologías clínicas, edades prevalentes y sus episodios de diarrea.



Antecedentes

Las gastroenteritis agudas (GA) constituyen un problema de salud importante, pudiendo estar causadas por bacterias, parásitos y virus enteropatógenos, entre los que se han reconocido hasta la actualidad son norovirus, rotavirus, astrovirus, adenovirus y calicivirus. (4) (8)

Las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años ocasionando 525,000 defunciones de niños cada año. En el pasado, la deshidratación grave y la pérdida de líquidos eran las principales causas de muerte por diarrea. (2)

La frecuencia de rotavirus como causa de casos esporádicos de GA oscila entre el 17,3% y el 37,4% La frecuencia de rotavirus como causa de casos esporádicos de GA oscila entre el 17,3% obtenido en un estudio realizado en Francia y el 37,4% obtenido en Indonesia. Los Astrovirus humanos también son una causa importante de gastroenteritis aguda (AGE) en todo el mundo y se detectan en entre el 2% y el 9% de todos los casos de AGE en niños menores de 3 años (9)

De acuerdo a datos internacionales, norovirus (NoV) es uno de los agentes etiológicos más importantes de diarreas. Dentro de los genotipos de NoV más infectivos se encuentra GII-4, el cual ha sido la causa predominante de las grandes epidemias de gastroenteritis aguda en muchos países desde mediados de la década de 1990, y el brote de epidemias por GII-44 ha aumentado en los últimos años. En general, se estima que el genotipo GII-4 es el responsable de 60 a 80 % de todos los brotes de gastroenteritis asociados a NoV en todo el mundo. (10)

En el trabajo de Bok y colaboradores (2009), se reporta que la primera cepa documentada de NoV GII.4 fue en 1987, en Washington, D.C., cuando se comenzaron a utilizar los métodos moleculares. Sin embargo, en el estudio que realizaron, analizaron por RT-qPCR, muestras de heces de niños entre los años 1974 y 1991 de un hospital infantil de Washington. Encontraron que el genotipo de



NoV GII.4 ha estado circulando por más de tres décadas, ya que encontraron estas cepas en muestras desde 1974. (3)

En España - Cataluña, las gastroenteritis en general y en especial las vehiculadas por alimentos constituyen uno de los procesos más frecuentes en la población catalana. Durante el año 2004 se declararon 291.035 casos de enteritis y diarreas, lo que supone una tasa de incidencia del 4.575 por 100 mil habitantes. (11)

En un estudio descriptivo de corte transversal donde participaron 345 niños ≤ 5 años de edad que se presentaron con diarrea aguda entre el 2009 y 2010 (12) a las salas de emergencia de los hospitales HEODRA y Victoria Mota de León y Jinotega, respectivamente, así como a los puestos de Salud de los repartos Rubén Darío y Antenor Sandino de León. La prevalencia global de NoV en este estudio fue del 22%, casi el doble de lo reportado en el 2005 (12%). Puede que este incremento se deba al efecto de la vacunación, es decir la prevalencia de NoV aumentó a expensas de la presión inmunológica ejercida por la vacuna anti-RV, sin embargo, el método utilizado en este estudio es más sensible que el utilizado en el 2005. (12)

Un dato relevante reportado es que NoV fue encontrado en el 40% de los niños < 6 meses de edad que recibieron lactancia materna exclusiva y en el 31% de los niños que contaban con una sola dosis de la vacuna anti-RV. NoV GII fue el genogrupo más común con el 90% seguido por GI con 9% y un caso de coinfección con ambos genogrupos. (12)

Según datos de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) en Estados Unidos, en el periodo de septiembre de 2013 a mayo de 2014, se registró que 58 % de los brotes de gastroenteritis fueron causados por NoV GII.4, también denominado Sydney. Otros genogrupos en orden de prevalencia fueron GI.3 con el 16 %, y GII.13 con el 5 %.

En un estudio de cohorte de nacimientos en varios países, describieron la infección por rotavirus en los primeros 2 años de vida en sitios con y sin programas de vacunación contra rotavirus. (13) Un total de 1737 niños contribuyeron con 22646 muestras de vigilancia y 7440 muestras diarreicas. En general, se detectó rotavirus



en el 5,5% (408/7440) de las heces diarreicas, y 344 (19,8%) niños alguna vez tuvieron gastroenteritis por rotavirus. El hacinamiento en los hogares y una alta carga de patógenos fueron factores de riesgo constantes de infección y enfermedad. Tres infecciones previas confirieron una protección del 74 % ($p < 0,001$) contra infecciones posteriores en sitios que no utilizaron la vacuna. (13)

Se observaron infecciones repetidas o múltiples basadas en pruebas de heces en solo 178 (10%) niños (13)

En el estudio de Epidemiología de la gastroenteritis pediátrica por astrovirus en una cohorte de nacimiento nicaragüense se evaluaron la incidencia, los factores de riesgo, las características clínicas, los genotipos, las coinfecciones virales y la estacionalidad de la gastroenteritis por astrovirus en 443 niños nicaragüenses sanos nacidos en 2017-2018, seguidos durante 36 meses. (14)

Del total de 1708 muestras analizadas, ochenta niños (18%) experimentaron al menos 1 episodio de astrovirus y 9 experimentaron episodios repetidos, principalmente durante la temporada de lluvias (mayo-octubre). La incidencia de episodios de astrovirus fue de 7,8/100 niños-año (9)



Planteamiento del problema

¿Cuál es la etiología viral causante de infecciones gastrointestinales utilizando un ensayo de PCR multiplex en tiempo real en muestras diarreicas de niños menores de cinco años de la población de León?



Justificación

La gastroenteritis aguda es una de las principales causas de morbimortalidad infantil. De acuerdo con datos de la OMS se reportan alrededor de 1.4 millones de muertes anuales por gastroenteritis viral esencialmente en países bajos y de medianos ingresos, permanece entre las 5 causas de mortalidad en menores de cinco años siendo los más afectados. (12) En la región de Latinoamérica y el caribe ocurren 15,000 muertes anuales, 75,000 hospitalizaciones (15)

El factor principal de estos virus es que su fuente de contaminación son las aguas que a su vez contaminan alimentos con la persistencia en el medio ambiente hacen que estos virus con una pequeña carga viral alrededor de 10 partículas puedan causar infección, aunque varíen según la cepa y el estado inmunológico de cada paciente con gastroenteritis aguda.

Existen diferentes metodologías para la detección de virus gastrointestinales, sin embargo, no todas tienen un nivel de especificidad y sensibilidad alto y muchas veces solo pueden detectar la presencia de un único patógeno a la vez, en cambio los ensayos de PCR pueden ser múltiples y con una misma muestra podemos detectar diferentes virus que causan diarrea en una sola reacción.

El presente estudio ayudará a conocer la etiología de los virus que afectan a niños menores de 5 años, en particular, se enfocará en describir las características clínicas y epidemiológicas asociadas con los virus gastrointestinales. Además, se buscará identificar el momento del año en el que los niños son más propensos a contraer estas infecciones y analizar el período de incubación de estos virus quedando disponible en el departamento de microbiología y parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, para un diagnóstico certero en estudios epidemiológicos moleculares que contribuyan en nuestro país, siendo un documento de referencia para posibles investigaciones que quieran realizar estudios gastrointestinales.



Objetivos

Objetivo general

Aplicar un PCR multiplex en tiempo real para la detección de virus gastrointestinales en episodios diarreicos de niños menores de 5 años del sector de salud Perla María Norori.

Objetivo específico:

- 1- Describir las características clínicas y demográficas de los casos de diarrea de la población en estudio.
- 2- Detectar la presencia de los virus gastrointestinales en muestras diarreicas en niños de la ciudad de León.
- 3- Asociar la etiología viral detectada a las características clínicas y demográficas de la población en estudio.



Marco teórico

Gastroenteritis es una inflamación y/o disfunción del intestino producida por virus, bacterias o parásitos, que da lugar a una alteración de su capacidad para regular la absorción y secreción de sales y agua, produciendo diarrea. (16)

Las gastroenteritis agudas se encuentran entre las enfermedades más frecuentes del ser humano, solamente superadas por las infecciones víricas respiratorias agudas. Entre los más comunes están los adenovirus, astrovirus, rotavirus, sapovirus y norovirus. (6)

Otros virus, tales como coronavirus, torovirus, picornavirus (virus Aichi) y picobirnavirus son también causa de diarrea, pero con menor trascendencia epidemiológica (7)

Epidemiología

Norovirus

Norovirus es reconocido como la causa principal de gastroenteritis aguda no bacteriana. En países en desarrollo, la infección por NoV causa aproximadamente 200,000 muertes al año en niños ≤ 5 años. (3)

Debido a su baja dosis infecciosa (~10 a 100 partículas) NoV es altamente contagioso, provocando así casos esporádicos donde los individuos están dispersos o grandes brotes de diarrea aguda donde las personas están agrupadas como en: hospitales, escuelas, universidades, lugares de camping, cruceros, hoteles, instituciones militares y restaurantes (12)

Se estima que cada año NoV causa 64,000 episodios de diarrea que requieren hospitalización y 900,000 visitas clínicas entre los niños en los países industrializados y hasta 218,000 muertes de niños < 5 años de edad en los países en desarrollo (12)

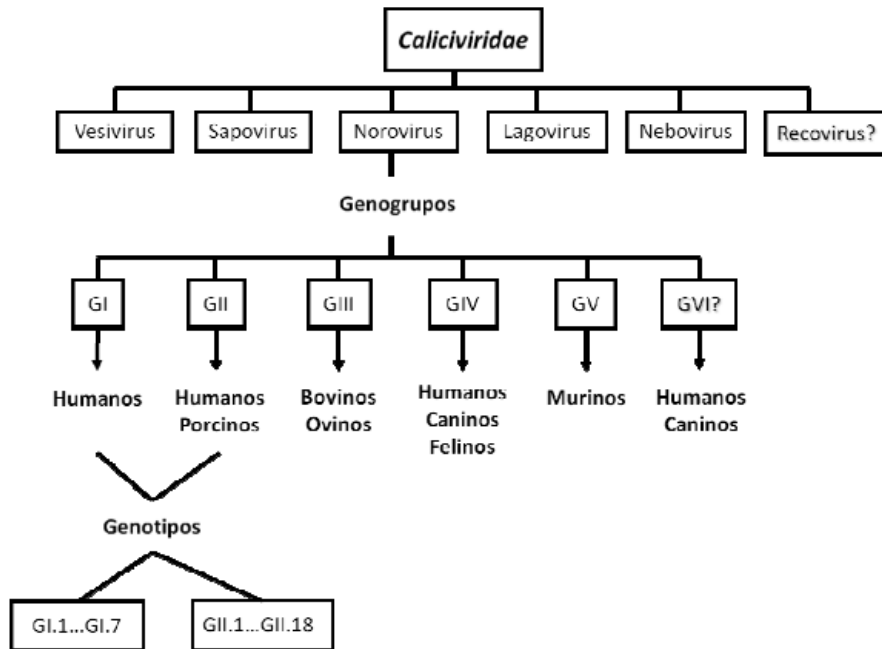


ILUSTRACIÓN 1 CLASIFICACIÓN DE LOS CALICIVIRUS SEGÚN EL ICTV. EN LA PARTE SUPERIOR LA FAMILIA CALICIVIRIDAE QUE SE DIVIDE EN 5 GÉNEROS. RECOVIRUS REPRESENTA UN SEXTO GÉNERO PROPUESTO RECIENTEMENTE PERO TODAVÍA NO ACEPTADO POR EL ICTV. EL GÉNERO NOROVIRUS SE HA DIVIDIDO EN SEIS GENOGRUPOS BASADO EN EL ANÁLISIS DE LA CÁPSIDE. LOS GENOGRUPOS SE HAN SUBDIVIDIDO EN GENOTIPOS, 7 EN GI Y 18 EN GII ACTUALMENTE.

NoV puede causar gastroenteritis aguda en personas de todas las edades. Las características clínicas incluyen náuseas, dolor abdominal, vómito y diarrea no sanguinolenta. Sin embargo, algunos pacientes pueden tener formas graves, con síntomas vinculados a náuseas y vómitos, seguidos por diarrea abundante, que puede resultar en deshidratación y ocasionalmente la muerte. (12)

También pueden estar asociados con la infección dolores de cuerpo y fiebre baja y por lo tanto el término "gripe estomacal" a menudo se utiliza para describir la enfermedad, aunque no hay ninguna asociación biológica con la gripe. (12) el nombre "enfermedad del vómito invernal" que se refiere a la epidemiología observada para la enfermedad causada por NoV, caracterizada por la aparición de vómitos y diarrea autolimitada que alcanzaba su punto máximo durante los meses más fríos. (17)



Por lo general, las personas presentan síntomas entre 12 y 48 horas después de haber estado expuestas a norovirus. La mayoría de las personas con la enfermedad por norovirus se recuperan en 1 a 3 días

Los síntomas de deshidratación incluyen:

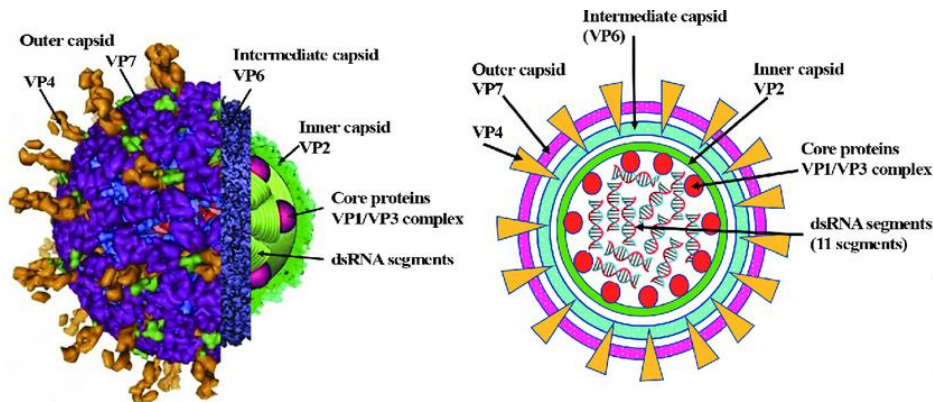
- Orinar menos
- Tener la boca y la garganta secas
- Sentirse mareado al estar de pie

Rotavirus:

El género rotavirus pertenece a la familia Reoviridae. Es un virus ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena, en 11 segmentos. Se han identificado siete grupos principales de rotavirus, denominados de la A a la G. Sin embargo, sólo los grupos A, B y C infectan a los seres humanos, siendo el grupo A el más importante. La partícula viral está compuesta de tres capas proteicas concéntricas alrededor del genoma y tiene forma de rueda.

La infección por rotavirus es responsable de alrededor de 600.000 muertes anuales y aproximadamente 40% de las hospitalizaciones por diarrea en menores de 5 años de edad en todo el mundo, lo que la convierte en la causa más importante de diarrea en este grupo de población. El rotavirus puede provocar desde una infección asintomática en menores de 3 meses, hasta una diarrea grave con deshidratación que puede ocasionar la muerte. Según los datos disponibles, en la Región de las Américas el rotavirus causa aproximadamente 75.000 hospitalizaciones y cerca de 15.000 muertes anuales.

Los rotavirus
(virus ARN,
familia
Reoviridae)
poseen al
menos cuatro
serotipos,
relacionados



con segmentos genómicos específicos, y dos subgrupos. Es responsable del 30-50% de las gastroenteritis agudas del niño y de más del 70% de las del lactante menor de 1 año. (18)

El rotavirus puede provocar desde una infección asintomática en menores de 3 meses, hasta una diarrea grave con deshidratación que puede ocasionar la muerte.

En países de clima templado las infecciones predominan en invierno, mientras que en los países tropicales los casos suelen ocurrir durante todo el año, aunque pueden registrarse picos más altos en invierno. (17)

El rotavirus se transmite principalmente por vía fecal-oral, pero también se puede transmitir a través de las manos, superficies y objetos sucios. Los excrementos de una persona infectada pueden contener más de 10 billones de partículas infecciosas por gramo. (19) al menos de 100 de estas partículas para infectar a otra persona. Los síntomas aparecen aproximadamente 2 días después de que la persona se exponga al virus.

Los vómitos y la diarrea líquida pueden durar entre 3 y 8 días. Otros posibles síntomas son pérdida de apetito y deshidratación (pérdida de líquidos corporales), lo que puede ser especialmente peligroso para los bebés y los niños pequeños.

Los síntomas de deshidratación incluyen:

- orinar menos,
- boca y garganta secas,
- llorar sin lágrimas o con pocas lágrimas, y



- somnolencia o irritación inhabitual.

Mecanismo de la infección:

La diarrea está causada por las múltiples actividades del virus. La malabsorción se debe a la destrucción de las células intestinales denominadas enterocitos. La proteína tóxica NSP4 del rotavirus interrumpe al transportador SGLT1 (proteína de transporte sodio-glucosa) que interviene en la reabsorción del agua, al parecer, reduce la actividad de las disacaridasas y, posiblemente, activa los iones de calcio dependientes de los reflejos de la secreción del sistema nervioso entérico. (20)

Los enterocitos sanos segregan lactasa en el intestino delgado; la intolerancia a la leche causada por una deficiencia de lactasa es un síntoma de la infección por rotavirus, una diarrea recurrente leve a menudo le sigue la reintroducción de la leche en la dieta del niño, debido a la fermentación bacteriana del disacárido lactosa en el intestino. (20)

Sapovirus

Las infecciones por sapovirus son responsables tanto de casos esporádicos como de brotes ocasionales de gastroenteritis aguda. Si bien todos los grupos de edad se ven afectados, los niños menores de cinco años tienen la mayor carga de enfermedad. Al compartir muchas similitudes con las norovirus estrechamente relacionados, los síntomas comunes de la gastroenteritis por sapovirus incluyen vómitos y diarrea, que generalmente se resuelven en una semana. (21)

La prevalencia del sapovirus varía entre el 1 y el 17% de los episodios de diarrea en todo el mundo, con la mayor carga en niños pequeños y adultos mayores. Además, los estudios epidemiológicos han utilizado enfoques novedosos para explicar la presencia de coinfecciones con otros patógenos entéricos; Un estudio de cohorte en múltiples sitios de niños menores de dos años encontró que el sapovirus tenía la segunda incidencia atribuible más alta entre todos los patógenos diarreicos estudiados. (21)



Astrovirus

Los astrovirus humanos son una causa importante de gastroenteritis aguda (AGE) en todo el mundo y se detectan en entre el 2% y el 9% de todos los casos de AGE en niños menores de 3 años (9)

Las infecciones suelen ser autolimitadas con 1 a 4 días de diarrea acuosa, fiebre y dolor abdominal y, en raras ocasiones, infección extra gastrointestinal y muerte en adultos y niños inmunocomprometidos (9)

El Astrovirus aparece frecuentemente como una coinfección con otros patógenos virales entéricos, especialmente rotavirus, norovirus y sapovirus.

Los astrovirus pueden infectar a individuos de todas las edades, pero en general infectan a lactantes y niños pequeños. En climas templados, la infección es más común en los meses de invierno y en las regiones tropicales, la infección es más común en los meses de verano. La transmisión se produce por la vía fecal-oral y la incubación es de 3 a 4 días.

La enfermedad atribuida a Astrovirus consiste, principalmente, en la instauración aguda de diarrea, malestar, cefalea, náuseas, vómitos e hipertermia leve. El cuadro clínico típico es autolimitado, con una duración de 1-5 días.

Los episodios pueden ser esporádicos o presentarse en forma de brotes. Se han descrito casos de diarrea prolongada asociada a eliminación fecal de virus; en un estudio reciente en Bangladesh, se detectaron astrovirus en el 15% de los cuadros de diarrea persistente estudiados. Clínicamente, la gastroenteritis por astrovirus es más leve que la producida por rotavirus, principalmente en cuanto a la menor duración de la diarrea y menor incidencia de fiebre y vómitos, lo que se traduce también en una mayor frecuencia de detección en pacientes ambulatorios que en los que precisan hospitalización. (14)

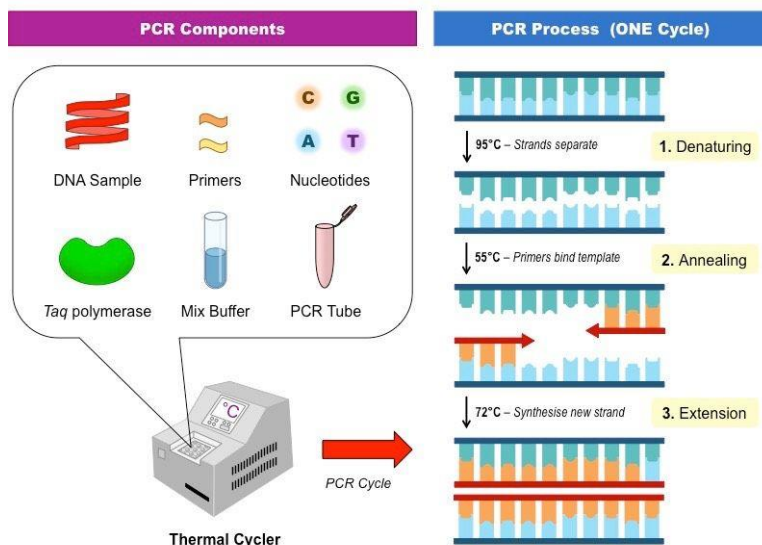
La necesidad de ingreso hospitalario en niños con gastroenteritis por astrovirus se ha cifrado en 1-2% de los pacientes atendidos por ese motivo. La mortalidad atribuible a esta enfermedad es prácticamente nula, aunque se ha comunicado algún caso aislado.

El periodo de incubación se ha establecido, según los datos de estudios en voluntarios adultos, en 3-4 días, aunque podría ser de 24-36 h según otros estudios. La enfermedad se manifiesta, sobre todo, en niños en los tres primeros años de edad, con una mayor frecuencia entre los seis y los 18 meses de vida.

La historia natural de la enfermedad es menos conocida que en el caso de rotavirus. Aunque se creía que la mayoría de infecciones por astrovirus eran sintomáticas los estudios de cohortes han demostrado hasta un 24-74% de infecciones asintomáticas.

Reacción en cadena de la polimerasa PCR

Uno de los descubrimientos más importantes de la historia que marcó el inicio de una nueva era en el estudio y conocimiento de los ácidos nucleicos fue el de Watson y Crick, al descifrar la estructura del ADN (ácido desoxirribonucleico). Desde entonces, varios grupos han mostrado un gran interés por desarrollar métodos sensibles y reproducibles que les permitan estandarizar protocolos experimentales para estudiar los ácidos nucleicos. (véase tabla 1)



Para la PCR estándar, todo lo que se necesita es una polimerasa de ADN,

ILUSTRACIÓN 2 LA TÉCNICA DE LA PCR (INTRODUCCIÓN Y PRINCIPIOS BÁSICOS) LABBOX ESPAÑA.

magnesio, nucleótidos (dNTPs), primers, la plantilla de ADN a amplificar y un termociclador.

El método utiliza un par de oligonucleótidos o cebadores sintéticos, cada uno de los cuales se hibrida con una hebra de una diana de ADN bicatenario (ADNbc), y el par abarca una región que se reproducirá exponencialmente. El cebador hibridado actúa como sustrato para una ADN polimerasa (más comúnmente derivada de la bacteria termófila *Thermus Aquaticus* y llamada Taq), que crea una cadena complementaria mediante la adición secuencial de desoxinucleótidos.

El mecanismo de PCR es tan simple como su propósito:

- El ADN de doble cadena se desnaturaliza por calor (desnaturalización)
- Los primers se alinean (hibridación) con las hebras individuales de ADN
- Los primers se extienden por la ADN polimerasa (elongación), lo que da como resultado dos copias de la hebra de ADN original.

La mayoría de las polimerasas de ADN que se utilizan para PCR funcionan mejor entre 68 y 72 °C. Por lo tanto, la temperatura de elongación elegida debe estar en este rango. Sin embargo, la enzima también se puede activar a menor temperatura. A temperaturas muy por debajo de la temperatura de alineamiento/hibridación, los primers tienden a unirse de forma no específica, lo que puede dar lugar a una amplificación inespecíficas (23)

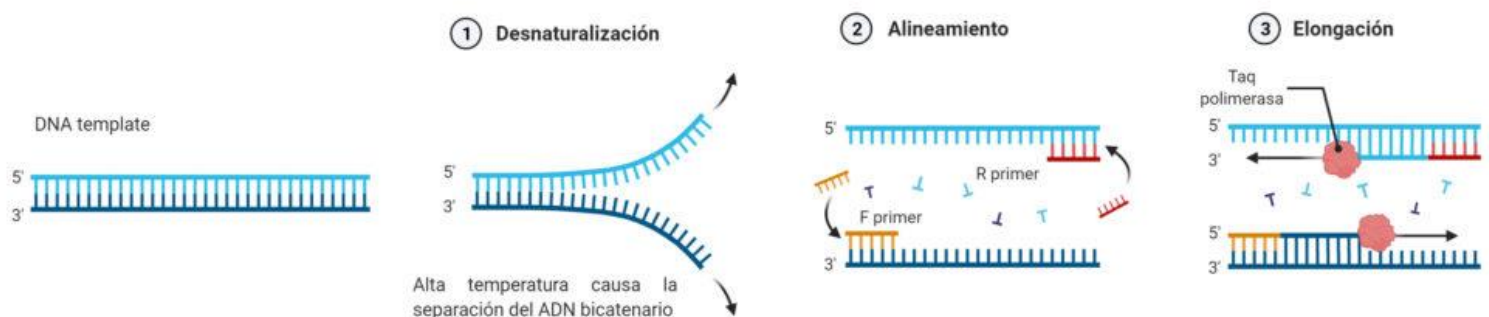


ILUSTRACIÓN 3 PROCESO DEL PCR (23)



Secuenciación de ADN y el advenimiento de la PCR

En el año 1977, Frederick Sanger identificó un método de secuenciación de ADN que involucraba una ADN polimerasa, un cebador y precursores de nucleótidos, por lo que recibió el Premio Nobel en 1980. Así, para el año 1980, todos los componentes para la amplificación por PCR estaban listos.

Sin embargo, no fue hasta 1983 que, en un esfuerzo por solucionar algunos problemas en su trabajo de investigación, Mullis utilizó el método de secuenciación del ADN de Sanger como base para idear una nueva técnica. Agregó un segundo cebador a la hebra opuesta y se dio cuenta de que el uso repetido de la ADN polimerasa desencadenaría una reacción en cadena que amplificaría un segmento específico de ADN, descubriendo así la tecnología PCR.

Análisis de productos PCR – Southern Blotting

Mullis continuó probando su idea, inicialmente sin ciclos térmicos pero luego con ciclos térmicos repetidos. En 1984, Mullis, junto con el equipo de análisis de mutaciones genéticas de Cetus, comenzó a trabajar en experimentos que muestran la capacidad de la PCR para amplificar el ADN genómico. Aunque inicialmente el producto de la amplificación no era evidente en la electroforesis en gel de agarosa, la transferencia Southern confirmó el aumento en la cantidad de los segmentos de ADN deseados. (22)

El ADN amplificado de la PCR fue clonado y secuenciado con éxito por los investigadores, quienes solicitaron una patente sobre la PCR y sus aplicaciones y obtuvieron la aprobación de la patente en 1987. Mientras tanto, el equipo usó la PCR para otras aplicaciones mediante el diseño de nuevos cebadores y sondas, lo

que hizo que la reacción más específica hasta que los resultados fueron evidentes en la electroforesis en gel de agarosa

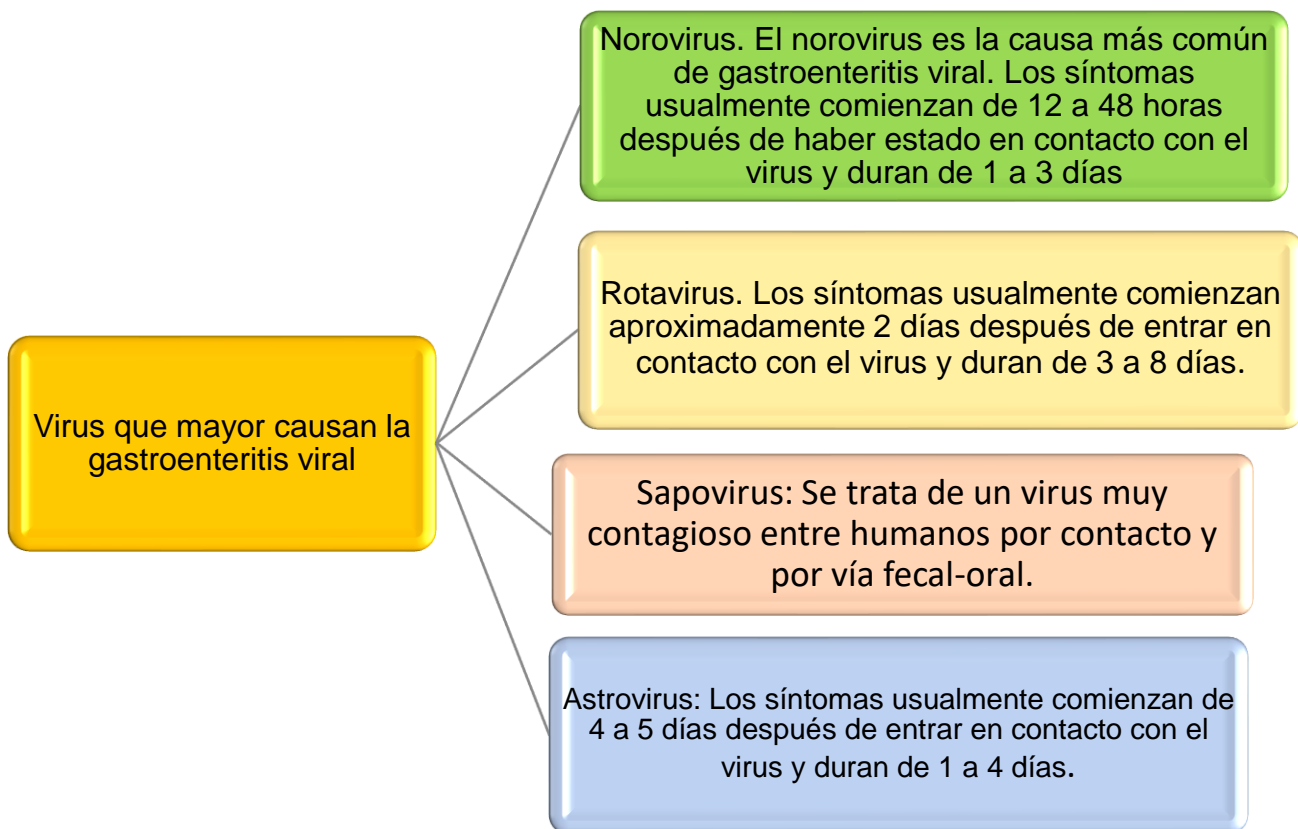


ILUSTRACIÓN 4 VIRUS QUE MAYORMENTE CAUSAN GASTROENTERITIS AGUDA.

PCR en tiempo real

Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores, en 1992, al videograbar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV.7

Desde entonces, el objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. (22)



El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente.

El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. (22)

Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. (22)

Tipos de PCR

PCR anidada.

PCR de extensión solapada (Mutagénesis)

PCR in situ.

PCR múltiple.

PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)

PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR,)

Variaciones de la PCR básica.

PCR múltiple

Desde su descripción en 1988 por Chamberlain y colaboradores con la finalidad de amplificar loci múltiples para el gen de la distrofia muscular en humanos, la mPCR ha sido aplicada en muchas áreas para el análisis simultáneo de marcadores múltiples incluyendo deleciones, mutaciones, polimorfismo, análisis cuantitativos por transcriptasa reversa y por RT-PCR



Con óptimos resultados ha sido empleada en análisis micro satelital, detección de organismos genéticamente modificados, detección de patógenos y tipificación de diferentes cepas. En el campo epidemiológico, su importancia crece por la factibilidad de aumentar en una sola reacción la detección simultánea de varios microorganismos aprovechando entre otros parámetros la similitud de cuadros clínicos.

Por su alta sensibilidad pueden presentarse contaminaciones producto de amplificaciones inespecíficas generando reacciones falsas positivas. En este sentido, son válidas y siempre vigentes medidas de control como la realización de cada fase de reacción en ambientes separados, utilización de tubos, pipetas y guantes estériles propios para cada área y limpieza y exposición a cada ambiente a radiaciones ultravioletas, alcohol y/o soluciones libres de RNasa. (22)

Asimismo, es conveniente recordar que por la susceptibilidad a errores de ejecución y de contaminaciones, es necesaria una formación especializada del personal que ejecutará el análisis.

Es también importante tener en cuenta que el procedimiento necesita en la medida que sea posible, realizarse en conjunción con otros métodos (directos, bioquímicos y/o inmunológicos, por ejemplo), situación que no pretende menospreciar la gran utilidad que puede tener una detección precoz de información genética -como la ejecución de medidas.

Diseño de cebadores para PCR multiplex:

Un requisito previo para el éxito de la PCR. Los cebadores para la PCR multiplex deben tener una longitud de 21 a 30 nucleótidos múltiplex es el diseño de pares de cebadores óptimos.

- a) Longitud del Cebador: Los cebadores usados para la reacción de amplificación varían entre 15 y 30pb; los cebadores más cortos pueden no



proporcionar la adecuada especificidad y los más largos no incrementan la especificidad y son más caros de sintetizar.

- b) b) Secuencia: La composición de nucleótidos de los cebadores utilizados en el protocolo de amplificación determina directamente la temperatura de hibridación.

Los cebadores para la PCR multiplex deben tener un contenido de GC del 40 al 60%. La probabilidad de que un cebador tenga más de un sitio de unión específico dentro de un genoma es significativamente menor para los cebadores más largos. Además, los cebadores más largos permiten la hibridación a temperaturas ligeramente más altas donde la actividad de la ADN Taq polimerasa es mayor.

Temperatura de annealing (Ta): La temperatura de fusión o de melting (T_m) de los cebadores utilizados para la PCR multiplex debe ser de al menos 60°C. Para obtener resultados óptimos se recomienda utilizar pares de cebadores con una T_m de ≥ 68 °C. Por encima de 68 °C, las diferencias en los valores de T_m de diferentes pares de cebadores no suelen afectar al rendimiento. La T_m se puede calcular utilizando la siguiente fórmula: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{número de [A+T]}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{número de [G+C]})$.

Si la temperatura de hibridación es demasiado alta, los cebadores de oligonucleótidos hibridan mal, si es que lo hacen, con la plantilla y el rendimiento de ADN amplificado es muy bajo. Si la temperatura de hibridación es demasiado baja, puede ocurrir la hibridación no específica de los cebadores, lo que resulta en la amplificación de segmentos de ADN no deseados.

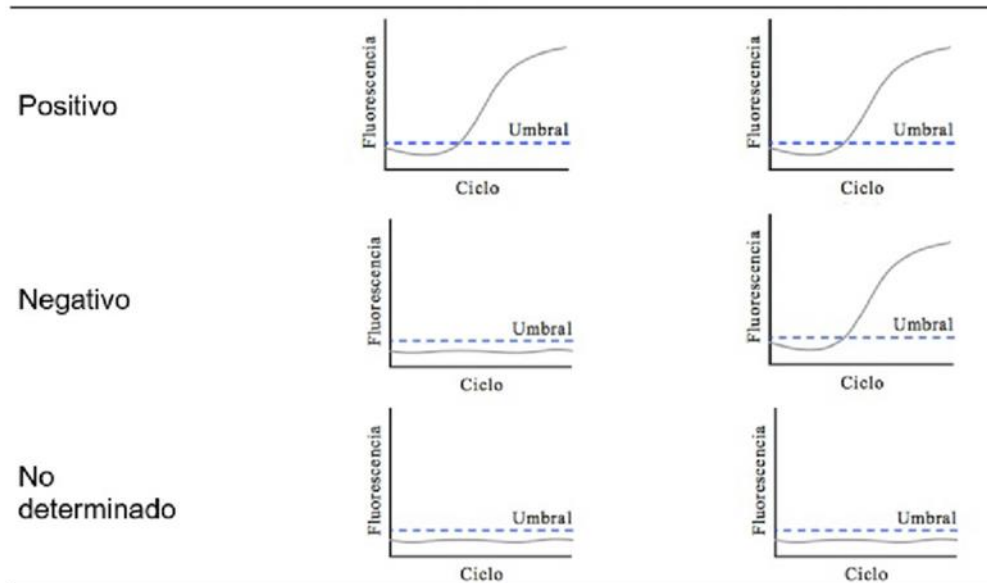


ILUSTRACIÓN 5 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE INTERPRETACION DE RESULTADOS DE PCR MULTIPLEX

ADN Polimerasa

Las ADN polimerasa utilizadas en PCR incluyen un grupo de enzimas termoestables aisladas de organismos termófilos, de calidad suficiente que evitan pérdidas en especificidad, eficiencia, fidelidad y rendimiento. Su temperatura óptima de catálisis oscila alrededor de 70-72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo. En la actualidad la mayoría son versiones recombinantes e incluso mejoradas por ingeniería genética.

Descripción del Ensayo y Resultados de la Optimización Extracción:

Extracción del ARN de la muestra El ARN del VHC se aísla a partir de suero o plasma humano empleando una modificación optimizada del método del fenol-cloroformo, mediante lisis de los viriones con agentes caotrópicos y precipitación del ARN en isopropanol.

Luego se lava con etanol al 75%, los restos de solvente se extraen con acetona y el ARN se resuspende en agua libre de ribonucleasas. El método tradicional consta



de 21 pasos con 18 horas de ensayo (3 días), y se redujo a 16 pasos sencillos y 3 horas, además de reducir los volúmenes de muestras y reactivos a la mitad.

Para optimizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de virus gastrointestinales, se deben tener en cuenta varios aspectos. A continuación, se presentan algunos parámetros (23)

Cada sistema de PCR puede requerir ajustes específicos, por lo que es recomendable realizar pruebas preliminares y optimizaciones iterativas para obtener los mejores resultados. Además, la optimización del PCR puede variar según el virus específico que se esté detectando, por lo que es importante tener en cuenta las características genéticas y biológicas del virus objetivo. (22)



Etiología viral de la diarrea.

Cuando el intestino secreta más electrolitos y agua de los que absorbe. Las causas de mayor secreción son infecciones, grasas no absorbidas, ciertos fármacos y diversos secretagogos intrínsecos y extrínsecos. (18)

Normalmente, el intestino delgado y el colon absorben el 99% del líquido resultante de la ingesta oral y de las secreciones del tubo digestivo: una carga total de líquidos de alrededor de 9-10 L diarios. Por lo tanto, aun pequeñas reducciones (es decir, 1%) de la absorción intestinal de agua o aumentos de secreción pueden incrementar lo suficiente el contenido de agua como para provocar una diarrea. (24)

Varios mecanismos básicos causan la mayoría de las diarreas clínicamente significativas. Los tres más habituales son: aumento de la carga osmótica, incremento de las secreciones y disminución de la absorción y disminución del tiempo/superficie de contacto. (18)

Existe una diversidad de bacterias, virus y parásitos que puede causar GEA. Los agentes más frecuentemente involucrados varían de acuerdo a las condiciones socioeconómicas y sanitarias de la región y con la edad del paciente (16)

Causas

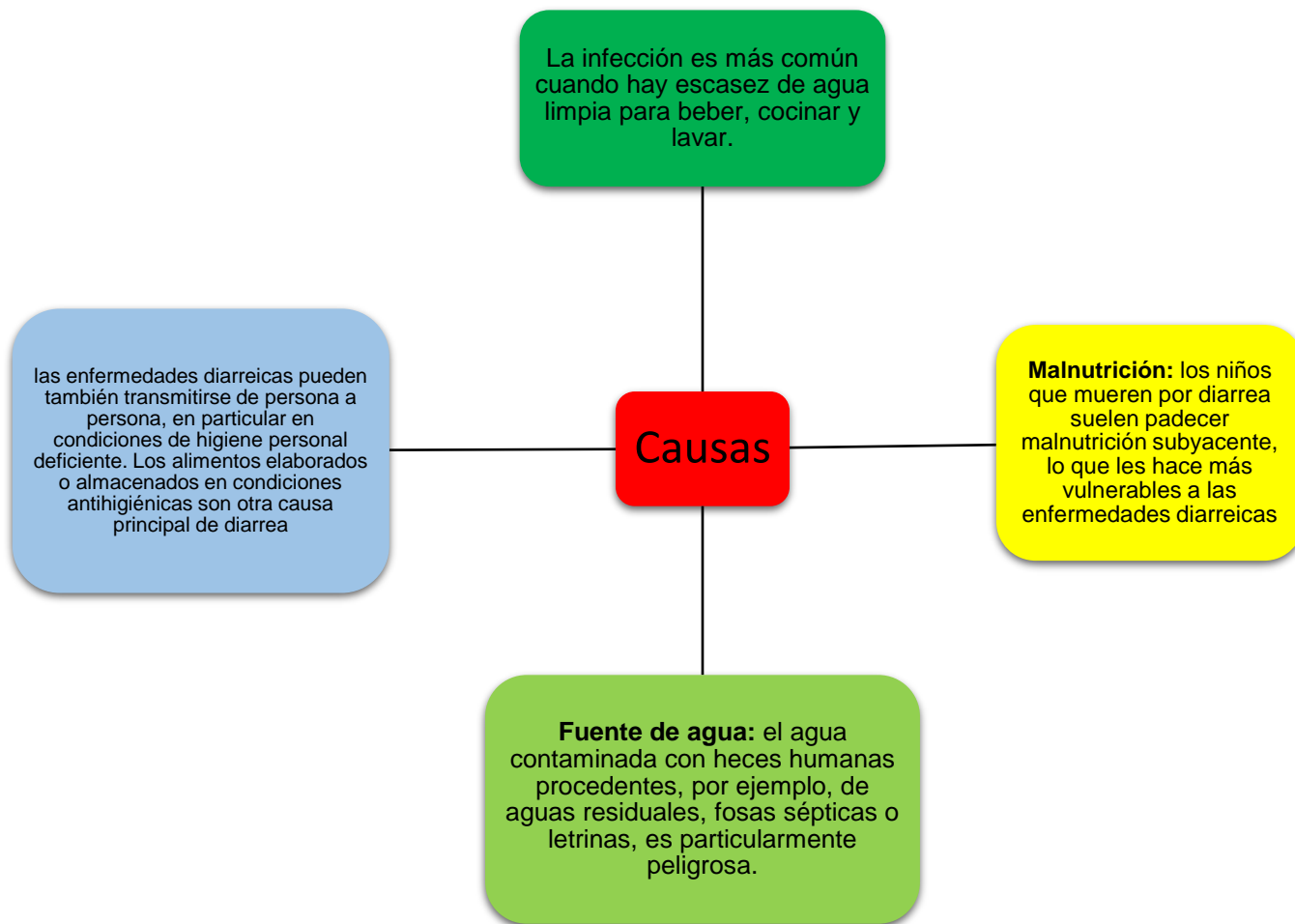


ILUSTRACIÓN 6 CAUSAS DE GASTROENTERITIS



Diseño Metodológico

1. **Tipo de estudio:** Descriptivo de corte transversal.

2. **Área de estudio:**

El estudio se realizó en el sector de salud Perla María Norori el cual abarca el sector sur de la ciudad de León y dicho puesto atiende una población de más de 17,000 personas procedentes de los barrios de Guadalupe, Laborío; San Sebastián, El Sagrario; Santa Clara, El Chiriquí, Bella Vista, Las Chácaras, Carlos Fonseca, donde se tomaron todas las muestras diarreicas.

Este estudio se desarrolla en las instalaciones del laboratorio del centro de investigación de enfermedades infecciosas (CEI) en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-León, e incluye muestras diarreicas de los proyectos de investigación que se ejecutan en el CEI.

3. **Unidad de análisis:**

3.2 **Muestra:** Todos los primeros episodios de diarrea en la población de estudio.

3.3 **Muestreo:** No probabilístico por conveniencia.

3.4 **Fuente de información:** Primaria. Los resultados del laboratorio obtenidos de los registros que se anotarán en una ficha diseñada para la obtención de la información.

3.5 **Criterios de inclusión:** Todos los niños con muestras diarreicas del estudio.



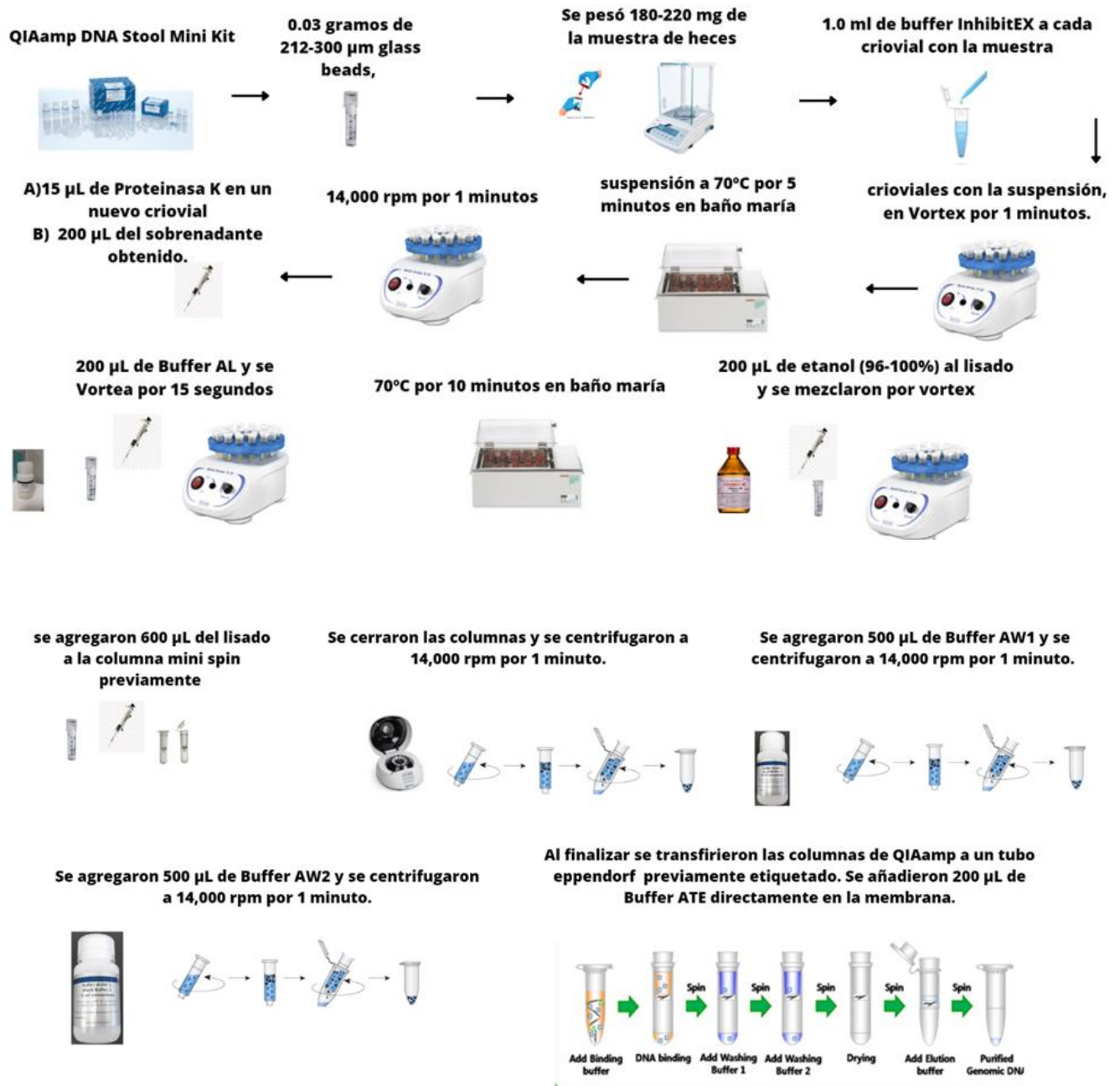
4. Recolección y procesamiento de la muestra:

A continuación, se describe el procedimiento que se llevó a cabo por los proyectos de investigación que se desarrollaron en el Centro, donde se recolectaron estas muestras biológicas en frascos estériles o pañales desechables mensualmente y cuando se reportó un caso de diarrea; éstas fueron transportadas al Laboratorio de Investigación del Centro de Enfermedades Infecciosas (CEI) de la UNAN-León.

4.1. **Procesamiento y Almacenamiento de la muestra:** utilizando el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit siguiendo las especificaciones del fabricante. Se tomó 200 µl de la suspensión y se mezcló con una 20 ul solución buffer que contiene sales caotrópicas que favorecen la unión de los ácidos nucleicos a la superficie de las partículas de vidrio (Binding Buffer).

Luego se realizó dos pasos de lavado (Wash Buffer) que permitieron remover sales, proteínas y otras enzimas. Finalmente, los ácidos nucleicos fueron eludidos con un buffer que contiene agua libre de nucleasas y concentraciones bajas de sal. Un total de 200 µl de ADN aislado fue obtenido y guardado a -20°C hasta su posterior análisis. Nota: El prospecto original del kit fue modificado; se le añadió el uso de las glass beads en los crioviales antes de la extracción de ADN para una mejor lisis de las heces fecales.

4.2. Extracción y purificación de ARN genómico:



Principio:

Los mini kits QIAamp Viral RNA proporcionan la forma más rápida y sencilla de purificar el ARN viral para obtener resultados fiables.

El ARN viral se puede purificar del plasma (tratado con anticoagulantes distintos de la heparina), suero y otros líquidos corporales libres de células. Las muestras pueden ser fresco o congelado, pero si está congelado, no debe descongelarse más de una vez. Congelación y descongelación repetidas de muestras de plasma conducirá a títulos virales reducidos y debe evitarse para lograr una sensibilidad óptima.

Los crioprecipitados se acumulan cuando las muestras se someten a repetidos ciclos de congelación y descongelación. Este puede provocar la obstrucción de la membrana QIAamp cuando se utiliza el protocolo de vacío. Los minikits QIAamp Viral RNA son para uso general y se pueden utilizar para el aislamiento de ARN viral de una amplia variedad de virus, pero no se puede garantizar el rendimiento para todos los virus.

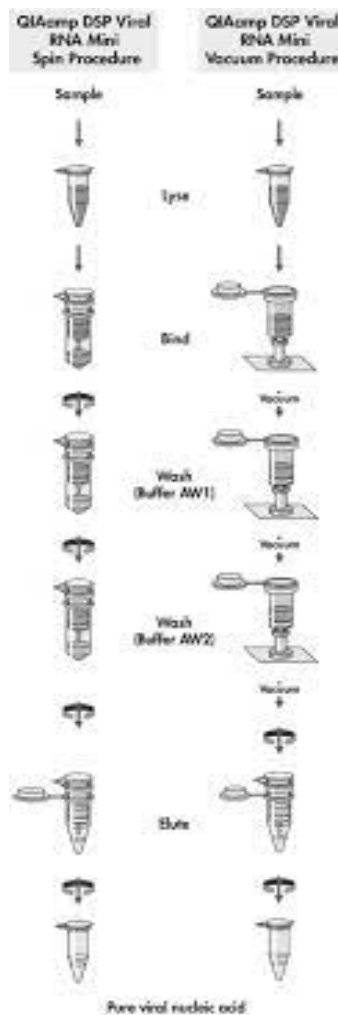


ILUSTRACIÓN 7 QIAAMP VIRAL RNA KITS (30)



4.3. Ensayo de RT-PCR:

Identificación de rotavirus, norovirus, astrovirus y Sapovirus, para el análisis por el método de RT-PCR se utilizaron Primers y Sondas descritas

ENSAYO	PRIMER & PRO
<i>Astrovirus</i>	F, CAGTTGCTTGCTGCGTTCA 4 R, CTTGCTAGCCATCACACTTCT P, CACAGAAGAGCAACTCCATCGC
<i>NOROVIRUS GII</i>	F, CARGARBCNATGTTYAGR TGGATGAG R, TCGACGCCATCTTCATTCACA P, TGGGAGGGCGATCGCAATCT
<i>Rotavirus</i>	F, ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG R, GGTACATAACGCCCCTATAGC P, AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA
<i>Sapovirus</i>	F, GAYCAGGCTCTCGCYACCTAC F, TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC R, CCCTCCATYTCAAACACTA P, CYTGGTTCATAGGTGGTRCAG P, CAGCTGGTACATTGGTGGCAC

4.4. Condiciones de optimización del PCR

Se utilizaron primer descritos en la tabla No 3, para proceder con la mezcla de estos y la mezcla del powermix con las muestras y exponerlas a las temperaturas de hibridación

4.5. Protocolo de extracción de ADN para muestras de heces.

Método de extracción según protocolo QIAamp DNA Stool Mini Kit (Cat #51604)

Materiales:



- QIAamp DNA Stool Mini Kit:
- Buffer InhibitEX
- Proteínasa K
- Buffer AL
- Buffer de lavado AW1
- Buffer de lavado AW2
- Buffer ATE
- Columnas minispin QIAamp
- Tubos colectores (2mL)
- Etanol 96-100%
- 212-300 μm glass beads
- Pipetas de 5-50 μL
- Pipetas de 1000 μL
- Puntas de 30 μL .
- Puntas de 200 μL .
- Puntas de 1000 μL .
- Microcentrífuga minispin.
- Baño maría 70°C
- Vortex BEAD MILL 4 ThermoFisher Scientific.
- Coolrack
- Tubos eppendorf 1.5 mL
- Crioviales 1.8mL.
- Gradillas de tubos eppendorf 1.5 mL y/o crioviales de 1.8 mL.

Procedimiento de extracción:

1. Limpiar el área de trabajo y preparar las muestras a extraer.
2. Todas las muestras serán colocadas en coolrack antes de utilizarlas, con el fin de mantener las muestras temperaturas óptimas de viabilidad.
3. Agregar 0.03 gramos de 212-300 μm glass beads en crioviales de 1.8mL.



4. Pesar 180-220 mg de la muestra de heces y añadir en crioviales de 1.8mL.
(colocar en gradillas de crioviales de 1.8mL)

Nota A): En caso en que las heces se encuentren re-suspendidas en PBS 1X, se extraerán 200 μ L de solución y añadir a crioviales de 1.8 mL (Que contienen el buffer InhibitEX y el glass beads).

Nota B): Cuando se utilicen muestras congeladas, tenga cuidado de que las muestras no se descongelen hasta que se agregue el buffer InhibitEX en el paso 4 para lisar la muestra; de lo contrario el ADN en la muestra puede degradarse. Después de la adición del buffer InhibitEX, todos los pasos siguientes se pueden realizar a temperatura ambiente.

5. Añadir 1.0 ml de buffer InhibitEX a cada criovial con la muestra.
6. Colocar los crioviales con la suspensión en el vortex Bead Mill por 1 minuto.
7. Calentar la suspensión a 70°C por 5 minutos.
8. Dar vortex por Bead Mill por 15 segundos y centrifugar la muestra a 14,000 rpm por 1 minutos. Pipetear 1.2 ml del sobrenadante dentro de un nuevo tubo de 1.5 mL. (para separar las glass beads)
9. Agregar 15 μ L de proteinasa K en un nuevo criovial de 1.8mL y agregar 200 μ L del sobrenadante obtenido en el paso 7.
10. Agregar 200 μ L de Buffer AL y dar vortex por 15 segundos.

NOTA: No agregar proteinasa K directamente al buffer, se debe mezclar primeramente con el lisado de la extracción.

11. Incubar a 70°C por 10 minutos. Centrifugar brevemente para eliminar gotas en el interior del tubo. (opcional)
12. Agregar 200 μ L de etanol (96-100%) al lisado y mezclar por vortex. Centrifugar brevemente para eliminar gotas en el interior del tubo. (opcional)
13. Etiquete las tapas de las columnas de QIAamp y colocarlas en un tubo colector de 2mL. Colocar cuidadosamente 600 μ L de lisado obtenido en el paso 11 a la columna tratando de no dejar porciones del lisado en los bordes. Cerrar la columna y centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto. Colocar la



columna en un nuevo tubo colector de 2mL y descartar el tubo que contiene el filtrado.

14. Abrir cuidadosamente la columna y agregar 500 μ L de Buffer AW1. Cierre la columna y centrifugar el contenido a 14,000 rpm por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y descartar el tubo que contiene el filtrado.
15. Abrir cuidadosamente la columna y agregar 500 μ L de Buffer AW2. Cierre la columna y centrifugar el contenido a 14,000 rpm por 3 minutos. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL y descartar el tubo que contiene el filtrado.
16. Centrifugar a 14,000 rpm por 3 min. Este paso ayudará eliminar restos de Buffer AW2.
17. Transferir la columna de QIAamp a un eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado. Abrir cuidadosamente la columna y añadir 200 μ L de Buffer ATE directamente en la membrana. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar a máxima velocidad por 1 min para eludir el ADN.

5. Consideraciones éticas:

- Las muestras utilizadas de este estudio han sido de proyectos de investigación que se desarrollan en el CEI (Centro de Investigaciones Infecciosas) que cuentan con la aprobación del comité de ética local.
- Únicamente utilizaremos el resultado de análisis previo que indica su positividad o negatividad.
- No se permitirá ni se emitirá juicios de valor ni censura.
- Se mantendrá una actitud profesional del investigador.
- Se garantiza la seguridad y sigilo de la información una vez concluido el estudio.
- El presente estudio se rige bajo las consideraciones del protocolo de Helsinki.



Resultados

El presente estudio muestra la utilidad del Ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección de virus gastrointestinales en muestras diarreicas de niños menores de 5 años. Un total de 301 muestras fueron analizadas para la detección de virus gastrointestinales.

Características sociodemográficas y clínicas

El 100% de los participantes viven en el sector del Perla María Norori que es considerado del casco urbano, el 55% fueron varones y la edad más prevalente fue el rango de 0-5 meses 118 niños que representan el 39%. **Ver tabla 1.**

La frecuencia de los signos y síntomas clínicos se muestran en la tabla 1, la frecuencia de diarrea fue del 100% ya que fue considerado como criterio de inclusión, fiebre fue reportado en el 37% (n=110) de los niños y 55 niños sufrieron vómito (18%). Un total de 109 niños (36%) recibió atención médica en clínicas y 44 (15%) fueron ingresados al servicio de emergencia. Entre el 13% y 27% recibieron algún tipo de tratamiento ante la diarrea. **Ver tabla 1.**

Tabla 1. Características demográficas, manifestaciones clínicas y atención medica de la población en estudio (n=301).

Variable			Frecuencia	Porcentaje
Características sociodemográficas	Edad en meses	0-5	118	39%
		6-10	101	34%
		11-15	37	12%
		16-20	33	11%
		21-27	12	4%
	Sexo	Hombre	165	55%
	Mujer	136	45%	
Sintomatología	Fiebre	Si	110	37%
		No	191	63%
	Vómito	Si	55	18%
		No	246	82%
	Sangre en las heces	SI	2	4%
		NO	288	96%
Atención médica	Hospitalización	Si	14	5%
		No	286	96%
	Clínica	SI	109	36%
		NO	192	64%
	Emergencia	SI	44	15%
		NO	257	85%
Medicamentos	Tratamiento fluido	SI	13	5%
		NO	288	95%
	Zinc	Si	82	27%
		No	219	73%



La duración de los síntomas clínicos: vómito fue el síntoma menos frecuente, el máximo de deposiciones diarreicas fue de 17, el máximo de días de diarrea sufrido por los sujetos en estudio fue de 17 días. El promedio de la edad fue de 9.04 meses (SD: 6.517). **Ver tabla 2.**

Tabla 2: Promedio de días de la presentación de síntomas clínicos en los niños en estudio.

Variable	Máximo	Mínimo	Promedio	Desviación estándar.
Vómito	7	0	0.71	1.613
Diarrea	17	1	6.21	3.593
Número de deposiciones	17	1	6.25	2.374
Edad en meses	26	1	9.04	6.517

Detección de virus gastrointestinales en las muestras diarreicas: de un total de 301 muestras diarreicas 87 (29%) fueron positivas para virus gastrointestinales, (**Ver gráfico 1**) en las cuales se logró determinar un total de 102 virus, habiendo presencia de coinfecciones en 14 de las 87 muestras diarreicas. La etiología de los virus detectados utilizando el PCR multiplex en tiempo real se muestra en el (**Gráfico 2**) Rotavirus y Norovirus fueron los virus gastrointestinales más frecuentes. Donde prevalece con un 44% Rotavirus para un total de 38 virus encontrados.

Gráfico 1. Resultado del PCR multiplex en tiempo real en la detección de virus gastrointestinales en muestras diarreicas.

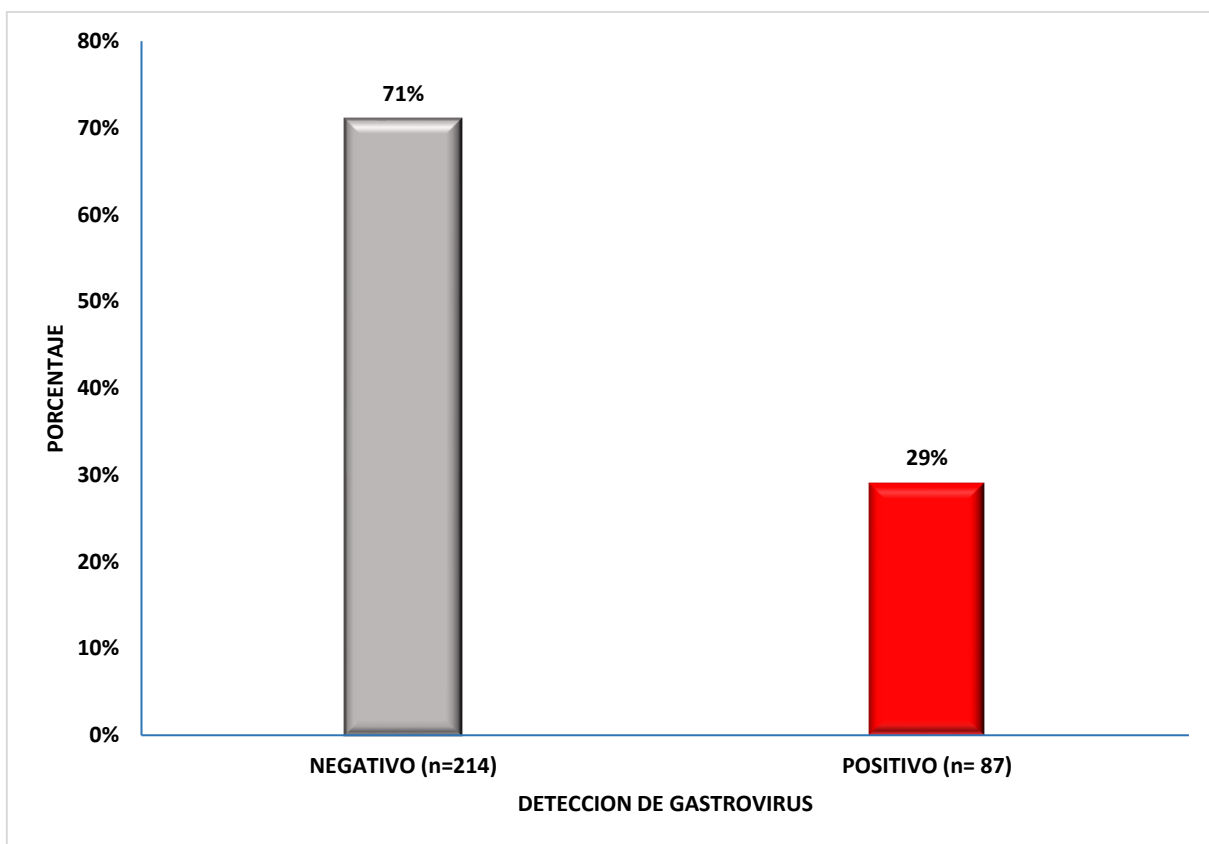
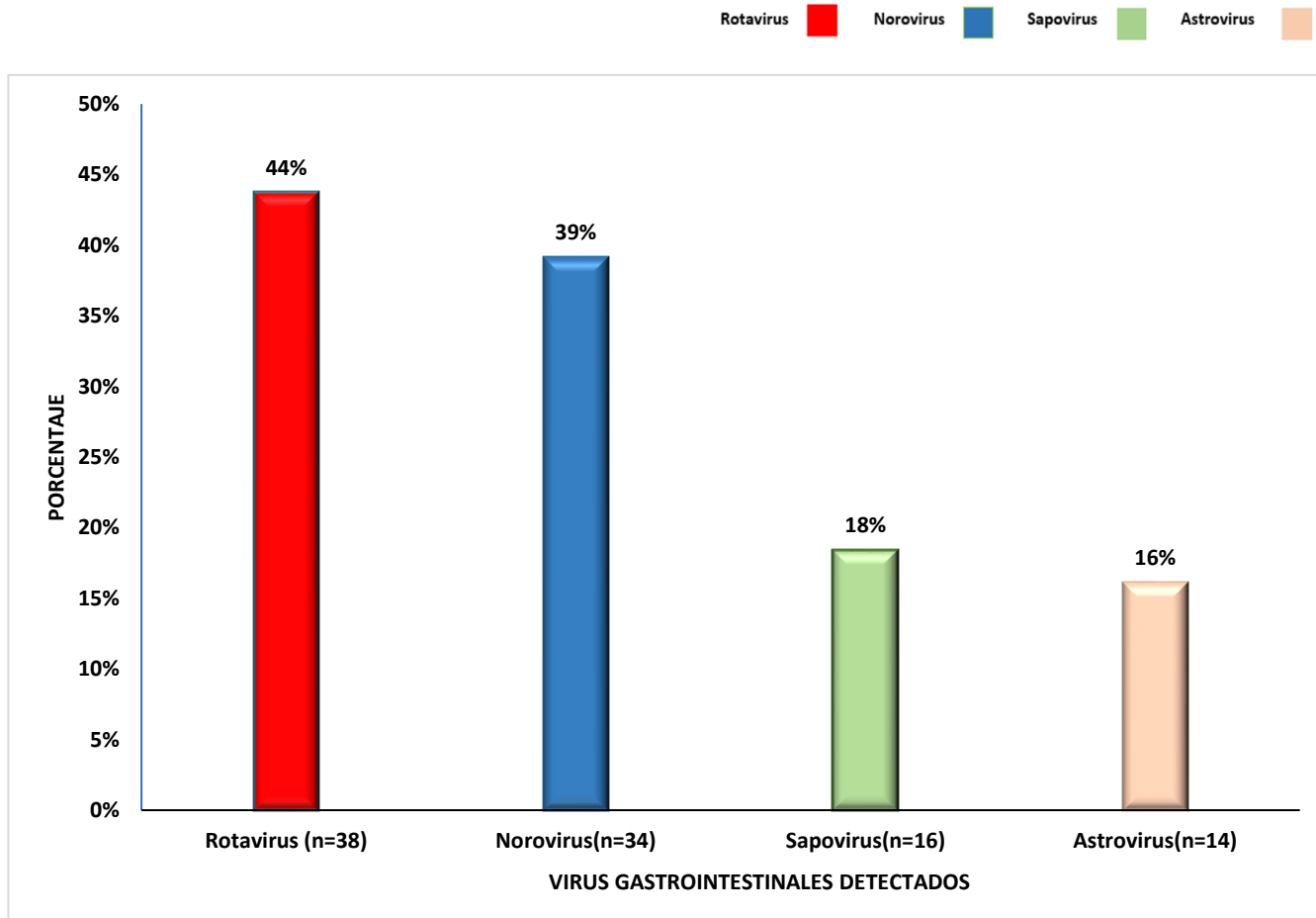


Gráfico 2 Frecuencia de etiología viral causante de gastroenteritis detectando un total de 102 virus en las 87 muestras diarreicas positivas.



Características demográficas según etiología viral detectada: al evaluar la etiología viral según edades y sexo se observa que de los 87 casos positivos tomados para diarrea por virus gastrointestinales tenemos 56 varones y 31 niñas siendo la edad promedio en meses a la que se infectan los niños con Rotavirus, Sapovirus y Norovirus de 8.47 meses (SD=6.23) para varones en comparación con las niñas de 10.06 (SD=6.98), excepto en las infecciones por Astrovirus donde las niñas se infectan antes. Aunque no hay diferencias estadísticas significativas ($p>0,05$). De los 38 (43.7%) infectados por rotavirus el 26.4% pertenece con mayor incidencia en los niños del rango de 0 a 5 meses con 23 niños afectados.

Gráfico 3. Frecuencia de la etiología viral detectada de los 102 virus según el sexo de los participantes en estudio.

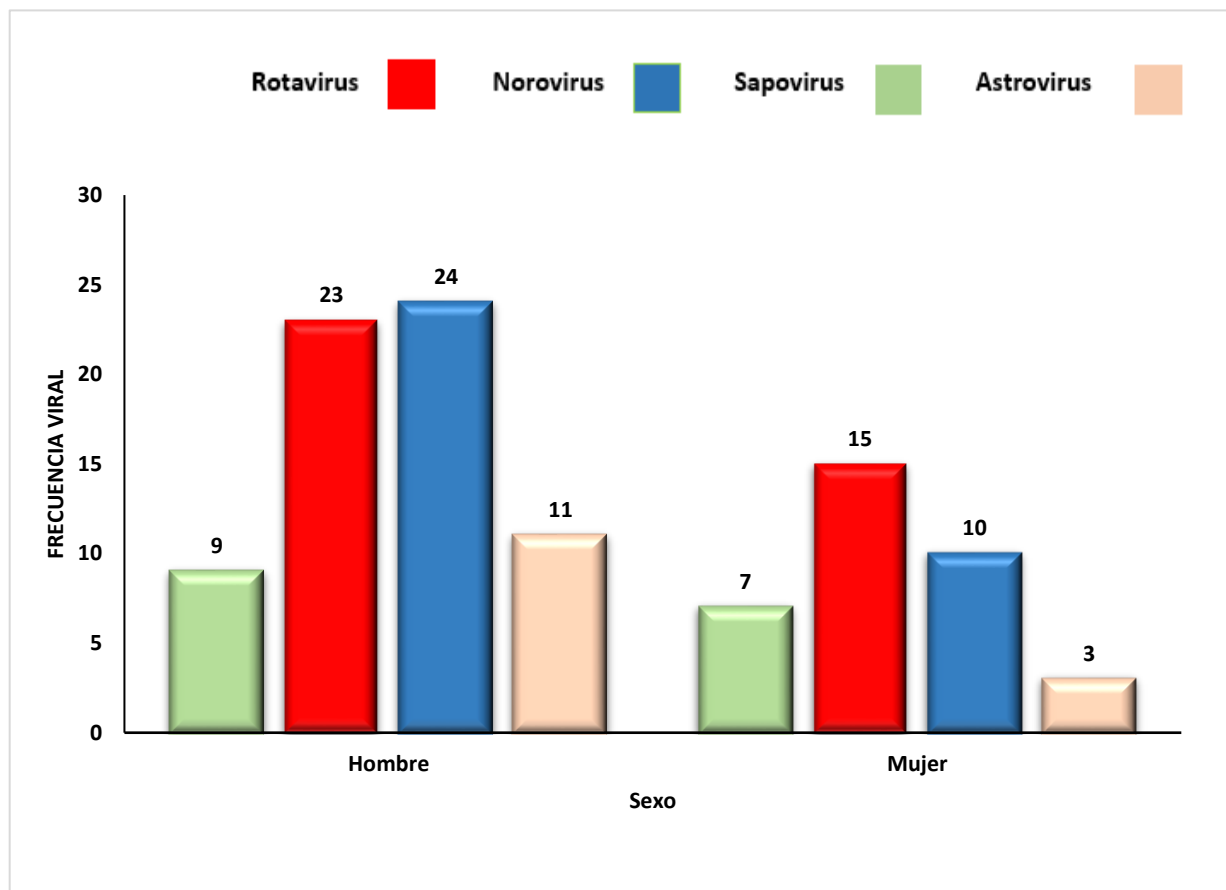
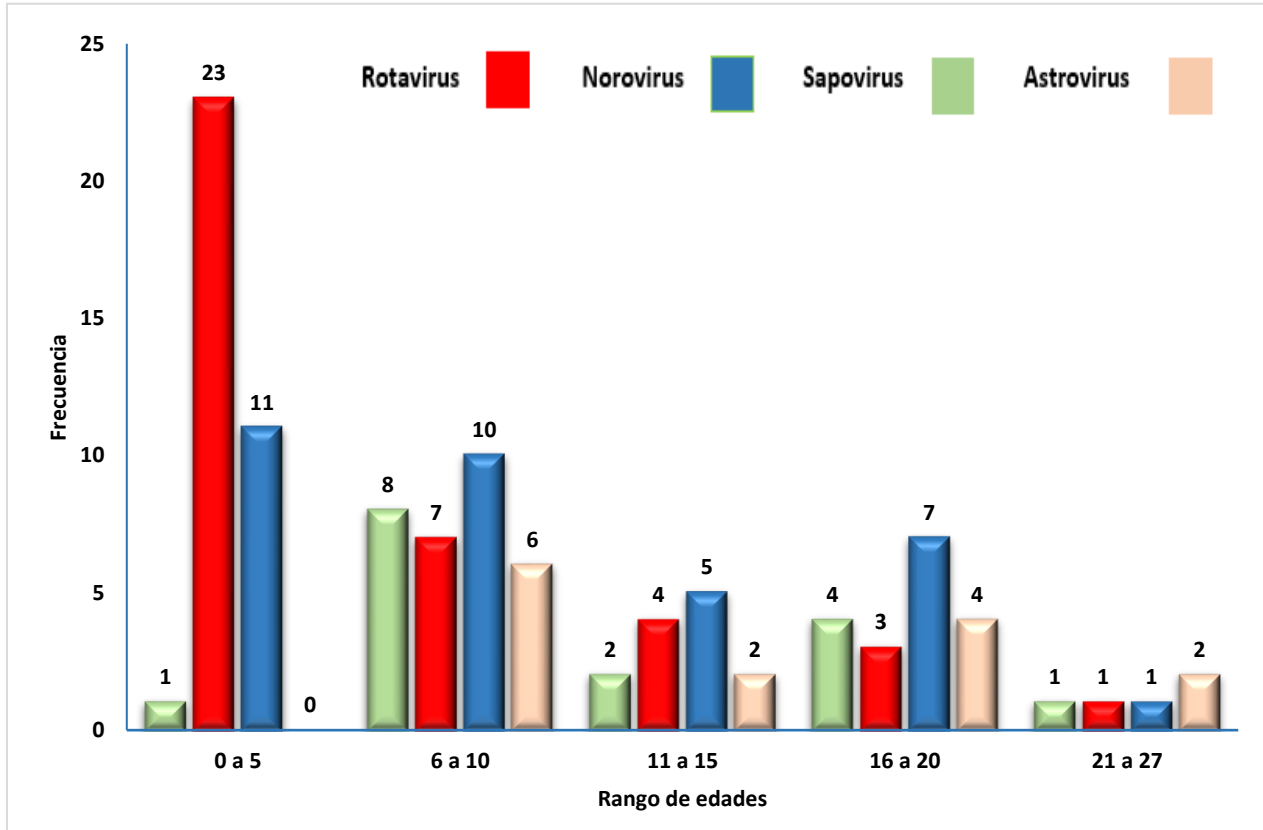
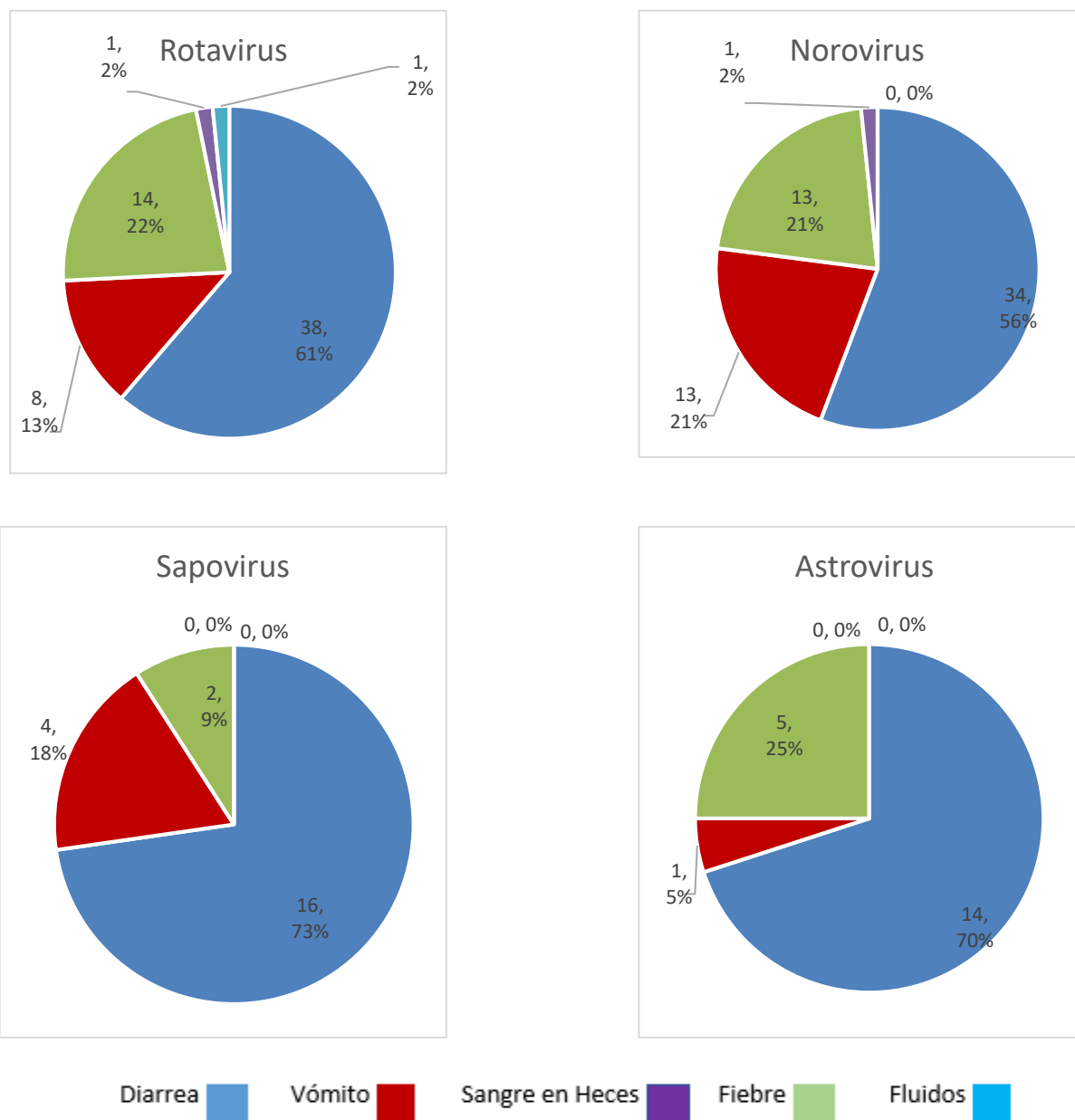


Gráfico 4. Frecuencia de la etiología viral examinada según el rango de edades en meses y tipos de virus con mayor incidencia.



Características clínicas según etiología viral detectada: el panel de gráfico 5 nos muestra la etiología viral detectada y los porcentajes de los síntomas clínicos reportados durante los episodios de diarrea (n=87). Rotavirus y Norovirus presentaron mayor frecuencia de vómito en comparación con Sapovirus y Astrovirus, la presencia de sangre en las heces como un síntoma clínico de la diarrea solo fue reportado en 2 casos.

Gráfico 5. Síntomas clínicos asociados a la etiología viral detectada de cada uno de los virus gastrointestinales.





Coinfecciones: de las 87 muestras diarreicas positivas 14 niños mostraron coinfecciones virales con un total de 28 virus detectados por PCR múltiplex en tiempo real, donde rotavirus y norovirus predomina con mayor incidencia, así mismo la frecuencia de coinfecciones y su relación es presentada en la **tabla 3**.

Tabla 3. Coinfecciones detectadas en las muestras diarreicas positivas para virus gastrointestinales.

	Rotavirus	Norovirus	Sapovirus	Astrovirus	Total
Rotavirus	0	4	2	1	7
Norovirus	4	0	1	4	9
Sapovirus	2	1	0	2	5
Astrovirus	1	4	2	0	7
Total	7	9	5	7	



Discusión

El presente estudio muestra la utilidad del ensayo del PCR multiplex en tipo real para la detección de muestras diarreicas de enfermedades gastrointestinales de niños menores de 5 años, ya que es de gran relevancia en el campo de la salud y la epidemiología por diversas razones tanto que esta población es particularmente vulnerable a infecciones que pueden causar diarrea grave vómitos, fiebres o complicaciones.

Con el uso del PCR multiplex en tiempo real nos proporciona una herramienta altamente sensible y específica para identificar rápidamente la presencia de virus gastrointestinales, lo que nos permite un diagnóstico más preciso y un inicio temprano del tratamiento. Admitiendo no solo la detección de un solo virus, sino también la identificación de coinfecciones, un fenómeno que a menudo pasa desapercibido en los métodos de diagnóstico convencionales.

De un total de 301 niños con gastroenteritis, se detectó que el 29% (n=87) tomados como positivos para virus gastrointestinales causantes de diarrea, 38 sufrieron una mayor infección por Rotavirus con (43.7%). En el estudio de “Agentes causantes de diarrea en niños menores de 5 años en Tunja, Colombia” reportado por Fred G, Abril Manrique y colaboradores indican que la mayoría de los sujetos en estudio el agente detectado con mayor frecuencia también fue Rotavirus (48%) (25)

En relación a la edad el grupo más afectado fueron los niños de 0-5 meses con un 26.4% (n=23) de los 87 casos positivos para diarrea por virus gastrointestinales, y en total el 43.7% n=38 niños fueron infectados por Rotavirus, en el estudio de “Infección y enfermedad por rotavirus en una cohorte de nacimientos en varios sitios: resultados del estudio MAL-ED”, describieron la infección por Rotavirus se detectó Rotavirus en el 5,5% (408/7440) de las heces diarreicas, y 344 (19,8%) niños alguna vez tuvieron gastroenteritis por Rotavirus. (14) indican que las edades donde mayor número de virus causantes de diarrea se detectan en niños menores de 2 años (26)



En nuestro estudio el 71% de los episodios de diarrea fueron causados por otros agentes diferentes de virus, por tanto, en el estudio de Jimmy Blandón, Bryan y Katerine sobre “Factores de riesgos asociados a infecciones sintomáticas por Giardia lamblia, en niños menores de 3 años pertenecientes a la zona sureste de la ciudad de León, en el periodo de Julio 2017- Julio 2021. La presencia de G. lamblia en muestras de heces se realizó mediante PCR en tiempo real indicando que La mayoría de los casos presentaron diarrea aguda (82.6%), con deposiciones de 5-6 veces al día (39.1%) (27) bacterias, parásitos y hongos pueden causar diarrea,

El Proyecto MAL-ED (Child Health and Development) nos brinda un análisis más completo de la infección por Giardia realizado en el periodo comprendido desde noviembre de 2009 a febrero de 2014, la prevalencia general de Giardia en muestras de heces fue de 14.7%, se detectó al menos una vez en dos tercios de un total de 1,741 niños que completaron el estudio hasta los dos años de edad. (28)

La sintomatología clínica en nuestro estudio con mayor porcentaje fue vomito (21%) para norovirus, en comparación con Rotavirus 13% y Astrovirus 5% seguido de fiebre (25%) para Astrovirus, la presencia de sangre en las heces como un síntoma clínico de la diarrea solo fue 2%. En el estudio SAGE y colaboradores sobre “Epidemiología de la gastroenteritis pediátrica por astrovirus en una cohorte de nacimiento nicaragüense” señalan que los síntomas más frecuentes en los sujetos en estudio fueron los niños que tuvieron contacto con una persona que experimentó diarrea o vómitos en la semana anterior tuvieron más probabilidades de experimentar un episodio de AGE por astrovirus que aquellos que no tuvieron dicho contacto (HR = 9,08; IC del 95 %: 5,77 a 14,29)

La incidencia de Astrovirus entre los episodios de AGE (89/1710, 5,2%) fue similar a la de las cohortes de nacimiento de Nepal, Bangladesh, India, Pakistán, Perú, Brasil, Sudáfrica y Tanzania que fueron seguidas durante 2 años (todos 5,6%). (9)

Con el estudio de “Infección y enfermedad por rotavirus en una cohorte de nacimientos en varios sitios: resultados del estudio MAL-ED” evaluaron además la severidad de la diarrea, los episodios de diarrea se definieron por ≥ 3 deposiciones



blandas en un período de 24 horas y estuvieron separadas por al menos 2 días. La gravedad se evaluó utilizando una puntuación de Vesikari modificada (leve, 1 a 4; moderada, 5 a 8; grave, 9 a 13; y muy grave, 14 a 17) (13) en este estudio no se logró determinar la severidad de la gastroenteritis. (13)

Un dato relevante observado en este estudio fue la frecuencia de coinfecciones, donde 14 sujetos estaban coinfectado por 28 patógenos virales, de mayor frecuencia de Rotavirus-Norovirus, la significancia de este hallazgo está relacionado con la evacuación de la severidad de la diarrea. En el estudio de “Epidemiología de la gastroenteritis pediátrica por Astrovirus en una cohorte de nacimiento nicaragüense.” El Astrovirus aparece frecuentemente como una coinfección con otros patógenos virales entéricos, especialmente rotavirus, norovirus y sapovirus, donde las coinfecciones con otros patógenos también se han asociado con síntomas de gastroenteritis más graves y una mayor probabilidad de experimentar diarrea en entornos de países de ingresos bajos y medianos (9)

Conclusión

El presente estudio demostró la utilidad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección de la etiología viral en muestras diarreicas de niños en León, contribuyendo a la recopilación de datos epidemiológicos actualizados, lo que es fundamental para el diseño de estrategias de salud pública y la implementación de medidas preventivas.

La edad promedio de los niños fue de 8.47 meses con una desviación estándar de 6.239 predominando el sexo masculino con el 64.4% (n=56) de los 87 niños con diarrea causada por gastrovirus.

El 29% (n=87) de los niños con muestras diarreicas fueron positivos para virus gastrointestinales con una frecuencia de Rotavirus y Norovirus prevaecientes más en hombres que en mujeres, pero no habiendo una significancia estadística entre los grupos. El promedio de edad de las infecciones por virus gastrointestinales fue de 10 meses para las niñas y 8.5 meses para los niños ($P>0.05$) No observándose diferencias estadísticas entre la edad y el sexo.

Las infecciones virales por Rotavirus y Norovirus son más frecuentes en el grupo etario de 0 – 5 meses donde estos virus presentan una mayor frecuencia de síntomas clínicos de vómito (Rotavirus=13% y Norovirus=21%) y fiebre (Rotavirus=22% y Norovirus=21%)



Recomendaciones

Aplicar el ensayo PCR mutiplex en tiempo real para la detección de la gastroenteritis viral en muestras diarreicas no solo de niños sino también en adultos y ancianos para conocer la frecuencia de estos patógenos en estos grupos etarios.

Para futuros estudios se recomienda detectar otras etiologías diferentes de gastrovirus, para determinar que otros patógenos (bacterianos, parasitarios o micóticos) pueden causar gastroenteritis en niños.



Bibliografía

1. Riveros M, Ochoa TJ. Enteropatógenos de importancia en salud pública. Revista peruana de medicina experimental y salud pública. 2015; 32(1): p. 157-164.
2. OMS. Organización mundial de la salud OMS. [Online].; 2017 [cited 2023 Mayo 28. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
3. Espinoza Torres EM. Riul unan leon. [Online].; 2011 [cited 2023 junio 01. Available from: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/348/1/220101.pdf>.
4. Domínguez Á, Godoy P, Torner N, Cardeñosa N, Martínez A. Las gastroenteritis víricas: un problema de salud pública. Revista Española de salud pública. 2009; 83(5): p. 679-687.
5. MayoClinic. Mayo Clinic. [Online].; 2022 [cited 2023 Mayo 30. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/viral-gastroenteritis/symptoms-causes/syc-20378847>.
6. MedlinePlus , NIH. PCR. [Online].; 2022 [cited 2023 junio 21. Available from: [https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/pruebas-de-pcr/#:~:text=Las%20pruebas%20de%20PCR%20\(reacci%C3%B3n,c%C3%A9lulas%20anormales%20en%20una%20muestra](https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/pruebas-de-pcr/#:~:text=Las%20pruebas%20de%20PCR%20(reacci%C3%B3n,c%C3%A9lulas%20anormales%20en%20una%20muestra).
7. Luz BA, Teresa AC. Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2017; 35(6): p. 367-376.



8. Romero Arguelles R. Repositorio Institucional Mexico. [Online].; 2017 [cited 2023 septiembre 20. Available from:
http://repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/20.500.12984/2006/1/romeroa_rguellesricardol.pdf.
9. Rubinstein RJ, Reyes Y, González F, Gutiérrez L, Toval-Ruiz C, Hammond K, et al. Epidemiología de la gastroenteritis pediátrica por astrovirus en una cohorte de nacimiento nicaragüense. MedRxiv Pubmed. 2023 Agosto 25.
10. L H, ED S, L P, M S, H H, O V, et al. National library of medicine Pubmed center. [Online].; 2011 [cited 2023 10 19. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3080904/>.
11. Garcia NT. Estudio epidemiológico de los brotes de gastroenteritis aguda de etiología vírica en cataluña. [Online].; 2008 [cited 2023 julio 5. Available from:
https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2852/NTG_TESIS.pdf?sequence=1.
12. Reyes Berrios YI. Epidemiología molecular de Norovirus en niños con diarrea inmunizados contra Rotavirus 2009 - 2010. Riul.UnanLeon. 2012 Octubre;; p. 78.
13. Mohan VR, Karthikeyan R, Babji S, McGrath M, Shrestha S, Shrestha J, et al. Infección y enfermedad por rotavirus en una cohorte de nacimientos en varios sitios: resultados del estudio MAL-ED. The journal of infectious diseases. 2017 Mayo 3; 216(3): p. 305-316.
14. Y RRR, F G, L G, C TR, K H, L B, et al. Epidemiology of pediatric astrovirus gastroenteritis in a Nicaraguan birth cohort. PubMed. 2023 agosto 25.
15. luciana k. Gastroenteritis aguda viral en la era post-introducción de la vacuna contra el rotavirus. [Online].; 2012 [cited 2023 Agosto 8. Available from:
<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/848969/20124116-11.pdf>.



16. Yalda LA. Etiología y manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos. Revista médica Clínica Las Condes. 2014; 25(3): p. 463-4872.
17. Panamericana UdiIO. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE DIARREAS CAUSADAS POR ROTAVIRUS. Guia práctica. ; 2007.
18. Dupont C. Diarreas agudas del niño. Elsevier Masson SAS. Pubmed. 2011 Agosto 10; 44(4): p. 1-9.
19. Bishop R F. Natural history of human rotavirus infection. Archivos de virologia. 1996; 12: p. 119-128.
20. Hyser JM, Estes MK. Rotavirus vaccines and pathogenesis. current Opinion in Gastroenterology. 2008 Enero; 25: p. 36-43.
21. Sylvia Becker-Dreps MM, Fredman González M, Filemón Bucardo P. Sapovirus: una causa emergente de diarrea infantil. PUBMED. 2021 octubre 1; 33(5): p. 388–397.
22. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Research. 2002 Marzo 15; 30(6): p. 1292–1305.
23. Labbox. Labbox España. [Online].; 2022 [cited 2023 agosto 03. Available from: <https://esp.labbox.com/la-tecnica-de-la-pcr-introduccion-y-principios-basicos/>.
24. Gotfried J. Manual MSD. [Online].; 2022 [cited 2023 octubre 19. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/trastornos-gastrointestinales/s%C3%ADntomas-de-los-trastornos-gastrointestinales/diarrea>.
25. G F, Manrique A. Scielo. Revista de salud publica. 2006 mayo 18; 8(1): p. 88-97.



26. Morán GEB. Universidad de Zaragoza. [Online].; 2016 [cited 2023 Octubre 19]. Available from: <https://zaguán.unizar.es/record/57642/files/TAZ-TFG-2016-938.pdf>.
27. Blandón J, padilla B, balladares K. “Factores de riesgos asociados a infecciones sintomáticas por Giardia. Tesis monografía licenciatura. León: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN LEÓN, departamento de microbiología y parasitología; 2022.
28. Rogawski ET, Bartelt LA, Platts-Mills JA, Seidman JC, Samie A, Havt A, et al. Determinantes e impacto de la infección por Giardia en los primeros 2 años de vida en la cohorte de nacimientos MAL-ED. PubMed J Pediátrico Infect Dis Soc. 2017 junio 1; 6(2): p. 153-160.
29. Sanchez Garcia GJ. Detección y genotipificación de sapovirus en niños con gastroenteritis aguda. [Online].; 2017 [cited 2023 septiembre 20]. Available from: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/972/Deteccion_SanchezGarcia_Gerardo.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
30. QIAGEN. QIAamp Viral RNA Mini Handbook. QIAamp. 2020 julio;; p. 48.

Anexos

Operacionalización de las variables:

Variable	Conceptos	Indicadores	Escala
Edad	Tiempo transcurrido del nacimiento hasta obtener la información	Ficha de recolección de datos	0-5 meses. 6-10 meses. 11-15 meses. 16-20 meses. 21-27 meses.
Sexo	Clasificación en macho o hembra basado en numerosos criterios entre ellos las características anatómicas y cromosómicas.	Ficha de recolección de datos	Masculino (M) Femenino (F)
Diarrea	Estado que se encuentra el paciente con tres o más deposiciones líquidas o acuosas en un periodo de tiempo.	Ficha de recolección de datos	SI NO
Vómito	Expulsión violenta del contenido del estómago a través de la boca	Ficha de recolección de datos	SI NO
Fiebre	Aumento de la temperatura corporal por encima de los 37°C	Ficha de recolección de datos	Si No



Atención medica	Conjunto de atenciones en el puesto de salud u hospital.	Ficha de recolección de datos	SI NO
Hospitalizaci ón	Ingreso de una persona enferma o herida en el hospital para su pronta recuperación	Ficha de recolección de datos	SI NO



Encuesta

FORMULARIO PARA NIÑOS CON DIARREA (CASOS)

INTRODUZCA LA FECHA DE HOY: (dd/mm/aaaa) ___ / ___ / _____

1. Sexo:

M_____ F_____

2. Edad_____

3. Procedencia_____

CÓDIGO DEL NIÑO/A: _____

Síntomas:

1. ¿El niño(a) ha tenido diarrea y/o vómito en los últimos 7 días? (MARQUE TODOS QUE SE APLICAN)

Diarrea_____

Vómito_____

2. ¿Cuál fue el número máximo de deposiciones por período de 24 horas que experimentó el niño (a) desde que comenzaron los síntomas?

_____ (número, rango 1-20)

3. ¿En qué fecha terminó el vómito? MUESTRELE AL CUIDADOR UN CALENDARIO Y MARQUE LA FECHA

___ / ___ / _____ (dd / mm / aaaa)



SÍNTOMAS Y TRATAMIENTO DE DIARREA Y/O VÓMITO

1. ¿Ha tenido su niño(a) fiebre desde que comenzaron los síntomas de diarrea y/o vómito?

[FIEBRE DEFINIDO POR APRECIACIÓN DE LA MADRE.]

SÍ

NO

2. ¿Ha tenido su niño/a sangre visible en las heces desde que comenzaron los síntomas?

SÍ

NO

3. ¿Recibió el niño (a) líquido intravenoso (líquido a través de la vena) desde que comenzaron los síntomas?

SÍ

NO

4. ¿Recibió el niño (a) zinc desde que comenzaron los síntomas?

SÍ

NO

5. ¿Recibió el niño cualquier medicamento desde la última visita (no incluyendo suero oral)?

SÍ

NO

6. ¿Por qué razón toma el niño (a) el/los medicamento(s)?

Para la diarrea/vomito



Para otra infección

7. ¿Se atendió al niño (a) en el centro/puesto de salud u otra clínica desde que comenzaron los síntomas?

Sí

NO

8. ¿Se atendió al niño (a) en la sala de emergencias (pero no hospitalizado) desde que comenzaron los síntomas?

Sí

NO

9. ¿El niño (a) fue hospitalizado desde que comenzaron los síntomas?

Sí

NO