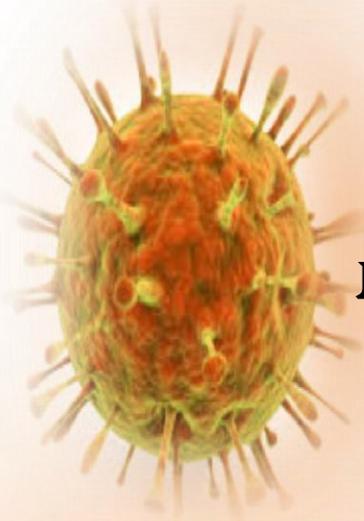


INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

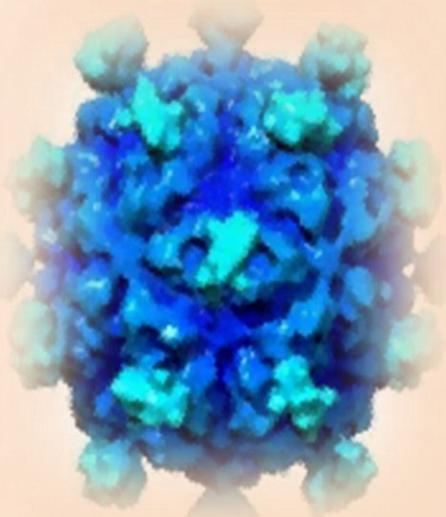
TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE MÁSTER EN VIROLOGÍA



**" IDENTIFICACIÓN DE ROTAVÍRUS,
NOROVÍRUS Y ASTROVÍRUS EN NIÑOS
MENORES DE 5 AÑOS CON GASTROENTERITIS
AGUDA. CUBA 2009-2016 "**

AUTOR: LIC. YAHISEL TEJERO SUÁREZ

TUTOR: DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES RIBAS .MD.DRC





INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE MÁSTER EN VIROLOGÍA

**"IDENTIFICACIÓN DE ROTAVIRUS, NOROVIRUS Y
ASTROVIRUS EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS CON
GASTROENTERITIS AGUDA. CUBA 2009-2016".**

AUTOR: LIC. YAHISEL TEJERO SUÁREZ

TUTOR: DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES RIBAS .MD.DRC

LA HABANA 2017

La confianza en sí mismo es el primer secreto del éxito

Ralph Waldo Emerson

AGRADECIMIENTOS.

A la vida por darme la sabiduría para vencer todos los obstáculos y así poder llegar a esta etapa.

A mis padres a quienes amo inmensamente, por todo su sacrificio para que yo lograra culminar esta fase y hoy les digo misión cumplida.

A mis hijos y esposo tesoros de mi vida, por haberme apoyado en todo momento y aceptar los sacrificios y decirles valió la pena nuestro esfuerzo.

A mis hermanos y sobrinos, por sus muestras de cariño, amor y por haberme alentado a ser cada día mejor.

A mis abuelos por su entrega durante mi vida.

A mi tía y primas por apoyarme y siempre decirme si se puede.

A Elianis y su familia por entrar en mi familia y apoyarme.

A mi tutora la Dra Angelita por su amistad, ayuda, conocimientos y estar siempre conmigo desde mis primeros pasos en este camino.

A mis compañeras de laboratorio, Yanislet y Daileny por apoyarme, aguantarme y darme fuerzas para seguir.

A Rosita, Carlos, Mayling, Aina, Rosmery, Elias, Oney y todos los compañeros de ITS, Respiratorio, Hepatitis, Enterovirus, Dengue que colocaron y siempre que pedía algo para el trabajo me ayudaron.

A las compañeras que pasaron por el laboratorio desde que empecé y que ahora se encuentran en otras instituciones, a ellas gracias por siempre acordarse de mí.

En fin a todo aquel que de alguna manera ha puesto su mano o su fe en este trabajo, mis más sinceros agradecimientos.

RESUMEN

El Rotavirus del grupo A, junto a otros virus como son los Norovirus y Astrovirus, se muestran como los principales agentes productores de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años. El objetivo de este estudio, fue identificar estos virus, conocer sus características epidemiológicas, así como los genotipos de Rotavirus y Norovirus circulantes. El estudio se realizó en 1375 muestras de heces de niños menores de 5 años que llegaron al Laboratorio de Diagnóstico del IPK entre enero 2009 y diciembre 2016. El diagnóstico de Rotavirus y Norovirus se llevó a cabo empleando la técnica ELISA y para la genotipificación de las muestras positivas, la TR-RCP. La identificación de Astrovirus se realizó en las muestras de los niños menores de 2 años solamente, a través de la TR-RCP. El Rotavirus fue identificado en el 49.2% de las muestras estudiadas (677/1375), siendo las combinaciones de genotipos G1 P [8] y G9 P [8], con un 55.1% y 5.3% respectivamente, las mayormente observadas. Los Norovirus se diagnosticaron en el 7.7% (106/1375) de los casos, encontrándose el genogrupo GII en el 100% de las muestras positivas. En los niños menores 2 años, el Astrovirus estuvo presente en un 2.7%(36/1313) de las muestras estudiadas. El análisis mostró en los niños menores 12 meses, un predominio de la coinfección Rotavirus –Norovirus con un 88%, mientras que en los de 13 a 24 meses fue la Rotavirus-Astrovirus con un 32%. La gastroenteritis aguda en los niños menores de 5 años es un importante problema de salud, por lo que fortalecer el conocimiento de los agentes asociados a esta enfermedad, permitirá desarrollar estrategias para lograr la prevención y el control de la misma.

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------------|----|
| 1.- Introducción..... | 1 |
| 2.- Objetivos | 3 |
| 3.- Revisión Bibliografica | 4 |
| 3.1.- Rotavirus..... | 4 |
| 3.1.1.-Historia..... | 4 |
| 3.1.2.-Características generales..... | 4 |
| 3.1.3.-Proteínas del virus. | 5 |
| 3.1.4.- Ciclo replicativo viral | 6 |
| 3.1.5.- Patogenia y Patología. | 7 |
| 3.1.6.- Cuadro clínico | 7 |
| 3.1.7.- Inmunidad. | 7 |
| 3.1.8.- Diagnóstico | 8 |
| 3.1.9.- Epidemiología. | 8 |
| 3.1.10.- Prevención y Control..... | 10 |
| 3.2.- Norovirus..... | 10 |
| 3.2.1.- Historia..... | 10 |
| 3.2.2.Características generales..... | 11 |
| 3.2.3.- Proteínas del virus. | 12 |
| 3.2.4.- Ciclo replicativo viral | 13 |
| 3.2.5.- Patogenia y Patología. | 14 |
| 3.2.6.- Cuadro clínico | 14 |
| 3.2.7.- Inmunidad. | 14 |
| 3.2.8.- Diagnóstico | 15 |
| 3.2.9.- Epidemiología. | 16 |
| 3.2.10.- Prevención y Control..... | 17 |
| 3.3.- Astrovirus | 18 |
| 3.3.1.- Historia..... | 18 |
| 3.3.2. Características generales..... | 18 |
| 3.3.3.- Proteínas del virus. | 19 |

| | |
|---|----|
| 3.3.4.- Ciclo replicativo viral | 20 |
| 3.3.5.- Patogenia y Patología. | 21 |
| 3.3.6.- Cuadro clínico | 21 |
| 3.3.7.- Inmunidad. | 21 |
| 3.3.8.- Diagnóstico | 22 |
| 3.3.9.- Epidemiología. | 23 |
| 3.3.10.- Prevención y Control..... | 23 |
| 4.- Materiales y Métodos | 25 |
| 4.1.- Definición del universo de estudio..... | 25 |
| 4.2- Variables y su operacionalización. | 25 |
| 4.3- Colección y almacenamiento de las muestras: | 25 |
| 4.4.- Técnicas empleadas en el estudio Rotavirus del grupo A..... | 26 |
| 4.5.- Técnicas empleadas en el estudio Norovirus..... | 30 |
| 4.6.- Técnicas empleadas en el estudio Astrovirus. | 31 |
| 4.7.- Algoritmo trabajo | 32 |
| 4.8.- Procesamiento de los datos | 33 |
| 4.9.- Aspectos éticos | 34 |
| 5.- Resultados y discusión | 35 |
| 5.1.- Estudio de Rotavirus | 35 |
| 5.2.- Estudio de Norovirus..... | 43 |
| 5.3.- Estudio de Astrovirus | 49 |
| 5.4.- Coinfección de los tres virus estudiados | 51 |
| 6.- Conclusiones..... | 54 |
| 7.- Recomendaciones..... | 55 |
| 8.- Referencias Bibliográficas | 56 |
| 9.- Anexos... .. | 68 |

1.-INTRODUCCIÓN.

La gastroenteritis aguda es una causa importante de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años a nivel mundial. Se estima que se producen más de 700 millones de casos de diarrea aguda con una mortalidad muy alta encontrándose cifras entre 3.5 y 5 millones de fallecidos anualmente, la mayor parte en países en vías de desarrollo (de Oliveira y cols., 2015; Steele y cols., 2016).

A pesar de que la gastroenteritis asociada a bacterias y parásitos decreció en frecuencia como resultado de los avances alcanzados en la salud pública, muchos de los casos en los cuales la etiología es desconocida han sido relacionados con los virus.

Estos microorganismos que producen diarrea aguda, fueron conocidos como agentes etiológicos a principios de la década de 1970 con el descubrimiento de Kapikian y colaboradores mediante inmunomicroscopía electrónica de partículas virales en heces procedentes de un brote de gastroenteritis en Norwalk (Kapikian y cols., 1972). Un año después Bishop y colaboradores observaron por microscopía electrónica partículas víricas en células epiteliales de mucosa duodenal en niños con diarrea aguda, partículas que recibieron el nombre latino de rota por su forma característica de rueda de carro (Bishop y cols., 1973). Desde este descubrimiento se han definido tres grandes categorías de virus asociados con gastroenteritis en humanos: Rotavirus, Calicivirus humanos y Astrovirus. Todos son virus con ARN (ácido ribonucleico) como material genómico y sin envoltura lipoproteica, que pueden producir desde una infección subclínica hasta un cuadro grave de diarrea aguda (Wilhelmi y cols., 2003).

Diferentes estudios muestran al Rotavirus del grupo A como el principal agente productor de gastroenteritis en niños menores de cinco años (Ribas y cols., 2011; Zhang y cols., 2017). En abril del año 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó un estimado global de 215 000 muertes por Rotavirus. En la región de las Américas se calcula que el Rotavirus causa aproximadamente 75 000 hospitalizaciones y cerca de 15 000 muertes anualmente, mientras que en África sub-sahariana causa el 42 % de las hospitalizaciones con 121 000 defunciones. Igualmente en Asia ocurren al año alrededor de 63 000 casos fatales, siendo la India el país con la mayor tasa lo que representa el 22 % del total de muertes por Rotavirus a nivel mundial (Blanco y Fernández, 2016).

En Cuba, la gastroenteritis en niños menores de 5 años representa entre un 5 - 6.5% de todas las consultas médicas que se realizan cada año, requiriendo ingreso hospitalario entre el 15 y el 30% de los casos, produciéndose un número considerable de hospitalizaciones (*Aguilar y cols., 2009; Ribas y cols., 2016*). La mayoría de estos niños presentan una gastroenteritis viral aguda producida por Rotavirus del grupo A con un porcentaje entre un 18 a un 60 % (*Ribas y cols., 2015*) y el resto corresponde a otros agentes de igual importancia como son los Norovirus y Astrovirus.

El desarrollo de las técnicas de biología molecular para el estudio de estos virus en la población infantil cubana tiene gran importancia, nos permite conocer los genotipos circulantes en la comunidad, la periodicidad con que estos cambian y crean pautas para futuros estudios que ayuden a decidir la introducción o no de la vacuna contra el Rotavirus en la población infantil (*Ribas y cols., 2016*).

En el presente trabajo se realizó un estudio prospectivo transversal desde enero de 2009 hasta diciembre del 2016 en niños menores de 5 años con gastroenteritis aguda, con la finalidad de conocer las características epidemiológicas presentes en los mismos e identificar virus productores de diarreas, para lo cual se trazaron los siguientes objetivos.

2.-Objetivos.

Objetivo general

Analizar la etiología de la gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años ocurrida en Cuba entre enero 2009 y diciembre 2016.

Objetivos específicos

- 1.- Identificar Rotavirus del grupo A, Norovirus y Astrovirus en muestras de heces de niños menores de 5 años con gastroenteritis aguda.
- 2.-Identificar los genotipos de Rotavirus y Norovirus circulantes en la población infantil cubana.
- 3.-Determinar el comportamiento epidemiológico de las diarreas causadas por estos virus.

3.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

3.1.-Rotavirus

3.1.1.-Historia.

El Rotavirus en humanos fue inicialmente descrito en 1973 por Ruth Bishop en Australia quién describió “partículas virales” por microscopía electrónica en capas finas de mucosa duodenal de niños con diarrea severa no asociada a bacterias. En base a la morfología de estos virus, cuya apariencia al microscopio electrónico era la de una rueda de carreta antigua, fueron bautizados con el nombre de Rotavirus, del latín rota, que significa rueda (*Bishop y cols., 1973; Estes y cols., 1999*).

3.1.2.-Características generales.

Rotavirus pertenece taxonómicamente a la familia Reoviridae. Son partículas virales de forma icosaédrica y sin cubierta lipídica, su genoma se encuentra formado por once segmentos de ARN de doble cadena, que codifican a seis proteínas estructurales y seis no estructurales.

Las partículas maduras, que mide entre 70-75 nm de diámetro, presentan una cápside proteica de doble capa, una externa y otra interna (*Castello y cols., 2004*). Dentro de la interna hay una tercera capa, el núcleo que encierra al genoma (Fig.1).

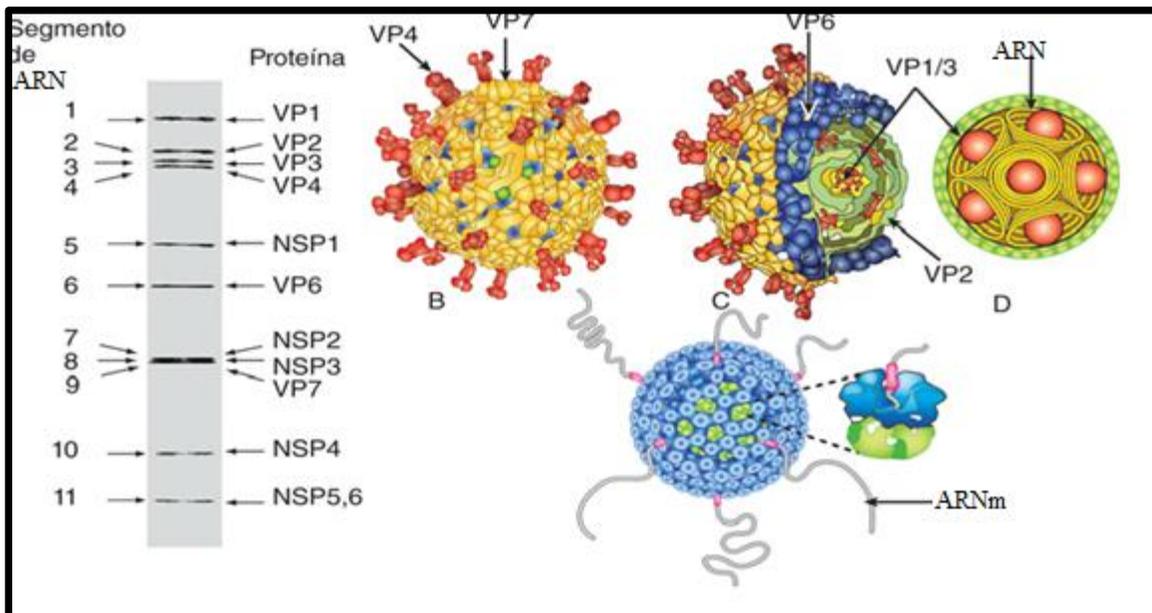


Figura 1: Proteínas estructurales de Rotavirus. (Tomado de Usonis y cols., 2012).

3.1.3.-Proteínas del virus.

El virión está formado por seis proteínas estructurales (*VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7*). Aparte de estas proteínas, hay seis más *no estructurales* (NSP), producidas únicamente en las células infectadas denominadas *NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6*.

Por lo menos seis de las doce proteínas codificadas por el genoma vírico llevan ARN asociado y la función de estas proteínas no están bien explicadas; se cree que están implicadas en la síntesis y empaquetamiento del ARN, transporte del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) hacia la zona de replicación del genoma y en la traslación de ARNm y regulación de la expresión génica (*Greenberg y cols., 2009*).

3.1.3.1.-Proteínas estructurales.

La VP1 está situada en el núcleo del virus y es una ARN polimerasa. En una célula infectada produce los transcritos de ARNm que sintetizan las proteínas víricas y duplica el genoma para producir nuevas partículas víricas (*Lee y cols., 2001*).

Las proteínas VP2 y VP3 forman parte de la capa más interna del virión, donde la VP2 va unida al genoma de ARN (*Chandra y cols., 1999*) y la VP3 es una enzima llamada *guanilil transferasa*, que produce la caperuza en la posición 5' del ARN, durante la modificación postranscripcional del ARNm (*Villena, 2003*).

La proteína VP6 también se encuentra en la cápside interna, es la determinante de las reactividades de grupo dependiendo de los diferentes epítopes presentes en esta proteína, habiéndose constatado hasta ahora 7 grupos (A, B, C, D, E, F y G). Los grupos A, B y C han sido aislados tanto en humanos como en animales, mientras que los grupos D, E, F y G han sido aislados solo en animales. La mayoría de las infecciones por Rotavirus en humanos son causadas por Rotavirus del grupo A (*Linhares y cols., 2002*).

En la parte externa del virión se encuentran situadas las proteínas VP4 y VP7. La VP4 forma una protuberancia, que es capaz de unirse a los receptores celulares para entrar en su interior. La estructura de esta proteína determina la virulencia del virus y el tipo P de la cadena. La proteína VP7 determina el tipo G de la cadena, y junto con VP4, está implicada en la respuesta inmunitaria al virus (*Patton y cols., 2004*).

3.1.3.2.-Proteínas no estructurales.

Las NSP1 y NSP2 son proteínas no estructurales de unión a ARN, donde las NSP1 es transcrita por el gen 5 y la NSP2 se acumula en inclusiones citoplasmáticas y es necesaria en la replicación del genoma (*Desselberger, 2010*). La NSP3 está unida a ARNm en las células infectadas, es responsable de la finalización de la síntesis proteica celular.

La proteína no estructural NSP4 es una enterotoxina viral que induce diarrea, fue la primera enterotoxina viral que se descubrió (*Chen y cols., 2012*). La NSP5 está codificada por el segmento 11 del genoma vírico de Rotavirus A, y en las células infectadas se acumula en el citoplasma (*Desselberger, 2010*). La NSP6 es una proteína de unión a ácido nucleico, es codificada por el gen 11 en un marco abierto de lectura (MAL) desfasado.

3.1.4.-Ciclo replicativo viral.

Durante el proceso de entrada, la partícula viral pierde las proteínas de la capa externa y se activa la transcripción que depende de la ARN polimerasa viral (VP1) (*Guerrant y cols., 1992*). Los transcritos virales recién sintetizados tienen dos funciones; por una parte funcionan como ARNm que dirigen la síntesis de las seis proteínas estructurales (VPs) y las seis proteínas no estructurales (NSPs) del virus y por la otra, sirven como blanco para la síntesis de la cadena negativa (que es complementaria al ARNm) y da lugar al ARN de doble cadena (ARNds) que constituye el genoma viral (*Steele y cols., 1994*). Una vez que se acumula una masa crítica de proteínas virales, de 3 a 4 horas después de la infección, se forman en el citoplasma celular estructuras electrodensas llamadas viroplasmos en donde se ha propuesto que se lleva a cabo la replicación del genoma viral. En estas estructuras también se ensamblan las partículas de doble capa que posteriormente geman al interior del retículo endoplásmico y adquieren durante este proceso la tercera capa proteica, dando lugar a la partícula madura. Las proteínas NSP2 y NSP5 son esenciales para la formación de los viroplasmos, ya que en ausencia de cualquiera de ellas no se forman estas estructuras y el ciclo replicativo del virus se interrumpe (*Arguelles y cols., 2000*).

3.1.5.-Patogenia y Patología.

Tras producirse la infección por vía fecal-oral, el virus infecta las células maduras de las vellosidades del intestino delgado. La invasión de las células epiteliales del intestino delgado por parte del virus ocasiona la destrucción de las células absortivas maduras. Las células lesionadas de las vellosidades son sustituidas por células de las criptas inmaduras que no pueden absorber eficazmente los carbohidratos ni otros nutrientes, lo que da lugar a una diarrea osmótica. La gravedad de la diarrea por Rotavirus es proporcional a la intensidad de la lesión en la mucosa del intestino delgado (*Matsuno y cols., 2002*).

3.1.6.-Cuadro clínico.

La infección por Rotavirus está precedida por un periodo de incubación de 24-72 horas, los síntomas oscilan desde fiebre, vómito y diarrea acuosa sin sangre de corta duración, hasta gastroenteritis severa con deshidratación considerable y acidosis, que pone en peligro la vida. La infección también puede estar acompañada por infección de las vías respiratorias altas. El vómito y la fiebre ceden dentro de los primeros 2-3 días de la enfermedad, mientras que la diarrea suele persistir por 5-8 días (*Rondon, 2006*).

La primoinfección aparentemente deja una inmunidad parcial, pues si bien son frecuentes las reinfecciones, éstas tienden a ser asintomáticas (*Nakagomi y Nakagomi, 2002*). La enfermedad comienza de forma aguda y es usual el aumento de enzimas hepáticas en alrededor de las dos terceras partes de los niños internados por diarrea producida por rotavirus (*Cunliffe (a) y cols., 2001*).

3.1.7.-Inmunidad.

La inmunidad relativa a la infección por Rotavirus es adquirida después de la infección primaria en la infancia. La misma no es completa y los adultos con niveles bajos de anticuerpos pueden ser sintómicamente infectados. Los niños pueden ser infectados varias veces durante sus vidas y después de una infección natural, el 38% de los enfermos quedan protegidos contra cualquier infección subsecuente, 77% contra diarrea, y 87% se mantienen protegidos contra diarrea severa (*Nakagomi y Nakagomi, 2002*).

Los componentes de la respuesta inmune necesaria para suministrar protección contra Rotavirus no han sido completamente definidos. La inmunoglobulina A salival y fecal específica para Rotavirus, IgA sérica y la IgG, anticuerpos específicos del tipo G, y la inmunidad celular reflejan la infección natural y la enfermedad. Las respuestas de los

anticuerpos a las primeras infecciones son primariamente homotípicas al tipo G infectante. Las respuestas subsecuentes son más amplias y reflejan una respuesta heterotípica con la detección de anticuerpos neutralizantes específicos para Rotavirus en suero después de la infección aguda (*Hoshino y Kapikian, 2000*).

3.1.8.-Diagnóstico.

El diagnóstico de laboratorio de Rotavirus está basado fundamentalmente en su detección en las heces, se emplean varias técnicas tales como son la microscopía electrónica que tiene la posibilidad de visualizar directamente las partículas infectivas aisladas de las muestras, aunque no permite hacer la diferenciación entre los grupos de Rotavirus y necesita de un personal altamente capacitado, por lo cual es un método limitado como herramienta diagnóstica (*Riverón y cols., 1989*).

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE: siglas del inglés Polyacrylamide Gel Electrophoresis) es otro método usado para la detección de Rotavirus que se fundamenta en la separación electroforética de los segmentos de ARN del virión.

EL ensayo inmunoenzimático (ELISA) es el método más utilizado para confirmar la presencia de Rotavirus por su alta sensibilidad, utiliza anticuerpos policlonales y monoclonales que detectan antígenos específicos de grupo (*Parashar y cols., 2006*).

La TR-RCP (Trascrición - Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa) es un método molecular que detecta la presencia de ARN vírico, permite caracterizar los diferentes aislamientos determinando el genotipo G y P por RCP semianidada, disponiendo de los cebadores adecuados(*Rahman y cols., 2005*).

3.1.9.-Epidemiología.

Los Rotavirus se han asociado de manera consistente a ciento once millones de episodios de gastroenteritis infantiles, constituyendo el agente etiológico que de manera aislada ocupa la mayor frecuencia como causa de diarrea en menores de dos años de edad (*Freeman y cols., 2008*).

En los países desarrollados, donde las diarreas de origen bacteriano han disminuido, las infecciones por Rotavirus son la primera causa de diarrea en el niño, presentándose en invierno con muy pocos cuadros fuera de este pico estacional, mientras que en los países en vías de desarrollo la enfermedad ocurre durante todo el año sin variaciones según las

estaciones, aunque pueden presentarse picos de Febrero a Mayo y de Septiembre a Noviembre (*Cáceres y cols., 2005*).

El Rotavirus del grupo A es el más importante epidemiológicamente y el que con más frecuencia circula (*Freeman y cols., 2008*). Dentro de este grupo las cepas circulantes en el mundo varían ampliamente entre las distintas regiones donde el G1P[8] fue el genotipo más frecuente en las Américas (43 %), Europa (33%) y el Pacífico Occidental (47%), es por lo tanto el genotipo de Rotavirus A más frecuentemente detectado a nivel mundial. Sin embargo, la prevalencia de G4P [8] (23%) en los países europeos y G3P [8] (25%) en el Pacífico Occidental fue notable. En el Mediterráneo Oriental, el genotipo G2P [4] (41%) fue el más comúnmente identificado, seguido de una proporción sustancial de cepas poco comunes (31%). Los datos de África y del sudeste asiático revelaron una imagen diferente, donde genotipos de rotavirus no comunes, como G2P [6], G3P [6], G12P [8], G12P [6] y G9P [6], fueron predominantes (*Jain y cols., 2014*).

En Cuba en estudios realizados en el año 2015, las combinaciones más comunes identificadas fueron G9P [8] (28.3 %) y G1P [8] (10%) encontrándose además nuevas combinaciones de genotipos como son G2P [8] y G9P [4] (*Ribas y cols., 2015*).

La principal ruta de transmisión de los Rotavirus es la vía fecal-oral, aunque también se ha especulado que el contacto persona a persona, con secreciones respiratorias, y con superficies contaminadas pudieran ser fuentes de transmisión, ya que los altos índices de infección por este virus en los primeros tres años de vida en todo el mundo son independientes de las condiciones higiénico- sanitarias. La infección es especie-específica ya que la transmisión de Rotavirus entre el hombre y animales no ha sido documentada, a pesar de que las cepas aisladas de humanos tienen una alta homología genética con las cepas aisladas de animales (*Inove y Kitahori, 2006*).

El período de incubación de este virus es de uno a tres días, provocando un síndrome clínico conocido como gastroenteritis viral que varía de una diarrea leve a severa que ocasiona deshidratación a veces fatal. Cabe mencionar que puede existir una infección simultánea con dos o más cepas diferentes de Rotavirus, tras la exposición a ambientes altamente contaminados (*Arista y cols., 2003*).

3.1.10.-Prevención y Control.

La mejora de las medidas higiénicas y la disponibilidad de soluciones de rehidratación oral en todo el mundo han disminuido la mortalidad de la enfermedad, pero no se han producido cambios apreciables en la incidencia de diarrea causada por este virus (*Parashar y cols., 2006*). La vacunación frente a Rotavirus parece ser en estos momentos la mejor estrategia en la prevención de la infección, pues evita la aparición de gastroenteritis grave por rotavirus, disminuye la mortalidad y la necesidad de ingreso hospitalario por este motivo (*Glass y cols., 2006*).

En la actualidad existen dos vacunas licenciadas, precalificadas por OMS y que están disponibles en el Mercado, Rotarix[®] desarrollada por GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium (GSK) , monovalente de origen humano de virus vivo atenuado .La cepa inicial era un Rotavirus humano con especificidad G1P[8] , aislado de un niño con gastroenteritis (*Vizzi, 2009*).

La RotaTeq[®] producida por Merck and Co. Inc, West Point, PA, USA, recombinante y pentavalente de origen humano-bovino, utiliza la cepa de Rotavirus bovino WC3. Contiene cinco cepas obtenidas por recombinación genética que expresan la proteína de superficie VP7 de los Rotavirus humanos de los tipos G1, G2, G3 y G4 y la proteína VP4 del Rotavirus humano correspondiente al genotipo P[8] (*Tamayo y Moreno, 2007*).

3.2.-Norovirus

3.2.1.-Historia

Zahorsky en 1929, describió una enfermedad caracterizada por un inicio repentino de vómitos y diarreas que tenía una mayor incidencia durante los meses de invierno, a la cual llamó enfermedad de vómitos invernales (siglas del inglés Winter Vomiting Diseases). No fue hasta 1972 que Kapikian y colaboradores, en muestras obtenidas de un brote de gastroenteritis ocurrido en 1968 en una escuela primaria de Norwalk, Ohio, descubrieron la etiología de este síndrome mediante el análisis por inmuno- microscopía- electrónica de filtrados de heces. Estos virus fueron identificados como virus Norwalk, el agente prototipo del género Norovirus (*Zahorsky , 1929; Kapikian y cols., 1972; Patel y cols., 2009*).

Antes de 1993, los Norovirus fueron diagnosticados en muestras de heces por microscopía electrónica fundamentalmente, siendo registrados en la literatura por su estructura viral

pequeña y redonda como SRV (siglas del inglés Small Round Virus) y posteriormente se les denominó virus parecido al Norwalk (siglas del inglés Norwalk Like Virus) (*Glass y cols., 2009*).

3.2.2.-Características generales.

Norovirus corresponde a la familia Caliciviridae, el virión se compone de una cápsida y un ácido nucleico de 27 a 30 nanómetros (nm) de diámetro, no son envueltos, la nucleocápsida es redonda y exhibe una simetría icosaédrica. Es una molécula lineal de simple cadena de ARN con polaridad positiva de aproximadamente 7.7kb de longitud y codifica para tres MAL. El MAL 1 va desde el extremo amino (N) hasta el carboxilo (C) terminal, se inicia en la proteína p48, continúa en la NTPasa, p22, VPg, y termina en la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) (*Morillo y Timenetsky, 2011*). El MAL 2 codifica para la principal proteína de la cápsida viral (VP1) y el MAL 3, considerado la región más variable del genoma de Norovirus, codifica para la menor proteína estructural (VP2). El genoma actúa como ARNm en la célula hospedera, por lo que una vez dentro de ésta, se une a sus ribosomas y comienza la traducción de las proteínas virales (*Shirato, 2011*).

En 2005 fue establecida una clasificación basada sobre el análisis filogenético de 164 secuencias del MAL 2, lo cual permitió subdividir a los Norovirus en cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV, GV) constituidos por al menos treinta y un genotipos: 8 en el genogrupo GI, 19 en GII, 2 en GIII, 1 en GIV y 1 en GV. Los genogrupos GI y GII son los que presentan mayor diversidad genética y al igual que el genogrupo IV infectan a humanos, mientras que GIII y GV se encuentran en el ganado y los ratones respectivamente (*Morillo y Timenetsky, 2011*)(Fig. 2).

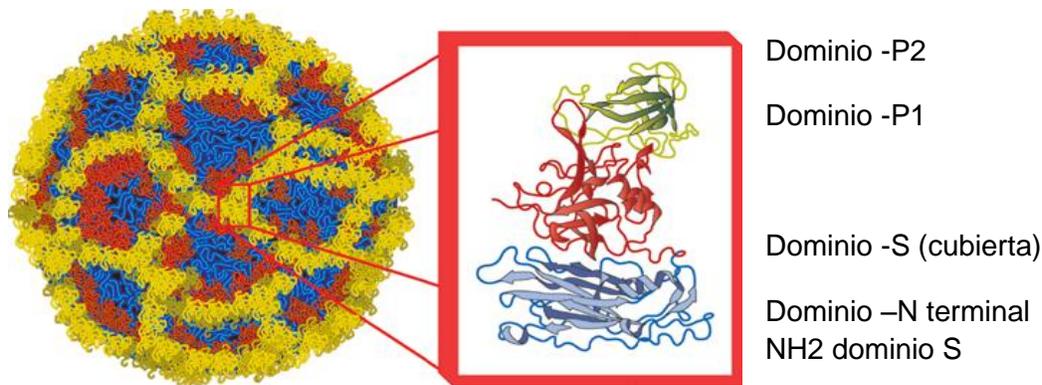


Figura 2: Estructura de la cápside Norovirus (Tomado de Prasad y cols., 1999).

3.2.3.-Proteínas del virus.

3.2.3.1.-Proteínas estructurales.

El virión de Norovirus está compuesto por 90 dímeros de la proteína principal VP1 y una o dos copias de la proteína menor de la cápsida VP2 (*Glass y cols., 2009*). La Proteína VP1 está compuesta por una cadena aproximadamente de 530 a 555 aminoácidos (aa) y tiene un peso molecular de 58-60kDa, es la proteína principal de la cápsida viral involucrada en el proceso de replicación (*Karst, 2010*). La VP2 está compuesta por aproximadamente de 208-268 aa, con un peso molecular de 22-29 kDa, exhibe una secuencia variable y extensa entre sus cadenas, es la proteína estructural menor que está presente en una de dos copias por virión. Se considera que la misma podría actuar como empaquetador del ARN (*Glass y cols., 2009*).

3.2.3.2.-Proteínas no estructurales.

La proteína p48 está ubicada en el extremo N-terminal de la poliproteína traducida a partir del MAL 1, es un tanto variable en longitud y en secuencia entre los genogrupos I y II. Como la replicación del genoma viral ocurre sobre membranas intracelulares, p48 puede coordinarse con las propiedades de proteína A para anclar el complejo de replicación a membranas. La Proteína p41 tiene actividad NTPasa y no helicasa (*Hardy, 2005; Pfister y Wimmer, 2001*).

La proteína p22 ocupa una posición en el genoma del Norovirus, está involucrada en la inhibición de la secreción de proteínas de la célula hospedera y tiene una participación activa en el proceso de formación del complejo de replicación (*Karst, 2010*).

La VPg es una proteína de aproximadamente 15kDa unida de forma covalente al genoma y al ARNm, tiene varias funciones en el ciclo de replicación. Experimentos directos sugieren un papel para VPg en la traducción del ARN viral, debido a que su eliminación del genoma

ocasiona una disminución de los niveles de proteínas virales sintetizadas in vitro, aunque la fidelidad de iniciación parece estar intacta. Por lo que VPg participa en el reclutamiento de ribosomas hacia el ARN viral (*Daughenbaugh y cols., 2003*).

La ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) de Norovirus se extiende desde el aminoácido 1281 hasta el extremo carboxilo terminal de la poliproteína traducida a partir del MAL 1 y exhibe elementos catalíticos y estructurales característicos de RdRp de otros virus de ARN de simple cadena positiva (*Green , 2007*)(Fig. 3).

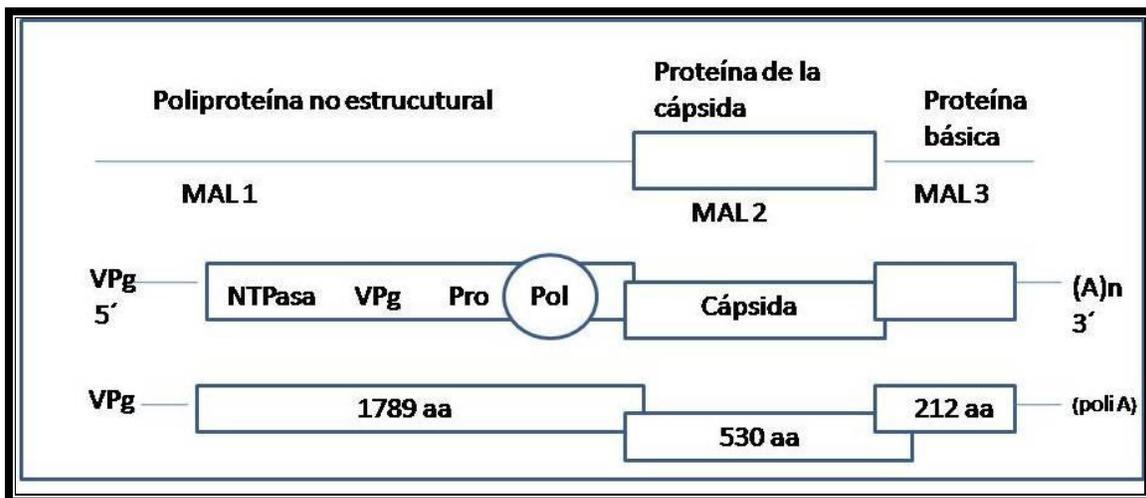


Figura 3. Organización genómica de Norovirus. (Tomado de Morillo y Timenetsky, 2011).

3.2.4.-Ciclo replicativo viral.

Los Norovirus se replican en el citoplasma del enterocito. La cadena positiva de ARN funciona como ARNm, el cual es traducido apenas ocurre la entrada de la partícula viral en la célula, este evento de traducción inicial produce proteínas no estructurales que son empleadas en el proceso de replicación del genoma viral y en la producción de una nueva progenie. La replicación del genoma ocurre en las membranas intracelulares, por lo que es posible observar un gran cambio en la morfología de las mismas cuando la célula está infectada (*Green, 2007*). Las proteínas no estructurales son traducidas a partir del ARN genómico, mientras que el ARN subgenómico sirve como mensajero para la traducción de las dos proteínas estructurales VP1 y VP2 (*Karst, 2010*).

3.2.5.-Patogenia y Patología.

El estudio de los mecanismos moleculares de la patogenia de Norovirus está limitado por su incapacidad de replicarse in vitro. Se ha demostrado que la infección depende de la presencia de antígenos de grupo histosanguíneo específicos (HBGA, siglas del inglés *histo-blood group antigens*), que actúan como receptores en el intestino de los hospederos susceptibles (*Reeck y cols., 2010*).

Estos virus se unen a los receptores celulares a través de un dominio específico de la proteína de la cápsida. Ésta posee dos dominios funcionales: el dominio S (la porción interna de la cápsida) y el dominio P (la porción protuberante). El dominio P se divide en los subdominios P1 (el enlace entre el interior y la región P2) y P2 (que se une al receptor celular y es la región más externa de la cápsida) (*Reeck y cols., 2010*).

3.2.6.-Cuadro clínico.

La enfermedad se caracteriza clínicamente por la aparición brusca de náuseas, vómitos, diarreas no sanguinolentas, fiebre y dolor abdominal. Los vómitos son muy frecuentes en los niños mayores de 1 año, mientras que en los lactantes suelen desarrollarse sólo las diarreas (*Kaplan y cols., 1982*). Estos síntomas pueden persistir en pacientes hospitalizados y en niños menores de 11 años, entre 4 y 6 días, aunque usualmente los síntomas se resuelven en un periodo de 3 días (*Ribes y Buesa, 2010*).

3.2.7.-Inmunidad.

En investigaciones realizadas con la participación de voluntarios, permitieron conocer que individuos infectados con Norovirus desarrollaron una respuesta inmunitaria de corta duración, entre 6 y 14 semanas (*Johnson y cols., 1990*).

Contrariamente a lo esperado, estos estudios mostraron que las personas con títulos elevados de anticuerpos séricos o de coproanticuerpos, tenían más probabilidad de infectarse con los virus, que aquellas con concentraciones bajas de los mismos. La explicación para este hecho fue, que los voluntarios con ausencia de anticuerpos frente a una cepa determinada de Norovirus, no eran genéticamente susceptibles a ella. También se observó, que los individuos que fueron sintomáticos en un momento determinado, podían reinfectarse cuando se les volvía a inocular entre 27 y 42 meses más tarde (*Karst, 2010*).

La respuesta serológica de IgG virus específica especialmente, es inducida y persiste durante meses después de la infección, mientras que la respuesta serológica de IgA e IgM es de corta duración (*Karst, 2010; Ribes y Buesa, 2010*).

La respuesta inmunológica mediada por células fue estudiada también en voluntarios, los cuales fueron inoculados de forma oral con partículas virales VLPs (siglas del inglés viral like particle), conformadas por la proteína principal de la cápsida de Norovirus. Las VLPs estimulan la inmunidad mediada por células, que incluye la proliferación de la respuesta virus específico. Al incrementarse el interferón gamma en ausencia de la producción de la interleukina 4 (IL-4), se sugirió un patrón dominante de células T auxiliaoras 1 en la producción de citoquininas (*Green, 2007*).

3.2.8.-Diagnóstico.

El diagnóstico clásico de Norovirus es a través de la microscopía electrónica, detectándose partículas virales de 27- 30nm de diámetro. Este método es empleado en laboratorios de salud pública de muchos países, sin embargo, se requiere de un personal altamente capacitado y un costoso equipamiento que hacen impracticables los estudios epidemiológicos o clínicos (*Morillo y Timenetsky, 2011*).

Los métodos inmunoenzimáticos tipo ELISA, emplean las proteínas de la cápsida de Norovirus expresadas en baculovirus como reactivo en el ensayo inmunoenzimático y permiten el diagnóstico directamente desde las heces. La desventaja de estos métodos consiste, en que poseen una elevada especificidad pero una moderada sensibilidad, por lo que los resultados pueden variar según las cepas circulantes y deben ser confirmados por TR-RCP. Sin embargo, el desarrollo de nuevas generaciones de estuches, como el RIDASCREEN de 3ra generación, los cuales son más sensibles y específicos, traen grandes beneficios para el diagnóstico rápido de Norovirus principalmente durante los brotes de EDA (*Morillo y Timenetsky, 2011*).

Una vez conocida la secuencia nucleotídica de su genoma, la TR-RCP se ha convertido en la técnica de referencia para el diagnóstico, lo que nos permite detectar Norovirus en muestras clínicas y ambientales, en agua y alimentos. Esta técnica, junto a la secuenciación nucleotídica, es particularmente útil en los estudios epidemiológicos para conocer el origen de un brote o caracterizar cepas (*Ribes y Buesa, 2010*).

Las técnicas TR-RCP en tiempo real TaqMan y SYBR Green cuantifican secuencias específicas de ADN(ácido desoxirribonucleico) o ARN en muestras clínicas y la expresión de genes emite luz fluorescente desde el primer ciclo de amplificación, características que aventajan a la TR-RCP convencional, en cuanto a, especificidad, sensibilidad y reproducibilidad (*Morillo y Timenetsky, 2011*).

3.2.9.-Epidemiología.

Los Norovirus infectan a personas de todas las edades, sin embargo, son considerados grupos de riesgo los niños, ancianos y los pacientes inmunodeprimidos (*Patel y cols., 2009*). Son la causa más frecuente de brotes epidémicos de diarrea no bacteriana, produciéndose durante todo el año, aunque existe una mayor incidencia durante los meses más fríos en los países de clima templado, sin embargo, también se han descrito en la primavera y el verano en niños hospitalizados(*Boga y cols., 2004*).

Varios atributos patogénicos de Norovirus facilitan su propagación en epidemias, estos incluyen su baja dosis infecciosa, la prolongada duración de la viabilidad del virión sobre las superficies contaminadas, la estabilidad del virión a relativamente altas concentraciones de cloro y en un amplio rango de temperaturas. La posibilidad de una reinfección debido a la falta de una completa protección contra las diversas cadenas de Norovirus y a la inadecuada duración de la inmunidad, constituye otro factor e interés en su propagación (*Glass y cols., 2009*).

En la mayoría de los brotes, las cepas más comunes son los genotipos pertenecientes al genogrupo II, especialmente el genotipo GII.4, el cual predominó durante los últimos 20 años en todo el mundo, causando pandemias de gastroenteritis (*Donaldson y cols., 2010*).

El modo de transmisión más frecuente es la vía fecal-oral. Los virus se propagan muy rápido en establecimientos como hospitales, cruceros, campamentos, colegios y guarderías, hoteles o residencias produciendo brotes epidémicos, esto puede deberse en gran medida, a la dispersión a través del vómito, tanto por la contaminación de fómites como por la formación de aerosoles, también se ha demostrado la persistencia de partículas virales sobre superficies contaminadas durante el curso de un brote (*Ferreira y cols., 2010*).

Se ha descrito que los primeros casos de un brote aparecen tras la exposición al agua o alimentos contaminados y la propagación de la infección se produce posteriormente por los contactos de persona a persona. Los alimentos pueden resultar contaminados directamente

desde su origen (moluscos, verduras o bayas cultivadas o silvestres) o por manipulación a partir de personas infectadas, dentro de ellos, los moluscos (ostras, almejas, mejillones, etc.) son especialmente peligrosos, porque concentran activamente los virus al filtrar grandes cantidades de agua y con frecuencia se consumen crudos o escasamente cocinados, sin embargo, los principales alimentos que transmiten la enfermedad son las comidas preparadas y listas para consumir, especialmente aquellas que requieren manipulación y no cocción (*Le Guyader y cols., 2009*).

El período de incubación de una infección por Norovirus es generalmente, de 24-48 horas. Mientras que la transmisibilidad incluye toda la fase aguda de la enfermedad hasta 48 horas después de la finalización de los síntomas (*Ferreira y cols., 2010*).

3.2.10.-Prevención y Control.

Detener la transmisión de la enfermedad constituye la primera estrategia para la prevención contra Norovirus, especialmente en hospitales y en centros de cuidados de niños. El lavado de las manos con agua y jabón, antes y después del contacto con un paciente u objetos usados por el mismo y la limpieza de las superficies con hipoclorito al 2%, deben llevarse a cabo sobre todo, si el paciente ha sido diagnosticado con gastroenteritis aguda. El lavado de los alimentos y de las manos durante su elaboración, así como de los envases donde se preparan los alimentos crudos, son medidas que evitan la transmisión a través de alimentos contaminados (*Morillo y Timenetsky, 2011*).

La infección por Norovirus induce una gastroenteritis mediana y autolimitada, que normalmente se resuelve sin complicaciones. El tratamiento está encaminado a la rehidratación mediante fluidos orales y electrolitos, reponiendo las pérdidas de los mismos ocasionados por las diarreas y vómitos característicos de la enfermedad (*Morillo y Timenetsky, 2011*).

El desarrollo de una vacuna efectiva ha encontrado diversos obstáculos, entre ellos, la falta de correlación entre la respuesta inmune y la protección a la infección, la corta duración de la respuesta de anticuerpos siguiendo un episodio de la enfermedad y la diversidad genética y antigénica de Norovirus (*Hernández y Lecuona, 2015*).

3.3.- Astrovirus

3.3.1.-Historia.

Los Astrovirus fueron identificados por primera vez como agentes infecciosos causantes de gastroenteritis en el año 1975 durante la investigación de un brote de diarrea y vómitos entre los niños de una sala de maternidad (*Appleton y Higgins, 1975*). La observación de muestras de heces de niños enfermos bajo el microscopio electrónico en busca de un agente causal puso de manifiesto la presencia de unas partículas víricas de morfología distinta a otros virus conocidos hasta el momento asociados con gastroenteritis como Rotavirus o Calicivirus (*Guix, 2003*). El término Astrovirus fue propuesto meses más tarde a su descubrimiento por Madeley y Cosgrove (1975), la misma deriva de la palabra “astron”, que significa estrella en griego, y hace referencia a su estructura estrellada presente en la superficie de la cápside (*Madeley y Cosgrove, 1975*).

3.3.2.-Características generales.

En 1993 se estableció la familia Astroviridae dentro de los virus ARN. Esta familia comprende virus humanos y animales, se divide actualmente en dos géneros. El género Mamastrovirus el cual lo componen virus humanos, felinos, ovinos, porcinos y bovinos, mientras que el género Avastrovirus incluye Astrovirus de pavos, patos y el virus de la nefritis aviar (*Matsui y Greenberg, 2001*).

Se han descrito ocho serotipos, siendo el más prevalente a nivel mundial el serotipo 1 (*van Regenmortel y cols., 2000*). Son partículas icosaédrica que miden de 28 a 30 nm de diámetro y sin cubierta. El genoma de los Astrovirus está constituido por una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva. Este ARN es poliadenilado y codifica para tres MAL. Los MAL1a y MAL1b, localizados en los extremos 5', codifican proteínas no estructurales, concretamente una serin-proteasa y una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp), respectivamente, implicadas en la replicación viral. EL MAL2, localizado en el extremo 3', codifica una poliproteína de 87 kD que, por proteólisis, da lugar, al menos a tres proteínas estructurales (VP26, VP29 y VP32) componentes de la cápsida del virus. Aunque la estructura proteica de los Astrovirus no es todavía bien conocida, estudios con anticuerpos monoclonales sugieren que la VP26 y/o la VP29 pueden ser importantes en la neutralización viral, la inmunidad heterotípica y la unión del virus a las células diana. Además, estas proteínas estructurales,

especialmente la VP26, parecen ser las responsables de la variación antigénica observada entre los distintos serotipos (Méndez y cols., 2004) (Fig. 4).

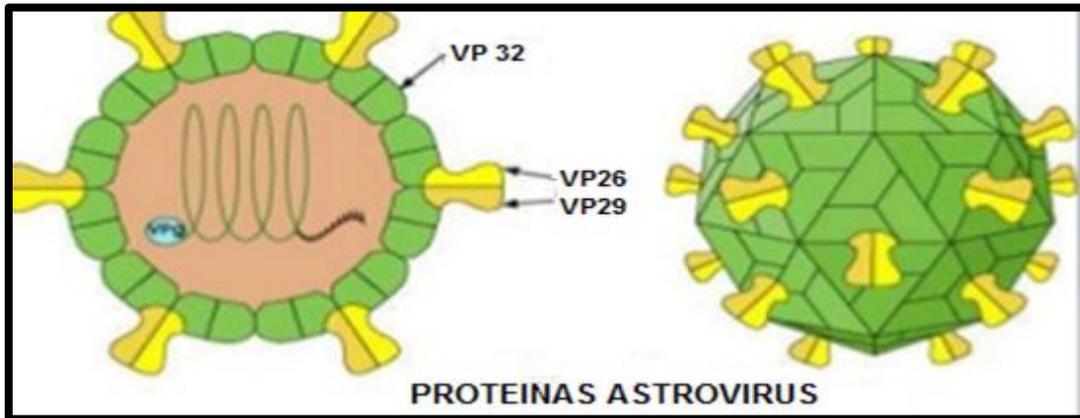


Figura 4: Proteínas estructurales de los Astrovirus (Tomado de Usonis y cols., 2012).

3.3.3.-Proteínas del virus.

3.3.3.1.-Poliproteína No estructural del MAL1a.

La poliproteína codificada a partir del MAL1a (nsP1a) consta entre 920 y 935 aa según el serotipo de Astrovirus. En el extremo amino-terminal de la poliproteína se han identificado varios dominios transmembrana que pueden estar implicados en el anclaje del complejo de replicación del ARN vírico a membranas celulares. La característica que más destaca a la poliproteína nsP1a es la presencia de una proteasa en su región central (Méndez y cols., 2012).

3.3.3.2.-Poliproteína no estructural del MAL1b.

El MAL1b codifica para una poliproteína (nsP1b) de entre 515 y 519 aa dependiendo del serotipo. Posee un potencial codón de inicio de traducción, se ha demostrado que la síntesis de la poliproteína tiene lugar tras un mecanismo por el cual el ribosoma se desplaza y modifica la pauta de lectura que se produce en la región de solapamiento entre el MAL1a y el MAL1b. De este modo se forma una superproteína que engloba el MAL1a y el MAL1b (nsP1a/1b) y que es procesada posteriormente en las dos poliproteínas nsP1a y nsP1b (Jiang y cols., 1993).

3.3.3.3.-Poliproteína estructural del MAL2.

La poliproteína codificada por el MAL2 tiene un tamaño variable según el serotipo de Astrovirus que oscila entre 782 y 796 aa. En un estudio realizado por Wang y colaboradores (2001), la secuencia del MAL2 fue dividida en cuatro regiones. La región I, que abarca la secuencia entre los aa 1 y 415, es la que está más conservada entre todos los serotipos del virus. En esta región existe una zona rica en residuos básicos que se ha relacionado con el empaquetamiento del ARN vírico. La región II (entre los aa 416 y 648) presenta un ligero grado de variabilidad entre los diferentes serotipos mientras que la homología dentro de cada serotipo es elevada. La región III (desde el residuo 649 al 707) es la zona con mayor grado de variabilidad entre los diferentes serotipos con presencia de inserciones y/o deleciones. Finalmente, la región IV (desde el residuo 708 al final) vuelve a presentar un elevado grado de similitud entre todos los serotipos (*Wang y cols., 2001*) (Fig.5).

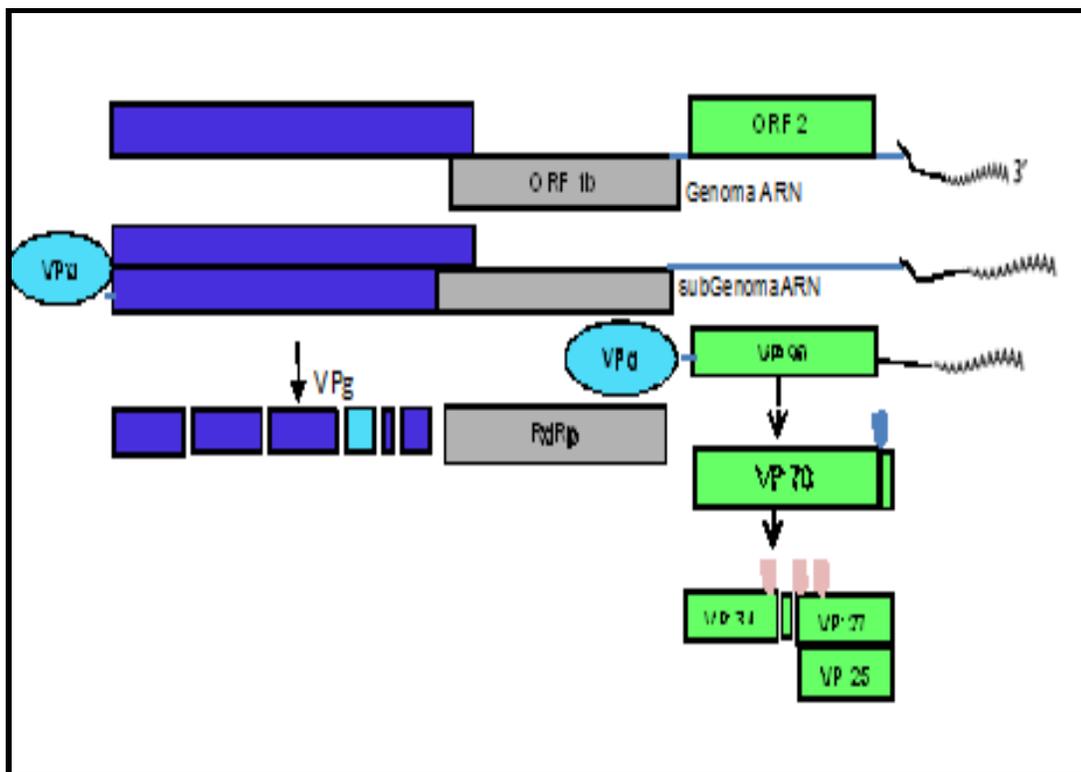


Figura 5. Organización genómica del Astrovirus humano (Tomado de: King y cols., 2011).

3.3.4.-Ciclo replicativo viral.

El esquema de replicación, transcripción y traducción que se postula para Astrovirus presentan una organización genómica y una estrategia de síntesis de las proteínas

estructurales a partir de un ARN subgenómico de polaridad positiva. Tras la entrada del virus en la célula hospedadora, tiene lugar la síntesis de las proteínas no estructurales a partir del genoma. Estas proteínas transcriben la cadena negativa completa, la cual a su vez sirve de molde para la síntesis tanto de nuevas moléculas genómicas como de moléculas de ARN subgenómico de polaridad positiva. Finalmente, tiene lugar la síntesis de las proteínas estructurales a gran escala al traducirse el ARN subgenómico. De este modo, la presencia de proteínas de la cápside es indicativa de que la replicación del genoma ha tenido lugar (*Matsui y cols., 2001*).

3.3.5.-Patogenia y Patología.

Los Astrovirus son transmitidos por la vía fecal-oral causando gastroenteritis en niños por lo general menores de 2 años, aunque las personas inmunocomprometidas, así como ancianos también constituyen grupos de alto riesgo. El virus afecta principalmente las células epiteliales del tracto intestinal. Infeccionan los enterocitos maduros, en la mayor parte de la porción apical de las vellosidades. Dentro de los enterocitos parasitados se observan acúmulos virales en lisosomas y vacuola (*Midthun y cols., 1993*).

3.3.6.-Cuadro clínico.

Los principales síntomas que se presentan durante la infección son diarrea acuosa, náuseas, vómito, fiebre y en algunos casos pérdida del apetito y deshidratación. Los síntomas de la gastroenteritis no permiten distinguirla de las gastroenteritis causadas por otros virus como Rotavirus o Calicivirus, aunque en general se considera que la infección por Astrovirus es un poco más leve (*Mitchell, 2002*).

3.3.7.-Inmunidad.

La inmunidad frente Astrovirus se adquiere en las primeras etapas de la vida, permanece inalterable durante la madurez y finalmente empieza a debilitarse al final de la vida de la persona. En un estudio realizado por Mitchell y colaboradores (1999) se puso de manifiesto que el 96% de niños con una edad menor de 5 años poseían anticuerpos contra el serotipo-1. Aún no se ha podido confirmar la existencia de inmunidad cruzada frente los diferentes serotipos, la mayoría de los datos epidemiológicos inclinan la balanza hacia la existencia de una inmunidad homotípica pero no heterotípica (*Mitchell y cols., 1999; Guix y cols., 2002*). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que la mayoría de brotes en los adultos corresponden con serotipos encontrados con menos frecuencia en la población infantil

(*Midthun y cols., 1993*). La mucosa intestinal juega un papel crucial en la adquisición de inmunidad frente a repetidas infecciones por Astrovirus. Los linfocitos T de la lámina intestinal reconocen de forma específica los antígenos de superficie y al activarse, producen citoquinas, interferón gamma y factor de necrosis tumoral desencadenando toda una respuesta inmune (*Molberg y cols., 1998*).

3.3.8.-Diagnóstico.

Los Astrovirus han sido diagnosticados por microscopía electrónica, sin embargo solamente el 10% de las partículas virales poseen la característica morfológica semejante a una estrella, haciendo difícil su detección (*Madeley y Cosgrove , 1975*), por lo que actualmente se han desarrollado otros métodos más específicos, sensibles y accesibles basados en las propiedades genómicas y antigénicas del virus para su diagnóstico.

Entre los métodos más empleados para el diagnóstico se encuentran los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) donde Herrmann y colaboradores (1990) diseñaron un ELISA para su detección específica, utilizando anticuerpo monoclonal MAb 8E7 el cual reconocía un epítipo común a todos los serotipos (*Herrmann y cols., 1990*). En estos momentos existe estuches comerciales, que utilizan el MAb 8G4 como anticuerpo de captura y del mismo anticuerpo biotinilado como anticuerpo detector. Al igual que el anticuerpo monoclonal MAb 8E7, el anticuerpo monoclonal MAb 8G4 reconoce todos los serotipos descritos de Astrovirus humanos con una gran sensibilidad y especificidad (*Shastri y cols., 1998*).

La Inmunofluorescencia (IF) es otro método utilizado para la detección de antígeno, empleando anticuerpos específicos. Es una técnica útil para el serotipado del virus (*Taylor y cols., 1997*).

El conocimiento de la secuencia del genoma de los Astrovirus humanos ha permitido el desarrollo de métodos moleculares como la TR-RCP y la TR-RCP en tiempo real, que detectan la presencia del ARN vírico en la muestra de heces (*Le Cann y cols., 2004*).

3.3.9.-Epidemiología.

Los Astrovirus presentan una distribución mundial, generalmente afectan a niños menores de cinco años, siendo en niños entre cero y dos años, el rango de edad en el cual la infección es más frecuente (*Bosch y cols., 2014*).

La infección sigue un patrón estacional. En las regiones templadas la incidencia de las infecciones aumenta sobre todo en el invierno, aunque también se observan casos en verano. En los climas tropicales el patrón de incidencia anual es diferente con tasas más elevadas en la temporada de lluvia (*Bosch y cols., 2014*).

Las coinfecciones con algún otro patógeno, como Rotavirus y Norovirus o agentes bacterianos como *Escherichia coli*, se han descrito con frecuencia (*Guix, 2003*).

La transmisión de la infección ocurre fundamentalmente por la vía fecal-oral. La excreción de virus infecciosos en las heces de individuos infectados puede llegar a contaminar el agua, alimentos o superficies, los cuales pueden representar a su vez nuevos focos de infección. El virus puede sobrevivir en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo hasta que es ingerido por otro individuo en el que provoca una nueva infección (*Abad y cols., 2001*).

El periodo de incubación es de 3 a 4 días y los síntomas generalmente permanecen de 2 a 3 días pero pueden persistir hasta 12 días, sobre todo en individuos inmunocomprometidos.

3.3.10.-Prevención y Control.

La gastroenteritis producida por Astrovirus suele ser una enfermedad autolimitada, por lo que no se necesita ningún tratamiento específico, únicamente si se desarrollan problemas de deshidratación se requerirá la aplicación de terapias de hidratación oral o intravenosa. Debido a que se trata de una enfermedad de transmisión fecal-oral, la prevención de la infección se basa fundamentalmente en interrumpir las vías de transmisión del virus entre personas. Esto es especialmente importante en lugares como círculos infantiles y hospitales, por ello, se deben tomar medidas higiénicas extremas. Este virus también puede transmitirse a través de agua o alimentos contaminados, por lo que es importante lavar y manipular los alimentos cuidadosamente y depurar adecuadamente el agua destinada al consumo (*Kurtz y cols., 1980*).

Actualmente, la mayoría de estudios realizados sobre Astrovirus todavía van encaminados a evaluar con exactitud cuáles son las principales características epidemiológicas de estos virus y su importancia médica real en la población mundial. Una vez se disponga de esta

información para diferentes regiones del mundo y se haya profundizado también en el conocimiento del grado de variabilidad estructural entre los distintos serotipos, se proseguirá con el desarrollo de una vacuna para prevenir la infección. Por otra parte, los datos que se disponen hasta ahora parecen indicar que la mayoría de las infecciones tienen lugar en niños menores de 2 años de edad. Por consiguiente, uno de los requerimientos de la posible vacuna sería que fuera capaz de inducir inmunidad en niños de esa población (*Bosch y cols., 2014*).

4.-MATERIALES Y METODOS.

4.1.-Definición del universo de estudio.

El universo de trabajo estuvo constituido por 2665 muestras de heces de niños menores de 5 años recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de Rotavirus, en el período de Enero de 2009 hasta Diciembre del 2016 procedentes de las diferentes provincias del país. Se utilizaron 1375 muestras que presentaron todos los datos epidemiológicos necesarios para realizar el estudio (Edad, Género, Provincia, Fecha de inicio de los síntomas, Fecha de toma de la muestra) que aparecen en el modelo de recolección de datos sobre muestras para diagnóstico microbiológico o envío de cepas para el trabajo de referencia nacional en el IPK, que acompañaron a las muestras (Anexo 1).

4.2-VARIABLES Y SU OPERACIONALIZACIÓN.

| | | |
|--------------------------|-----------|-----------------------|
| Edad | | Cuantitativa discreta |
| Sexo | Masculino | Nominal |
| | Femenino | |
| Provincia | | Nominal |
| Fecha inicio de síntomas | | Cuantitativa discreta |
| Fecha toma de muestra | | Cuantitativa discreta |

4.3-Colección y almacenamiento de las muestras.

Se recibieron en el laboratorio de 5 a 10 ml de muestras de heces de niños menores de 5 años con diagnóstico de gastroenteritis aguda de etiología viral. Las muestras se colocaron en frascos limpios de tapa de rosca o en viales de 1.5ml, correctamente identificados y acompañados del Modelo de recolección de datos sobre muestras para diagnóstico microbiológico o envío de cepas para el trabajo de referencia nacional en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) (Anexo1). Las mismas fueron almacenadas a menos 20⁰ C hasta su uso.

El estudio de Astrovirus se realizó en las muestras de heces de los niños menores de 2 años.

4.4.-Técnicas empleadas en el estudio de Rotavirus del grupo A.

4.4.1.-ELISA (De las siglas en inglés: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para la detección de Rotavirus del grupo A.

Para la identificación cualitativa de Rotavirus se empleó el ensayo inmunoenzimático tipo sándwich RIDASCREEN Rotavirus (R-Biopham, Darmstadt, Germany). La superficie de los pocillos de la placa estuvo recubierta de un anticuerpo monoclonal contra el gen viral (VP6). Se pipetearon en la cavidad de la microplaca a temperatura ambiente (20 – 25 °C) (TA) una suspensión de la muestra de heces a analizar, así como de los controles, junto con los anticuerpos anti-rotavirus monoclonales biotinilados (conjugado 1), incubándose todo una hora a TA. Después de un paso de lavado se adicionó un conjugado de poliestreptavidina con peroxidasa (conjugado 2) y se incubó por 30 minutos (min) a TA. Cuando en la muestra de heces se encontró presencia de Rotavirus, se formó un complejo sándwich entre los anticuerpos inmovilizados, los antígenos de Rotavirus y los anticuerpos conjugados del complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa. La fracción no enlazada del conjugado de estreptavidina-peroxidasa se eliminó en un paso posterior de lavado. Después de añadir el sustrato, cuando la muestra fue positiva, la enzima enlazada transformó el color de la solución en las cavidades de la microplaca de incolora hacia el color azul. Mediante la adición de un reactivo de parada se llevó a cabo un cambio de color del azul al amarillo. El valor medido para la absorbancia fue proporcional a la concentración de Rotavirus en la muestra.

4.4.2.-Trascricpción - Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa (TR-RCP) para la identificación de Rotavirus del grupo A.

4.4.2.1.- Extracción del ARN viral.

Se realizó la extracción del ARN de las muestras de heces, empleando el estuche comercial QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen, Alemania). Se adicionaron 140µl de la muestra a 560µl de tampón lisis (tampón AVL), mezclándose en un vibroagitador durante 15 segundos (seg), posteriormente se incubó la mezcla a TA durante 10 min. A la misma se le añadieron 560µl de etanol al 96%, agitándose durante 15 seg y centrifugándose a 14 000 rpm durante 30 seg. A una mini columna (QIAamp spin column) proporcionada por el estuche, se le añadieron 630 µl de la mezcla, luego se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min, se descartó el filtrado y se repitió el paso anterior. Se añadieron 500µl de tampón de lavado 1(AW1) y se centrifugó a 8000rpm por 1 min, luego se adicionó la misma cantidad de tampón de lavado 2 (AW2) centrifugándose

a 14 000rpm por 3 min. La mini columna se colocó en un tubo de centrifuga de 1,5 ml añadiéndose 60 µl del tampón de elución (AVE) y se incubó a TA durante 1 min. Luego se centrifugó la mezcla a 8000rpm por 1 min y el producto final fue guardado a menos 70°C hasta su uso.

4.4.2.2.-Técnica de TR-RCP.

Se utilizaron oligonucleótidos sintetizados por Eurofins MWG (Operon, Huntsville, Luxemburgo), los cuales se emplearon en la caracterización de los genotipos G (Vp7) y P (Vp4) de Rotavirus que se exponen en las tablas 1 y 2, siguiendo el protocolo descrito por Gouvea y colaboradores (*Gouvea y cols., 1990*).

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos que se emplearon para la determinación del genotipo G (Vp7).

| Oligonucleótidos | Secuencia (5' - 3') | Posición |
|------------------|--|-----------|
| Beg9b | GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G | 1-28 |
| End9b | GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG | 1062-1036 |
| 9 con1L | TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT AT | 37-59 |
| VP7R | AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC | 914-932 |

Tabla 2. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos que se emplearon para la determinación del genotipo P (Vp4).

| Oligonucleótidos | Secuencia (5' - 3') | Posición |
|------------------|--------------------------------|----------|
| 4 con3 | TGG CTT CGC TCA TTT TAT AGA CA | 11-32 |
| 4 con2 | ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC | 868-887 |

Para la técnica de TR-RCP se empleó el estuche comercial QIAGEN OneStep TR-RCP Kit (Qiagen, Alemania). La reacción se realizó en tubos eppendorf de 200 µL a un volumen final de 50 µL, en los que se añadió 5 µL del ARN extraído y una mezcla que contenía 10 µL de solución tampón 5X, 2 µL de enzima (OneStep TR-RCP Enzyme Mix), 2 µL de trifosfato de desoxinucleotidos (10 mM), 2 µL de cada oligonucleótidos que se encontraban a 100 picomoles (Tablas 1 y 2) y se completó el volumen con agua libre de RNasa. Estas mezclas

se prepararon tanto para los genotipos G (Vp7) como para P (Vp4) cambiando únicamente los oligonucleótidos.

La mezcla de la reacción para la TR-RCP se colocó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) con el siguiente programa: para efectuar la Transcripción – Reversa (TR) se incubó 50 °C durante 30 min, luego se realizó la amplificación (1 ciclo 95 °C por 15 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) y para la elongación de la cadena se realizó un ciclo de 72 °C por 10 min.

4.4.2.3- Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) anidada.

Se realizó la determinación de los genotipos G (G1–G5, G8, y G9) y P (P[4], P[6], P[8], P[9], P[10]) , para lo cual se utilizaron 2 ul del ácido desoxiribonucleico complementario (cDNA) obtenido de la TR-RCP, empleando los oligonucleótidos sintetizados por Eurofins MWG (Operon, Huntsville, Luxemburgo) presentados en las tablas 3 y 4 , siguiendo el protocolo descrito por Gouvea y colaboradores (*Gouvea y cols., 1990*).

Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos que se emplearon para la RCP anidada. Genotipos G (Vp7).

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'- 3') | Posición |
|------------------|---------------------------------|-----------|
| RVG9 | GGT CAC ATC ATA CAA TTC T | 1062-1044 |
| aAT8 (G8) | GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG | 178-198 |
| aBT1 (G1) | CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G | 314-335 |
| aCT2 (G2) | CAA TGA TAT TAA ACA TTT TCT GTG | 411-435 |
| aET3 (G3) | CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG | 689-709 |
| aDT4 (G4) | CGT TTC TGG TGA GGA GTT G | 480-498 |
| aFT9 (G9) | CTA GAT GTA ACT ACA ACT AC | 757-776 |
| 9 con1L | TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT AT | 37-59 |
| 9T1-1 (G1) | TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG | 176-195 |
| 9T1-2 (G2) | GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT | 262-281 |
| 9T-3P (G3) | GTC CAG TTG CAG TGT AGC | 484-501 |
| 9T-4 (G4) | GGG TCG ATG GAA AAT TCT | 423-440 |
| 9T-9B (G9) | TAT AAA GTC CAT TGC AC | 131-147 |

Tabla 4. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos que se emplearon para la RCP anidada. Genotipos P (Vp4).

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'-3') | Posición |
|------------------|--------------------------------|----------|
| 4 con3 | TGG CTT CGC TCA TTT TAT AGA CA | 11-32 |
| 1T1 (P[8]) | TCT ACT TGG ATA ACG TGC | 339-356 |
| 2T1 (P[4]) | CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC | 474-494 |
| 3T1 (P[6]) | TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA | 259-278 |
| 4T1 (P[9]) | TGA GAC ATG CAA TTG GAC | 385-402 |
| 1T-1VN (P[8]) | TGT ACT GGA TCG ACG TGC | 339-356 |
| 5T- (P[10]) | ATC ATA GTT AGT AGT CGG | 575-594 |

La RCP anidada se preparó para un volumen final de 25 μ L en tubos eppendorf de 200 μ L, a los cuales se les añadieron 2 μ L de cDNA obtenido de la TR-RCP, 5 μ L de solución tampón 10X, 1 μ L de trifosfato de desoxinucleótidos (10 mM), 0.25 μ l de enzima Taq ADN polimerasa (5U/ μ l, Roche), 5 μ l de los oligonucleótidos tanto para los genotipos G (Vp7) como para P (Vp4) y se completó el volumen con agua libre de RNasa. Se empleó el termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) con el siguiente programa: 94 °C por 2 min de desnaturalización inicial, se prosiguió con 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min, seguida de una elongación final de 72 °C por 10 min.

Para chequear el producto amplificado se tomaron 5 μ l del producto de la RCP anidada y se les añadieron 2 μ l del colorante 5x Blue/Orange 6X (Promega, USA). La mezcla se sometió a una corrida electroforética durante 30 min a 100 Volts (V) en un gel de agarosa al 2% (Promega, USA) usando tampón TBE 1X (Tris-Borato 0,09M (Sigma), EDTA 2mM (Sigma), pH 8). La tinción de los geles se realizó con una solución de bromuro de etidio (Promega, USA), a una concentración final de 0.1-0.2 μ g/ml. Para observar las bandas de amplificación, se empleó un transiluminador de luz ultravioleta (Spectrolin); determinándose el tamaño de las bandas amplificadas mediante la comparación con el marcador de peso molecular 100bp DNA ladder (25ug/ μ l, Promega, USA).

4.5.-Técnicas empleadas en el estudio de Norovirus.

4.5.1.-Técnica de ELISA para la detección de Norovirus.

Se empleó un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich RIDASCREEN Norovirus 3rd Generation (C1401), (R-Biopham, Darmstadt, Germany). La superficie de los pocillos de la placa estuvo recubierta con anticuerpos monoclonales específicos contra los antígenos de los genotipos GI y GII. Se pipetearon en la cavidad de la microplaca a TA una suspensión de la muestra de heces a analizar, así como de los controles, junto con los anticuerpos anti-norovirus monoclonales biotinilados (conjugado 1), incubándose todo una hora a TA. Después de un paso de lavado se adicionó un conjugado de poliestreptavidina con peroxidasa (conjugado 2) y se incubó por 30 min a TA. Cuando en la muestra de heces se encontró Norovirus se formó un complejo sándwich entre los anticuerpos inmovilizados, los antígenos de Norovirus y los anticuerpos conjugados del complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa. La fracción no enlazada del conjugado de estreptavidina-peroxidasa se eliminó en un paso posterior de lavado. Después de añadir el sustrato, cuando la muestra fue positiva, la enzima enlazada transformó el color de la solución en las cavidades de la microplaca de incolora hacia el azul. Mediante la adición de reactivo de parada se llevó a cabo un cambio de color del azul al amarillo. El valor medido para la absorbancia fue proporcional a la concentración de Norovirus en la muestra.

4.5.2.- Técnica de TR-RCP para la identificación de Norovirus.

4.5.2.1.- Extracción del ARN viral.

Se realizó la extracción del ARN de las muestras de heces estudiadas, como fue descrito en el acápite 4.4.2.1.

4.5.2.2.- Técnica de TR-RCP

Se utilizaron oligonucleótidos sintetizados por Eurofins MWG (Operon, Huntsville, Luxemburgo). Los oligonucleótidos empleados en la caracterización de los genogrupos I y II de Norovirus se exponen en la tabla 5, siguiendo el protocolo descrito por Kojima y colaboradores (*Kojima y cols., 2002*).

Tabla 5. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos que se emplearon para la detección a Norovirus (GI y GII).

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'- 3') | Genogrupos | Posición |
|------------------|---------------------------------------|------------|-----------|
| G1SKF | CTGCCCGAATTYGTAATGA | GI | 5342-5671 |
| G1SKR | CCAACCCARCCATTRTACA | GI | 5342-5671 |
| COG2F | CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG | GII | 5003 |
| COG2R | TCGACGCCATCTTCATTCACA | GII | 5100 |

Para la técnica de TR-RCP se empleó el estuche comercial QIAGEN OneStep TR-RCP Kit (Qiagen, Alemania), como se describe en el acápite 4.4.2.2 .Se le añadió 1 µL de cada oligonucleótidos que se encontraban a 100 picomoles (Tabla 5) y se completó el volumen con agua libre de RNasa.

La mezcla de la reacción para la TR-RCP se colocó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) con el siguiente programa: para efectuar la TR se incubó 50 °C durante 30 min, luego se realizó la amplificación (1 ciclo 95 °C por 15 min, las mezclas fueron sometidas a 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min y 72 °C por 1 min) y para la elongación se realizó un ciclo de 72 °C por 10 min.

El producto amplificado fue chequeado según se describe en el acápite 4.4.2.3.

4.6.-Técnicas empleadas en el estudio de Astrovirus.

4.6.1.- Técnica de TR-RCP para la identificación de Astrovirus.

4.6.1.1.- Extracción del ARN viral.

Se realizó la extracción del ARN de las muestras de heces estudiadas, según se describe en el acápite 4.4.2.1.

4.6.1.2.- Técnica de TR-RCP.

Se utilizaron oligonucleótidos sintetizados por Eurofins MWG (Operon, Huntsville, Luxemburgo). Los oligonucleótidos empleados en la caracterización de Astrovirus se exponen en la tabla 6, siguiendo el protocolo descrito por Malasao y colaboradores (*Malasao y cols., 2012*).

Tabla 6. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos que se emplearon para la detección de Astrovirus.

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'- 3') | Posición |
|------------------|-----------------------|----------|
| PreCap1 | GGACTGCAAAGCAGCTTCGTG | 6471 |
| 82B-Astro | GTGAGCCACCAGCCATCCCT | 6022 |

Para la técnica de TR-RCP se empleó el estuche comercial QIAGEN OneStep TR-RCP Kit (Qiagen, Alemania), como se describe en el acápite 4.4.2.2. Se adicionó 0.5 µL de cada oligonucleótidos que se encontraban a 100 picomoles (Tabla 6) y se completó el volumen con agua libre de RNasa.

La mezcla de la reacción para la TR-RCP se colocó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) con el siguiente programa: para efectuar la TR se incubó 50 °C durante 30 min, luego se realizó la amplificación (1 ciclo 95 °C por 15 min, las mezclas fueron sometidas a 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min) y la elongación se realizó con un ciclo de 72 °C por 10 min.

El producto amplificado fue chequeado según se describe en el acápite 4.4.2.3.

4.7.- Algoritmo trabajo.

El estudio se realizó siguiendo el algoritmo que se muestra en la figura (Fig.6).

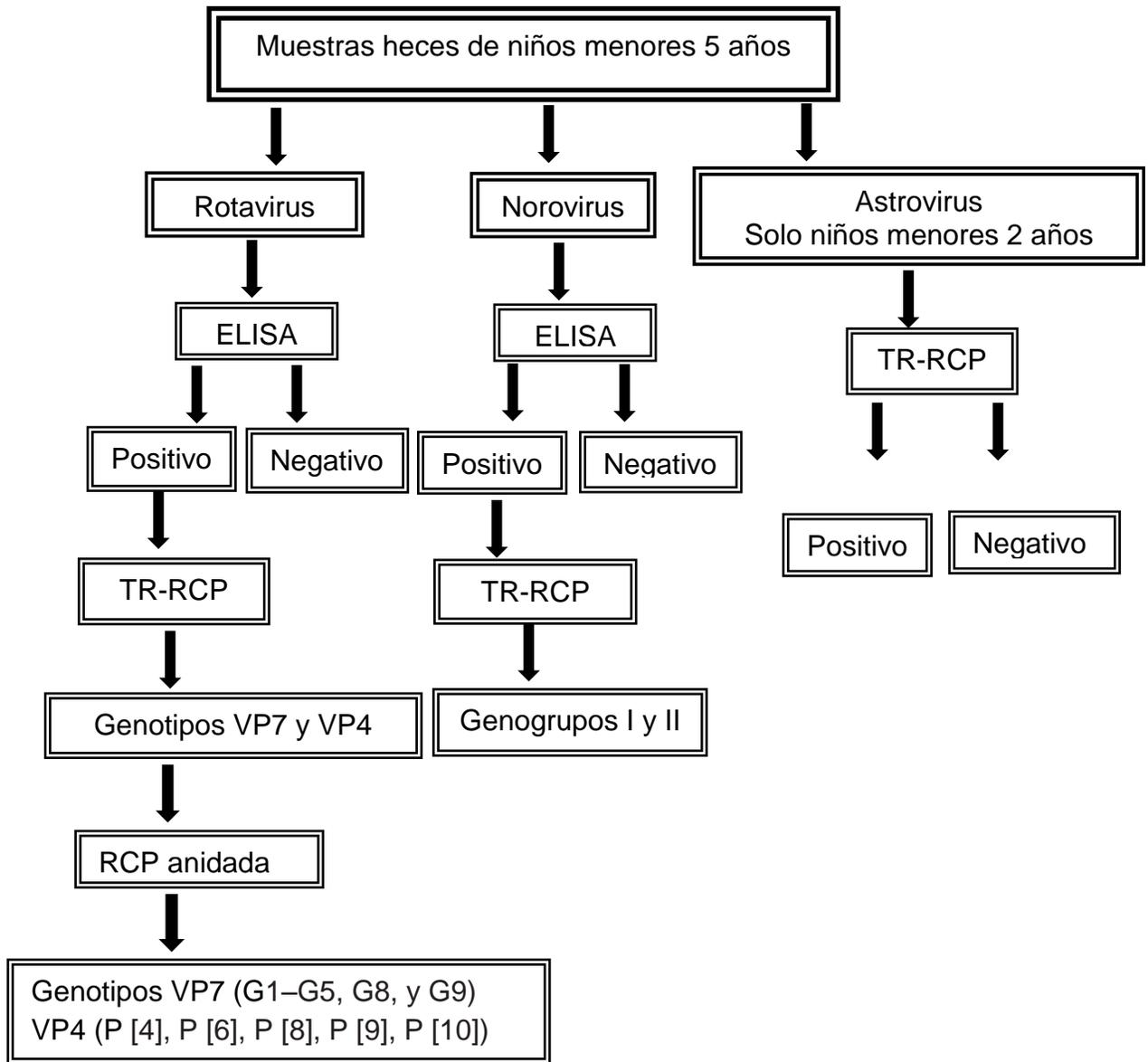


Figura 6. Algoritmo de trabajo.

4.8.- Procesamiento de los datos.

Los datos de cada paciente fueron colectados en una base de datos en el programa EXCEL XP confeccionada al efecto. Los textos fueron procesados empleando el programa WORD XP y para realizar las tablas y figuras se empleó EXCEL XP. Los resultados se presentaron en tablas de frecuencia, elaborándose tablas de contingencia entre variables.

Para el análisis comparativo de la positividad en los diferentes grupos de edades, los diferentes años estudiados, los genotipos encontrados con la edad y por años, se utilizó el test

paramétrico empleando el paquete estadístico contenido en el programa GraphPad Prism 5.0 (2007).

4.9.- Aspectos éticos.

El estudio se realizó de acuerdo a los principios éticos expresados en la Declaración de Helsinki. El personal (centro hospitalario/Policlínico) encargado de recoger la muestra de heces de los pacientes, solicitó el consentimiento informado al padre o tutor, explicándole de forma oral, clara y comprensible la importancia de la investigación y la necesidad de recoger los datos que aparecen en el modelo de muestras para diagnóstico microbiológico. Predominaron los principios de voluntariedad, beneficencia y confidencialidad en la recogida de los datos de los pacientes.

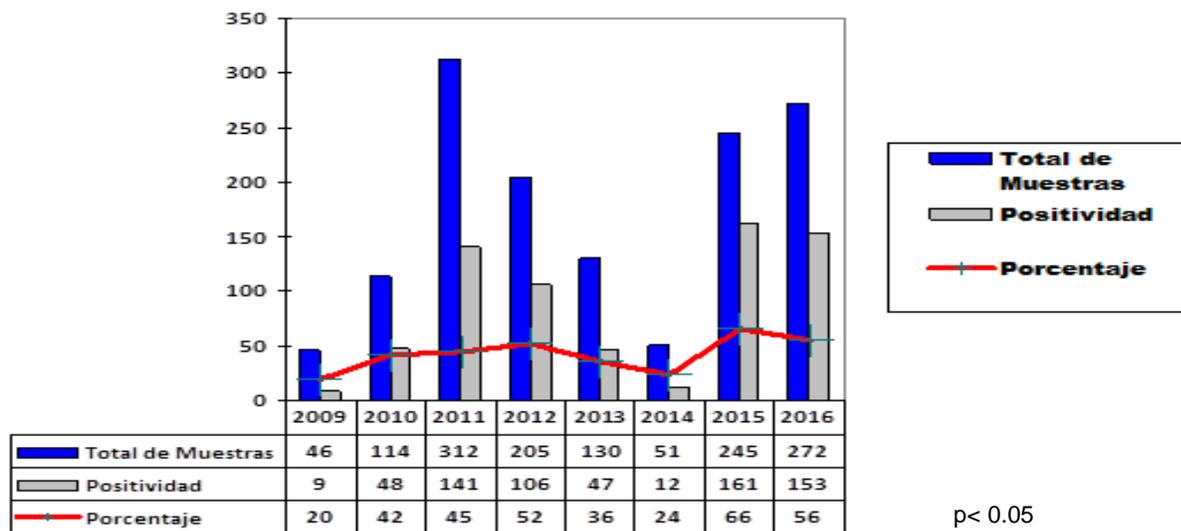
El acceso a los datos será restringido y solo será utilizado para el análisis de los datos relevantes para este estudio y supervisado por los responsables del protocolo.

5.-RESULTADO Y DISCUSIÓN.

5.1.-Estudio de Rotavirus

Se estudiaron un total de 1375 muestras de heces de niños menores de cinco años con diagnóstico de gastroenteritis aguda de etiología viral, siendo la media de la edad de 12 meses (rango: 0 a 60 meses), pertenecieron a pacientes del género femenino 642(46.7%) casos y 733(53.3%) al masculino.

La positividad de Rotavirus en los diferentes años estudiados fue de un 49.2% (677/1375), encontrándose el mayor número en el año 2015 con un 66% (161/245) (Fig.7).La diferencia entre los años estudiados fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).



$p < 0.05$

Figura 7. Positividad de Rotavirus en los diferentes años estudiados. Cuba 2009-2016.

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK.

La positividad de Rotavirus encontrada fue semejante a la reportada en diferentes estudios en la población infantil cubana los cuales reflejaron valores de alrededor de un 50%, ya sea empleando la técnica ELISA, la cual ha sido la más ampliamente utilizada para la detección de antígeno a este virus por su alta sensibilidad y especificidad, como otras técnicas diagnósticas tales como el PAGE, LATEX y las tiras reactivas, entre otras (Cruz y cols., 1990; Estévez y cols., 1993).

Aguiar y colaboradores en el 2009 en un estudio realizado en 14 hospitales pediátricos, encontraron un 42.1% de positividad de Rotavirus empleando la tira de producción cubana Hebertfast Line rotavirus (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba), siendo superior la reportada en el 2011 por Ribas y colaboradores en muestras colectadas entre los años 2006 y 2008, la cual fue de un 60.9% por ELISA y PAGE. En el 2015, este mismo autor realizó otro estudio en 3 hospitales pediátricos de la Habana donde encontró una positividad del 54.5%(*Aguiar y cols., 2009; Ribas y cols., 2011; Ribas y cols., 2015*).

En diferentes países de América, tales como Ecuador y Chile en estudios realizados con niños menores de 5 años con diarrea, se obtuvo una positividad del 16% y 31% respectivamente, por debajo de lo obtenido en Cuba. La disminución de casos en estos países se atribuyó a la implementación del programa universal de inclusión de vacunas de la Organización Mundial de la Salud desde el año 2007(*Lucero y cols., 2012; Simaluiza y cols., 2016*).

La tabla 7 muestra la distribución de los casos positivos de Rotavirus en los diferentes años y grupos de edades estudiados, encontrándose una mayor positividad en los niños menores 24 meses (644/677; 95%), siendo en los menores de 6 meses de un 46% (311/677), seguidos por los de 7 a 12 meses con un 38% (258/677) y de 13 a 24 meses con un 11%(75/677).

En los años 2011 y 2015 en el grupo de edad correspondiente a los niños de hasta 6 meses, se alcanzó un 22.2%(69/311) de positividad, mientras que en el 2016 el que presentó un mayor número de casos positivos fue el grupo de 7 a 12 meses con un 28.7% (74/258).

En el grupo de edad entre 13 a 24 meses, el año que se comportó con mayores muestras positivas fue el 2015 con un 32%(24/75), mientras que en los grupos de edades de 25 a 36 meses y de 37 a 60 meses la positividad fue mayor en el 2012 con un 38%(5/13) y un 35%(7/20) respectivamente ($p < 0.05$).

Tabla 7: Positividad de Rotavirus en los diferentes años y grupos de edades estudiados. Cuba 2009-2016.

| Años | 0-6m | | 7-12m | | 13-24m | | 25-36m | | 37-60m | | Total | |
|------|------|------|-------|------|--------|------|--------|------|--------|------|-------|------|
| | No | % | No | % | No | % | No | % | No | % | No | % |
| 2009 | 5 | 1.6 | 3 | 1.2 | 0 | 0 | 1 | 8.0 | 0 | 0 | 9 | 1.3 |
| 2010 | 23 | 7.4 | 20 | 7.7 | 5 | 7.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 | 7.1 |
| 2011 | 69 | 22.2 | 49 | 19.0 | 15 | 20.0 | 2 | 15.0 | 6 | 30.0 | 141 | 20.8 |
| 2012 | 50 | 16.1 | 30 | 11.6 | 14 | 18.0 | 5 | 38.0 | 7 | 35.0 | 106 | 15.7 |
| 2013 | 22 | 7.1 | 18 | 7.0 | 5 | 7.0 | 1 | 8.0 | 1 | 5.0 | 47 | 6.9 |
| 2014 | 10 | 3.2 | 2 | 0.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 1.8 |
| 2015 | 69 | 22.2 | 62 | 24.0 | 24 | 32.0 | 4 | 31 | 2 | 10.0 | 161 | 23.8 |
| 2016 | 63 | 20.2 | 74 | 28.7 | 12 | 16.0 | 0 | 0 | 4 | 20.0 | 153 | 22.6 |

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK.

p< 0.05

Resultados similares a los de este estudio fueron encontrados en el 2015, donde la mayor proporción de casos positivos en los niños cubanos se halló en los menores 6 meses con un 33.3%, seguido por los de 7 a 12 meses con un 31.6% y de 12 a 24 meses (26.6%)(*Ribas y cols., 2015*).

Lucero y colaboradores en el 2012 en Chile, encontraron que el riesgo de infección por Rotavirus era mayor en los niños de 7 a 24 meses de edad, periodo en el cual son más vulnerables a presentar una enfermedad grave con la aparición de complicaciones. Plantearon que por este grupo ser el más susceptible, se beneficiaría con el eventual uso de una vacuna anti-rotavirus administrada durante los primeros 6 meses de vida. Esto concuerda con lo descrito por Linhares y colaboradores en el 2011, en un meta-análisis realizado sobre la epidemiología de Rotavirus en Latinoamérica y el Caribe en niños menores de 5 años, donde el grupo de 6 a 24 meses de edad fue el que presentó mayor número de casos infectados(*Linhares y cols., 2011; Lucero y cols., 2012*).

Al hacer la distribución por género podemos observar que la mayor positividad fue hallada en el género masculino con un 52% (353/677) con respecto al femenino con un 48%(323/677) (Fig. 8) (p< 0.05).

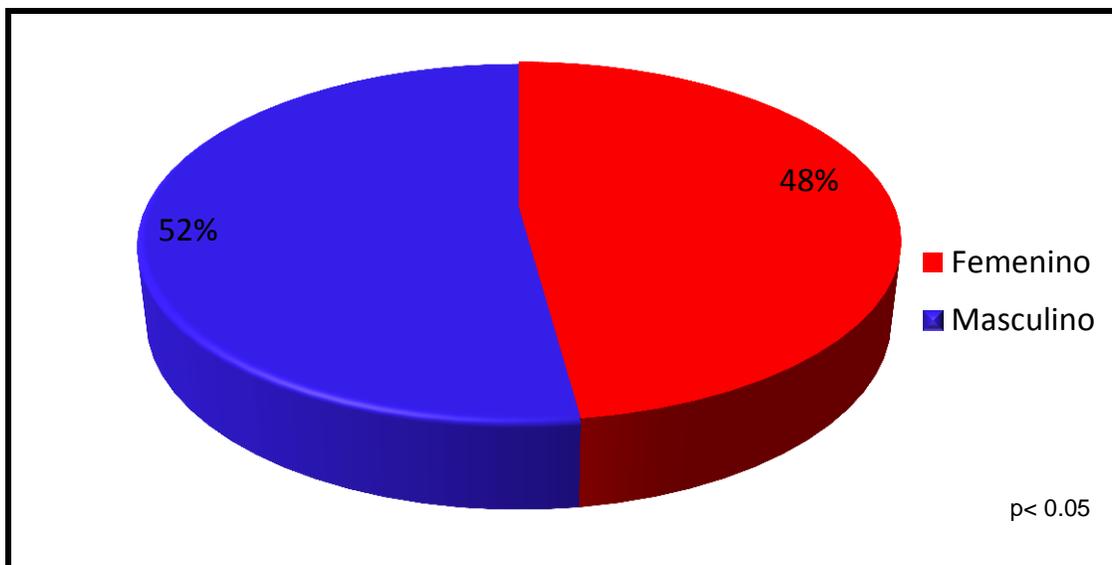


Figura 8. Distribución de la positividad a Rotavirus en cuanto a género. Cuba 2009- 2016.

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK

Resultados similares a estos fueron encontrados en el 2010 por Maldonado y colaboradores en Venezuela, donde predominó el género masculino con un 55,3% sobre el femenino con un 44,7% (*Maldonado y cols., 2010*).

Thompson y colaboradores en 1991, plantearon que la mayor susceptibilidad de los varones a las infecciones está ligada al cromosoma humano (X), ya que en él se encuentran los genes responsables del control del nivel de las inmunoglobulinas M (*Thompson y cols., 1991*). Igualmente en estudios realizados por el doctor Claude Lieger en la Universidad de Gante, en Bélgica en 2011, muestran la mayor resistencia de las mujeres a padecer enfermedades infecciosas, lo que está dado por la presencia de dos cromosomas X, los hombres tienen sólo uno, y este cromosoma adicional es el que les ofrece una mayor resistencia tanto para combatir enfermedades como para vivir una vida más larga (*Lieger y cols., 2011*).

La figura 9 muestra el comportamiento de Rotavirus en los diferentes meses del año, encontrándose un mayor porcentaje de positividad en el mes de enero con un 21%(140/677), seguido de junio con 10%(68/677) y luego febrero y marzo ambos con un 9%(63/677) ($p < 0.05$).

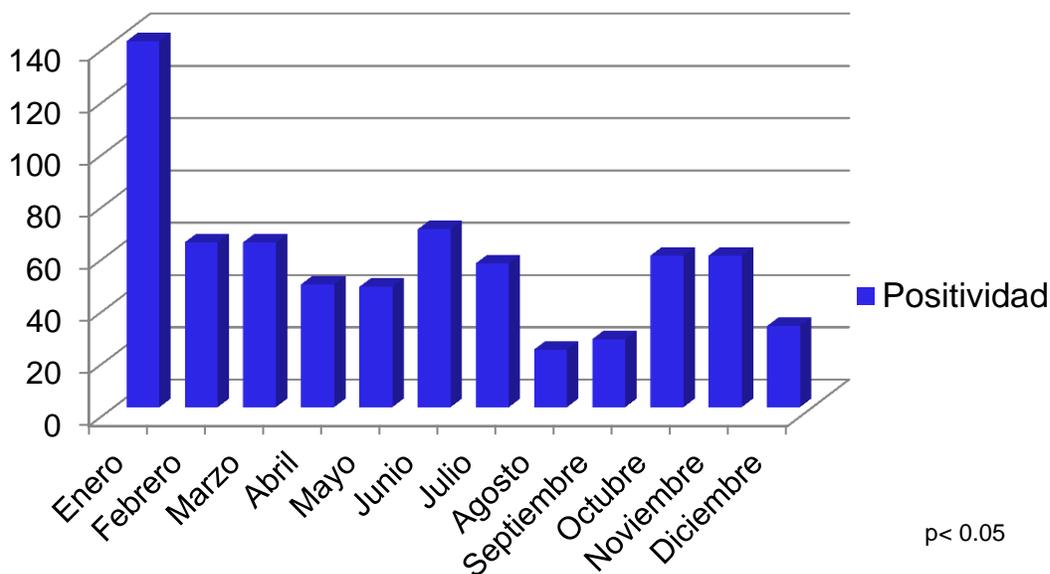


Figura 9. Positividad de Rotavirus en los diferentes meses del año estudiados. Cuba 2009-2016
Fuente: LNR de Rotavirus. IPK

El patrón de distribución estacional que tienen los Rotavirus en diferentes partes del mundo es un factor tan importante como desconocido. Investigaciones realizadas han establecido que en climas tropicales la incidencia de la enfermedad suele ser duradera a lo largo del año, con una cierta preferencia en los meses fríos (Enero a Febrero) y en el verano lluvioso (Mayo a Junio) (Aguilar y cols., 2009; WHO, 2007).

En Cuba en un estudio realizado en la provincia de Holguín de Diciembre del 2010 a Mayo del 2011, la estacionalidad de Rotavirus durante todo el período de estudio, mostró una elevada incidencia en los meses de Enero con un 93,0% y en Mayo con un 92,3%(Méndez y Escobar, 2012).

Díaz en el 2010 en un estudio realizado en Chile, encontró circulación de Rotavirus durante todo el año, incrementándose en los meses de invierno, mientras que en Perú en el 2015, en un trabajo realizado por Oyola, el pico más alto de incidencia ocurrió en los meses correspondientes al invierno-primavera, temporada fría y húmeda (Díaz , 2010; Oyola , 2015).

En tabla 8 se muestra la distribución de los diferentes genotipos G encontrados en las muestras positivas estudiadas. Se observó una mayor circulación del genotipo G1 con el 60.7%(411/677), seguido por los genotipos G9, G2 y G8 con un 9.4%(64/677), 5.7%(39/677) y

1.4%(10/677) de positividad respectivamente. También pudieron identificarse genotipos mixtos en un 3.3%(23/677). No se pudo (ND) determinar el genotipo en el 10.6 %(72/677) de los casos estudiados ($p > 0.05$).

Tabla 8: Genotipos G identificados en los diferentes años estudiados. Cuba 2009-2016.

| Genotipos | 2009 | | 2010 | | 2011 | | 2012 | | 2013 | | 2014 | | 2015 | | 2016 | | Total | |
|-----------|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|-------|------|
| | No | % | No | % |
| G1 | 2 | 18 | 4 | 8 | 105 | 69 | 8 | 24 | 3 | 19 | 9 | 75 | 152 | 91 | 128 | 72 | 411 | 60.7 |
| G2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26 | 17 | 0 | 0 | 10 | 62 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 39 | 5.7 |
| G8 | 0 | 0 | 9 | 19 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 1.4 |
| G9 | 7 | 64 | 16 | 33 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 3 | 25 | 6 | 4 | 31 | 17 | 64 | 9.4 |
| MIXTO | 1 | 9 | 0 | 0 | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 13 | 7 | 23 | 3.3 |
| ND | 1 | 9 | 19 | 40 | 16 | 10 | 24 | 70 | 3 | 19 | 0 | 0 | 3 | 2 | 6 | 3 | 72 | 10.6 |

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK.

$p > 0.05$

Leyenda: ND: No determinado

En Cuba Ribas y colaboradores en el 2011, obtuvieron resultados similares a los del estudio, encontrando una circulación del genotipo G1 en un 60.5%, seguido por el genotipo G9 en un 37.2% (*Ribas y cols., 2011*).

Los Rotavirus muestran un alto grado de diversidad genética y aunque suele haber predominio de determinados genotipos, existen grandes variaciones en la distribución entre diferentes regiones y períodos de tiempo. En estudios realizados en Brasil, México, Argentina y Venezuela por Linhares y colaboradores en el 2011, los genotipos G mayormente identificados fueron el G1 (34.2%), seguido por G9 (14.6%) y G2 (14.4%) (*Linhares y cols., 2011*).

En la región de Cajamarca, Perú entre los años 2010 al 2012, circuló el genotipo G9 con un 35.7% seguido por el genotipo G12 con un 33.3% (*Weilg y cols., 2014*)

La distribución de los genotipos P de Rotavirus en las muestras positivas estudiadas se exponen en la tabla 9. El genotipo P [8] fue el que se encontró con mayor frecuencia con un 62.6%(424/677), seguidos por el P [6] y el P [4] con un 2.9%(20/677) y 0.7%(5/677)

respectivamente. No se pudo identificar el genotipo en un 14.7%(100/550) de las muestras estudiadas ($p > 0.05$).

Tabla 9: Genotipos P identificados en los diferentes años estudiados. Cuba 2009-2016.

| Genotipos | 2009 | | 2010 | | 2011 | | 2012 | | 2013 | | 2014 | | 2015 | | 2016 | | Total | |
|-----------|------|-----|------|----|------|----|------|----|------|----|------|-----|------|----|------|-----|-------|------|
| | No | % | No | % | No | % | No | % | No | % | No | % | No | % | No | % | No | % |
| P[4] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0.7 |
| P[6] | 0 | 0 | 4 | 8 | 9 | 6 | 1 | 8 | 4 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1.3 | 20 | 2.9 |
| P[8] | 9 | 100 | 38 | 79 | 127 | 90 | 11 | 92 | 4 | 27 | 12 | 100 | 96 | 60 | 127 | 82 | 424 | 62.6 |
| MIXTO | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.7 | 1 | 0.1 |
| ND | 0 | 0 | 6 | 13 | 5 | 4 | 0 | 0 | 2 | 13 | 0 | 0 | 63 | 40 | 24 | 16 | 100 | 14.7 |

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK.

$p > 0.05$

Leyenda: ND: No determinado

En un estudio realizado en el 2011 en Cuba, los genotipos P que se detectaron fueron el P [8] con un 90.6%, seguido del genotipo P [6] con un 6.9%, siendo estos resultados similares a los del estudio (*Ribas y cols., 2011*).

Los genotipos P [4], P [6] y P [8] son los que presentan una mayor prevalencia a nivel mundial (*Linhares y cols., 2011*). En Brasil en un estudio realizado en el 2014, la circulación del genotipo P [4] fue de un 78.9%, seguido por el P [8] y el P [6] con un 15.4% y 3.5% de positividad respectivamente (*Gurgel y cols., 2014*).

En África se realizó un estudio en Kenya de Enero de 2010 a Marzo de 2011 a 166 muestras de niños menores de cinco años, encontrándose resultados similares a los del estudio, donde el genotipo de mayor circulación fue el P [8] con un 60%, seguidos del P [6] y P [4] con un 22.9% y un 11.4% respectivamente (*Gikonyo y cols., 2017*).

Al observar las combinaciones de los genotipos G/P de las muestras estudiadas, (Fig.10), se encontró que los que circularon con mayor frecuencia fueron el G1P [8] con un 55.1%(373/677) de positividad, seguido por el G9P [8] con un 5.3% (36/677). Con menor frecuencia se encontró la circulación de los genotipos G2P [8] (3.5%; 24/677) y G2P [4] (2.4%; 16/677), observándose también la circulación del genotipo G8P [8] (9/677; 1.3%).

El año 2013 fue el que presentó mayor combinación de genotipos, circulando el G1P [8], G1P [4], G2P [8], G2P [4] y el G2P [6], los que representaron el 7%(47/677) de positividad en ese año.

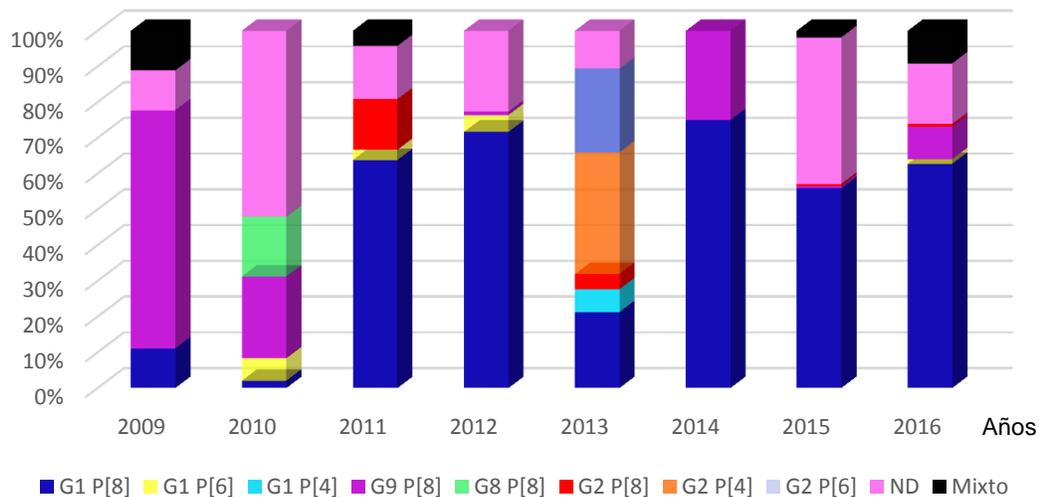


Figura 10. Distribución de las combinaciones de genotipos G/P en los diferentes años estudiados. Cuba 2009-2016.

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK.

En el año 2011 no se encontró la circulación del genotipo G9P [8] , a diferencia de lo encontrado por Ribas y colaboradores , quienes reportaron predominio de los genotipos G1P [8] y el G9P [8] con un 71,4% y un 80% de positividad respectivamente en los años 2011 y 2015 (*Ribas y cols., 2011; Ribas y cols., 2015*).

Se consideró que la diversidad de genotipos encontrados en 2013 se debió a que en el estudio se analizaron muestras de todas las provincias del país, mientras que los realizados hasta el momento por Ribas y colaboradores se han limitado a un seleccionado grupo de muestra de una o dos provincias (*Ribas y cols., 2011*).

de Oliveira y colaboradores en el 2009, realizaron un estudio en 11 países de Latinoamérica y la región del Caribe a 388 muestras de niños menores de cinco años, encontrando la circulación de los genotipos G1P [8] con un 32%, seguido del G9P [8] y el G2P [4] con un 20.9% y 18.3% de positividad respectivamente (*de Oliveira y cols., 2009*)

En un estudio realizado en Haití por Esona y colaboradores en el 2015, detectaron la circulación de los genotipos G1 P [8] con un 29%, seguido del G9P [8] con un 21% (*Esona y cols., 2015*).

Es necesario señalar que en el estudio fueron encontradas dos combinaciones de genotipos poco usuales, el G8P [8] en el año 2010 y el G2P [4] en el 2013.

En Rio de Janeiro, Brasil en un estudio realizado en el 2002, se encontró entre las combinaciones de genotipos poco frecuentes el G8P [8] (Gómez y cols., 2010). Del 2010 al 2013, en Tailandia se realizó un estudio donde se encontró el G8P [8] con un 13% de positividad, demostrando que esta combinación de genotipo es más frecuente en países asiáticos y africanos (Chieochansina y cols., 2016).

En cuanto al genotipo G2P [4] en Guarujá, Brasil en el verano del 2010, se encontró la presencia de este genotipo en un 17.9% de positividad, mientras que en Argentina en el 2017, Degiuseppe y colaboradores analizaron muestras de niños menores de cinco en el periodo del 2012 al 2014, hallando que el mayor porcentaje de positividad se encontró en la combinación G2P [4] en los años 2012 y 2013 con un 28.4% y 42.5% respectivamente (Luchs y cols., 2013; Degiuseppe y cols., 2017).

Martínez y colaboradores en Brasil en el 2014, realizaron un estudio para estimar la prevalencia de G2P [4] en niños vacunados y sin vacunar con gastroenteritis aguda, encontrando que existe una diversidad genética en diferentes regiones geográficas a lo largo de los años anteriores y después de la introducción de vacuna, además el largo período de baja o nula circulación de este genotipo en Brasil previo a la introducción de la vacuna, podría haber creado condiciones favorables para la acumulación de individuos inmunológicamente susceptibles (Martínez y cols., 2014).

5.2.-Estudio de Norovirus

Al realizar la detección de Norovirus en todas las muestras estudiadas pudimos observar que la positividad fue de un 7.7 % (106/1375), encontrándose en el 2010 el mayor porcentaje con un 23% positividad (26/114) (Fig.11). La diferencia entre los años estudiados fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

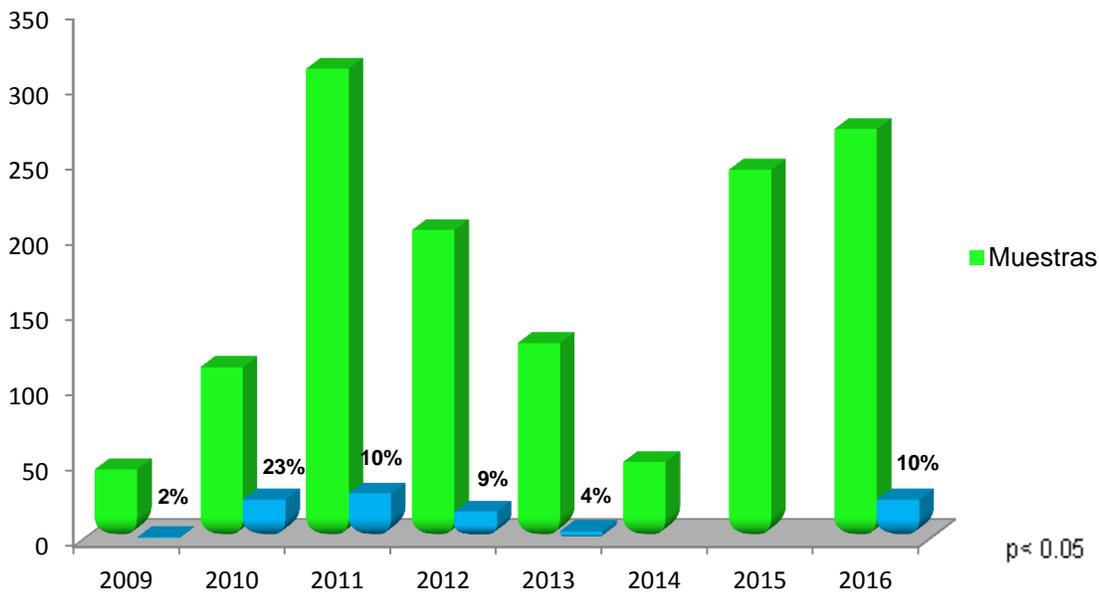


Figura 11. Positividad de Norovirus en los diferentes años estudiados. Cuba 2009-2016.
Fuente: LNR de Rotavirus. IPK

Entre los virus causantes de gastroenteritis aguda en la población infantil se encuentran con mayor frecuencia los rotavirus, sin embargo, estudios más recientes consideran al Norovirus como principal causa de brotes de enfermedades diarreicas agudas no bacterianas en personas de todas las edades, ocupando un segundo lugar en los niños menores de 5 años (*Nishimura y cols., 2010; Monteiro y cols., 2013; Zhuang y cols., 2017*).

En Cuba en el 2015 se realizó un primer reporte de casos de gastroenteritis aguda ocasionada por Norovirus en niños menores de 5 años, obteniéndose un 31.8% de positividad, lo que evidencia una proporción notable de este patógeno emergente en los niños en edad pediátrica (*Ribas y cols., 2015*).

Durante los años 2008 al 2012, en Brasil se realizaron estudios que demostraron la presencia de Norovirus en niños menores de cinco años, obteniéndose variaciones en los porcentajes de positividad desde un 7.8% a un 36.5% (*Siquiera y cols., 2013; Raboni y cols., 2014; Costa y cols., 2015; Picanço da Costa y cols., 2017*).

Al realizar el análisis de las 106 muestras positivas de Norovirus, se encontró que el porcentaje de positividad en los diferentes grupos de edades estudiados mostró en los niños

menores de 12 meses un 88% (93), siendo en los menores de 6 meses de un 49%(52), seguido por los de 7 a 12 meses con un 39%(41) (Fig.12) ($p < 0.05$).

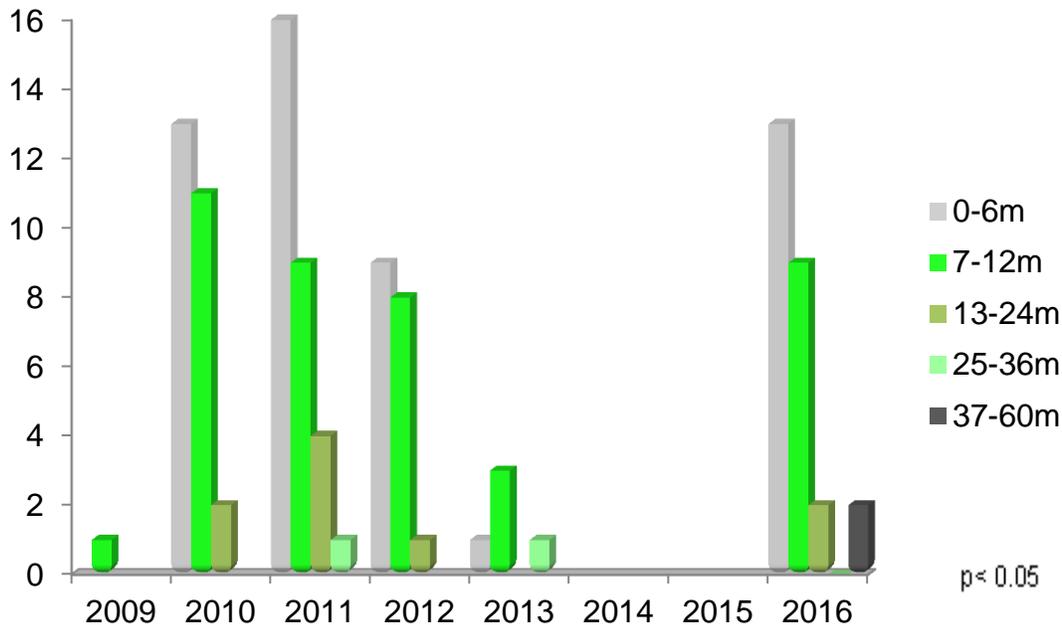


Figura 12. Positividad de Norovirus en los diferentes años y grupos de edades estudiados. Cuba 2009-2016.

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK

Los resultados fueron diferentes a los obtenidos en un estudio de población cubana en el 2015 en niños menores de 5 años de edad con enfermedades diarreicas agudas, donde se encontró el mayor porcentaje de positividad en niños entre 7 a 12 meses de edad(64.3%)(*Ribas y cols., 2015*).

Sin embargo, Mahar y Kirkwood en un trabajo presentado en el 2011 en niños australianos, la mayor positividad la encontraron en los menores de 6 meses con un 26.5% seguido por los de 7 a 12 meses con un 22.9%(*Mahar y Kirkwood, 2011*).

En los estudios realizados en el estado de Rondônia, Brasil en muestras de niños menores de seis años en el período comprendido desde el año 2010 al 2012, se encontró la mayor positividad en el grupo de 7-12 meses con un 39.1%,seguido por los de 13-18 meses con un 26.1%(*Costa y cols., 2015*).

En cuanto a género, como se observa en la figura 13, la positividad para ambos fue de un 50%(53/106) ($p > 0.05$).

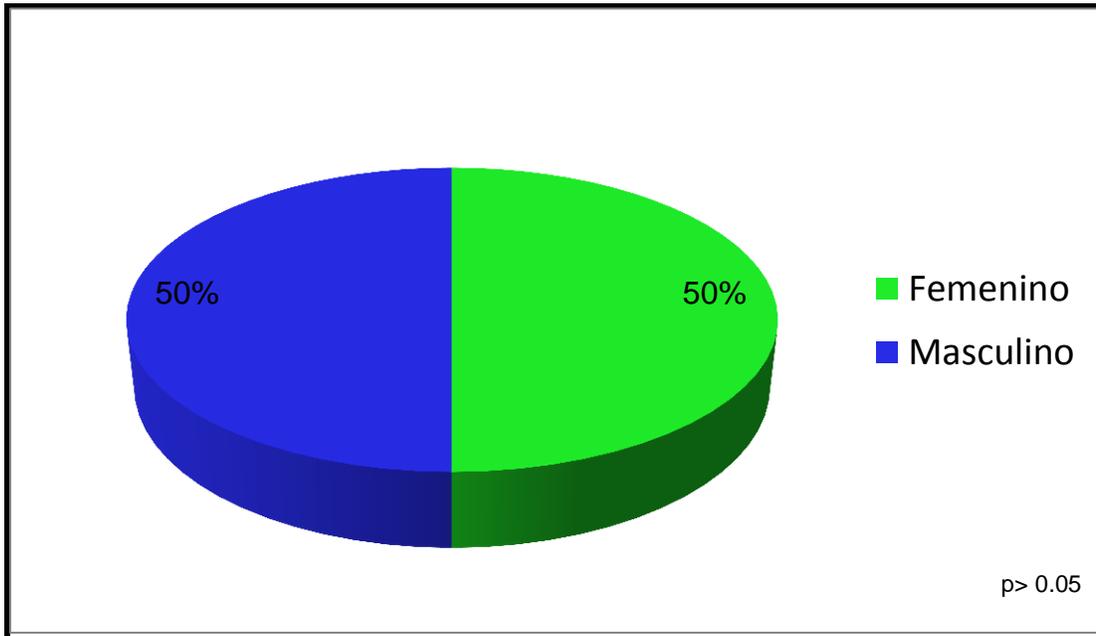


Figura 13. Positividad de Norovirus en cuanto al género. Cuba 2009-2016.

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK

En Cuba en el 2015, la positividad fue mayor en el sexo femenino con un 53.6% (*Ribas y cols., 2015*), sin embargo, en Chile en el 2014 se encontró que el sexo masculino tuvo un mayor porcentaje de positividad que el sexo femenino (31.5%/17.4%). En ese mismo año se realizó un estudio en Marruecos donde predominó la positividad del sexo masculino sobre el femenino (57.4%/ 42.6%). Aún no se conoce la causa de la mayor preferencia de la infección por Norovirus a un determinado género (*Montenegro y cols., 2014; El Qazoui y cols., 2014*).

La figura 14 muestra la distribución de Norovirus en los diferentes meses del año, encontrándose un mayor porcentaje de positividad en los meses enero con un 42%(44/106) y febrero con un 20%(21/106) ($p < 0.05$).

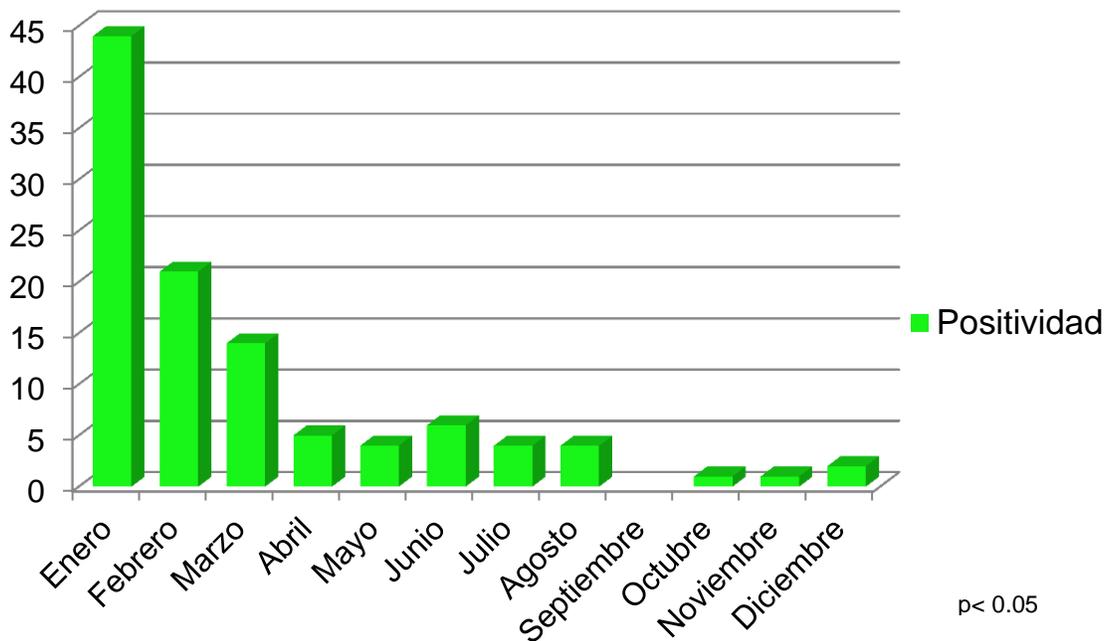


Figura 14. Positividad de Norovirus en los diferentes meses del año estudiados. Cuba 2009-2016.

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK

Estos resultados coinciden con los obtenidos en Chile en el 2014, donde la mayor positividad fue encontrada en los meses invierno (*Montenegro y cols., 2014*).

Se ha reportado que la estacionalidad de la infección por Norovirus aún no está bien establecida, aunque existe una alta frecuencia de aparición durante los meses de invierno, pudiéndose encontrar reportes de casos en la primavera y fundamentalmente en los meses de verano, ya que comienza la etapa de vacaciones, aumentando los factores de riesgo que facilitan la infección por este agente (*Abugalia y cols., 2011*).

Al realizar la técnica de TR –RCP, se observó que el genogrupo GII circuló en un 100% de los casos positivos estudiados. (Fig.15).

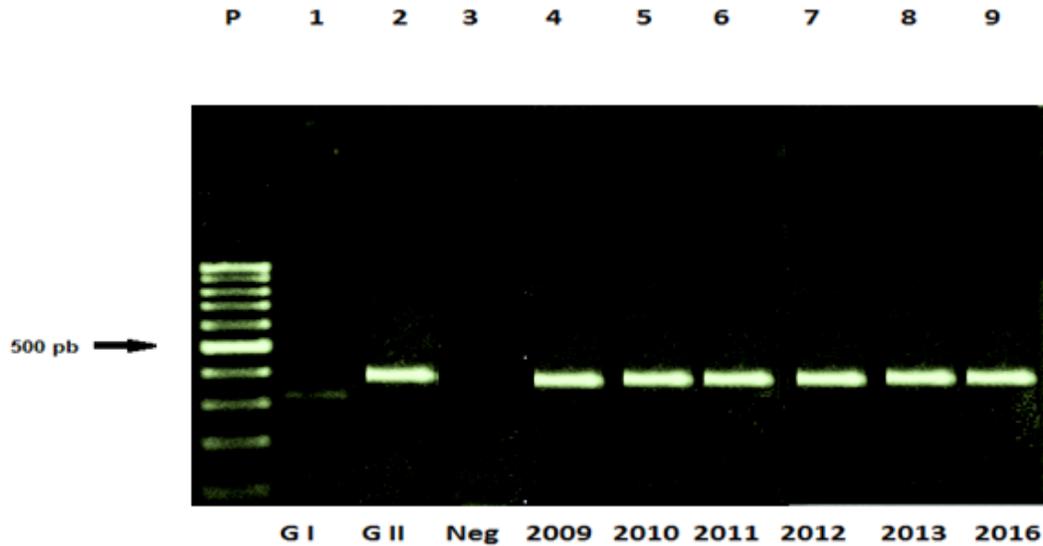


Figura 15. Resultados de la TR-RCP de Norovirus. Cuba 2009-2016.

Gel de corrida electroforética. P: Patrón de peso molecular de 100pb, carril 1 control positivo para GI, carril 2 control positivo para GII, carril 3 control negativo, Carriles 4 al 9 muestras de pacientes positivas GII.

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK

En Cuba en el años 2015 en un estudio realizado en el Hospital Pediátrico de Centro Habana, se encontró el predominio del genogrupo GII con un 78.6% (22/28) (*Ribas y cols., 2015*).

Un estudio realizado en la región del Amazona, Brasil del 2010 al 2011, se detectó la circulación del genogrupo GII con un 29.8% de positividad (*Picanço da Costa y cols., 2017*), este mismo genogrupo fue encontrado en Irán en el 2012 al estudiar 143 muestras de heces de niños menores de 5 años (*Jalilian y cols., 2012*).

En el 2014 en Chile, se encontró con mayor frecuencia al genogrupo GII, con un 62.2% (23/37), seguido de GI 24,3% (9/37) y se obtuvo un 13,5% (5/37) de coinfección con ambos genogrupos (*Montenegro y cols., 2014*).

Se considera que el genogrupo GII juega un papel importante tanto en la aparición de casos esporádicos, como en brotes de gastroenteritis aguda en niños y esto se debe, a que está mayormente asociado a transmisión por alimentos contaminados, contacto persona-persona y contaminación del medioambiente, además, la concentración viral en las heces de este genogrupo es 100 veces mayor a la de GI, de ahí su mayor prevalencia (*Matthews y cols., 2012*).

5.3.-Estudio de Astrovirus

La detección de Astrovirus solo se realizó en los niños menores de 2 años. De las 1313 muestras estudiadas se encontró una positividad en un 2.7% (36/1313), fundamentalmente en los años 2011(7/300;2%),2015(1/230;0.4%) y 2016(9/261; 3.4%) (Fig. 16). La diferencia entre los años estudiados fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

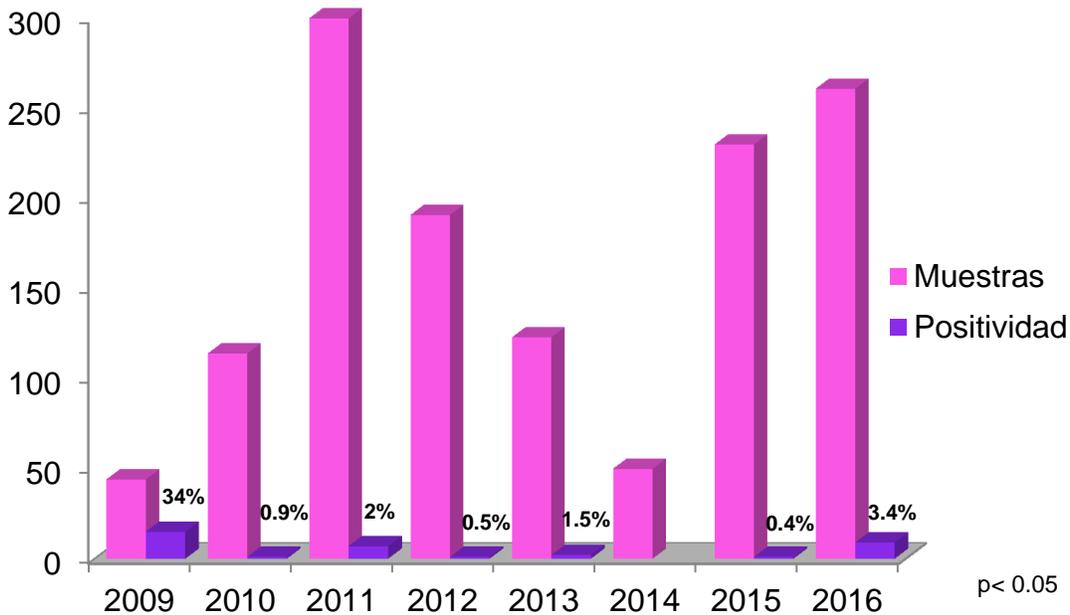


Figura 16. Positividad de Astrovirus en los diferentes años estudiados. Cuba 2009-2016. Fuente: LNR de Rotavirus. IPK.

Este es el primer reporte en Cuba de casos de gastroenteritis aguda ocasionada por Astrovirus en niños menores de 2 años, la técnica empleada para la detección del mismo fue la TR-RCP, la cual se plantea es la más adecuada para este diagnóstico por ser sensible y específica, dada la diversidad genética y antigénica del virus, lo que limita la utilidad de otros métodos como el del ELISA con el cual se realiza solamente la detección del antígeno (Zaraket y cols., 2017).

El porcentaje de positividad encontrado en el estudio, está en el rango de incidencia de Astrovirus a nivel mundial. En Corea, de Junio 2014 a Mayo 2015, empleando la TR-RCP, se obtuvo un 2.6% de positividad (Jin Hill y cols., 2016).

Otros estudios que también emplearon esta técnica para el diagnóstico, realizados en Brasil, Tailandia y el Líbano reportaron una positividad de un 1.4%, 7.1% y 5.5% respectivamente (*Malasao y cols., 2012; Xavier y cols., 2015; Zaraket y cols., 2017*).

La mayor positividad se encontró en los niños menores de 6 meses con un 53 % (19/36), seguido por los de 7 a 12 meses con un 42%(15/508), al comparar la positividad en los diferentes grupos de edades la diferencia fue significativa ($p < 0.05$).

El número de casos positivos fue el mismo para ambos géneros (18 casos), a pesar de que hubo un predominio en el género femenino en los niños de 0 a 6 meses (13/319; 4%) y del masculino en los de 7 a 12 meses (10/273;4%)(Tabla 10).

Tabla 10: Positividad de Astrovirus en cuanto a grupo de edades y género. Cuba 2009- 2016.

| | 0-6m | | | 7-12m | | | 13-24m | | | Total | |
|------------------|------------|----------|-----|------------|----------|-----|------------|----------|----|------------|-----|
| | No Muestra | Positivo | % | No Muestra | Positivo | % | No Muestra | Positivo | % | No Muestra | % |
| Femenino | 319 | 13 | 4% | 235 | 5 | 2% | 59 | 0 | 0 | 613 | 47 |
| Masculino | 357 | 6 | 2% | 273 | 10 | 4% | 70 | 2 | 3% | 700 | 53 |
| Total | 676 | 19 | 53% | 508 | 15 | 42% | 129 | 2 | 5% | 1313 | 100 |

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK.

$p < 0.05$

González y colaboradores en Venezuela en el 2011 encontraron, la mayor proporción de casos positivos en los niños menores de cinco meses (*González y cols., 2011*). Sin embargo, Xavier y colaboradores en Brasil en el 2015 detectaron Astrovirus en todos los grupos de edades analizados, evidenciando un mayor porcentaje de positividad en el grupo de 49-60 meses de edad con un 11.9%(*Xavier y cols., 2015*).

En Colombia se realizó un estudio en el año 2005, donde se encontró diferencia significativa entre el género masculino y el femenino (50.5%/49.5%), no siendo así en otro estudio realizado en el mismo país en el año 2014, en el cual predominó el género femenino con un 52% sobre el masculino con un 48%(*Gutiérrez y cols., 2005; Román y cols., 2014*).

La figura 17 muestra la distribución de Astrovirus en los diferentes meses del año estudiados, encontrándose un mayor porcentaje de positividad en el mes de mayo con un 28% (10/36) ($p < 0.05$).

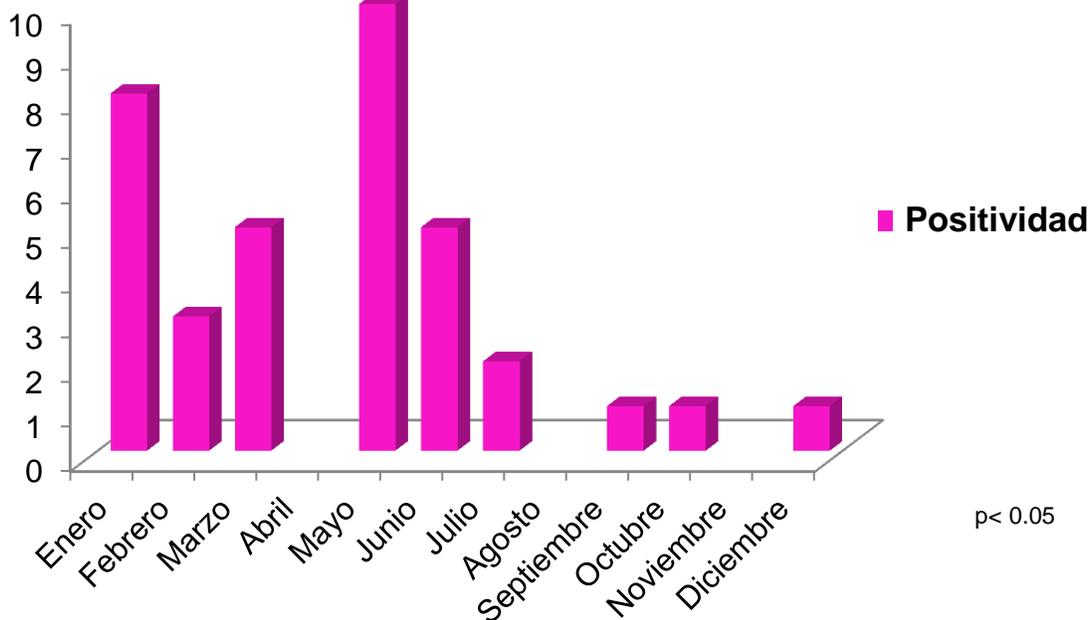


Figura 17. Positividad de Astrovirus en los diferentes meses del año estudiados. Cuba 2009-2016.

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK.

Xavier y colaboradores en 2015, obtuvieron en siete años de estudio resultados similares a los de este trabajo, mostrando una ligera tendencia hacia mayores tasas de detección durante la estación de lluvia (*Xavier y cols., 2015*). En países de climas templados el pico de detección de Astrovirus se reporta en los meses más fríos, mientras que en países de clima tropical la incidencia máxima es en temporada de lluvia aunque se pueden presentar durante todo el año (*Matsui y Greenberg, 2001*).

5.4.-Coinfección de los tres virus estudiados.

Se realiza el análisis de coinfección de los tres virus a las 1313 muestras de niños menores de dos años, definiéndose como coinfección, al proceso mediante el cual dos o más agentes infecciosos coexisten en un mismo hospedero. Este proceso es el resultado de la colonización de la primera especie patógena, la cual disminuye las defensas del hospedero y provoca daño tisular, generando un ambiente adecuado para que otros microorganismos produzcan una sobre infección (*Arrevillaga y Gómez, 2006*).

El análisis mostró coinfección Rotavirus- Norovirus en 26 casos (2%), Rotavirus-Astrovirus en 22(1.7%) y Rotavirus–Norovirus–Astrovirus en 2 (0.2%), predominando en los menores 12 meses la coinfección de Rotavirus –Norovirus con un 88%, mientras que en los niños de 13 a 24 meses (7/22; 32%) estuvo presente Rotavirus-Astrovirus. (Fig.18).

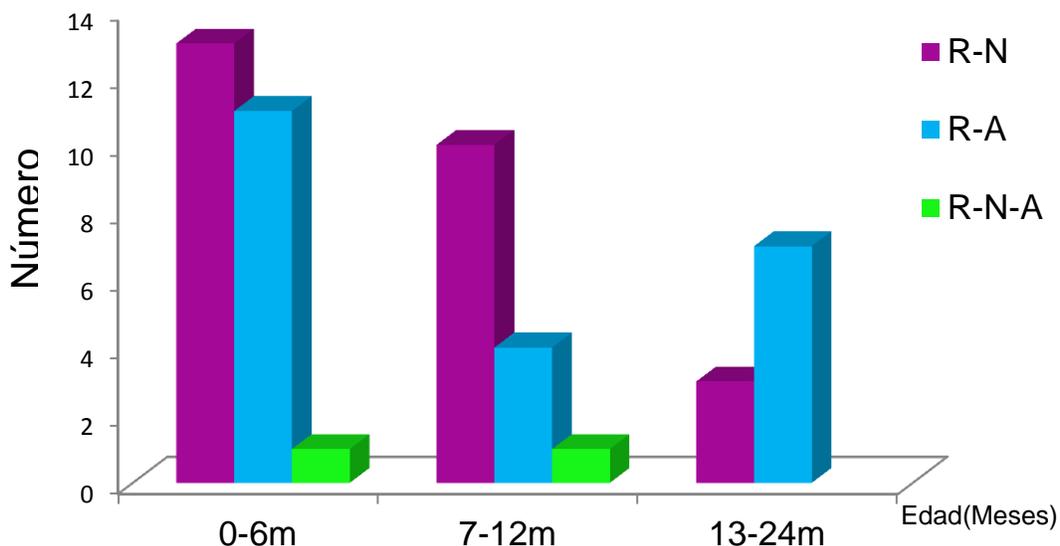


Figura 18. Coinfección entre los virus estudiados en los niños menores de 2 años. Cuba 2009-2016.

Fuente: LNR de Rotavirus. IPK

Leyenda: R-Rotavirus, N-Norovirus, A-Astrovirus

En el reporte realizado por Ribas y colaboradores en el 2015, se identificaron un 20.5% de coinfecciones entre Rotavirus –Norovirus en los niños menores de 6 meses (Ribas y cols., 2015).

Koh y colaboradores en Corea en el 2008, realizaron un estudio a 155 niños que presentaron un cuadro de diarreas acuosas agudas, encontrando coinfección en el 18.1% de las muestras positivas, de éstas él 64.3% correspondieron a la coinfección entre Rotavirus–Norovirus (Koh y cols., 2008).

La mayoría de las coinfecciones entre dos o más microorganismos ocurren en niños menores de 1 año, sobre todo en los menores o iguales a 6 meses de edad. Se considera que entre los factores predisponentes a estas infecciones, están la introducción de alimentos que pueden estar contaminados con diferentes microorganismos, el contacto directo con heces cuando el

niño gatea, la escasa inmunidad activa del menor de un año y principalmente la ausencia de la lactancia materna o el destete precoz con introducción de leche artificial en edades tempranas de la vida, con la consiguiente disminución de anticuerpos adquiridos de la madre (*Ouyang y cols., 2012*).

Podemos concluir que la gastroenteritis aguda en los niños menores de 5 años es un importante problema de salud, ya que constituye una enfermedad con un alto porcentaje de morbi-mortalidad anual a nivel mundial, siendo necesario fortalecer el conocimiento de los agentes asociados a esta enfermedad, lo que permitirá desarrollar estrategias para lograr la prevención y el control de la misma.

6.-CONCLUSIONES.

- 1.- En Cuba por primera vez se identificó la presencia de Astrovirus en casos de gastroenteritis aguda en niños menores de 2 años
- 2.-La infección por rotavirus continuó siendo la causa más frecuente de gastroenteritis aguda en la población infantil cubana menor de 5 años
- 3.-La presencia de Norovirus mostró la necesidad de tener en cuenta a este agente como segunda causa de diarreas en niños
- 4.-En el país se observó diversidad de genotipos de rotavirus circulantes en con predominio del G1P [8] y G9P [8] y se identificaron genotipos no presentes en las vacunas actuales
- 5.-Se demostró coinfecciones virales en niños con gastroenteritis aguda, lo que pudiera influir en el cuadro clínico de la enfermedad

7.-RECOMENDACIONES.

1.-Introducir en la vigilancia de una manera sistemática el estudio de Rotavirus, Norovirus y Astrovirus como importantes agentes causantes de diarreas en niños menores de 5 años.

2.-Ampliar los estudios de genotipificación de Rotavirus previo a la introducción de una vacuna contra este agente, en el programa ampliado de inmunizaciones del país.

8.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- ❖ Abad F, Villena C, Guix S, Caballero S, Pintó R, Bosch A. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.*2001; 37:3904-3907.
- ❖ Abugalia ML, Cuevas A, Kirby W, Dove O, Nakagomi T, et al. Clinical features and molecular epidemiology of rotavirus and norovirus infections in Libyan children. *J Med Virol.*2011; 83(10): 1849 - 56.
- ❖ Aguiar P, Rojas O, Ribas M, Hernández G. del Corral E. Proporción de casos esporádicos de diarreas agudas causadas por rotavirus del grupo A en Cuba de julio a noviembre de 2006. *Rev Cub Hig Epidemiol.*2009; 47 (2).
- ❖ Appleton H, Higgins P. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* . 1975; 1: 1297.
- ❖ Arguelles M, Villegas G, Castello A, Abrami A, Ghiringhelli P, Semorile L. VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *J. Clin. Microbiol.*2000; 38(12): 252-259.
- ❖ Arista S, Vizzi E, Migliore M, Di Rosa E, Cascio A. High incidence of G9P [8] rotavirus infections in Italian children during the winter season 1999- 2000. *Eur. J. Epidemiol.* 2003; 18(7-8): 711-714.
- ❖ Arrevillaga G. Gómez B. Aspectos moleculares de coinfecciones de virus respiratorios con bacterias. *Enf Inf Microbiol.* 2006; 26(4): 115-122.
- ❖ Bishop R, Davidson G, Holmes I, Ruck B. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet* . 1973; 1281-1283.
- ❖ Blanco N, Fernández S. Vacunas contra rotavirus: estado actual y tendencias futuras. *Vaccimonitor.* 2016; 25 (3).
- ❖ Boga J, Melon S, Nicieza I, De Diegol, Villar M, Parra F, et al. Etiology of sporadic cases of pediatric acute gastroenteritis in Asturias, Spain, and genotyping and characterization of norovirus strains involved. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(6): 2668-2674.
- ❖ Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(4):1048–74.
- ❖ Cáceres D, Peláez D, Sierra N, Estrada E, Sánchez L. La carga de la enfermedad por rotavirus en niños menores de cinco años, Colombia, 2004. *Rev. Panam. Sal. Pub.* 2005; 20(1): 6-14

- ❖ Castello A, Arguelles M, Rota R, Olthoff A, Jiang G, Glass R, et al. Molecular epidemiology of group A Rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of infrequent genotype G12. *J Clin Microbiol* .2004; 44:2046–2050.
- ❖ Chandra S, Diwakarla L, Palombo E. Genetic and antigenic variation of capsid protein VP7 of serotype G1 human rotavirus isolates. *J Gral Virol*, 1999; 80:341–344.
- ❖ Chen S, Tan L, Huang L, Chen K. Rotavirus infection and the current status of rotavirus vaccines. *J F Med Ass*.2012; 111(4), 183–93.
- ❖ Chieochansina T, Vutithanachotc V, Phumpholsup T , Posuwana N, Theamboonlersa A, Poovorawan Y. The prevalence and genotype diversity of Human Rotavirus A circulating in Thailand, 2011–2014. *Infection, Genetics and Evolution*.2016; 37(2016)129–136.
- ❖ Costa MS, Estevam GK, Penatti M, Lafontaine R, Gomes IC, Pontes PK, et al. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2015; 110(2): 215-221.
- ❖ Cruz F, Guzmán MG, Esquivel M, Grandio O, Vázquez S, Bravo GJR. Estudio de los aspectos clínicos y epidemiológicos de la diarrea aguda por rotavirus en niños: Cuba, 1982-1984. *Rev Cubana Med Trop* 1990; 42(2):178-87.
- ❖ Cunliffe (a) N, Gondwa J, Graham S, Thindwa B, Dove N, Broadhead R. Rotavirus strain diversity in Bantyre, Malawi from 1997-1999. *J. Clin. Microbiol*. 2001; 39(4):836-843.
- ❖ Daughenbaugh K, Fraser C, Hershey J, Hardy M. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J*.2003; 22(11): 2852-2859.
- ❖ de Oliveira LH, Camacho LA, Coutinho ES, Ruiz-Matus C, Leite JP. Rotavirus vaccine effectiveness in Latin American and Caribbean countries: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 2015; 33 Suppl 1:A248–54
- ❖ de Oliveira LH, Danovaro-Holliday MC, Kim J, Bispo AM, Gentsch J, Ruiz, et al. Sentinel Hospital Surveillance for Rotavirus in Latin American and Caribbean Countries. *JID* 2009:200 (Suppl 1)

- ❖ Degiuseppe Ji, Reale EA, Stupka JA, and Argentine Rotavirus Surveillance Network: Rotavirus Epidemiology and Surveillance Before Vaccine Introduction in Argentina, 2012–2014. *Journal of Medical Virology*.2017; 89:423–428.
- ❖ Desselberger U. Rotaviruses: from basic research to disease prevention by vaccination. *Future Virology*.2010; 4, 11–16.
- ❖ Díaz J. Vigilancia de diarreas por rotavirus en Hospitales Centinelas, Chile 2006-2008. [Tesis doctoral en Internet]. 2010
- ❖ Donaldson E, Lindesmith L, Lobue A, Baric R. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(3): 231-241.
- ❖ El Qazoui M, Oumzil H, Baassi L, El Omari N, Sadki K, Amzazi S, et al. Rotavirus and Norovirus infections among acute gastroenteritis children in Morocco. *BMC Infectious Diseases* 2014, 14:300.
- ❖ Esona MD, Buteau J, Ali Ber Lucien M, Joseph GA, Leshem E, Boncy J, et al. Rotavirus Group A Genotypes Detected through Diarrheal Disease Surveillance in Haiti, 2012 .*Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2015; 93(1):15. 54–56.
- ❖ Estes M, Morris A. A viral enterotoxin: a new mechanism of virus induced pathogenesis. *Adv Exp Med Biol*.1999; 473:73-82.
- ❖ Estévez TM, Díaz GM, Monte BR, Toledo RI, Bravo JR. Etiología infecciosa de las enfermedades diarreicas agudas en le República de Cuba, 1991. *Rev Cubana Med Trop* 1993; 45(2):139-45.
- ❖ Ferreira M, Victoria M, Carvalho-Costa F, Vieira C, Xavier M, Fioretti J, et al. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol*. 2010, 82(8): 1442-1448.
- ❖ Freeman M, Kerin T, Hall J, Caustland K, Gentsch J. Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stools using a modified real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol*.2008; 80(2): 1489-96.
- ❖ Gikonyo JN, Nyangao J, Mbae C, Sang C, Njagi E, Ngeranwa J, et al. Molecular characterization of group A rotaviruses in Mukuru slums Kenya: detection of novel strains circulating in children below 5 years of age. *BMC Res Notes* .2017; 10:290.
- ❖ Glass R, Parashar U, Estes M. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*.2009; 361(18): 1776-1785.

- ❖ Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet*. 2006; 368:323-32.
- ❖ Gómez MM, Volotaño EM, Lima de Mendonca, Tort L, da Silva MF, Leite JP. Detection of Uncommon Rotavirus A Strains P [8] G8 and P [4] G8 in the City of Rio de Janeiro, 2002. *J. Med. Virol*. 2010; 82:1272–1276.
- ❖ González G, Liprandi F, Ludert JE. Molecular Epidemiology of Enteric Viruses in Children With Sporadic Gastroenteritis in Valencia, Venezuela. *J. Med. Virol*. 2011; 83:1972–1982.
- ❖ Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*. 1990; 28:276-82.
- ❖ Green K. Caliciviridae: The Noroviruses. En: D. M. H. Knipe, M. Peter (ed.), *Fields Virology*, 5th Edition. 2007; Vol. I, pp. 950-979.
- ❖ Greenberg H, Estes M. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*. 2009; 136(6), 1939–51.
- ❖ Guerrant R, Schorling J, McAuliffe J, De Souza A. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1992; 47(13):28-35.
- ❖ Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, et al. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40: 133-139.
- ❖ Guix S. La proteína asP1a/4 y el ciclo biológico de astrovirus: aplicación en epidemiología molecular. [Tesis doctoral en Internet]. 2003; 1–233.
- ❖ Gurgel R, Alvarez A, Rodrigues A, Ribeiro RR, Dolabella S, Da Mota NL, et al. Incidence of Rotavirus and Circulating Genotypes in Northeast Brazil during 7 Years of National Rotavirus Vaccination. *PLOS ONE*. 2014; 9(10):110217.
- ❖ Gutiérrez MF, Matiz A, Ulloa JC, Alvarado M. Astrovirus (HAstV) como agente causal de diarrea en niños Colombianos: Siete años de estudio. *NOVA* 2005; 1794-2470 .3 (3).
- ❖ Hardy M. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 253(1): 1-8.
- ❖ Hernández M, Lecuona M. *Norovirus* and its increasing clinical importance. *Med Clin (Barc)*. 2015; 144(5):207–208

- ❖ Herrmann J, Nowak N, Perron-Henry D, Hudson R, Cubitt W, Blacklow N. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 1990; 61: 226-229.
- ❖ Hoshino Y, Kapikian A. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J. Health. Popul. Nutr.* 2000; 18(9): 5-14.
- ❖ Inoue Y, Kitahori Y. Rare group A rotavirus P [9] G3 isolated in Nara Prefecture Japan. *Jap. J. Infect. Dis.* 2006; 59(2-3): 139-140.
- ❖ Jain S, Vashisth J, Changotra H. Rotaviruses: is their surveillance needed *Vaccine*, 2014; 32(27), 3367–78.
- ❖ Jalilian, S, Samarbaf-Zadeh AR, Mozhgani S, Makvandi M, Parsa-nahad M, Pirmoradi R, et al. Relative Frequency of Norovirus Infection in Children Suffering From Gastroenteritis and Referred to Aboozar Hospital, Ahvaz, Iran. *J Microbiol.* 2012; 5(1): 355-358.
- ❖ Jiang B, Monroe S, Koonin E, Stine S, Glass R. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .1993; 90: 10539-10543.
- ❖ Jin HLL, Lee YM, Choi YJ, Jeong SJ. Recent viral pathogen in acute gastroenteritis: a retrospective study at a tertiary hospital for 1 year. *Korean J Pediatr* 2016; 59(3):120-125.
- ❖ Johnson P, Mathewson J, DuPont H, Greenberg H. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis.* 1990; 161(1): 18-21.
- ❖ Kapikian A, Wyatt T, Thornhill A, Kalica R, Chanock R. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* 1972; 10(5): 1075-1081.
- ❖ Kaplan J, Gary G, Baron R, Singh N, Schonberger L, Feldman R , et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med.* 1982; 96(6 Pt 1): 756-761.
- ❖ Karst S. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses.* 2010; 2(3): 748-781.
- ❖ King M, Adams Q, Carstens J, Lefkowitz B. *Virus taxonomy.* Elsevier Inc. 2011; 1327 (1): 334.
- ❖ Koh H, Baek SY, Shin J, Chung KS, Mee Jee Y. Coinfection of Viral Agents in Korean Children with Acute Watery Diarrhea: *J Korean Med Sci* .2008; 23: 937-40.

- ❖ Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* .2002; 100:107–114.
- ❖ Kurtz J, Lee T, Parson A, The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *J Hosp Infec*. 1980; 1:321-325.
- ❖ Le Cann P, Ranarijaona S, Monpoeho S, Le Guyader F, Ferre V. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res. Microbiol*.2004; 155: 11-15.
- ❖ Le Guyader F , Parnaudeau S, Schaeffer J, Bosch A, Loisy F, Pommeypuy M, et al. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol*.2009; 75(3): 618-624.
- ❖ Lee Ch, Lin Ch, Liang K, Zao L, Shih M, Hsiao N. Genetic characterization of the Rotaviruses Associated With A Nursery Outbreak. *J. Med. Virol* .2001; 63:311:20.31.
- ❖ Libert C, Dejager L, Pinheiro I.The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY*.2010; 10(8). p.594-604
- ❖ Linhares A, Mascarenhas R, Gusmao Y, Gabbay A, Fialho M, .Leite JP. Neonatal rotavirus infections in Belém, northern Brazil: Nosocomial transmission of a P [6] G2 strain. *J Med Virol*. 2003; 67(5): 418-426.
- ❖ Linhares A, Stupka J, Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Aruj P, et al. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2011; 10.1002.
- ❖ Lucero Y, Mamani N, Cortés H, Peña A, Vergara R, O’Ryan M. Genotipos de rotavirus aislados de niños chilenos con gastroenteritis atendidos en dos hospitales públicos: variantes virales circulantes en un país con uso limitado de vacunas anti-rotavirus. *Rev. chil. infectol*. 2012; 29(2).
- ❖ Luchs A, Morillo SG, Ribeiro CD, Cilli A, Calux SJ, Carmona R, et al. Rotavirus G2P [4] and G2P [4]+[6] infections during norovirus gastroenteritis outbreak: summer season 2010, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(2):227-230.
- ❖ Madeley C, Cosgrove B. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* .1975; 2: 451-452.

- ❖ Mahar J, Kirkwood CD. Characterization of Norovirus Strains in Australian Children from 2006 to 2008: Prevalence of Recombinant Strains. *J. Med. Virol.* 2011; 83: 2213–2219.
- ❖ Malasao R, Khamrin P, Chaimongkol N, Ushijima H, Maneekarn N. Diversity of Human Astrovirus Genotypes Circulating in Children With Acute Gastroenteritis in Thailand During 2000–2011. *J. Med. Virol.* 2012; 84:1751–1756.
- ❖ Maldonado A, Franco C, Blanco A, Villalobos L, Martínez R, Hagell, et al. Características clínicas y epidemiológicas de la infección por rotavirus en niños de Cumaná, Venezuela. *Invest Clin.* 2010; 51:519-529.
- ❖ Martínez M, Carvalho-Costa FA, de Mello E, Lundgren T, Figueira M, Madi Fialho A, et al. Prevalence and genomic characterization of G2P[4] group A rotavirus strains during monovalent vaccine introduction in Brazil. *Genetics and Evolution.* 2014; 28: 486–494.
- ❖ Matsui SM, Greenberg HB. Astroviruses. In DM Knipe, PM Howley (eds), *Fields Virology*, 4th ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2001; 875-893.
- ❖ Matsuno S, Hasegawa A, Mukoyama A, Inouye S. A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.* 2002; 54(6972): 623-624.
- ❖ Matthews JE, Dickey B, Miller RD, Felzer JR, Dawson B, Lee AS, et al. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol Infect.* 2012; 140(7): 1161-1172.
- ❖ Méndez E, Murillo A, Velázquez R, Burnham A, Arias CF. Replication cycle of Astroviruses. In Schultz-Cherry S, *Astrovirus Research*. Springer Verlag, New York. 2012; 19-45.
- ❖ Méndez E, Salas-Ocampo E, Arias S C. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol.* 2004; 78:8601-8608.
- ❖ Méndez M, Escobar ME. Gastroenteritis por Rotavirus. Holguín. Diciembre 2010 - Mayo 2011. *Memorias Convención Internacional de Salud Pública. Cuba Salud*. 2012; ISBN 978-959-212-811-8.
- ❖ Midthun K, Greenberg H, Kurtz J, Gary G, Lin F, Kapikian A. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 955-962.

- ❖ Mitchell D, Matson D, Jiang K, Berke T, Monroe S, Carter M, et al. Molecular Epidemiology of childhood Astrovirus Infection in child care centers. *The J Infect Dis.* 1999; 180: 514-517.
- ❖ Mitchell D. Astrovirus gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis.* 2002; J.21:1067-1069.
- ❖ Molberg O, Nilsen E, Sollit L, Scott H, Brandtzaeg P, Thorsby E, et al. T cells with specific reactivity against astrovirus isolated from human small intestine. *Gastroenterology.* 1998; 114: 115-122.
- ❖ Monteiro JA, Linhares A, dos Santos M, Nascimento de Carvalho TC, Aguiar MC, Pereira J, et al. Group A rotavirus and norovirus display sharply distinct seasonal profiles in Belém, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,* 2013; 108(5): 661-664.
- ❖ Montenegro S, Pineda S, Enríquez I, Enríquez N, Rivera N, Delgado C. Detección de norovirus en niños con diarrea adquirida en la comunidad o nosocomial en el Hospital Guillermo Grant Benavente de Concepción, Chile. *Rev Chilena Infectol.* 2014; 31 (3): 298-304.
- ❖ Morillo S, Timenetsky C. Norovirus: an overview. *Rev Assoc Med Bras.* 2011; 57(4): 453-458.
- ❖ Nakagomi O, Nakagomi T. Genomic relationships among rotaviruses recovered from various animal species as revealed by RNA-RNA hybridation assays. *Res. Vet. Sci.* 2002; 73(2): 207-214.
- ❖ Nishimura N, Nakayama H, Yoshizumi S, Miyoshi M, Tonoike H, Shirasaki Y, K. et al. Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification. *J Virol Methods.* 2010; 163(2): 282-286.
- ❖ Ouyang Y, Jin M, Wang X, Wang J, Xu L, Lin, S, et al. Etiology and epidemiology of viral diarrhea in children under the age of five hospitalized in Tianjin, China. *Arch Virol.* 2012; 157(5): 881-887.
- ❖ Oyola MG, Diversidad de Rotavirus A en niños con gastroenteritis aguda en Lima, Perú. [Tesis Licenciatura Biología en Internet]. 2015.
- ❖ Parashar U, Gibson C, Bresse J, Glass R. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(1): 304-6.
- ❖ Patel M, Hall A, Vinje J, Parashar U. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol.* 2009; 44(1): 1-8.

- ❖ Patton J, Carpio R, Spencer E. Replication and Transcription of the Rotavirus Genome. *Current Pharmaceutical Design* .2004; 10(30), 3769–3777.
- ❖ Pfister T, Wimmer E. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol*. 2001; 75(4): 1611-1619.
- ❖ Picanço da Costa ST, Fumian TM, Gomes de Lima IC, Monteiro JA, Damascena da Silva L, Hernández JM, et al. High prevalence of norovirus in children with sporadic acute gastroenteritis in Manaus, Amazon Region, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*.2017; 112(6): 391-395.
- ❖ Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes M, X-ray Crystallographic structure of the Noewalk Virus capsid, *Science*. 1999; 286(5438):287-90.
- ❖ Raboni SM, Costa Damasio GA, Ferreira C, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR, et al. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2014; 109(4): 428-435,
- ❖ Rahman M, Matthijssens J, Nahar S, Podder G, Sack D, Azim A. Characterization of a novel P [25] G2 human group A rotavirus. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(1-2): 3208-3212.
- ❖ Reeck A, Kavanagh O, Estes M, Opekun A, Gilger M, Graham D, et al. Serological correlate of protection against norovirus-induced gastroenteritis. *J Infect Dis*. 2010; 202(8): 1212-1218.
- ❖ Ribas MA, Castaño Y, Martines MD, Tejero Y, Cordero Y .Norovirus and Rotavirus infection in children aged less than five years in a paediatric hospital, Havana, Cuba. *Braz Infect Dis*. 2015; 1 9(2):222–223.
- ❖ Ribas MA, Nagashima S, Calzado A, Acosta G, Tejero Y, Cordero Y, et al. Emergence of G9 as predominant genotype of human rotavirus in Cuba. *J Med Virol*. 2011; 83: 738-44.
- ❖ Ribas MA, Tejero Y, Cordero Y, León M, Rodríguez M, Perez-Lastre J, et al. Detection of rotavirus and other enteropathogens in children hospitalized with acute gastroenteritis in Havana, Cuba. *J Med Virol*. 2015; 160:1923-1960.
- ❖ Ribas MA, Tejero Y, Cordero Y. Ramirez Y, Pérez D, Roque R, et al. Gastroenteritis Aguda en niños menores de 5 años: Impacto de los agentes virales en su etiología .*Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 2016; 6(3).

- ❖ Ribes J, Buesa J. Norovirus infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*2010; 28 Suppl 1, 51-55.
- ❖ Riverón R, Zarragoitia O, Fernández H, Comellas M, Bernanrd A, Hernandez J, et al. Enfermedades diarreicas agudas por Rotavirus: diagnóstico por microscopía electrónica y prueba de Latex .*Rev Cub Ped.*1989; 61(2):178-188.
- ❖ Román Y, Ramírez R, Claudia P, Jaimes B. Prevalence of astrovirus in patients with acute diarrheal disease at San Rafael Hospital of Tunja (Colombia). *Salud Soc. Uptc.* 2014; 1(1): pp. 26-30.
- ❖ Rondon S. (2006): El peligroso rotavirus primera causa de diarrea en el niño .Disponible en: <http://www.drrondonpediatra.com>.
- ❖ Shastri S, Doane A, Gonzales J, Upadhyayula U, Bass D. Prevalence of astroviruses in a children's hospital. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 2571-2574.
- ❖ Shirato, H. Norovirus and histo-blood group antigens. *Jpn J Infect Dis.*2011; 64(2): 95-103.
- ❖ Simaluiza R, Cevallos G, Bourdett L, Arévalo P, Ruiz J, Villacis D, et al. Genotipificación de Rotavirus en niños menores de cinco años en la región sur del Ecuador. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 2016; 50 (4).
- ❖ Siqueira JA, Linhares A, Carvalho TCN, Aragão GC, Oliveira DS, Santos MC, et al, Norovirus infection in children admitted to hospital for acute gastroenteritis in Belém, Pará, northern Brazil. *J Med Virol* .2013; 85: 737-744.
- ❖ Steele AD, Madhi S, Cunliffe NA, Vesikari T, Phua KB, Lim F, et al. Incidence of rotavirus gastroenteritis by age in African, Asian and European children: Relevance for timing of rotavirus vaccination. *Hum Vaccin Immunother* 2016; 12(9):2406-12.
- ❖ Steele AD, Williams M, Bos P, Peenze I. Comparision of two rapid enzyme immunoassays with standard enzyme immunoassay and latex agglutination for the detection of human rotavirus in stools. *J. Diarr. Dis. Res.*1994; 12: 117-120.
- ❖ Tamayo L., Moreno B. Actualización Rotavirus. Hospital del Niño La Paz Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés.2007.
- ❖ Taylor M, Grabow W, Cubitt W. Propagation of human astrovirus in the PLC/PRF/5 hepatoma cell line. *J. Virol. Methods* .1997; 67: 13-18.

- ❖ Thompson M, Innes R, Willar H. Genetics in Medicine. In: Genetics of the immunesystem. Fifth edition. Philadelphia. W.B. Saunders Company. 1991; 337-347.
- ❖ Usonis V, Ivaskeviciene I, Desselberger U, Rodrigo C. The unpredictable diversity of co-circulating rotavirus types in Europe and the possible impact of universal mass vaccination programmes on rotavirus genotype incidence. *Vaccine* .2012; 30(31):4596-4605.
- ❖ van Regenmortel M, Fauquet C, Bishop D, Carstens E, Estes M, Lemon S, et al. Pringle, & R. B. Wickner.2000. *Virus taxonomy*.2000; 1162 Academic Press, San Diego.
- ❖ Villena C. Vigilancia Ambiental Molecular de Rotavirus Grupo A humanos. Facultad de Biología. Departamento de Microbiología. Barcelona. [Tesis doctoral en Internet]. 2003.
- ❖ Vizzi E. Rotavirus: consideraciones biológicas, epidemiológicas e inmunológicas de la infección en humanos. 2009; 12(1):14-30.
- ❖ Wang Q, Kakizawa J, Weng L, Shimizu M, Nishio O, Fang Z, et al. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *J. Med. Virol.* 2001; 64:245-255.
- ❖ Weigl P, Orellana F, Cornejo H, del Vallec LJ, Cornejo A, Bazaín J, et al. Diarrhoea caused by rotavirus in a regional Peruvian hospital: determination of circulating genotypes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*2014; 10.1093.
- ❖ WHO (2007): Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por Rotavirus: Guía Práctica. Retrieved from. Disponible en: http://cidbimena.desastres.hn/filemgmt/files/guiapractica_rotavirus.pdf.
- ❖ Wilhelmi I, Roman E, Sánchez Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9:247-62.
- ❖ Xavier M, Costa FAC, Rocha MS. Surveillance of Human Astrovirus Infection in Brazil: The First Report of MLB1 Astrovirus. *PLOS ONE.*2015; 10:0135687.
- ❖ Zahorsky J. Hyperemesis Hiemis or Winter Vomiting Disease. *Arch. Pediat.*1929; 46, 391.
- ❖ Zaraket H, El-Hassan HA, Kreidieh K, Soudani N, Ali Z, Hammadi M, et al. Characterization of astrovirus-associated gastroenteritis in hospitalized children under five years of age. *Infection, Genetics and Evolution* .2017; S1567-1348(17)30176-4.
- ❖ Zhang S, Yin J, Yang J, Tian L, Li D, Zhang Q, et al . Epidemiology and Genetic Diversity of Group A Rotavirus in Acute Diarrhea Patients in Pre-Vaccination Era in Southwest China. *J Med Virol.* 2017; 89:71–78.

❖ Zhuang Z, Jin Y, YanK , Cheng W. Study of the association between histo-blood group antigens and norovirus infection in Chinese children. Arch Virol .2017; 10.1007.

9.-ANEXOS.

9.1.-Anexo 1

Modelo de recolección de datos sobre muestras para diagnóstico microbiológico o envío de cepas para el trabajo de Referencia nacional en el IPK.

| | | | | | | | | | |
|---|---|------------------|---------------|---|---|-----------------------|---------------------------------------|---|--|
| 1-Nombre(es) | | Primer Apellido: | | Segundo Apellido: | | 2-Carné de Identidad: | | No. | |
| 3-Dirección Particular: | | 4-Municipio: | | 5-Provincia: | | 6-Hist. Clínica: | | | |
| 7-Edad: | 8-Sexo: Masc. <input type="checkbox"/> Fem. <input type="checkbox"/> | 9-Ocupación | | 10-Color de la piel: Blanca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Amarilla <input type="checkbox"/> Mestiza <input type="checkbox"/> | | | 11-Días de ingreso | | |
| 12-Centro que Remite: | | 13-Sala | 14-Municipio: | | 15-Provincia: | | 16-Fecha: _ _ _ _ Día Mes Año | | |
| 17-Diagnóstico Clínico: _____ | | | | | 18-Tipo de Muestra colectada: | | | 19-APP: | |
| 20-Fecha de comienzo de los Síntomas: _ _ _ _ Día Mes Año | | | | | Suero <input type="checkbox"/> Sangre <input type="checkbox"/> | | | Enfermedad similar en la familia o comunidad: | |
| 21-GENERALES: | | | | | LCR <input type="checkbox"/> Humor acuoso <input type="checkbox"/> | | | SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> | |
| Fiebre <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Cefalea <input type="checkbox"/> Linfadenopatía <input type="checkbox"/> | | | | | Orina <input type="checkbox"/> Líquido amniótico <input type="checkbox"/> | | | Historia de viajes al exterior: | |
| Malestar General <input type="checkbox"/> Vómitos <input type="checkbox"/> Rash <input type="checkbox"/> Petequias <input type="checkbox"/> | | | | | Gargarismo <input type="checkbox"/> Esputo <input type="checkbox"/> | | | SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> | |
| Diarreas <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> Esplenomegalia <input type="checkbox"/> | | | | | Heces <input type="checkbox"/> | | | País: _____ | |
| Anorexia <input type="checkbox"/> Ictero <input type="checkbox"/> Hepatomegalia <input type="checkbox"/> | | | | | Exudado <input type="checkbox"/> Cual _____ | | | Fecha llegada al país: | |
| Astenia <input type="checkbox"/> Escalofríos <input type="checkbox"/> Sangramiento <input type="checkbox"/> | | | | | Tejido <input type="checkbox"/> Cual _____ | | | _ _ _ _ Día Mes Año | |
| Dolor abdominal <input type="checkbox"/> Aumento de volumen de parótida <input type="checkbox"/> | | | | | **Lámina de: _____ | | | Tratamiento Previo: | |
| IRA: | | | | | Cepa _____ de: | | | SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> | |
| Tos <input type="checkbox"/> Disnea <input type="checkbox"/> Expectorcación <input type="checkbox"/> | | | | | Fecha colecta muestra: | | | Cuál(es): _____ | |
| Laringitis <input type="checkbox"/> Faringitis <input type="checkbox"/> Rinorrea <input type="checkbox"/> | | | | | _ _ _ _ Día Mes Año | | | Antecedente de vacunación PRS | |
| Otitis <input type="checkbox"/> Coqueluche <input type="checkbox"/> Amigdalitis <input type="checkbox"/> | | | | | 22-Estudio solicitado: | | | SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> | |
| Laringotraqueobronquitis <input type="checkbox"/> Estornudos <input type="checkbox"/> | | | | | Diagnóstico <input type="checkbox"/> | | | Fecha : _____ | |
| Vacunación anti-Influenza <input type="checkbox"/> | | | | | Referencia <input type="checkbox"/> | | | _ _ _ _ Día Mes Año | |
| SNC: | | | | | 23-SUEROS PAREADOS | | | | |
| Desorientación <input type="checkbox"/> Rigidez nucal <input type="checkbox"/> Convulsiones <input type="checkbox"/> | | | | | Fecha de colecta: | | | | |
| Perdida de conciencia <input type="checkbox"/> Trastornos de conducta <input type="checkbox"/> | | | | | 1 ^{er} Suero _ _ _ _ Día Mes Año | | | | |
| Dificultad en la marcha <input type="checkbox"/> | | | | | 2 ^{do} Suero _ _ _ _ Día Mes Año | | | | |
| ITS: | | | | | Confirmatorio <input type="checkbox"/> | | | | |
| Secreción Genital <input type="checkbox"/> Lesión Genital <input type="checkbox"/> | | | | | (Dengue) | | | | |
| SEPSIS URINARIA: Disuria <input type="checkbox"/> | | | | | Referencia <input type="checkbox"/> | | | | |
| Otros: _____ | | | | | | | | | |
| 24- Nombre del Facultativo: | | | | | | | | | |
| 25- RESULTADOS | | | | | | | | | |

*Para el envío de cepas solo se requieren los datos correspondientes a los acápite: 1, 4, 5, 6,

