



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

“CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE”

NÚMERO DE REGISTRO: 457.2016

“PREVALENCIA DE INFECCIONES GASTROINTESTINALES POR CALICIVIRUS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS INMUNOCOMPROMETIDOS EN EL CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE”.

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD DE:

INFECTOLOGIA

PRESENTA:

DR. CARLOS ANDRÉS ACEVES BARRIOS

ASESOR DE TESIS:

DR. ALFREDO MORAYTA RAMIREZ



CIUDAD DE MÉXICO

ENERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN

DRA. AURA A. ERAZO VALLE SOLÍS
Subdirector de Enseñanza e Investigación del Centro Médico 20 de Noviembre

DR. ALFREDO MORAYTA RAMIREZ
Profesor titular del Curso de Infectología
CMN 20 de Noviembre ISSSTE

DR ALFREDO MORAYTA RAMIREZ
Asesor y director de Tesis

DRA. SOFIA LIZETH ALCARAZ ESTRADA
Jefa de la División de Medicina Genómica
CMN 20 de Noviembre-ISSSTE
Investigador responsable y Asesor de Tesis

DR. JAVIER ORDOÑEZ ORTEGA
CMN 20 de Noviembre-ISSSTE
Asesor Técnico de Tesis

DR. CARLOS ANDRÉS ACEVES BARRIOS
Médico residente de la especialidad de Infectología
CMN 20 de Noviembre ISSSTE

ÍNDICE

TEMA	PÁGINAS
Título	4
Resumen	5
Summary	6
Abreviaturas	7
Introducción	8
Antecedentes	9-13
Planteamiento del problema	14
Justificación	15
Objetivos	16
General	
Específicos	
Metodología	17
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	17
Variables	18
Aspectos éticos	19
Resultados	20-21
Discusión	22
Conclusiones	23
Referencias bibliográficas	31-32

TITULO

“PREVALENCIA DE INFECCIONES GASTROINTESTINALES POR CALICIVIRUS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS INMUNOCOMPROMETIDOS EN EL CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE”.

RESUMEN

Introducción Las gastroenteritis virales representan un problema de salud pública en el país. Los Norovirus (NoVs) son la principal causa en epidemias de gastroenteritis ocasionando más del 90% de gastroenteritis no bacterianas y aproximadamente el 50% de todas las gastroenteritis a nivel mundial. Estos virus pertenecen a la familia *Caliciviridae*. Los pacientes inmunocomprometidos tienen riesgo de presentar episodios prolongados y recurrentes de gastroenteritis por calicivirus. En México no se ha determinado el papel que juegan los calicivirus en la población pediátrica inmunosuprimida.

Objetivos. Determinar la prevalencia de *calicivirus* en muestras fecales diarreicas de pacientes pediátricos hemato-oncológicos inmunosuprimidos.

Material y métodos. Estudio prospectivo de cohorte dinámica. Se obtuvieron muestras fecales diarreicas de pacientes inmunocomprometidos y se almacenaron a -80 °C. Se realizó la determinación de muestras positivas a calicivirus, específicamente notovirus, primero por una reverso transcripción y reacción en cadena de polimerasa multiplex (RT-PCR) y posteriormente una reacción en cadena (PCR) multiplex en punto final.

Resultados. Solamente 10 muestras cumplieron con los criterios de inclusión hasta el momento, 10% pertenecían a mujeres y 90% a hombres. 8 pacientes (80%) tenían diagnóstico de base Leucemia linfocítica aguda y 20% padecían tumores sólidos. El 100% se encontraba bajo esquemas de quimioterapia con distintos grados de inmunosupresión. Se encontró positividad para calicivirus en 90% de los pacientes. 2 pacientes presentaron también positividad para adenovirus.

Conclusiones. Es limitado nuestro conocimiento actual de las infecciones en esta población por calicivirus en México. Los resultados concuerdan con hallazgos de otros países, donde se observa una alta prevalencia de este virus en población pediátrica inmunosuprimida.

Palabras clave. Cáncer, Calicivirus, Inmunosupresión, Gastroenteritis infecciosa,

SUMMARY

Introduction Viral gastroenteritis represents a public health problem in the country. Norovirus (NoVs) are the leading cause of gastroenteritis epidemics causing more than 90% of non-bacterial gastroenteritis and approximately 50% of all gastroenteritis worldwide. These viruses belong to the family Caliciviridae. Immunocompromised patients are at risk for prolonged and recurrent episodes of calicivirus gastroenteritis. In Mexico, the role of calicivirus in the immunosuppressed pediatric population has not been determined.

Goals. To determine the prevalence of calicivirus in diarrheal fecal samples of immunosuppressed hemato-oncological pediatric patients.

Material and methods. Prospective cohort study. Diarrheal fecal samples were obtained from immunocompromised patients and stored at -80 ° C. Calicivirus positive samples, specifically norovirus, were determined first by a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and second a final point multiplex polymerase chain reaction (PCR).

Results. Only 10 samples met the inclusion criteria so far, 10% belonged to women and 90% to men. 8 patients (80%) were diagnosed with acute lymphocytic leukemia and 20% had solid tumors. 100% were under chemotherapy regimens with different degrees of immunosuppression. Calicivirus positivity was found in 90% of patients. 2 patients also had adenovirus positivity.

Conclusions. Our current knowledge of infections in this population by calicivirus in Mexico is limited. The results agree with findings from other countries, where a high prevalence of this virus is observed in immunosuppressed pediatric population.

Keywords. Cancer, Calicivirus, Immunosuppression, Infectious gastroenteritis

ABREVIATURAS

- Norovirus (NoVs)
- Calicivurs Humanos (HuCa)
- Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR).
- Amortiguador de fosfato salino (PBS)
- Ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA)
- Ácido ribonucleico (RNA)
- Transcriptasa reversa (RT)
- Calicivirus Humanos (HuCVs)
- Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)
- Síndrome de distress respiratorio agudo (SDRA)
- Leucemia Linfoblástica aguda (LLA)
- Neutropenia febril (NF)
- Proteína C reactiva (PCR)
- Recuento absoluto de neutrófilos (RAN)
- Horas (h)

INTRODUCCION

La gastroenteritis es una enfermedad que, a pesar de los controles en calidad de agua y comida así como las estrategias de prevención, sigue siendo un problema a nivel mundial, encontrándose dentro de las primeras causas de defunción infantil en países en vías de desarrollo. Esta enfermedad provoca alrededor de 1.8 millones de muertes infantiles al año. El control de estos padecimientos requiere un conocimiento dirigido específicamente a los agentes causales de la diarrea severa.

Para fines de este estudio se considera diarrea como un cambio en los hábitos intestinales presentando 3 o más evacuaciones no formadas con disminución en su consistencia habitual en un plazo de 24 h o documentación médica de la diarrea por el profesional de la salud tratante. La resolución de la diarrea fue considerada como un período mínimo de 48 h durante el cual se presentaron heces de características normales posterior a evento de diarrea.

Se define Diarrea recurrente como un episodio de diarrea que ocurre al menos 1 semana después pero menos de 4 semanas de haber presentado resolución de la diarrea inicial. Sujetos que experimentaron resolución de la diarrea, pero desarrollaron una recaída antes de cumplir 1 semana posterior al primer evento, se consideró que era la continuación de su episodio de diarrea inicial. La diarrea persistente se definió como duración de la diarrea mayor a 14 días y a diarrea con inicio en la comunidad o habiéndose presentado con 48 h tras el ingreso hospitalario fue descrito como la diarrea asociada a la comunidad. Inicio de la diarrea > 48 h tras el ingreso hospitalario se consideró como la diarrea asociada a cuidados de la salud.

Virus Norwalk y virus Sapporo son virus pertenecientes a dos diferentes géneros (Norovirus y Sapovirus) ambos comprendidos dentro de la familia Caliciviridae un grupo de virus con genomas de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. Estos virus son llamados comúnmente como Calicivirus humanos (HuCa). La utilización de técnicas de diagnóstico molecular ha permitido determinar que NoVs son la principal causa en epidemias de gastroenteritis en todos los grupos de edades ocasionando más del 90% de gastroenteritis no bacterianas y aproximadamente el 50% de todas las gastroenteritis a nivel mundial. A partir de la gran efectividad que ha tenido la vacuna de rotavirus humano, este agente ha dejado de ser la principal

causa de gastroenteritis aguda en la población en general, dando paso a nuevos agentes como los Calicivirus.

Se ha observado previamente que en los pacientes inmunocomprometidos son los más susceptibles a presentar episodios prolongados y recurrentes de gastroenteritis por calicivirus. Las fuentes de infección incluyen familiares, trabajadores de la salud así como agua y alimentos contaminados. Varios estudios han demostrado que las terapias inmunosupresivas son un factor de riesgo de infección con Calicivirus.

ANTECEDENTES

Caliciviridae es una familia de virus que actualmente incluye cinco géneros que difieren entre su organización genómica y sus secuencias genéticas comparadas filogenéticamente. Son cinco géneros que conforman esta familia y se denominan Norovirus, Sapovirus, Vesivirus, Lagovirus y Nebovirus. La primera enfermedad asociada a calicivirus en animales fue descrita en animales en 1932, cuando los brotes de un exantema vesicular restringido a cerdos domésticos ocurrieron en California y se extendieron por los Estados Unidos (Exantema vesicular de la infección por virus del cerdo [VESV], prototipo del género Vesivirus). Aunque no se disponía de herramientas de diagnóstico para identificar el agente causal, las observaciones epidemiológicas sugirieron un origen infeccioso que se transmitió probablemente a través de alimentos contaminados. Los programas extensivos de la esterilización de la alimentación y de la restricción de los tipos del alimento finalmente pararon los brotes en los años 50.

En los años setenta, las cepas de VESV fueron visualizado por microscopía electrónica y se observaron rasgos distintivos en su forma de “cálices” con bordes puntiagudos que recuerdan también a la Estrella de David, lo cual llevo al nombre de Calicivirus (Figura 1). Se observaron calicivirus en muestras de humanos hasta 1972, cuando las partículas virales fueron aisladas de muestras de heces de pacientes con gastroenteritis involucrados en un brote que afectó a los escolares, los profesores y sus contactos en la población de Norwalk, Ohio.

Los estudios demostraron el papel causal de estas partículas redondas y de superficie rugosa visualizadas por la microscopía electrónica, que fueron nombrados agentes de Norwalk (prototipo del género Norovirus). A partir de brotes de gastroenteritis en todo el mundo, se describieron posteriormente muchos virus pequeños similares, de estructura redonda (SRSV). Paralelamente, los investigadores que usan microscopía electrónica para examinar especímenes de heces de los niños con gastroenteritis esporádica y visualizaron partículas pequeñas que no tenían apariencia de SRSVs sino que eran similares a los calicivirus previamente identificados. Estos calicivirus "típicos" ocurrieron en un pequeño porcentaje de muestras de heces de diarrea esporádica y en algunos brotes de gastroenteritis, Incluyendo un brote en un orfanato en Sapporo, Japón (prototipo del género Sapovirus).

El análisis bioquímico y genómico de secuenciación confirmó posteriormente que los SRVS (norovirus) y los virus humanos con rasgos morfológicos típicos de calicivirus (sapovirus) pertenecen ambos a la familia Caliciviridae.

En 1984 se observó una hepatitis altamente contagiosa y mortal en conejos europeos criados en China. Este síndrome se propagó alrededor de 7,000 millas a través de Asia en Europa y alcanzó España dentro de 4 años, con una tasa de dispersión de aproximadamente 5 millas (8 kilómetros) por día en un huésped sedentario. En estas poblaciones europeas, experimentaron tasas de mortalidad superiores al 90 por ciento en los 3 días siguientes a la exposición en sus conejos. Se visualizaron partículas típicas de calicivirus en biopsias de hígados de conejo infectados, de ahí el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), prototipo del género Lagovirus). Recientemente, se aislaron partículas virales con características filogenéticas de calicivirus asociados a gastroenteritis en bovinos, y fueron reconocidos como un nuevo género, Nebovirus.

Estos resúmenes ilustran la diversidad de las relaciones ecológicas y el amplio espectro de enfermedades (de gastroenteritis leve a hepatitis mortal) asociadas a miembros de Caliciviridae.

PROPIEDADES DE LOS CALICIVIRUS

Características estructurales del virión

Los Caliciviridae son una familia de virus icosaédricos sin envoltura con un sentido positivo, poliadenilado, con una cadena de ARN de aproximadamente 7,500 nucleótidos de longitud. La microscopía de Cryoelectron y la cristalografía de rayos X han resuelto la estructura tridimensional de miembros representativos de cuatro de los cinco géneros. Las partículas típicas de virión de calicivirus son de 40 nm de diámetro y tienen una simetría icosaédrica $T = 3$, conformada por 90 dímeros de la proteína estructural principal, VP1 (Fig 1) VP1, es una proteína de 60 kDa que tiene dos Dominios (S y P) unidos por una bisagra. El dominio S es responsable de la estructura de la cápside y el dominio P sobresale de la concha, generando picos que denotan las depresiones "cuplike" que dan el nombre a esta familia. El ARN genómico está cubierto por la cápside y permanece covalente Unido por su extremo 5 'a la proteína ligada al genoma viral (VPg)

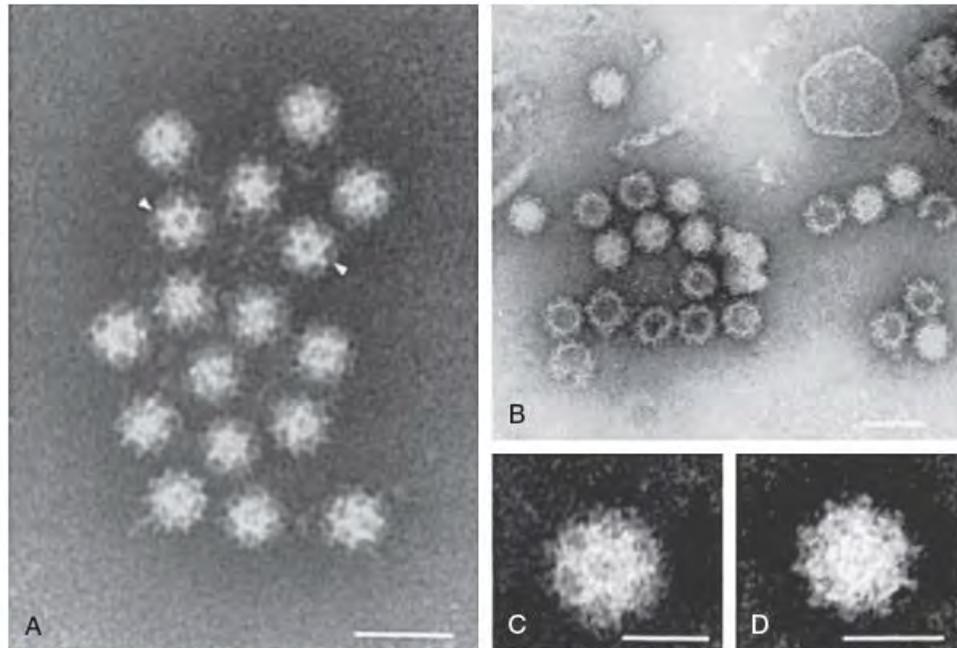


Fig. 1 Partículas de calicivirus humano visualizadas por microscopía electrónica. Las partículas de una preparación purificada de Sapporo / 1982 / Japón muestran copas de superficie distintas y el patrón de estrella de David es visible en algunas partículas (a, puntas de flecha). La tinción de partículas, el tipo de partículas y los desechos en muestras clínicas son variables, lo que frustra el reconocimiento de características estructurales distintas. B, Espécimen de un niño de Houston, Texas, infectado con un sapovirus antigénicamente distinto. Dos partículas de alta magnificación muestran el patrón de estrella de David (c) y las 10 proyecciones de superficie (d) características del calicivirus (especimen de un niño sintomático que asiste a una guardería en Phoenix, Arizona). Barra en a y b = 50 nm; Bar en c y d = 25 nm. *Cherry JD et al. Feigin & Cherry's textbook of pediatric infectious disease. 7a ed. 2014*

Relaciones Taxonómicas entre los Calicivirus

Los calicivirus se clasificaron como picornavirus cuando se identificaron inicialmente. Sin embargo, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus decidió separarlos, por lo que la familia *Caliciviridae* fue creada en 1978. El virus de la hepatitis E fue incluido inicialmente en el *Caliciviridae* hasta 1999, cuando fue separado. La familia *Caliciviridae* actualmente comprende cinco géneros: Norovirus, Sapovirus, Vesivirus, Lagovirus y Nebovirus. Según el informe de 2011 del Comité Internacional de Taxonomía de los Virus, se reconocen las siguientes especies dentro de cada género: virus Norwalk para Norovirus, virus Sapporo para Sapovirus, calicivirus felino y exantema vesicular de virus porcino para Vesivirus, Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo para Lagovirus y virus Newbury-1 para Nebovirus (Tabla 1). Además, de acuerdo con la secuencia de todo el genoma y regiones de la cápside, múltiples genogrupos se han clasificado denominados como G con números árabes siguiendo al nombre del genogrupo (por ejemplo, GI.4 para el genotipo 4 del genogrupo I).

Tabla 1 GÉNEROS DE CALICIVIRUS HUMANOS Y ANIMALES		
Género	Huésped	Ejemplos
Norovirus	Humanos, bovinos, cerdos	Norwalk, Snow Mountain y Lordsdale; Jena virus (bovinos)
Sapovirus	Humanos, cerdos	Sapporo calicivirus 82 / Japón, 86 / Houston, 90 / Houston; Virus de Manchester y Plymouth; Porcino entérico Calicivirus
Lagovirus	Conejo, liebre, cerdo, perro, humano, zorro, ratón, pájaro	Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo de Europa, Asia, Australia, Nueva Zelandia; Virus del síndrome de liebres marrones europeas
Vesivirus	Cerdo, gato, chimpancé, león marino, delfín, Mejillón, nutria de mar, mapache, Isla de Aruba Serpiente de cascabel	A48; Calicivirus felinos F4, CF1, F65, F9; Pan - 1, Tur - 1; San Miguel virus del león marino tipos 1 a 17; SMSV-5 Hom-1
Nebovirus	Virus Bovino	Newbury-1

Organización genómica

La organización genómica entre los géneros calicivirus difieren en el número y el tamaño de los marcos de lectura abierta (ORFs), la presencia de ciertos genes, y la necesidad de escisión postraducciona para la función del producto génico. Los genomas de los norovirus y los vesivirus tienen tres ORFs. ORF1 codifica una poliproteína dividida por una proteasa viral durante la replicación en un conjunto de proteínas no estructurales, incluyendo la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), la nucleósido trifosfatasa, la proteasa y la VPg; ORF2 codifica la proteína de la cápside; Y ORF3 codifica una proteína que parece ser una proteína estructural menor.

Los genes de los ORF2 y ORF3 de estos géneros están incluidos en un ARN subgenómico que se puede transcribir independientemente al ARN genómico. Los sapovirus, lavavirus y nebovirus tienen dos ORFs. ORF1 es una fusión de los ORF1 y ORF2 correspondientes de norovirus y vesivirus, mientras que ORF2 codifica para una proteína estructural menor. En algunas cepas de sapovirus está presente un ORF adicional, en otro marco, en el extremo 5' del gen de la cápside. Los genomas de calicivirus tienen una secuencia de nucleótidos no transcrita altamente conservada en el extremo 5' del genoma completo y en el extremo 5' del gen de la cápside. Además, muchos calicivirus tienen una superposición entre el extremo 5' de ORF1 y el extremo 3' de el ORF2. Ambas características de la organización genómica eventualmente favorecen la recombinación (ver discusión posterior). Las secuencias conservadas de algunas regiones del gen de la cápside han sido blancos apropiados para el diseño del cebador usado en la reacción en cadena polimerasa de transcriptasa inversa RT-PCR. El análisis secuencial de estos fragmentos ha permitido una discriminación precisa entre géneros y genogrupos, equivalente al análisis de secuencias de todo el genoma.

CALICIVIRUS HUMANOS: NOROVIRUS Y SAPOVIRUS

Las cepas de los virus llamados Calicivirus humanos que son comúnmente recuperadas de la enfermedad de gastroenteritis humana se dividen en dos géneros: Norovirus (principalmente GI y GII) y Sapovirus. Los norovirus y los sapovirus comparten una serie de propiedades.

Epidemiología

Los calicivirus humanos tienen distribución mundial, y los estudios serológicos indican que las infecciones por estos agentes ocurren comúnmente y temprano en la vida, con casi todos los individuos a los 5 años de edad teniendo anticuerpos. Los calicivirus humanos se describen como causantes de gastroenteritis aguda principalmente en dos situaciones distintas: casos esporádicos, endémicos que afectan a niños menores de 5 años de edad y como causa de brotes que afectan a individuos de todas las edades. El norovirus es la segunda causa de diarrea aguda endémica en niños después del rotavirus (antes de la introducción de la vacuna contra el rotavirus), causando entre el 10 y el 20 por ciento de los casos totales y cerca del 20 por ciento de las hospitalizaciones asociadas a diarrea. El sapovirus es comparativamente menos frecuentes, que representan del 1 al 10 por ciento de los casos de gastroenteritis.

Los norovirus son la principal causa de brotes de gastroenteritis, asociadas principalmente con agua y alimentos contaminados, en particular mariscos. Los norovirus representan aproximadamente el 50 por ciento de todos los brotes en países con saneamiento adecuado y más del 90 por ciento de brotes para los cuales no se puede encontrar ninguna causa bacteriana o parasitaria. A diferencia de los norovirus, Sapovirus se conocen principalmente de casos esporádicos de diarrea en niños, aunque los brotes en poblaciones cerradas ocurren.

La mayoría de los brotes de calicivirus humanos son reconocidos en entornos cercanos donde ocurre la exposición común, tales como viveros, guarderías infantiles, escuelas, hospitales, campamentos, hoteles y barcos. En estos brotes, además de la fuente primaria (agua contaminada o alimentos), la propagación de persona a persona también juega un papel importante en la prolongación de la duración del brote. Se ha descrito una larga persistencia de brotes de gastroenteritis por norovirus y se ha asociado con secreción asintomática persistente en manipuladores de alimentos, contaminación continua de la superficie y reexposición a la misma cepa de alimentos contaminados. Las tasas de ataque primario en los brotes con frecuencia son altas, cercanas al 30 por ciento, y las tasas de ataque secundario oscilan entre 5 y 30 por ciento.

Aunque se ha sido descrito para los calicivirus humanos diversidad genética y antigénica, principalmente para el Norovirus, se ha descrito un claro predominio de genotipos específicos y se han producido grandes cambios en la prevalencia relativa de estos genotipos durante los últimos 40 años. Por ejemplo, el virus Norwalk, prototipo de las cepas GI.1 y las cepas estrechamente relacionadas parecen haber sido los norovirus predominantes en los años setenta en varias regiones estudiadas. Posteriormente, el virus de Snow Mountain (Prototipo de cepas GII.2) y cepas relacionadas predominaron, mientras que las cepas dentro del grupo que contiene el prototipo de virus de Norwalk (GI) se encontraron con poca frecuencia (<5%). Desde mediados de 1990, las cepas GII.4 han surgido y se han esparcido de forma global. Representando actualmente más del 80 por ciento de los norovirus identificados. La distribución de los linajes GII.4 difiere notablemente de una región a otra y / o con el tiempo, lo que podría explicarse, al menos parcialmente, por la presión selectiva debida a la inmunidad adquirida por la población.

Patrones estacionales

Tanto las infecciones esporádicas como las asociadas al estallido de Norovirus tienen tendencia a la estacionalidad en el invierno (Fig.2). Se observan excepciones a esta tendencia para la transmisión en algunas fuentes. Las infecciones relacionadas con ciertos alimentos se producirán cuando se cosechan y se ingieren frescos (frutas, ensaladas, mariscos) o se transforman, envían y consumen más tarde (frutas congeladas, hielo). Las infecciones asociadas con instalaciones de recreación como albercas, pueden tener un predominio estacional de verano. Además, la contaminación de los suministros de agua ocurre con mayor frecuencia en situaciones de inundación que resulta en la mezcla de aguas claras y aguas residuales y en situaciones asociadas con la cosecha de mariscos. Una clara prevalencia estacional de Sapovirus no es evidente, pero el predominio del invierno se sugiere de varios estudios.

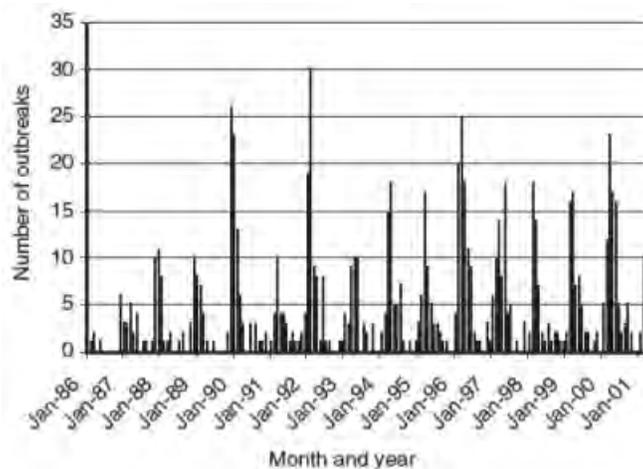


Fig 2. Estacionalidad de 840 brotes virales presuntos en hogares de ancianos en Maryland, 1986 a 2000. Análisis detallados de 20 brotes encontraron norovirus en 18. Green KY, Belliot G, Taylor JL, et al. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J Infect Dis* 2002;185:133-46

Patogenia, Patología e Inmunología

Patogenia

Los calicivirus humanos no han sido cultivados con éxito en líneas celulares hasta la fecha, y modelos animales todavía están en desarrollo, una situación que ha impedido el completo entendimiento de la patogénesis. La mayor parte de la información en esta área proviene de estudios de voluntarios humanos, ensayos *in vitro* con proteínas similares a virus (VLP) y modelos animales infectados con norovirus murino.

Los estudios de voluntarios humanos realizados en los años setenta mostraron un grupo de individuos que parecían resistentes a la infección por el virus Norwalk después del desafío incluso con altas dosis víricas. El mecanismo propuesto para este riesgo diferencial era la ausencia o presencia de HBGAs en la mucosa digestiva que podría actuar como receptor del huésped. Los HBGA son oligosacáridos presentes en secreciones humanas y epitelios y son parte del sistema inmune innato. La expresión de HBGAs en la mucosa está controlada por la actividad de una fucosil transferasa (FUT2), que es responsable de la síntesis del antígeno H, el precursor de los antígenos A y B. Los individuos portadores de una mutación inactivante de FUT2 no expresan HBGAs en sus epitelios, son eventualmente resistentes a Norovirus, y se denominan no secretadores, mientras que sujetos con FUT2 activo normal expresan estos oligosacáridos y se denominan secretores.

Más recientemente, los estudios de desafío voluntario, las encuestas epidemiológicas y los ensayos *in vitro* han apoyado el papel de estas estructuras de

azúcar en la fijación del virión de Norovirus. Se ha descrito un patrón de fijación de HBGA específico del genogrupo *in vitro* que podría estar relacionado con la susceptibilidad específica de la cepa. El estatus de “secretor” no explica completamente las diferencias observadas entre los individuos infectados y no infectados por todas las cepas de Norovirus. Es probable que se impliquen mecanismos adicionales y siguen siendo un campo de investigación en curso.

Patología

El conocimiento sobre los mecanismos patogénicos del calicivirus humano ha sido limitado por la falta de un modelo animal preciso. Las muestras de biopsia de intestino delgado obtenidas de voluntarios infectados con Norovirus en estudios de desafío que evaluaron principalmente el prototipo del virus de Norwalk han dado algunas pistas patológicas. La atrofia vellosa, el desorden del epitelio, la hiperplasia de la cripta, la vacuolización citoplasmática y el infiltrado inflamatorio de la lamina propia han sido descritas en muestras de biopsia duodenal / yeyunal obtenidas de individuos infectados con virus de Norwalk.

Estos cambios morfológicos se han evidenciado tanto en pacientes sintomáticos como en sujetos asintomáticos infectados y tan pronto como pocas horas antes de comenzar las manifestaciones clínicas. No se han descrito partículas virales ni efectos citopáticos específicos en enterocitos. Los cambios histológicos se resuelven después de 2 semanas en individuos inmunocompetentes, pero pueden tardar meses en pacientes inmunosuprimidos. Las actividades de sucrosa, trehalasa y fosfatasa alcalina del borde cepillado intestinal de pacientes sintomáticos disminuyen, induciendo un estado mal absorbivo transitorio. No se han determinado las características patogénicas de la infección por sapovirus en seres humanos y se supone que son las mismas que las de los calicivirus de Norovirus.

Inmunología

La primera barrera contra el calicivirus humano es la inmunidad innata, representada principalmente por HBGA en la superficie del enterocito, que actúa como receptores del huésped. Las personas no detectables que carecen de HBGA en sus epitelios tienen un menor riesgo de infección por Norovirus y gastroenteritis asociada a Norovirus. HBGA presentes en la leche materna humana pueden inhibir la unión de norovirus VLPs a saliva y oligosacáridos sintéticos *in vitro*. Los bebés alimentados con leche materna de madres secretoras tienen un menor riesgo de gastroenteritis causada por Norovirus en comparación con otros patógenos entéricos. Aunque la infección por calicivirus humano desencadena respuestas adquiridas inmunológicas tanto humorales como celulares, la infección por estos agentes puede ocurrir muchas veces en el mismo individuo y a cualquier edad. La inmunidad protectora adquirida a los norovirus parece ser compleja y sigue siendo incompleta. Los voluntarios y los estudios clínicos han demostrado que entre 2 y 3

semanas después de la infección por Norovirus, los anticuerpos específicos del suero pueden ser detectados y persistir durante muchos meses. Los individuos adultos re infectados por la misma cepa parecen estar protegidos poco después (6 a 14 semanas) Pero se puede infectar de nuevo cuando la exposición se produce entre 24 y 72 meses después del primer desafío. Se ha descrito la reactividad cruzada, pero parece estar restringida a cepas de los mismos genogrupos. No ha sido posible correlacionar los títulos de anticuerpos específicos con la protección, y los individuos con títulos altos de suero y duodeno desafiados con la misma cepa de Norovirus pueden ser incluso más susceptibles que sujetos que tienen títulos más bajos o son seronegativos. Sin embargo, la dosis infecciosa viral dada a los voluntarios en estos estudios de desafío fue varias veces mayor que las dosis infecciosas naturales, y por lo tanto no puede representar el fenómeno de la inmunidad natural. Los ensayos de neutralización viral no han sido posibles, debido a la falta de un sistema de cultivo celular adecuado. Ensayos de bloqueo de HBGA e inhibición de hemaglutinación sugieren que las infecciones naturales son seguidas por la producción de anticuerpos.

Manifestaciones clínicas

El período de incubación después de la exposición al Norovirus oscila entre 12 y 60 horas, con una media de 24 horas. La excreción de Norovirus en heces comienza tan pronto como 15 horas después del desarrollo de la infección, picos durante el segundo día y persiste por lo menos 7 días y hasta 2 meses en individuos inmunocompetentes. También se han detectado norovirus en vómitos, lo que sugiere la posibilidad de propagación por aerosol o dispersión de partículas de vómito. La enfermedad suele caracterizarse por un episodio autolimitado de diarrea no sangrienta, náuseas, vómitos y fiebre de bajo grado, de 1 a 2 días en el brote y de 5 a 6 días en los casos endémicos. En los niños mayores de 1 año predominan los vómitos, mientras que en los lactantes y adultos la diarrea tiende a predominar. Esta presentación clínica es indistinguible de la de otros patógenos entéricos. Un amplio espectro de enfermedades puede ocurrir que van desde pacientes asintomáticos excretores a una enfermedad grave con deshidratación que requiere hospitalización. En general, los casos de gastroenteritis por calicivirus humano son más leves que los casos de infecciones por rotavirus, a pesar de que estos agentes pueden representar hasta el 20 por ciento de diarrea asociada hospitalizaciones en niños menores de 5 años.

Se han descrito infecciones crónicas sintomáticas en individuos inmunocomprometidos. Aunque la característica predominante de las infecciones por calicivirus humano principalmente gastrointestinal, algunos investigadores han descrito ARN viral en muestras de suero, lo que sugiere la posibilidad de infecciones sistémicas ocasionales; convulsiones febriles y no febriles durante gastroenteritis por norovirus. Los factores específicos asociados con la gravedad clínica no han sido claramente identificados; las cepas de norovirus GII.4 se asociaron con casos más graves en un estudio. Las enfermedades por sapovirus también son

indistinguibles de otras gastroenteritis causadas por otro patógenos, en un estudio durante la hospitalización por una enfermedad de sapovirus se observó que tenían malabsorción prolongada, hemorragia rectal franca, deshidratación severa y acidosis, otros síntomas característicos de gastroenteritis, y leucopenia transitoria.

En casos esporádicos, los calicivirus humanos son casi indistinguibles por presentación clínica de otras causas virales y tóxicas de gastroenteritis. Las personas con infecciones asociadas a calicivirus tienden a tener menos fiebre y más vómitos que si estuvieran infectadas con otros agentes

Es limitado nuestro conocimiento actual de las infecciones por calicivirus en niños inmunocomprometidos y hasta donde es nuestro conocimiento en México no se ha realizado tal estudio de prevalencia. Lee *et al.* (2008) reportaron a un niño de 10 años con diarrea crónica después de dos meses de recibir un trasplante de hígado, páncreas y de intestino delgado. Se detectaron NoVs y Adenovirus en las múltiples muestras tomadas durante un periodo de 114 días. En otro estudio Ludwig *et al.* (2008), reportaron 9 casos de niños con desordenes oncológicos y hematológicos. Todos los pacientes presentaron enfermedad diarreica y una excreción viral de norovirus prolongada. Sair *et al.* (2011), reporto 13 niños que recibieron trasplante de células madre hematopoyéticas y requirieron alimentación parenteral y enteral prolongada debido a que presentaron disfunción intestinal grave acompañada de secreción de NoVs que se monitorio por PCR. La secreción viral duro en promedio 150 días resolviendo la infección cuando se recuperó el recuento de las células T de los pacientes. Kundu *et al.* (2013), analizaron por secuenciación, 13 muestras de heces de 5 pacientes positivos por PCR a NoVs y el análisis filogenético mostro que los virus de 3 de los pacientes estaban relacionados lo que sugiere contaminación cruzada entre ellos lo cual permitió determinar la dirección de la transmisión nosocomial. Munir *et al.* (2014), realizaron un estudio en Atlanta, EU para determinar la prevalencia de NoVs en niños inmunocomprometidos. Analizaron 92 muestras de niños y 16.3% fueron positivas para NoVs. Los resultados reportados del estudio realizado por Ye *et al.* (2015) en Texas, EU, detectaron positividad a NoVs en un 22% de las muestras analizadas (116 pacientes pediátricos). De estos el 55% requirió hospitalización debido a la diarrea y tres de los pacientes fallecieron por diarrea causada por norovirus.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las gastroenteritis virales siguen representando un problema de salud pública importante a nivel mundial, que impacta a la población en general y son causa de una elevada morbilidad y mortalidad en la población infantil.

Aunque los estudios de diagnóstico molecular en países desarrollados han permitido conocer la prevalencia y el impacto de los Calicivirus como generadores de infección en pacientes pediátricos inmunocomprometidos, su impacto en países en vías de desarrollo aun es poco conocido.

Actualmente en nuestro país no existe un estudio de prevalencia de las infecciones por éstos virus en población pediátrica inmunocomprometida, ni las características clínicas específicas con las que se presentan los cuadros de infección causados por éstos patógenos.

JUSTIFICACION

A partir de la gran efectividad que ha tenido la vacuna de rotavirus humano, este agente ha dejado de ser la principal causa de gastroenteritis aguda en la población en general, dando paso a nuevos agentes como los Calicivirus encontrándose como el agente causal más importante de gastroenteritis por virus en todo mundo.

Es menester conocer las características clínicas y la prevalencia de éste virus en las infecciones de pacientes pediátricos inmunocomprometidos ya que mientras no contemos con los datos epidemiológicos característicos de estas infecciones en éste grupo etario de la población mexicana no se podrán tomar medidas de prevención, manejo, y vigilancia epidemiología respectiva para aminorar sintomatología, detener transmisión lineal y reducir los costos de ingreso y estancia intrahospitalaria en los pacientes onco-hematológicos de la coordinación de pediatría de nuestra institución.

Por lo que este estudio nos permitirá:

- 1.- Conocer la prevalencia de calicivirus como agentes causantes de diarrea infecciosa en pacientes inmunocomprometidos en nuestra institución
- 2.- Determinar los patrones de presentación clínica, factores de riesgo específicos y características genotípicas de aquellas gastroenteritis causadas por calicivirus.
- 3.- Efectuar un plan de control epidemiológico particular para pacientes hospitalizados que presenten diarrea infecciosa por calicivirus, disminuyendo coinfecciones y tiempo de tratamiento con antimicrobianos no necesarios
- 4.- El análisis de los datos recolectados contribuirán para la mejora de la práctica médica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de calicivirus como agentes causantes de diarrea infecciosa en pacientes pediátricos inmunocomprometidos adscritos a nuestro Centro Médico Nacional 20 de Noviembre

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Determinar la frecuencia y prevalencia de calicivirus causantes de gastroenteritis en pacientes pediátricos con inmunosupresión.
- 2.- Determinar las características epidemiológicas particulares, los signos y los síntomas que acompañan los cuadros de diarrea infecciosa por calicivirus.
- 3.- Determinar las patologías de base en la población pediátrica inmunosuprimida que presentarán con mayor frecuencia infección por calicivirus.
- 4.- Determinar la prevalencia los distintos genotipos virales en las gastroenteritis por calicivirus en la población estudiada.

METODOLOGIA

Estudio Prospectivo de cohorte dinámica

POBLACION DE ESTUDIOS

- Pacientes menores de 18 años los cuales cuenten con el diagnóstico de cáncer dentro del servicio de hematología Pediátrica y oncología Pediátrica, que se encuentren recibiendo quimioterapia inmunosupresora y presenten un episodio agudo de diarrea.

UNIVERSO DE TRABAJO

- Pacientes hospitalizados o adscritos al Centro Medico Nacioanal 20 de Noviembre con el diagnóstico de Cáncer, en el servicio de hematología pediátrica, oncología pediátrica, Infectología pediátrica y admisión continua pediátrica, los cuales presenten enfermedad diarreica.

CRITERIOS DE INCLUSION

Pacientes menores de 18 años

Pacientes con diagnóstico de Cáncer

Pacientes que se encuentren recibiendo quimioterapia inmunosupresora

Pacientes que presenten enfermedad diarreica aguda estando hospitalizados o en su domicilio y que cuenten con al menos dos síntomas de enfermedad gastrointestinal como diarrea y/o vómito, dolor abdominal, fiebre, malestar general, dolor muscular.

CRITERIOS DE EXCLUSION

Menores de 18 años que no cuenten con diagnóstico de cáncer

Pacientes que no cuenten con quimioterapia inmunosupresora

Pacientes que no acepten participar en el estudio o que no se cuente con consentimiento informado

Pacientes que no presenten síntomas de enfermedad diarreica aguda

DESCRIPCION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

Variable	Categoría	Escala	Valor
Edad	cualitativa	nominal	Años
Grupo Sanguíneo	Cualitativo	Nominal	A/B/O +/-
Antígeno R/H de Lewis D	Cualitativa	nominal	
Genero	cualitativa	nominal	Masculino /femenino
Vacunación contra rotavirus	cualitativa	nominal	Si/No
Fecha de inicio de tratamiento inmunosupresor	cualitativa	nominal	Día/mes/año
Fecha de terminación de tratamiento inmunosupresor	cualitativa	nominal	Día/mes/año
Fecha de Inicio de diarrea	cualitativa	nominal	Día /mes/año
Fecha de resolución de la diarrea	cualitativa	nominal	Día/mes/año
Numero de evacuaciones al día	cuantitativa	continua	Número total de deposiciones/día
Conteo total de Leucocitos	cuantitativa	continua	Miles/mm ³
Cuenta absoluta de Neutrófilos	Cuantitativa	Continua	Miles /mm ³
Cuenta absoluta de Monocitos	Cuantitativa	Continua	Miles/mm ³
Cuenta absoluta de linfocitos	cuantitativa	Continua	Miles/mm ³
Proteína C reactiva	Cuantitativa	Continua	Mg/L
Pro calcitonina	Cuantitativa	Continua	Ng/ml
Fiebre	cualitativa	Nominal	Si/No
Dolor abdominal	cualitativa	Nominal	Si/No

Vomito	Cualitativa	Nominal	Si/No
Mal estado general	Cualitativa	Nominal	Si/No
Mialgias	cualitativa	nominal	Si/No
Hospitalización por diarrea	cualitativa	nominal	Si/No
Alimentación parenteral	cualitativa	nominal	Si/No
Diarrea aguda	cualitativa	nominal	Si/No
Diarrea Recurrente	Cualitativa	Nominal	Si/No
Diarrea Crónica o persistente	Cualitativa	Nominal	Si/No

TECNICAS Y PROCEDIMIENTO A REALIZAR

Colecta de muestras. Muestras fecales de aproximadamente 1.5 ml, de menores de 18 años, que presenten un cuadro compatible con gastroenteritis. Las muestras colectadas serán enviadas al laboratorio de virología y se almacenarán a -80 °C.

Determinación de muestras positivas a calicivirus por RT-PCR y PCR multiplex en punto final.

Obtención de ácidos nucleicos con el kit Magna Pure LC Total Nucleic Acid Isolation. Una parte de las muestras fecales se diluyo en una proporción 1:10 con amortiguador de fosfato salino (PBS) y se mezclo suavemente mediante el uso de un vortex. El protocolo se siguió de acuerdo a lo recomendado por el fabricante y a continuación se describe brevemente la metodología. Se tomó 300 µl de la mezcla homogenizada, se le agrego 450 µl buffer de lisis y se agito a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se le agrego 100 µl de proteinasa K (proporcionada en el kit y previamente resuspendido con 5 ml de buffer de elusión) y se incubo a 60 °C por 10 minutos. Al tubo se le agrego 150 µl de perlas magnéticas y se agito 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le agrego, a cada una de las muestras 700 µl de buffer de lavado 1 (tapón negro), se agitaron con vortex. Los tubos se colocaron en una gradilla con imanes y se les quito el sobrenadante. Se les agrego 700 µl de buffer de lavado 2 (tapón azul y se repitió el paso anterior. El ultimo lavado se realizó con el buffer de lavado 3 (tapón rojo) y finalmente se le agrego 50 µl de buffer de elusión previamente calentado 95 °C. Los ácidos nucleicos se cuantificaron por nanodrop.

2. Obtención de los amplicones. El DNA complementario (cDNA) se obtuvo utilizando la retrotranscriptasa MMLV (Promega) y siguiendo lo sugerido por el fabricante. Brevemente, aproximadamente 150 ng de los ácidos nucleico se utilizaron para realizar la RT-PCR. En un tubo se mezclaron los ácidos nucleicos extraídos, 4 µl del buffer 5x, 2 µl de hexámeros, 1 µl de nucleótidos trifosfatos, 0-5

μl de inhibidores de RNAsas y 0.5 μl de la retrotranscriptasa. La mezcla se incubó 1 h a 37 °C.

La PCR multiplex en punto final se realizó usando el Kit Diarrea-V ACE detection (Seeplex, Seegene) en donde se tomó 1.5 μl de la mezcla de RT-PCR, 2 μl del buffer 5x DVPM, 1.5 μl de la solución 8-MOPS y 5 μl de la mezcla 2x Multiplex. Esta mezcla se sometió a 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 90 s y 72 °C por 90 s. Finalmente los amplicones se observaron en un gel de agarosa al 2% teñidos con SYBR safe. La fotografía del gel se tomó utilizando un fotodocumentador.

PROCESAMIENTO Y ANALISIS ESTADISTICO

Estadística descriptiva, se utilizarán medidas de tendencia central, proporciones y se presentarán en gráficas y tablas.

Análisis del porcentaje de pacientes con RT-PCR positiva en relación al total de pacientes analizados, así como evaluación sus características sanguíneas, edad y factores de riesgo

ASPECTOS ETICOS

De acuerdo con los Artículos 16, 17 y 23 del CAPÍTULO I, TÍTULO SEGUNDO: De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, del REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. El presente proyecto es prospectivo con riesgo mínimo.

Los investigadores confirmamos que la revisión de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización, que contamos con la capacidad para llevarlo a buen término, nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad, a salvaguardar la confidencialidad de los datos personales de los participantes en el estudio, pondremos el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación por encima de cualquier otro objetivo, y nos conduciremos de acuerdo a los estándares éticos aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud, Las Pautas Éticas Internacionales Para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la OMS, así como la Declaración de Helsinki.

RESULTADOS

De todas las muestras recibidas hasta el momento, solo 10 muestras cumplieron adecuadamente los criterios de inclusión. De éste total, nueve muestras correspondían a pacientes del género masculino y una muestra de paciente femenino constituyendo el 90% y 10% respectivamente de las muestras.

El 80% (8) de las muestras correspondían a paciente con diagnóstico de base de Leucemia linfoblástica aguda en manejo por Hematología pediátrica. Y el resto, 20% (2 muestras) correspondían a pacientes con tumores sólidos en tratamiento por el servicio de Oncología pediátrica. El 100% de los pacientes se referían vacunados contra rotavirus sin embargo no se corroboró en todos los caso dado que no todos los familiares mostraron cartilla de vacunación.

Ocho pacientes tenían Hemotipo O rh positivo y el resto (2 pacientes) A positivo. El estado de inmunosupresión estuvo en su mayoría provocado por tratamiento a base de quimioterapia citotóxica, de entre las cuales, esquemas con Cliclofosfamida y Vincristina estuvieron presentes en seis pacientes (60%), Antracíclicos en cuatro pacientes (4%), Metrotexate dos pacientes (20%) y Dexametasona solo en un paciente (10%).

El tiempo de tratamiento inmunosupresor varió en función del diagnóstico de base y la estadificación propia de cada paciente durando un promedio de 5.2 días, con un rango de los 4 días hasta dos semanas. Los eventos diarreicos que se presentaron en estos pacientes duraron un promedio 2.7 días con un rango de uno hasta 8 días. Presentando un promedio de 2.5 evacuaciones al día, presentando desde 2 hasta 4 evacuaciones, con un único paciente (10%) presentando cuadro de disentería.

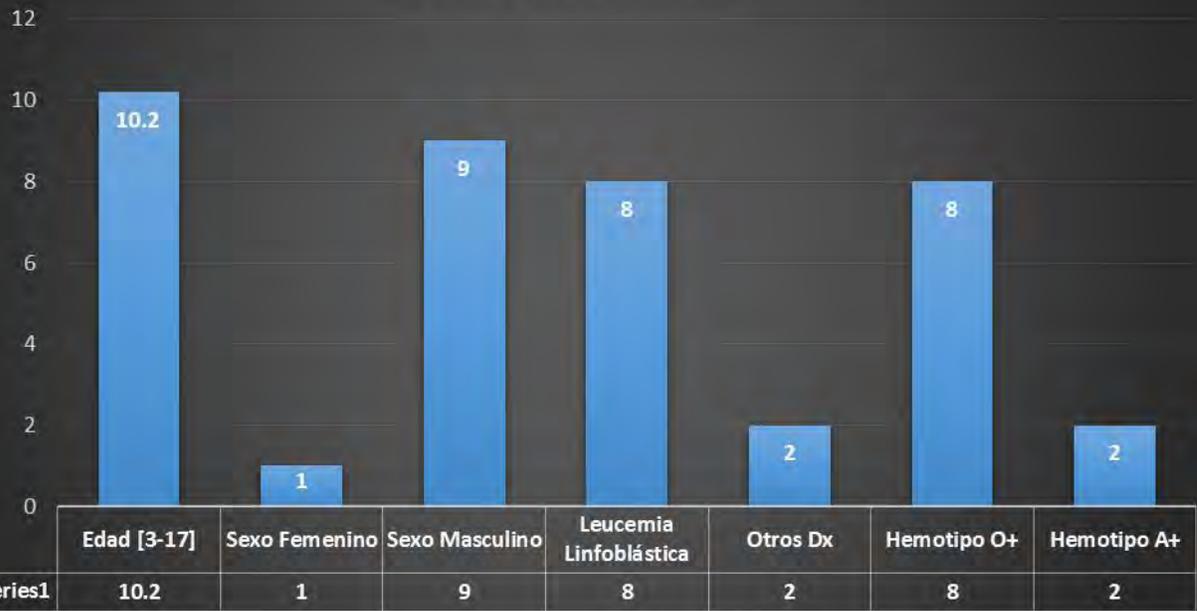
Los pacientes fueron sometidos a tratamiento quimioterapéutico con distintos grados de inmunosupresión, de entre los cuales mostraron distintas citopenias en función del tipo de quimioterapia y el tiempo recibido. El conteo total de leucocitos presentó un promedio de 5874 cel/mm³ con un rango desde 260 a 25,000 leucocitos. La cifra de neutrófilos totales tuvo un promedio de 4436 con rangos de pacientes con neutropenia profunda de 40 hasta pacientes con 21,000 neutrófilos totales. Linfocitos con un promedio de 775 y rango desde linfopenias de 60 cel/mm³ hasta 3540. Los reactantes de fase aguda tuvieron un promedio de Procalcitonina en 0.34, y Proteína C Reactiva de 45.

En cuanto al cuadro clínico presentado junto con evento de diarrea aguda, 7 pacientes (70%) presentaron Fiebre, el 90% presentó dolor abdominal de intensidad moderada a severa, 1 paciente presento vomito de contenido gastroalimentario, 80% presentaron ataque al estado general y aspecto tóxico y solo 10% dolor muscular.

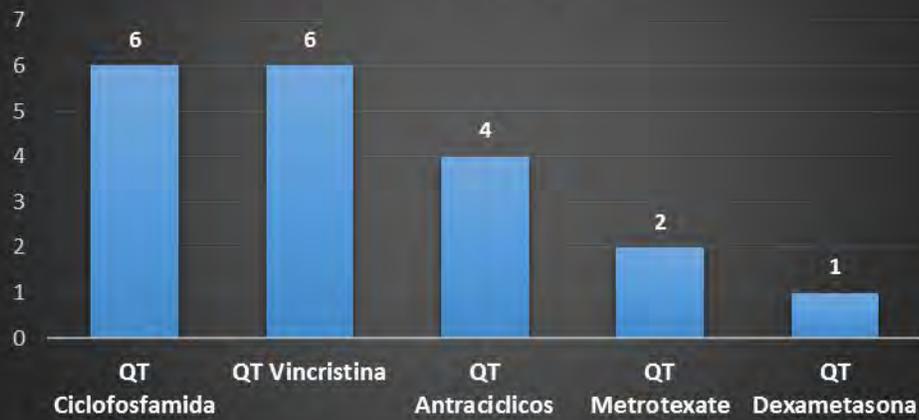
Todos los pacientes presentaron eventos de diarrea aguda durante su estancia intrahospitalaria para tratamiento de patología de base. Ninguno acudió con cuadro proveniente de la comunidad. 10% presentó diarrea recurrente y 30% de los pacientes recibieron tratamiento antibiótico a base de cefalosporinas de 3era generación, hasta Metronidazol o carbapenémicos.

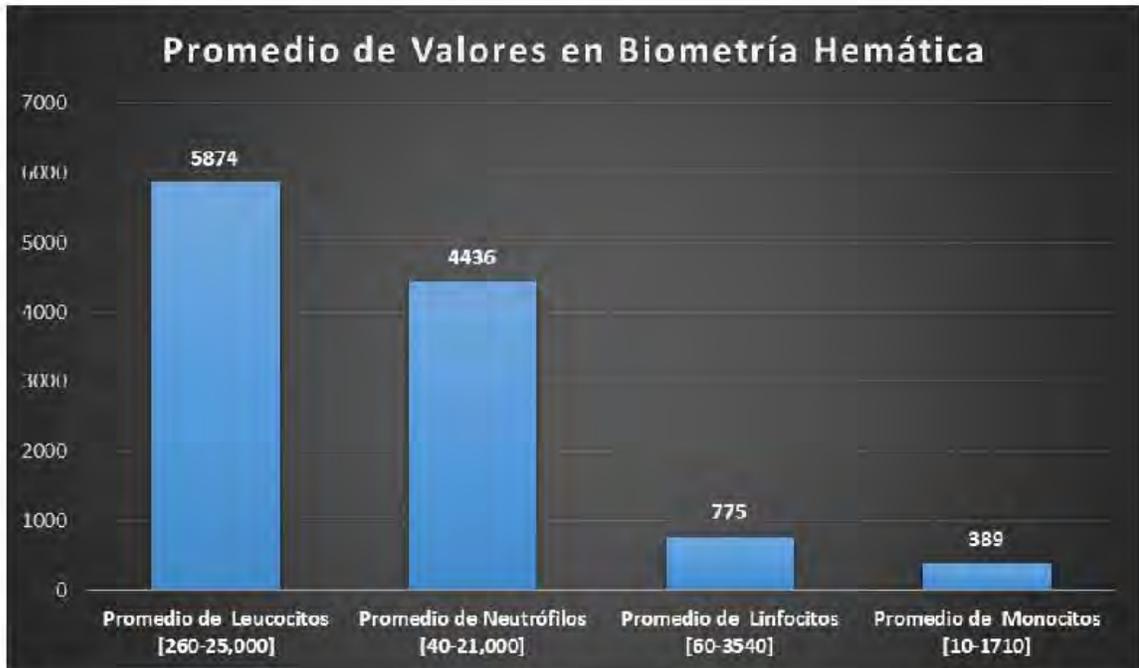
Tabla 1. Resultados Generales de Pacientes		%
Edad	10.2	[3-17]
Sexo Femenino	1	10%
Sexo Masculino	9	90%
Leucemia Linfoblástica	8	80%
Otros Dx	2	20%
Hemotipo O+	8	80%
Hemotipo A+	2	20%
Vacunación contra Rotavirus	10	100%
QT Ciclofosfamida	6	60%
QT Vincristina	6	60%
QT Antracíclicos	4	40%
QT Metrotexate	2	2%
QT Dexametasona	1	10%
Promedio de días de Tratamiento Supresor	5.2	[4-14]
Promedio de Días de Duración de Diarrea	2.7	[1-8]
Promedio de evacuaciones al día	2.5	[2-4]
Promedio de Leucocitos	5874	[260-25,000]
Promedio de Neutrófilos	4436	[40-21,000]
Promedio de Linfocitos	775	[60-3540]
Promedio de Monocitos	389	[10-1710]
Proteína C Reactiva PCR	45	Positiva 70%
PCT	0.34	Negativa 100%
Fiebre	7	70%
Dolor Abdominal	9	90%
Vomito	1	10%
Mal Edo. General	8	80%
Dolor Muscular	1	10%
Hospitalización por Diarrea	No	0
Tx	3	30%
Disentería	1	10%
Diarrea Recurrente	1	10%

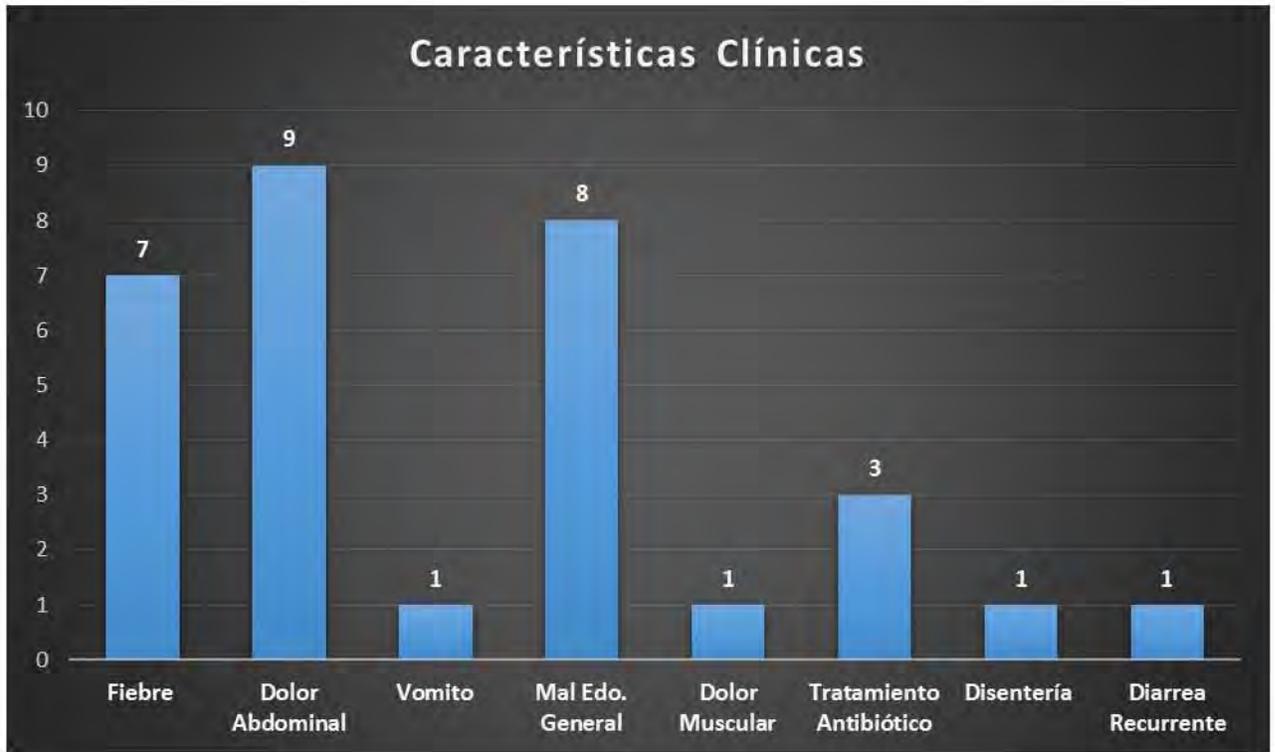
Datos Generales



Pacientes con Tratamiento Inmunosupresor







Del total de muestras, se encontraron en **9 pacientes (90%) resultados de positividad para Calicivirus**

De éstos resultados positivos, el 100% se identificó Norovirus GII y 30% presento también positividad para otros virus como Adenovirus (2) y Astrovirus (1)

Tabla 2: Resultados de RT-PCR		
No.Muestra	Resultado	Otros
1	Negativo	
2	Norovirus GII	
3	Norovirus GII	Adenovirus
4	Norovirus GII	Astrovirus
5	Norovirus GII	
6	Norovirus GII	
7	Norovirus GII	Adenovirus
8	Norovirus GII	
9	Norovirus GII	
10	Norovirus GII	



Figura 2. Detección de Norovirus por PCR multiplex en punto final. Las muestras que se incluyeron en el protocolo, se les extrajo el DNA y RNA se les realizo primero una retro-transcripción para generar cDNA. El cDNA se utilizo para realizar una amplificación por PCR multiplex en punto final. Los productos de la reacción se separaron en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con el colorante SYBR safe. La imagen es un resultado representativo de dos experimentos. Carril 1, Control marcador de peso molecular. Carril 2, Control Negativo. Carril 3-12, muestras procesadas. Carril 13-14, muestras positivas a Norovirus genotipo II. Carril 15, control positivo. pb: pares de bases.

DISCUSION

Los norovirus constituyen la principal causa de gastroenteritis viral grave que provoca admisión en un servicio de urgencias del hospital. Varios estudios han documentado también el importante papel de los norovirus en las infecciones nosocomiales. En una encuesta realizada a 289 hospitales de Estados Unidos que habían iniciado investigaciones de brotes en los 12 meses anteriores, los norovirus fueron los patógenos nosocomiales más frecuentemente detectados, lo que representó 53 de 291 (18,2%) de los brotes confirmados investigados y resultó en la tasa más alta de Unidad hospitalaria. Las infecciones por norovirus se caracterizan por un periodo de incubación breve de 1.2 días, el principal síntoma es diarrea (90%), vomito (75%), dolor abdominal, escalofríos, fiebre, mialgias y cefalea que puede persistir hasta por 3 días. En los pacientes inmunocomprometidos se ha descrito que los periodos sintomáticos se pueden prolongar por más de dos semanas e incluso se han reportado casos hasta de 1 año de duración. El 5% de los pacientes inmunocomprometidos han reportado complicaciones secundarias como deshidratación severa, choque hipovolémico, choque séptico, Síndrome de distress respiratorio agudo (SDRA) y arritmias cardiacas.

Cierres et al. Realizó un análisis de los factores de riesgo para desarrollar enfermedad por norovirus enfermedad en un hospital universitario y encontró que los pacientes inmunocomprometidos estaban en mayor riesgo de un resultado clínico grave después de la infección por norovirus. Se ha observado en otros estudios un derramamiento o secreción del virus prolongada en heces por individuos inmunocomprometidos y se ha sugerido como una fuente de cepas de virus para infecciones nosocomiales. Un brote nosocomial de norovirus en una unidad de trasplante de médula ósea se atribuyó, en parte, a los períodos más largos de secreción viral y la hospitalización de estos pacientes.

Los pacientes sometidos a tratamiento quimioterapéutico, así como trasplante de células hematopoyéticas o de órgano solido tienen un alto riesgo para desarrollar infecciones debido a la importante inmunosupresión relacionada a su padecimiento de base, así como a la terapia inmunosupresora en pacientes con trasplante de órgano sólido para prevenir rechazo. La inmunidad humoral y celular afectada en estos pacientes promueve que los pacientes sean susceptibles de infección por norovirus e impiden la expulsión y purga del virus del organismo.

Nuestros pacientes presentaron un comportamiento similar a la población mundial, donde hasta el 90% presento positividad para PCR-RT de calicivirus. Si bien, los virus encontrados correspondían al genotipo GII en su totalidad, concordando con los resultados de series reportadas en otros países, sería necesario realizar pruebas de extensión molecular para valorar si en todos los pacientes persistía el mismo

virus, apoyando la teoría de otros autores quienes comentan que mientras los pacientes se encuentren inmunodeprimidos, la recuperación ausente de celularidad y respuesta inmunológica predispondrá a una secreción del virus crónica, incluso con resolución de la sintomatología, perpetuará la presencia del virus en medio hospitalario y funcionará como especie de reservorio que persistirá infectando a pacientes inmunocomprometidos hospitalizados.

Existen reportes de casos y estudios pequeños retrospectivos donde se describen infecciones por norovirus con un curso crónico, caracterizados por fiebre, diarrea crónica y deshidratación, otros con datos de aislamiento del virus en heces durante meses posteriores a la primo infección con pérdida de peso, desnutrición que requirió manejo con nutrición parenteral así como datos de neumatosis intestinal, peritonitis y alteración en la barrera mucosa intestinal con evidencia de traslocación bacteriana y muerte. Sin embargo, estos estudios son más bien anecdóticos y no describen a fondo las características clínicas de los pacientes en los que se estudiaban evacuaciones diarreicas en busca de calicivirus. La presentación de nuestros pacientes difiere un poco de lo que se reporta en otros países, puesto que los cuadros fueron de una intensidad menor a la descrita, donde refieren diarrea recurrente, en algunos casos disintérica y por días prolongados donde la mayoría presenta descompensación hemodinámica y complicaciones asociadas a la infección. Por otra parte nuestros pacientes tuvieron una evolución más benigna donde algunos de los pacientes presentaron el evento diarreico y no volvió a padecer síntomas gastrointestinales, y en pacientes con franco ataque al estado general en ningún momento se requirió hospitalización por diarrea o asistencia hemodinámica con aminas.

Este estudio llevo un seguimiento epidemiológico largo prospectivo donde se intentó definir las características epidemiológicas y clínicas significativas dentro de la enfermedad diarreica causada por norovirus en paciente pediátricos inmunocomprometidos. Se tomó de base el estudio de Ye, X., et al. "Noroviruses as a cause of diarrhea in immunocompromised pediatric hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients" publicado en el 2015. Este estudio encontró una prevalencia de infección por norovirus en un 22% entre los pacientes post transplantados, con diarrea. Los norovirus fueron el patógeno más frecuentemente aislado en estos pacientes casi tan común como el resto de los patógenos juntos. La mayoría de los casos de diarrea por norovirus fueron asociados a infecciones adquiridas en la comunidad, sin embargo se observó hasta un 25% de los casos fueron diagnosticados en un contexto intrahospitalario.

En comparación con dicho estudio, nuestros pacientes fueron diagnosticados en su totalidad dentro del hospital y presentó una prevalencia del 90%. La principal presentación clínica de las infecciones del estudio a comparar fueron con una severidad grave, presentando diarrea persistente que duró hasta un mes, requiriendo hospitalización por deshidratación y manejo con líquidos endovenosos no así nuestros pacientes que como ya se comentó tuvieron una evolución benigna. El abordaje de estos pacientes y el establecimiento de una etiología se vuelve difícil, debido a que el estado de inmunosupresión afecta en la presentación del cuadro

clínico por la afección de respuesta celular, así mismo la causa de diarrea en estos pacientes puede atribuirse a un sinnúmero de causas, desde medicamentosas, al ser pacientes en situación de polifarmacia debido a patologías de base, así como diarrea atribuida a infección, alteraciones gastrointestinales crónicas, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad linfoproliferativa en pacientes con TOS, o mucositis secundaria al acondicionamiento en pacientes con TCHP. Además, se han descrito cuadros clínicos donde se evidencia una presentación asintomática de la infección en hasta un 30% de personas sanas expuestas al virus.

Se ha propuesto como indicador para discernir entre enfermedad por norovirus y una infección asintomática el conteo de cargas virales elevadas, sin embargo la mayoría de los estudios que evalúan la asociación entre concentración viral en heces y manifestaciones clínicas evalúan pacientes inmunocompetentes y reportan resultados heterogéneos.

El estudio comparativo demostró una persistencia del virus en heces que abarcó desde 31 días hasta 238 días, sin embargo se requerirán mayor seguimiento posterior al evento diarreico y las características clínicas concomitantes en cada paciente para determinar los factores asociados a una excreción crónica del virus en heces.

Por lo que en nuestro caso se citará a los pacientes evaluado después de un periodo de 3 meses de la primer prueba para determinar si el paciente persistió asintomático durante su egreso a comunidad o se mantuvo con síntomas gastrointestinales.

Algunas limitaciones de este estudio fue el enrolamiento pasivo de pacientes al estudio, puesto que únicamente los pacientes con los criterios de inclusión que progresivamente se iban presentando se incluían a la base de datos y se analizaba su muestra. La excreción del virus por heces empieza incluso antes del inicio de los síntomas, con un pico máximo al 4º día del inicio de los síntomas y su excreción puede persistir por semanas en individuos inmunocompetentes y por meses en inmunocomprometidos. La rápida identificación y determinación de la etiología de esta enfermedad diarreica es de gran importancia para administrar la terapéutica adecuada y evitar complicaciones.

CONCLUSIONES

Los norovirus se reconocen cada vez más como un factor de riesgo importante para la diarrea debilitante y la gastroenteritis crónica en pacientes inmunocomprometidos. No se sabe si estos individuos juegan un papel importante en la epidemiología del virus, o son responsables de la transmisión esporádica y ocasional. Existe una necesidad de un tratamiento eficaz en esta población especial de riesgo para eliminar la infección crónica por norovirus y restaurar la función intestinal normal.

La pronta identificación de estos virus en pacientes inmunocomprometidos dependerá de la sospecha diagnóstica y de la posibilidad de contar con herramientas de laboratorio molecular para discernir entre las distintas etiologías infecciosas que provocan diarrea en estos pacientes. Su identificación permitirá tomar las medidas de prevención y aislamiento epidemiológicas adecuadas que permitirá reducir costos de hospitalización producto de una prevención adecuada, un pronto manejo dirigido que disminuirá la probabilidad de complicaciones y reducirá la prescripción inapropiada de antibióticos, disminuyendo resistencias bacterianas y tiempos de estancia intrahospitalaria.

BIBLIOGRAFIA

1. Ye, X., et al. "Noroviruses as a cause of diarrhea in immunocompromised pediatric hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients
2. Moreno-Espinosa S, Farkas T Jiang X. Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis*; (2014) 15:237-245
3. Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 69–74.
4. Saif, M. A., et al. "Chronic norovirus infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients: a cause of prolonged intestinal failure requiring intensive nutritional support." *Pediatric transplantation* 15.5 (2011): 505-509.
5. Munir, Naeemah, et al. "Norovirus infection in immunocompromised children and children with hospital-acquired acute gastroenteritis." *Journal of medical virology* 86.7 (2014): 1203-1209.
6. Ludwig, A., et al. "Quantitative detection of norovirus excretion in pediatric patients with cancer and prolonged gastroenteritis and shedding of norovirus." *Journal of medical virology* 80.8 (2008): 1461-1467.
7. Bresee JS, Marcus R, Venezia RA et al. The etiology of severe acute gastroenteritis among adults visiting emergency departments in the United States. *J Infect Dis* 2012; 205: 1374–1381.
8. Rhinehart E, Walker S, Murphy D, O'Reilly K, Leeman P. Frequency of outbreak investigations in US hospitals: results of a national survey of infection preventionists. *Am J Infect Control* 2012; 40: 2–8.
9. Sukhrie FH, Siebenga JJ, Beersma MF, Koopmans M. Chronic shedders as reservoir for nosocomial transmission of norovirus. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4303–4305.
10. Hall AJ, Lopman BA, Payne DC, et al. Norovirus disease in the United States. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1198–1205.
11. Hall AJ, Curns AT, McDonald LC, Parashar UD, Lopman BA. The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis associated deaths in the United States, 1999–2007. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 216–223.
12. Payne DC, Vinje J, Szilagyi PG, et al. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *N Engl J Med* 2013; 368:1121–1130.

13. Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 327–333.
14. Koo HL, Ajami NJ, Jiang ZD, et al. Noroviruses as a cause of diarrhea in travelers to Guatemala, India, and Mexico. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1673–1676.
15. Cox GJ, Matsui SM, Lo RS, et al. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: A prospective study. *Gastroenterology* 1994; 107: 1398–1407.