

55



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

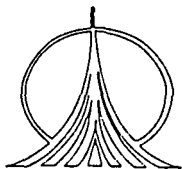
---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**PRESENCIA DE ASTROVIRUS EN NIÑOS CON  
DIARREA AGUDA**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
LORENA ROJAS HERRERA



**DIRECTOR: M. en C. HERLINDA GARCIA LOZANO**

**MEXICO D.F.**

**2002**



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.

Este trabajo fue realizado en :

El Laboratorio de Virus Gastrointestinales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de la Secretaría de Salud, bajo la asesoría de :

M. en C. HERLINDA GARCÍA LOZANO

Asesorado y evaluado en la Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por:

MTRO. JOSÉ LUIS ALFREDO MORA GUEVARA

Q.F.B. GEORGINA E. RIOS OLIVERA

Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO

Q.F.B. ROSALBA CERVANTES CRUZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Gracias a **DIOS**, por darme salud, fuerza y sabiduría para superar los momentos difíciles y no desistir. Por darme la oportunidad de vivir y la capacidad de realizar lo mejor posible cada una de las cosas que se me encomiendan.

Tú puedes.

No te quejes de tu suerte  
no reniegues de la vida,  
ten valor y serás fuerte  
y por ti la misma muerte  
ha de sentirse vencida .

No te amargues la existencia  
no te pongas a llorar,  
a nadie pidas clemencia  
porque en ti la providencia  
puso eso que hace triunfar.

Tú puedes lo que tú quieras  
haz la prueba y lo verás  
o acaso mejor prefieras  
que mañana cuando mueras  
se entierre un cobarde más.

Arremete contra todo  
lo que obstruya tu camino  
y verás que siempre hay modo  
de salirse hasta del lodo  
y de cambiar el destino.

El mundo te pertenece  
es tuyo, lucha por él,  
y si difícil parece  
recuerda que más merece  
quién de la hiel, hace miel.

Mi agradecimiento y dedicación para:

Todas aquellas personas que con su afecto y apoyo lograron la realización de este trabajo, **muchas gracias a:**

Juana Rojas<sup>1</sup>

Angelina Marín<sup>1</sup>

Eusebio Rojas Rojas

Josefa Herrera Marín

María de Lourdes Rojas Herrera

Patricia Rojas Herrera

Mauricio Rojas Herrera

Martin Rojas Herrera

Antonino Sáenz Prieto<sup>1</sup>

José Luis A. Mora Guevara

Herlinda García Lozano

Georgina E. Ríos Olivera

José Oscar González Moreno

Rosalba Cervantes Cruz

## ÍNDICE

<b>GLOSARIO</b>	<b>1</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
2.1. Eventos históricos de astrovirus	7
2.2. Generalidades de los astrovirus	9
2.2.1. Morfología	10
2.2.2. Estructura genómica	11
2.2.3. Proteínas virales	11
2.3. Clasificación de los astrovirus humanos	12
2.3.1. Serotipos	12
2.4. Características fisicoquímicas	12
2.5. Clínica y patología de la infección por astrovirus	14
2.5.1. Patogénesis	14
2.5.2. Manifestaciones clínicas	15
2.5.3. Transmisión	16
2.5.4. Inmunidad	17

<b>2.6. Epidemiología</b>	<b>18</b>
2.6.1. Prevalencia	<b>18</b>
2.6.2. Prevalencia de los serotipos de astrovirus humano	<b>21</b>
2.6.3. Estacionalidad de la infección por astrovirus	<b>24</b>
2.6.4. Distribución por grupo de edad de la infección por astrovirus	<b>25</b>
<b>2.7. Métodos de diagnóstico</b>	<b>26</b>
2.7.1. Microscopía electrónica	<b>26</b>
2.7.2. Inmunomicroscopía electrónica	<b>26</b>
2.7.3. Inmunoensayo enzimático	<b>27</b>
2.7.4. Reacción en cadena de la polimerasa	<b>27</b>
2.7.5. Cultivo celular	<b>27</b>
<b>2.8. Tratamiento</b>	<b>28</b>
<b>2.9. Prevención</b>	<b>28</b>

**3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA** **30**

<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
4.1. Objetivo general	<b>31</b>
4.2. Objetivos particulares	<b>31</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>32</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>33</b>
6.1. Material	<b>33</b>
6.1.1. Material biológico	<b>33</b>
6.1.2. Material y equipo de laboratorio	<b>33</b>
6.1.3. Reactivos	<b>34</b>
6.2. Metodología	<b>35</b>
6.2.1. Fundamento	<b>35</b>
6.2.2. Procedimiento	<b>35</b>
6.2.3. Diagrama de flujo	<b>36</b>
<b>7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>37</b>
7.1. Tipo de estudio	<b>37</b>
7.2. Criterios de inclusión	<b>37</b>
7.3. Criterios de exclusión	<b>37</b>



7.4. Criterios de eliminación	37
7.5. Variables dependientes	37
7.6. Variables independientes	37
7.7. Diseño estadístico	37
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>9. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>11. ANEXO 1.</b>	<b>60</b>
<b>12. REFERENCIAS</b>	<b>61</b>

## GLOSARIO

AstVsH	Astrovirus humanos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIA	Ensayo inmunoenzimático
IME	Inmunomicroscopía electrónica
Kb	Kilo bases
ME	Microscopía electrónica
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTA	Ácido fosfotungstico
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptasa reversa
RT-PCR	Transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
ssRNA	Ácido ribonucleico de una sola cadena
TMB	Tetrametil bencidina
µg	Microgramos
µL	Microlitros
°C	Grados centígrados

## 1. RESUMEN

Estudios realizados a nivel mundial muestran que existe una elevada incidencia de diarreas que ocurren por astrovirus considerándolo como un patógeno potencial que es excretado en heces. Este agente se ha detectado principalmente en niños menores de 5 años de edad. Diversos estudios sugieren que después de los rotavirus los astrovirus humanos (AstVsH) pueden ser la segunda causa más común de la gastroenteritis viral infantil. Se han reportado brotes en cuneros, guarderías, escuelas, asilos de ancianos, en instituciones de reclusión militar y son causa importante de infección nosocomial.

En este trabajo se pretende demostrar la presencia de AstVsH en niños menores de 5 años con diarrea aguda así como la circulación de este agente en nuestro país.

Durante el periodo Marzo de 1999 a Mayo del 2001 se analizaron 320 muestras diarreicas de niños menores de 5 años negativas a rotavirus por la técnica de rotaforesis. Procedentes de diferentes estados de la República Mexicana (Chihuahua, Monterrey, Tamaulipas, Hidalgo, Distrito Federal, Quintana Roo, Campeche y Yucatán); las cuales fueron analizadas para el diagnóstico de astrovirus por ensayo inmunoenzimático (EIA).

Del total de muestras analizadas 14 (4.4%) fueron positivas a AstVsH, lo que correlaciona con lo reportado por otros autores a nivel mundial. Se obtuvieron casos positivos en Chihuahua, Monterrey, Hidalgo, Distrito Federal, Quintana Roo y Campeche.

El grupo de edad donde se observó la presencia de astrovirus fue de 1-22 meses. Presentándose la infección por AstVsH en los meses de septiembre-mayo. Asimismo, se observó que las manifestaciones clínicas presentadas durante la infección fueron de 3 a 8 evacuaciones por día (64.28%), vómito (42.85%), temperatura mayor de 38°C (21.42%) y deshidratación ( 57.14 %).

Este estudio permitió determinar la presencia de astrovirus asociados a cuadros de diarrea aguda en la población infantil menor de 2 años, así como la circulación de este agente en nuestro país.

## 2. INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis infecciosa continúa siendo una causa importante de enfermedad y muerte en el mundo afectando principalmente a los niños, aún cuando muchos estudios han conducido a la identificación de los agentes causales el mayor número de episodios de gastroenteritis no se ha diagnosticado.

Las diarreas han significado un grave problema de salud pública por su magnitud y trascendencia, tienen una distribución mundial, con grandes variaciones en su frecuencia entre los países y aun entre las distintas regiones de un mismo país siendo los factores determinantes las condiciones geográficas, culturales, sociales, económicas, ambientales y de servicios públicos.<sup>(47)</sup>

La diarrea es una de las causas más frecuentes de enfermedad y muerte en los países en desarrollo. Aún en naciones desarrolladas como Estados Unidos, ocurren aproximadamente 500 muertes y se hospitalizan alrededor de 300 000 personas por diarrea cada año. Los grupos de edad más afectados son los menores de cinco años y los mayores de 65 años.

La Organización Mundial de la Salud informó, en 1994, que cada año se presentan 1300 millones de episodios de diarrea en niños menores de cinco años en países en desarrollo, los cuales ocasionan tres a cuatro millones de muertes relacionadas en 50 a 70 % con deshidratación, lo cual las ubica dentro de las principales causas de defunción en esos países.

La mayoría de los niños que sobreviven queda con algún grado de desnutrición, y los desnutridos, no sólo padecen con mayor frecuencia de diarrea sino que los episodios son más graves. Otro gran problema vinculado con las diarreas es el ausentismo escolar o laboral en personas mayores, causando millones de pérdidas de días de trabajo cada año.<sup>(50)</sup>

En un estudio realizado por el Dr. Mota y colaboradores de encuestas efectuadas en hogares en México en 1991 y 1993 estimaron la incidencia anual de episodios de diarrea por niño, en

menores de cinco años de edad, en 4.5 y 2.2 respectivamente. Mientras que en otro estudio realizado por Bern C. y colaboradores, en 1992, la incidencia anual promedio en todo el mundo, en este mismo grupo de edad, fue de 2.6 episodios por niño, asimismo estimó que mueren cada año 3.3 millones de niños por diarrea en todo el mundo.

A pesar de que la enfermedad diarreica ha sido una de las prioridades en los programas de salud en México, el número de muertes por diarrea sigue siendo elevado. En 1998 se registraron en México 3255 fallecimientos por diarrea en menores de cinco años, el problema fue más evidente en algunos estados del país con condiciones de pobreza extrema, como Chiapas y Oaxaca.<sup>(49)</sup>

Se ha determinado por diversos estudios que los virus son los agentes causales de gastroenteritis no bacteriana, definiendo a la gastroenteritis como una enfermedad febril de duración menor de 10 días asociada con diarrea y vómito en la cual no hay causa evidente de los síntomas.<sup>(1)</sup>

Actualmente se define diarrea, enfermedad diarreica, síndrome diarreico, infección intestinal o gastroenteritis aguda, como la presencia de heces líquidas o acuosas, casi siempre en número mayor de tres en 24 horas.

La definición pragmática es : disminución de la consistencia usual de las heces, con aumento a más del doble de su frecuencia habitual.

Las enfermedades diarreicas agudas son de naturaleza casi siempre infecciosa pero de carácter autolimitado. Los virus son la causa principal de las diarreas deshidratantes en niños menores de dos años de edad.

Las epidemias de gastroenteritis virales agudas ocurren en todo el mundo siendo rotavirus el agente viral más frecuente además de existir un alto porcentaje de casos en los que se desconoce el agente causante de la gastroenteritis, sin embargo, en los últimos años se ha involucrado a otros agentes virales tales como

astrovirus, adenovirus de serotipo 40 y 41, calicivirus, etc., como causa aparente de la enfermedad.<sup>(4)</sup>

Dentro de las manifestaciones clínicas por infección de algún agente viral además de la diarrea se presentan vómitos que pueden conducir rápidamente a deshidratación, con fiebre de grado variable esto aunado a otros signos de alarma como ojos hundidos, boca seca, fontanela hundida, anorexia, dolor abdominal, dolor de cabeza, náuseas y malestar general.

El mecanismo de transmisión clásico es el ciclo ano-boca, entendido este como la salida del agente infeccioso con la materia fecal y su ingestión, casi siempre a través de las manos contaminadas o de fomites. Otro mecanismo de transmisión frecuente es la ingestión de alimentos contaminados o de agua, otras bebidas o hielo, no sometidos a algún proceso de purificación. En el caso de los virus, la transmisión puede ser por vía aérea.

Desde la visualización inicial de los astrovirus en 1975, lentamente se acumularon evidencias acerca de su importancia como agentes causales de diarrea infantil. En varios países se ha reportado que los astrovirus son causa del 2-8 % de los episodios de diarrea en niños siendo un agente común de gastroenteritis viral en niños pequeños.<sup>(21,26,34,41)</sup>

La distribución de estos virus es mundial e incluso hay ocho diferentes subtipos antigénicos que pueden circular en una misma región. Los astrovirus causan una enfermedad caracterizada por diarrea, dolor abdominal, vómito, náusea, fiebre y malestar general. No existe tratamiento antimicrobiano para esta infección que se auto limita si se usan correctamente la hidratación y la nutrición.

Los astrovirus también se han asociado con diarrea en pacientes inmunosuprimidos y con epidemias de diarrea en guarderías, escuelas, hospitales, hogares de ancianos, etc., y son potencialmente muy peligrosos en pacientes seriamente enfermos en el hospital. <sup>(6,12,34,35,37)</sup>

Estudios de seroprevalencia indicaron que alrededor de 71% de los niños ingleses de 3 a 4 años presentan anticuerpos contra estos virus, indicando una elevada prevalencia de infección, pero sin un cuadro patológico definido. En algunos estudios se observó que estos agentes eran la segunda causa más frecuente de diarrea, después de los rotavirus.<sup>(28)</sup>

Con el fin de desarrollar prioridades de investigación y estrategias para el control de estas infecciones, los expertos de Bethesda realizaron un estudio prospectivo en 397 niños egipcios menores de 3 años para determinar los índices de incidencia de diarrea causada por astrovirus y los serotipos circulantes después de una infección.

Los índices de incidencia específica de episodios de diarrea por astrovirus por persona-año fueron de 0.38 para los menores de 6 meses, 0.40 para los de 6 a 11 meses, 0.16 para los de 12-23 meses y 0.05 para los de 24 a 35 meses. El índice de incidencia global de diarrea por astrovirus fue igual que para la diarrea por rotavirus: 0.19 episodios por persona-año. En 17% de los casos la infección por astrovirus se asoció con deshidratación severa. El serotipo más frecuente fue el serotipo-1 y en orden de frecuencia decreciente siguieron el serotipo 5 y 8.

Diversas investigaciones informaron prevalencias cercanas al 4% en niños centroamericanos con diarrea que concurrían a guarderías. En Guatemala, Cruz y Col. (1992) detectaron astrovirus en un 38.6% en niños de la zona rural, de 0-3 años de edad, mientras que en Chile fue detectado en 51 (16.5%) de las 310 muestras recolectadas de niños con diarrea. (12,34)

En varios países (Japón, Australia, Inglaterra, Estados Unidos, etc.) se está determinando la incidencia de astrovirus, la asociación entre la excreción de estos agentes y la presencia de síntomas diarreicos, los factores sociodemográficos y ambientales asociados con el riesgo de infección, los serotipos circulantes y la presencia de inmunidad persistente después de una infección, sin embargo, se requieren más estudios epidemiológicos en diferentes ambientes para determinar la importancia de la enfermedad por astrovirus.

## 2.1. EVENTOS HISTÓRICOS DE ASTROVIRUS

1975: Los astrovirus fueron asociados por Appleton y Higgins con la gastroenteritis humana. (1)

1975: El término astrovirus fue propuesto por Madeley y Cosgrove siguiendo una visualización por microscopía electrónica.(2)

1981: Lee y Kurtz aislaron en cultivo primario astrovirus humanos en células de riñón de embrión humano y tuvieron éxito en el crecimiento del virus en cultivo celular. Esto distinguió al virus de otros agentes, tal como el agente Norwalk, el cual no puede crecer en cultivo celular.

1984: 5 serotipos de astrovirus humanos son reconocidos. (3)

1988: Son desarrollados anticuerpos monoclonales específicos de astrovirus por Hermann y Col. Esto permitió el diagnóstico de astrovirus en gastroenteritis usando inmunoensayos enzimáticos.

1989: El serotipo 6 es reconocido en el Reino Unido (UK).

1991: El serotipo 7 es también reconocido en el UK. (28)

1992: Un estudio por Cruz y Col. demostraron la presencia de astrovirus en 38.6% de los niños de la zona rural de Guatemala.

1994: Lee y Kurtz realizaron un estudio en cual indica que el serotipo 1 es la causa de 65% de las infecciones por astrovirus. (28)

1994: El genoma del astrovirus es completamente secuenciado.(29)

1994: Astrovirus es implicado como única causa etiológica de tres brotes por separado de gastroenteritis en Japón. (16)



1995: Una transcripción reversa y una reacción en cadena de la polimerasa fue aplicada para la detección de los serotipos de astrovirus en Noruega. (30)

1997: Una región del genoma del cDNA clona de astrovirus es construido. Esto permitió incrementar el estudio de la replicación viral.

1997: Los astrovirus son asociados con un brote de gastroenteritis aguda entre reclutas militares en Francia, mostrando que estos virus no afectan únicamente a niños pequeños. (42)

1998: Diversos estudios utilizando RT-PCR, confirman la prevalencia de infecciones gastrointestinales por astrovirus. (31,32,44)

2000: Hasta esta fecha ya ha sido documentada la existencia del serotipo 8 de astrovirus, identificado en el Reino Unido, África, Oriente Medio y Australia. (31,38)

2001: Se reporta que en México al menos seis tipos antigénicos circulan en una comunidad peri urbana de la ciudad de México. (39)

## 2.2. GENERALIDADES DE LOS ASTROVIRUS

Los astrovirus han sido clasificados dentro de una nueva familia de virus la *Astroviridae* constituidos por una sola cadena de RNA (ssRNA), afectan a varias especies dentro de las cuales afecta a los humanos. Actualmente son ocho los serotipos reportados de astrovirus humanos predominando el serotipo 1 a nivel mundial mientras que en México se reporta al serotipo 2 como el más común. (8,12,15)

Dentro de los estudios realizados en México existen diferencias significativas de los resultados obtenidos en la detección de astrovirus siendo de los más relevantes el realizado en Chiapas: un estudio prospectivo de una cohorte de niños mayas, menores de tres años de edad, que habitan en una pequeña comunidad en el sudeste de México, Maldonado Y. y colaboradores (1998) detectaron astrovirus en 164 (61%) de 271 niños estudiados.

Mientras que Guerrero ML y colaboradores, en 1998, informaron los resultados de un estudio prospectivo de diarrea por astrovirus en la Cd. de México. La frecuencia de presentación fue de 5% en 510 episodios de diarrea, con predominio en niños de 13 a 18 meses de edad, se encontraron cinco tipos antigénicos predominantes y el tipo 2 fue el más común. Estos estudios nos proporcionan información en nuestro medio, si bien el pico de infecciones causadas por rotavirus es más alto que el de astrovirus, clásicamente se reporta que ambas se superponen en el invierno y que son indistinguibles clínicamente, esto hace que la infección por astrovirus sea subestimada. (8)

Teniendo como antecedente las investigaciones realizadas en varios países acerca de los astrovirus además de la gran relevancia que han tomado en la última década por afectar principalmente a gran parte de la población infantil y que en nuestro país son pocos los trabajos realizados en la investigación de dicho agente en este trabajo se pretende demostrar la presencia de AstVsH en niños con diarrea aguda así como la circulación de este agente en nuestro país.

### 2.2.1. MORFOLOGÍA

Por microscopía electrónica de contraste negativa, mide de 28-32nm, la estructura del virión es icosaédrica, tienen una apariencia de estrella con 5 a 6 picos sobre su superficie (en griego astron = una estrella). (2,48) **Figura 1**

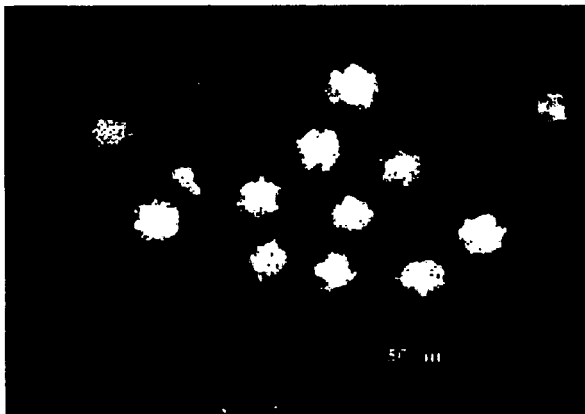


Fig.1 La micrografía electrónica ilustra la apariencia de partículas de astrovirus teñidas negativamente en una muestra de materia fecal humana, de un individuo con gastroenteritis. Tomada de Suzanne M. Matsui, 1996

### 2.2.2. ESTRUCTURA GENÓMICA

El virión del astrovirus está constituido de una cápside de 28 a 30 nm de diámetro.

El genoma consiste de una sola cadena, de sentido positivo, RNA poliadenilado de una longitud de 6.8 a 7.2 kb contiene tres segmentos de lectura abierta.

### 2.2.3. PROTEÍNAS VIRALES

Han sido identificados tres segmentos de lectura abierta (ORFs) designados como ORF1a, ORF1b y ORF2 por el Comité Internacional sobre la Taxonomía de los Virus. Los dos primeros ORFs, codifican para proteínas no estructurales y estas regiones contienen secuencias altamente conservadas la cual en contraste al ORF2 es muy variable en el extremo 3' terminal del genoma. Los primers específicos para la región serina proteasa conservada en el ORF1a o para el extremo 3' terminal no traducido del genoma son candidatos aceptables en RT-PCR para la detección de todos los tipos antigénicos de astrovirus. ORF2 (con una longitud de ~2.4 Kb) se encuentra en el extremo 3' terminal del genoma y codifica para la proteína precursor de la cápside. (36,46,47) **Figura 2**

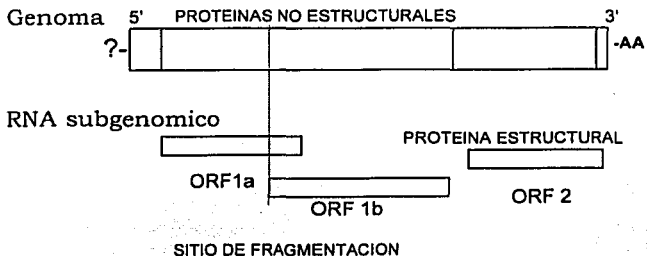


Fig.2. Organización del genoma de astrovirus, mostrando esquemáticamente la localización de sus proteínas.

## 2.3. CLASIFICACIÓN DE LOS ASTROVIRUS HUMANOS

### 2.3.1. SEROTIPOS

Los astrovirus pueden ser clasificados dentro de serotipos de acuerdo a la reactividad de las proteínas de la cápside con suero policlonal y anticuerpos policlonales. Los astrovirus son también clasificados dentro de genotipos sobre las bases de la secuencia nucleótida de una región de 348-pb del ORF2. Hay una buena correlación entre genotipo y serotipo. Existen actualmente siete serotipos establecidos de astrovirus humano que correlacionan con los siete genotipos. Se ha sugerido la existencia de un octavo genotipo por la secuencia de un presunto serotipo 8 de astrovirus depositado en el banco de genes.

Previos estudios han mostrado que el serotipo 1 es el tipo predominante causante de enfermedad, seguido por los serotipos 2, 3, 4, y 5, los cuales son menos comunes. Los serotipos 6, 7 y 8 han sido raramente detectados. Actualmente son 8 los serotipos reportados (AstV-1 - AstV-8), tanto en el Reino Unido, Africa, Oriente Medio, Australia y no hace mucho en México.<sup>(31,34, 42,43)</sup>

## 2.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

Su densidad en CsCl ha sido reportada para astrovirus humanos y animales, en humanos es de 1.35 a 1.37 g/ml, en perros y cerdos es de 1.34 a 1.35 g/ml, en ovejas es de 1.38 a 1.40 g/ml, etc.,. Las características físico-químicas de los astrovirus humanos incluyen estabilidad al medio ácido (pH 3), resistente a cloroformo y sobrevive a 60 °C por 5 minutos pero no por 10.

Las partículas virales parecen ser estables cuando se almacenan a temperaturas muy bajas ( $-70^{\circ}\text{C}$  a  $-85^{\circ}\text{C}$  ) hasta 6 a 10 años, pero pueden ser fragmentadas mediante repetidas congelaciones y descongelaciones.

Por lo general se describe a los astrovirus de 28 nm, sin embargo, el diámetro de la partícula puede variar dependiendo del origen del virus y del método de preparación para Microscopía Electrónica (ME).<sup>(47)</sup> **Figura 3**

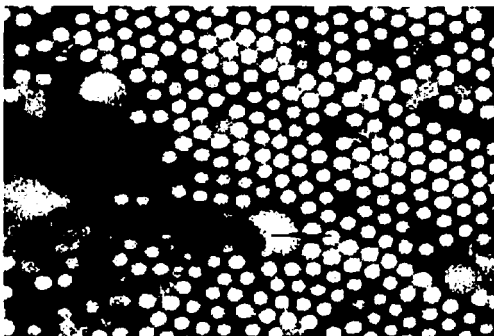


Fig. 3. Astrovirus Humanos, muestra teñida con ácido fosfotúngstico (PTA) al 2%, la barra representa 100nm.(29,700x). Tomado de Suzanne M. Matsui, 1996.

## 2.5. CLÍNICA Y PATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR ASTROVIRUS

### 2.5.1. PATOGÉNESIS

La patogénesis de la infección por astrovirus no ha sido bien estudiada en humanos. La correlación de la diarrea con la eliminación de astrovirus en heces y la identificación de partículas virales en las células del epitelio intestinal sugiere que la replicación viral tiene lugar en el tejido intestinal en humanos. La patogénesis viral de astrovirus en animales ha sido estudiada más extensamente. Los estudios de astrovirus en bovinos han determinado que los virus infectan las células M y los enterocitos absortivos situados sobre el domo de las vellosidades de las placas de Peyer en el intestino delgado. (40)

Estudios realizados sobre la infección de astrovirus en borregos revelaron que provoca diarrea que trasciende de manera leve siguiendo la infección de los enterocitos maduros en las dos terceras partes de la región apical de las vellosidades. Mientras que los experimentos in vivo anteriores sugieren que los astrovirus penetran a las células a través de la superficie apical, estudios de patogénesis viral en cultivo celular indican que los astrovirus humanos penetran a través de la superficie basolateral en lugar de por la superficie apical. En los bovinos una vez infectados los enterocitos células inflamatorias emigran hacia la superficie del domo. (40) **Figura 4**

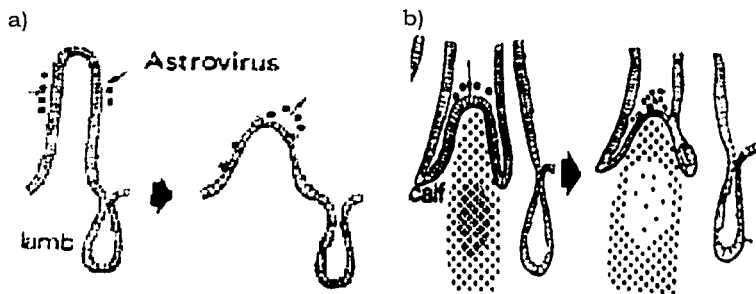


Fig.4. En el proceso de patogenicidad de astrovirus en a) corderos se observa que los enterocitos maduros son infectados y exfoliados, produciendo atrofia en las vellosidades mientras que en b) bovinos, la lámina propia del domo es infiltrado por neutrófilos y células linfoides. Tomada del Hall 1984.

## 2.5.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Sigue un periodo de incubación de uno a cuatro días, la infección por astrovirus típicamente se presenta como una diarrea aguda. La diarrea por astrovirus se ve principalmente en niños pequeños de seis meses a dos años de edad y puede ser asociada con anorexia, fiebre, vómito, dolor abdominal, dolor de cabeza.

Estos síntomas comparados con una gastroenteritis asociada a rotavirus son menos severos.<sup>(25)</sup>

Aunque la diarrea por astrovirus no resulta normalmente en una deshidratación significativa u hospitalización, los individuos sufren de un pobre estado nutricional y los pacientes con inmunodeficiencia tienen un mayor riesgo para el desarrollo de complicaciones.<sup>(2,17,25)</sup>



### 2.5.3. TRANSMISIÓN

Los astrovirus son transmitidos de persona a persona, por la ruta fecal-oral, por fomites, mediante agua y comida contaminada .Se reportó que una fuente de infección es el consumo de mariscos (contaminado por aguas residuales) y por lo tanto, también ha tenido consecuencias económicas para los pescadores y la industria de comida.(35,44)

La transmisión fecal-oral ha sido verificada por numerosos estudios en voluntarios. En 1979, Kurtz y colegas examinaron filtrados de un niño con gastroenteritis leve por ME y determinaron que contenía un gran número de partículas de astrovirus. El filtrado fue administrado a ocho voluntarios por la boca. Un voluntario desarrolló enfermedad diarreica y eliminó gran cantidad de astrovirus en las heces y otro experimentó síntomas constitucionales leves excretando un bajo nivel de astrovirus. El filtrado original fue subsecuentemente proporcionado a nueve voluntarios más, dos de los cuales eliminaron virus. Trece de dieciséis pacientes inoculados experimentaron un incremento en el título de anticuerpo homólogo en su suero.(25)

El agua y la comida contaminada han sido ocasionalmente implicados como la causa de los brotes de astrovirus. El 21 de Junio de 1991 fue identificado un brote de gastroenteritis aguda entre estudiantes y personal de cocina de 10 primarias y cuatro escuelas privadas en la ciudad de Katano, Prefectura de Osaka, Japón. Todo el suministro de agua a las escuelas se hace por separado pero los almuerzos de las escuelas vienen de tres cocinas centrales todas consiguen sus alimentos de un suministro en común. Oishi y Col. (1994) examinaron muestras de comida de las tres centrales de cocina y muestra fecal de 38 pacientes de 10 diferentes escuelas siendo astrovirus detectado en muestras de comida así como en 10 de las muestras fecales. (35)

Utogawa y Col. (1994) identificaron a astrovirus como el agente etiológico de gastroenteritis en tres brotes por separado. En el primer brote, 22 (67%) de 33 gentes quienes comieron en un restaurante en la Prefectura de Nagano más tarde desarrollaron gastroenteritis.

El segundo brote involucra a 1,419 personas tanto de cocina como estudiantes de una escuela en la Prefectura Yamaguchi quienes llegaron a enfermar después de comer almuerzos contaminados de la escuela. En el tercer brote, 45 de 68 estudiantes de la escuela superior llegaron a enfermar dentro de las 24 horas después de comer. Astrovirus fue detectado en 6-10% de las muestras examinadas. (16)

En Estados Unidos se obtuvieron 1160 muestras fecales de niños con gastroenteritis aguda no bacteriana en las que se detectó que 314 (27%) contenían virus, en 20 de las 314 se encontraron astrovirus. La diarrea asociada con astrovirus parece ser en este estudio de origen hospitalario en el 71 % de los casos, en este como en otros estudios ha sido demostrada la infección nosocomial por astrovirus. (25,26,32)

#### 2.5.4. INMUNIDAD

La inmunidad a la infección por astrovirus no está bien entendida. Niños pequeños y personas de la tercera edad en acilos son usualmente las poblaciones que desarrollan infecciones sintomáticas. Kurtz J. y col., en Inglaterra, demuestran en niños asintomáticos, menores de 10 años que la seroprevalencia de anticuerpos de astrovirus fue de 7% en niños de 6-12 meses de edad y de 75% en niños de 5-10 años de edad; sugiriendo que los anticuerpos son adquiridos cerca de la niñez, proporcionando protección durante la vida adulta declinando con la edad. Una investigación realizada por Koopmans y col. determinaron que no se presenta protección heteróloga entre los primeros siete serotipos de astrovirus humanos, en donde el porcentaje total de personas con anticuerpos neutralizantes para astrovirus fue de un rango del 10 al 91% dependiendo del serotipo de astrovirus. (4,47)

## 2.6. EPIDEMIOLOGÍA

La distribución de estos virus es cosmopolita ya que se han detectado en niños de China, Japón, Tailandia, Australia, Sudáfrica, Malawi, Suecia, Reino Unido, Estados Unidos, Canadá, Chile, Argentina, Perú, Guatemala y México entre otros. (7,8,12,22,24,41)

Estos agentes se han reportado en humanos y en algunos animales domésticos como perros y gatos, así como en borregos, cerdos, ovejas, venados, ratones, pájaros, vacas, mariscos, aves de corral como guajolotes y patos. (1,36,40,44,47)

### 2.6.1. PREVALENCIA

Estimaciones de la prevalencia de la infección por astrovirus varía ampliamente dependiendo de la población y del método de detección usado. Los hallazgos de algunos estudios sobre la prevalencia de astrovirus son resumidos más adelante. **Tabla 1** Usando la técnica de Northern dot blot (RNA), Palombo y Col. (1995) detectaron astrovirus en el 4.2% de las muestras fecales de niños en Melbourne Australia los cuales habían sido hospitalizados por gastroenteritis aguda. (37,38)

Usando un ensayo inmunoenzimático (EIA) capaz de detectar los serotipos del 1-5 de astrovirus humanos, Herrmann y Col. en 1991 llevaron a cabo estudios controlados en Tailandia determinando la incidencia de astrovirus entre pacientes externos pediátricos con gastroenteritis donde el 8.6% de casos de diarrea fueron asociados con astrovirus.

Usando también un EIA, Cruz y Col. (1992) detectaron astrovirus en un 38.6% en niños de la zona rural de Guatemala de 0-3 años de edad. (12,20)

Algunos de los estudios realizados en México, entre 1988-1991 por Guerrero y Col. se llevó a cabo un seguimiento de los episodios de diarrea en 214 niños menores de dos años de edad en el cual astrovirus se detectó en 26 (5%) de los 510 episodios de diarrea. (8). Así mismo Griffin D. y Col, durante el periodo comprendido de Octubre de 1994 a Marzo de 1995 reportan 26 (7.3%) casos positivos de astrovirus.(18)

Usando un EIA no comercial y RT-PCR, Maldonado y Col. (1998) identificaron que astrovirus era el patógeno entérico más común en una población rural de infantes Mayas viviendo en la sierra de Chiapas, México. Detectándose, en una cohorte de niños, en los primeros años de vida desde su nacimiento hasta los tres años una baja infección por rotavirus y adenovirus entéricos. Los astrovirus fueron detectados en 164 (61%) de los 271 niños de estos 26% presentaban un cuadro diarreico, esta es la más alta prevalencia reportada entre infantes de cualquier región del mundo.(33)

Kjeldsberg en un estudio realizado por el mostró que astrovirus se encuentra presente en un 4.2% en muestras de materia fecal de pacientes con gastroenteritis en Noruega cuya edad de estos individuos afectados no ha sido reportada y estudios en sujetos asintomáticos no ha sido realizado.(47)

Tabla 1. Estudios de la prevalencia de astrovirus.

ESTUDIO	REGIÓN	EDAD DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	MÉTODO DE DETECCIÓN	PREVALENCIA DE ASTROVIRUS
Palombo y Col. (1978)	Melbourne Australia	< de 5 años de edad	Northern Dot Blot (RNA)	4.2%
Herrmann y Col. (1991)	Bangkok, Thailandia	< de 5 años de edad	EIA	8.6%
Cruz y Col. (1992)	Guatemala	< de 3 años de edad	EIA	38.6%
Koopmans y Col. (1998)	Holanda	< de un año a 79 años de edad	Ensayo de Neutralización	*10-91%
Maldonado y Col. (1998)	Chiapas, México.	< de 3 años de edad	EIA y RT-PCR	61%

\*Este amplio rango en los valores de prevalencia es un resultado de diferencias en la prevalencia de los siete diferentes serotipos de astrovirus humano como se ilustra en la tabla 2. (8,12,18,28,33)

## 2.6.2. PREVALENCIA DE LOS SEROTIPOS DE ASTROVIRUS HUMANOS.

Numerosos estudios sobre la prevalencia de los serotipos de astrovirus humanos indican que el serotipo 1 es el de mayor circulación a nivel mundial. **Tabla 2** Lee y col. (1994) obtuvieron muestras fecales del laboratorio de salud pública de Oxford de niños menores de 6 años de edad los cuales presentaban o habían tenido gastroenteritis aguda. Ocasionalmente las muestras de adultos también fueron examinadas, pero sólo cuando se sospechaba de agentes virales de gastroenteritis. Las muestras fueron examinadas primeramente por ME para virus y fueron serotipificadas usando inmunomicroscopía electrónica (IME). De 291 muestras fecales positivas a astrovirus colectadas durante un periodo de 17 años de 1976-1992, 64.9% (n=189 muestras) contenían astrovirus serotipo 1, 1.3% (n=33 muestras) contenían el serotipo 2, 9.3% (n=27 muestras) contienen el serotipo 3, 1.3% (n=33 muestras) contenían el serotipo 4, 2.1%(n=6 muestras) contenían el serotipo 5, 0.3%(n=1 muestra) contenían el serotipo 6 y 0.7% (n=2 muestras) contenían el serotipo 7. (28)

Noel y Col. (1994) colectaron en Londres 162 muestras fecales positivas a astrovirus de niños con diarrea de 1981-1993. Los virus aislados de estas muestras fueron tipificados usando un ensayo inmunoenzimático e IME y se encontró que 66% (n=107) de los virus aislados fueron serotipo 1, 0.6% (n=1) fueron serotipo 2, 6.2% (n=10) fueron serotipo 3, 4.3% (n=7) fueron serotipo 4 y 0% (n=0) fueron serotipo 5. No hubo información provista para astrovirus serotipos 6 y 7.

En 1995, Noel y Col. usaron un inmunoensayo enzimático tipificante para determinar el tipo de 64 muestras positivas a astrovirus de 7 diferentes países. 52% (n=32 muestras) fueron astrovirus serotipo 1, 11% (n=7 muestras) fueron astrovirus serotipo 2, 16% (n=10 muestras) fueron serotipo 3, 10% (n=6 muestras) fueron astrovirus serotipo 4, 2% (n=1 muestra)

fueron astrovirus serotipo 5, 2% (n=1 muestra) fueron astrovirus serotipo 6 y 0% (n=0) fueron serotipo 7. (23)

En el estudio de Koopmans , se determinó que el porcentaje total de personas con anticuerpos neutralizantes de astrovirus fue mayor para astrovirus serotipo 1 (91%), seguido por 69% del serotipo 3, 56% del serotipo 4, 36% del serotipo 5, 31% del serotipo 2, 16% del serotipo 6 y 10% del serotipo 7.

En México, en un estudio realizado por Walter y Col. se ha reportado al serotipo 2 (AstV- 2) como el de mayor prevalencia con un 42%, seguido del serotipo 4 (AstV-4) con un 23%; mientras que Guerrero y Col. reportan al serotipo 2 con un 35% y al serotipo 4 con un 15 %.(8,39)

Méndez-Toss M. llevaron a cabo un estudio, acerca de la diversidad de serotipos de astrovirus humano en México con 950 muestras de las cuales 35 resultaron positivas a astrovirus , se determinó el serotipo de 26 de las cepas de astrovirus de estas 9 (35%) fueron AstV- 1, 6 (23%) de las muestras fueron AstV- 2, 4(15%) fueron AstV- 3, mientras que de AstV-4 fueron 3(12%) muestras, el menor número fue para el AstV-6 con 1(4%) y 3 (12%) de las muestras fueron AstV-8, es interesante notar que los virus de serotipo 8 se encontraron únicamente en la Cd. de Mérida, por lo que en nuestro país circulan al menos 6 de los 8 serotipos reportados.

Tabla 2. Resumen de algunos de los estudios de la prevalencia de serotipos.

ESTUDIO	MÉTODO DE DETECCIÓN	AstV-1	AstV-2	AstV-3	AstV-4	AstV-5	AstV-6	AstV-7
Lee y Col. (1994)	IME	64.9%	11.3%	9.3%	11.3%	2.1%	0.3%	0.7%
Noel y Col. (1994)	EIA Y IME	66%	0.6%	6.2%	4.3%	0%	-	-
Noel y Col. (1995)	EIA	52%	11%	16%	10%	2%	2%	0%
Koopmans y Col. (1998)	Ensayo de Neutralización	91%	33%	69%	56%	36%	16%	10%
*Walter y Col. (2001)	EIA Y RT-PCR	10%	42%	13%	23%	6%	-	6%
*Guerrero y Col. (1998)	EIA	4%	35%	11%	15%	5%	-	-

\*El estudio de Jan E. Walter y Lourdes Guerrero corresponden a algunos de los realizados en comunidades peri urbanas de la Cd. de México.



### 2.6.3. ESTACIONALIDAD DE LA INFECCIÓN POR ASTROVIRUS.

En regiones templadas, la mayoría de las infecciones por astrovirus son detectadas en el invierno mientras que en climas tropicales, la mayoría de las infecciones por astrovirus se han notado en época lluviosa.<sup>(47)</sup>

Utagawa y Col. (1994) examinaron la epidemiología y prevalencia de astrovirus en seis institutos de salud pública prefectural en Japón de 1982 a 1992. Las distribuciones estacionales de astrovirus de los casos esporádicos examinados por este estudio han mostrado que hubo un pico en Marzo y Abril lo cual fue informado para el 65% de los casos. Casos esporádicos se dieron de Noviembre a Mayo, pero no fue detectado un caso de Junio a Octubre.<sup>(16)</sup>

Cruz y Col. en 1992 llevaron a cabo un estudio longitudinal de infecciones por astrovirus y diarrea entre niños ambulatorios de la zona rural menores de tres años de edad viviendo en una comunidad rural de Guatemala y se encontró que el mayor rango de detección mensualmente de astrovirus en niños enfermos ocurrió en Mayo lo cual fue el principio de la temporada lluviosa.<sup>(12)</sup>

Maldonado y Col. (1998) examinaron la epidemiología de astrovirus en una población rural de infantes Mayas viviendo en la sierra de Chiapas, México y encontraron que aunque astrovirus se presenta durante todo el año el pico fue en Marzo y Mayo y disminuyó en Septiembre. Se incrementó la prevalencia de astrovirus correlacionada mejor con el principio de la época calurosa y lluviosa.<sup>(33)</sup>

Sin embargo estudios en el mundo han observado una clara tendencia estacional con un pico durante el invierno y otro en los meses de verano.<sup>(16,20,24,31,32,38,42)</sup>

#### 2.6.4. DISTRIBUCIÓN POR GRUPO DE EDAD DE LA INFECCIÓN POR ASTROVIRUS.

Hasta la fecha, existe un número limitado de estudios sobre la distribución de la edad en infección por astrovirus, pero los pocos estudios que se han llevado a cabo sugieren que la mayoría de la gente adquiere anticuerpos alrededor de los 5 años de edad. (4,14,20)

Un estudio por Kurtz y Col. (1978) examinaron la prevalencia de anticuerpo de astrovirus en 87 niños menores de 10 años de edad viviendo en la región de Oxford del Reino Unido. Los anticuerpos de astrovirus fueron detectados en 7% de infantes de 6 a 12 meses de edad, 70% de niños en edad escolar y 75% de niños de 10 años de edad. Un grupo de estudiantes de enfermería también fueron estudiados y los anticuerpos de astrovirus fueron detectados en 77% de este grupo. (28)

Koopmans y Col. (1998) utilizaron ensayos neutralizantes para determinar los porcentajes de seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes en una muestra de edad estratificada de la población en la provincia de Utrech . La edad estratificada total de la seroprevalencia de los siete serotipos de astrovirus humanos fue aproximadamente 15% para individuos menores de un año de edad, 29% para individuos de un grupo de 1 a 4 años de edad y 44% para individuos de 5 años de edad y otros.

Un estudio serológico en el Reino Unido ha demostrado que los anticuerpos a astrovirus fueron adquiridos por la mayoría de los niños antes de los 6 años de edad. (24)

## 2.7. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

En algunos países se lleva a cabo una mejora e implementación constante de métodos de detección de agentes virales, la mayoría de ellos son caros y sofisticados, los principales son:

### 2.7.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La infección de astrovirus ha sido tradicionalmente diagnosticada por ME, sin embargo, solamente el 10% de las partículas de astrovirus poseen la característica morfológica semejante a una estrella haciendo difícil su detección siendo importante por lo tanto su tamaño, morfología y la cantidad de partículas virales arrojadas durante el episodio diarreico para poder ser vistos por microscopía electrónica, donde se pueden encontrar de  $10^8$  a  $10^{10}$  partículas virales/mL de heces.<sup>(2,13)</sup>

Para la detección de astrovirus se realiza una suspensión al 10% de materia fecal en buffer salina de fosfatos a pH 7.3 es centrifugado a 106500g por 1 hora, se retira el sobrenadante y el paquete se resuspende en 100  $\mu$ L de agua destilada que contiene 100  $\mu$ g/mL de bacitracina, se deja reposar por 10 minutos se retira el sobrenadante por último se realiza una tinción negativa con tungstato de metilamina al 1%.<sup>(28)</sup>

### 2.7.2. INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Es una variante del método anterior pero con el uso de anticuerpos que inducen la aglutinación de partículas virales. Se utiliza cuando se desea tipificar a los astrovirus siendo indispensable disponer de los anticuerpos monoclonales específicos correspondientes, para la observación al ME también se tiñen con tungstato de metilamina al 1%.<sup>(28)</sup>

### 2.7.3. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO

El desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos (EIAs) para detectar virus en muestras fecales han mostrado que los astrovirus son una importante causa de diarrea en países en vías de desarrollo. La aplicación de un EIA para estudiar un brote que se dio en Estados Unidos muestra que muchos más casos fueron detectados por EIA que por ME, es la técnica de diagnóstico más extensamente usada. Dicha técnica hace uso de un anticuerpo monoclonal y uno policlonal, demostrando tener en algunos estudios una sensibilidad del 91% y una especificidad del 98 % comparada con la IME. (24,47)

### 2.7.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes como la transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es la más requerida ya que proporciona mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico, sobre todo si se pretende llegar hasta la identificación de serotipos virales. La PCR es un método que permite la rápida amplificación y detección in vitro del material genético (DNA) que produce el proceso de replicación del mismo, mientras que la RT-PCR se usa para retrotranscribir el RNA a cDNA mediante la enzima transcriptasa reversa.(30)

### 2.7.5. CULTIVO CELULAR

Todos los serotipos encontrados pueden ser cultivados en líneas celulares de riñón de mono y en células de riñón de embrión humano.(11) Un mayor progreso en la investigación de los laboratorios para el diagnóstico de astrovirus ha tenido como resultado el encontrar que pueden ser propagadas en una línea continua de células CaCo-2 de carcinoma de colon, así como en líneas celulares de hepatoma humano.(5,24,47)

Los trabajos sobre Biología Molecular en el diagnóstico de los astrovirus ha incrementado el entendimiento acerca del genoma viral, siendo una de las herramientas implementadas para la detección de grupos y serotipos virales.(7,8,42,45)

## 2.8. TRATAMIENTO

La gastroenteritis debida a astrovirus es generalmente poco severa, aunque puede interrumpir las actividades normales de cada individuo, es de carácter autolimitado, no se requiere de terapia especifica ya que no existe tratamiento antimicrobiano, sus principales complicaciones son la deshidratación y la desnutrición. Esta última puede verse agravada por la práctica común e inadecuada de disminuir o suspender la dieta habitual del paciente durante la diarrea, por lo que se debe continuar con la alimentación habitual, en especial la lactancia materna. (47)

La deshidratación se puede tratar, de acuerdo con el resultado de la evaluación del estado de hidratación del paciente, aplicando uno de los planes de tratamiento siguientes: plan A para prevenir la deshidratación y la desnutrición en sujetos no deshidratados; plan B para tratar la deshidratación por vía oral y plan C con objeto de tratar rápido, por vía intravenosa, el estado de choque hipovolémico. Las complicaciones tales como la deshidratación pueden desarrollarse en pacientes con enfermedad gastrointestinal básicamente por un estado nutricional pobre, por una infección mixta severa, con inmunodeficiencia, o con enfermedad prolongada. (49)

## 2.9. PREVENCIÓN

El poder interrumpir la transmisión es un factor clave para la prevención de la infección por astrovirus. Es pues fundamental afirmar que es en la familia y en las condiciones de higiene de la casa habitación donde se puede intervenir, al fortalecer la práctica de la higiene alrededor de las actividades concernientes a la alimentación de los niños, quienes son los seres más expuestos a

las diarreas agudas. En los adultos es igual, aunque es más frecuente que el mecanismo de la infección sea por vehículo común, ingestión de agua o alimentos contaminados, mientras que en el niño las infecciones pueden ocurrir por manipulaciones directas, en las condiciones de hacinamiento e insalubridad de algunos hogares.

La falta de hábitos higiénicos que se pueden dar en guarderías, escuelas y lugares de reunión de mucha gente donde también la transmisión de persona a persona es fácil que ocurra. Esto es especialmente importante en hospitales y otras instituciones tales como casas de la tercera edad.

La higiene del agua y de los alimentos, entre ellos los mariscos, desempeña el papel más importante en la prevención eficaz de las diarrea por astrovirus, prevista desde las instalaciones hidráulicas de la comunidad y del hogar, con el aseguramiento del agua potable y los servicios de distribución y protección del agua, como del cuidado de los alimentos y utilización de letrinas o fosas sépticas con retretes protegidos. (47,49)

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los astrovirus son agentes que han adquirido gran importancia dado a que se han detectado en varios países como una causa de diarrea aguda, determinándose además como agente importante de infección nosocomial, infectando a todos los grupos de edad, principalmente a niños menores de 5 años de edad. En México poco se conoce de este agente y su asociación a cuadros de diarrea debido a que no se cuenta con una técnica adecuada y accesible en todos los laboratorios para su detección, por lo que mediante este estudio se pretende evidenciar la presencia del astrovirus en niños menores de 5 años con diarrea aguda en algunas regiones geográficas del país.

Este estudio permitirá conocer si los astrovirus están presentes en muestras fecales de niños que han cursado por un proceso diarreico, lo que nos permitirá determinar la posible asociación de estos agentes con la diarrea aguda infantil.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de astrovirus en niños con diarrea aguda provenientes de algunos estados de la República Mexicana.

### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la presencia de astrovirus en niños con cuadros diarreicos mediante un ensayo inmunoenzimático.
- Conocer los grupos de edad más afectados dentro de una población de niños de 0-5 años en muestras analizadas con la infección por astrovirus.
- Determinar el periodo estacional de la diarrea asociada a astrovirus.
- Conocer las principales manifestaciones clínicas de la infección por astrovirus.



## **5. HIPÓTESIS**

Los astrovirus se han detectado a nivel mundial como una causa de diarrea aguda en la población infantil. Se conoce acerca del papel que juegan estos virus en la salud pública a través de estudios realizados en gran parte del mundo indicando que las infecciones por astrovirus ocurren alrededor de los 5 años de edad en el 60 a 80 % de las poblaciones analizadas. Por lo que este trabajo pretende demostrar que los astrovirus se encuentran asociados a cuadros diarreicos en niños menores de 5 años en nuestro país.

## 6. MATERIAL Y METODO

### 6.1. MATERIAL

#### 6.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Durante el periodo Mar 99-May 01 se analizaron 320 muestras diarreicas de niños menores de 5 años negativas a rotavirus por la técnica de rotaforesis y negativas a adenovirus por un ensayo inmunoenzimático. Procedentes de diferentes estados de la República Mexicana (Chihuahua, Monterrey, Tamaulipas, Hidalgo, Distrito Federal, Quintana Roo, Campeche y Yucatán); las cuales fueron analizadas para el diagnóstico de astrovirus mediante un ensayo inmunoenzimático (EIA).

#### 6.1.2. MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

Micro placas de 96 pocillos (8x12)

Tubos Eppendorf de 1500 $\mu$ L.

Pipetas Pasteur

Pipetas graduadas de 10 mL.

Micro pipetas de hasta 1000  $\mu$ L de capacidad.

Puntas estériles para micro pipeta de 100 a 1000  $\mu$ L de capacidad.

Papel absorbente.

Vórtex Genie-2 VWR.

Estufa incubadora a 37°C "Thelco Modelo 6".

Lector de EIA "Bio Kit Modelo El x 800".

### 6.1.3. REACTIVOS

El Kit del inmunoensayo para astrovirus se compone de lo siguiente:

- Reactivo 1 110 mL de diluyente la cual contiene buffer salina, un agente antimicrobiano y está teñido de verde.
- Reactivo 2 2 mL de control positivo: astrovirus tipo 1 en una solución buffer conteniendo agente antimicrobiano.
- Reactivo 3 2 mL de control negativo : buffer conteniendo agente antimicrobiano ligeramente verde.
- Reactivo 4 13 mL de reactivo de anticuerpo: astrovirus específico policlonal de conejo.
- Reactivo 5 13 mL de conjugado anti IgG de conejo con peroxidasa de rábano en una solución proteica tamponada con agente antimicrobiano y teñida de azul.
- Reactivo 6 110 mL del concentrado de buffer de lavado.
- Reactivo 7 11 mL del sustrato parte A: buffer que contiene tetrametil bencidina (TMB) y agente antimicrobiano.
- Reactivo 8 11 mL del sustrato parte B: Buffer que contiene peróxido de hidrógeno y agente antimicrobiano.
- Reactivo 9 11 mL de la solución de término de reacción ( $H_2SO_4$  0.46 mol /L.)

## 6.2. METODOLOGÍA

### 6.2.1. FUNDAMENTO:

El ensayo inmunoenzimático, utiliza un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal en un inmunoensayo de fase sólida para detectar el antígeno de astrovirus. Los micro pozos separables son cubiertos con un anticuerpo monoclonal específico de astrovirus. Es adicionada la suspensión fecal en la micro placa y el antígeno del astrovirus presente en la muestra es capturado en la fase sólida. El anticuerpo específico policlonal de conejo para astrovirus es adicionado a la micro placa los cuales se ligan a algún antígeno de astrovirus capturado, se adiciona el conjugado el cual se une a algún anticuerpo policlonal. La presencia de un anticuerpo marcado enzimáticamente y la adición de un cromógeno da como resultado un cambio de color indicando la presencia del antígeno de astrovirus en la muestra fecal.

### 6.2.2. PROCEDIMIENTO

Colocar en tubos Eppendorf 100  $\mu$ L de materia fecal, adicionar 1mL de reactivo 1, mezclar ligeramente en vórtex, dejar reposar 10' a temperatura ambiente. Adicionar a cada micro pocillo 2 gotas de la suspensión de materia fecal e incubar a 37°C 60'. Desechar totalmente el contenido de los pocillos y realizar 4 lavados con 350 $\mu$ L de reactivo 6 (previamente diluido en agua 1:24) Adicionar 2 gotas del reactivo 4, e incubar a 37°C 30', realizar nuevamente 4 lavados, y adicionar 2 gotas de reactivo 5, e incubar a 37°C 30', lavar 4 veces con reactivo 6, adicionar una gota de reactivo 7 e inmediatamente adicionar una gota de reactivo 8 mezclando suavemente el contenido de los pocillos para incubar a 37°C 10'. Realizar la lectura de los resultados \* y adicionar una gota de solución de paro y mezclar.

\*La lectura de los resultados puede realizarse visualmente considerando como prueba positiva la presencia de un producto de color azul o determinar la absorbancia fotométricamente a 450nm.(13)

### 6.2.3. DIAGRAMA DE FLUJO

Adicionar 2 gotas (100 $\mu$ L) de la muestra fecal diluida a la placa de ELISA.

↓ Incubar a 37 °C por 60 min.

↓ Lavar 4 veces.

↓ Adicionar 2 gotas(100 $\mu$ L) del reactivo de anticuerpo

↓ Incubar a 37 °C por 30 min.

↓ Lavar 4 veces.

↓ Adicionar 2 gotas (100 $\mu$ L) del conjugado

↓ Incubar a 37 °C por 30 min.

↓ Lavar 4 veces.

↓ Adicionar 1 gota (50 $\mu$ L) del substrato parte A  
Adicionar 1 gota (50 $\mu$ L) del substrato parte B

↓ Incubar a 37 °C por 10min.

↓ Leer visualmente (azul)

↓ Adicionar 1 gota (50 $\mu$ L) de la solución de paro

↓ Leer la absorbancia fotométricamente a 450 nm (amarillo)

## **7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

### **7.1. TIPO DE ESTUDIO**

Prospectivo, observacional, transversal y descriptivo.

### **7.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Población de estudio: niños con diarrea aguda .

Edad : menores de cinco años.

Muestras diarreicas procedentes de los hospitales que conforman la Red de Hospitales de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE).

Periodo de estudio: duración dos años (Marzo 1999-Mayo 2001)

Tamaño de muestra: 320 muestras diarreicas.

### **7.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Adultos y ancianos

Pacientes inmunodeprimidos (con SIDA, leucemia, cáncer)

Diarreas con duración mayores de 2 semanas

### **7.4. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

Muestra no diarreica.

### **7.5. VARIABLES DEPENDIENTES**

Diarrea aguda

Edad del paciente

### **7.6. VARIABLES INDEPENDIENTES**

Sexo

Pacientes tratados o no tratados con antibióticos.

### **7.7. DISEÑO ESTADÍSTICO**

Estadística descriptiva.

Estadística inferencial.

Prueba de análisis de  $X^2$ .

## 8.-RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron 320 muestras diarreicas durante el periodo de Mar 99-May 01 de niños menores de 5 años negativas a rotavirus por la técnica de rotaforesis y negativas a adenovirus mediante un ensayo inmunoenzimático. Procedentes de diferentes estados de la República Mexicana : Chihuahua, Monterrey, Tamaulipas, Hidalgo, Distrito Federal, Quintana Roo, Campeche y Yucatán; las cuales fueron analizadas para el diagnóstico de astrovirus por inmunoensayo enzimático.

Del total de muestras analizadas se observó que 14 (4.4%) fueron positivas a AstVsH. **Tabla 3 y Gráfica 1**

Las muestras positivas a AstVsH se presentaron distribuidas en Chihuahua, Monterrey, Hidalgo, DF., Campeche y Quintana Roo, observándose un mayor número de casos positivos en el Distrito Federal, mientras que en los estados de Tamaulipas y Yucatán no se encontró ningún caso positivo. **Figura 4 y Gráfica 2**

Del total de las muestras estudiadas de niños menores de 5 años, que se recibieron en el laboratorio de virus gastrointestinales, las edades en donde se observó la presencia de astrovirus fue de 1-22 meses. De los 14 casos positivos, la mayoría de las muestras corresponden a niños de 8-13 meses de edad. **Tabla 3 y Gráfica 3**

Tomando en cuenta el número total de muestras analizadas de Marzo de 1999 a Mayo del 2001 se ordenaron trimestralmente comparando el número de muestras tanto positivas como negativas obtenidas durante estos años de estudio. **Gráfica 4**

La circulación de estos agentes virales se presentó durante los meses de septiembre-mayo, asimismo, fue posible determinar que el mayor número de casos positivos a astrovirus fue de octubre a enero. **Gráfica 5**

Se observó que no existe diferencia de acuerdo al sexo en el número de casos positivos a astrovirus. **Tabla 3**

Las manifestaciones clínicas se obtuvieron consultando las encuestas de diarreas de la Secretaría de Salud diseñadas para el Programa de Vigilancia Epidemiológica de Diarrea por Rotavirus que se registraron en el momento de la toma de muestra.

Las manifestaciones clínicas más importantes que se tomaron en cuenta de las muestras positivas a astrovirus fueron las que presentaron : de 3 a 8 evacuaciones por día (64.28%), vómito (42.85%), temperatura mayor de 38°C ( 21.42%) y deshidratación ( 57.14 %). **Tabla 6**

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante la prueba Ji-Cuadrada ( $\chi^2$ ) de Independencia utilizando tablas de contingencia, de esta manera se confrontaron todas las edades de los pacientes tanto de muestras positivas como negativas y la temporada en la que se registran todos los casos tanto positivos como negativos, determinando si la edad y la temporada son eventos dependientes o independientes a la infección por astrovirus . **Tablas 4 y 5.**

Para el estudio de las características clínicas se llevó a cabo el análisis con la misma prueba estadística en la cual se determina si el número de evacuaciones es un factor independiente o dependiente a la infección por astrovirus, separando el número de pacientes que presentaron de 3 a 8 evacuaciones en 24 horas de aquellos pacientes que referían menos de 3 evacuaciones o que presentaban más de 8 evacuaciones, obteniéndose 8 casos positivos por astrovirus que presentaban de 3 a 8 evacuaciones en 24 horas y 205 casos que presentaban este mismo número de evacuaciones siendo negativas a astrovirus. **Tabla 7**

Al igual que para el número de evacuaciones se realizó una tabla de contingencia entre la presencia o ausencia de vómito y el número tanto de casos positivos como negativos obteniéndose 6



casos positivos con presencia de vómito y 103 casos negativos a astrovirus con este mismo síntoma. **Tabla 8**

Para la tabla de contingencia de temperatura mayor de 38°C se obtuvieron únicamente 3 casos positivos a astrovirus con este síntoma y 158 casos negativos con este mismo síntoma, el resto de los casos no presentaba una temperatura mayor a 38°C estos datos se obtuvieron de 296 encuestas de un total de 320 el resto de las encuestas no referían este dato. **Tabla 9**

Con respecto a la deshidratación se calculó la Ji-Cuadrada ( $\chi^2$ ), al igual que con las tablas anteriores, para determinar si esta era un evento dependiente o independiente a la infección por astrovirus. Se presentaron 8 casos positivos con deshidratación y 224 casos negativos con deshidratación. **Tabla 10.**

Tabla 3. MUESTRAS POSITIVAS A ASTROVIRUS EN NIÑOS CON DIARREA AGUDA.

CLAVE	SEXO	EDAD	FTM	PROCEDENCIA
2476	M	7 m	Sep-99	Chihuahua
2610	M	9 m	Nov-99	Hidalgo
2660	M	10 m	Nov-99	Chihuahua
2699	M	22 m	Dic-99	Distrito Federal
2703	M	8 m	Dic-99	Distrito Federal
1343	F	13 m	Mar-00	Hidalgo
2969	F	8 m	Oct-00	Distrito Federal
230	M	8 m	Oct-00	Distrito Federal
447	M	11 m	Ene-01	Campeche
1352	F	17 m	Ene-01	Distrito Federal
1070	F	13 m	Feb-01	Campeche
1454	F	1 m	Mar-01	Q. Roo
1351	F	8 m	Mar-01	Monterrey
2814	F	9 m	May-01	Monterrey

\* Dentro del rango de edad que comprende de 1-22 meses se obtuvo un promedio de 10 meses de edad.

FTM: Fecha de toma de muestra.

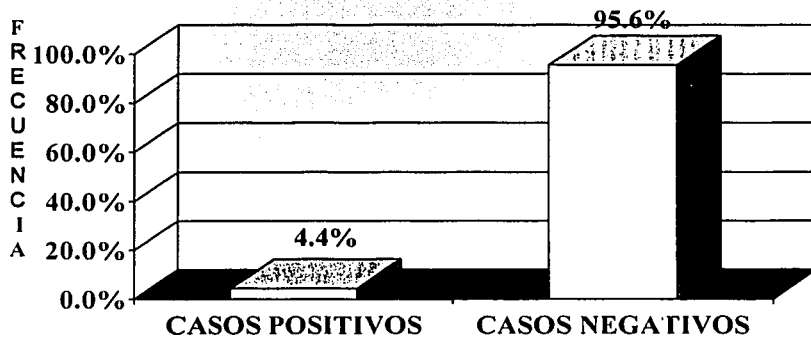
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 4. CIRCULACIÓN DE AstVsH EN ALGUNAS REGIONES GEOGRÁFICAS DEL PAÍS.



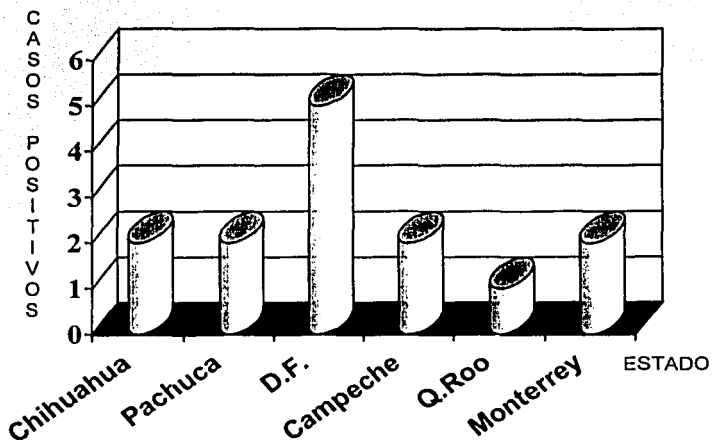
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Graf. 1. FRECUENCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETECCIÓN DE ASTROVIRUS.



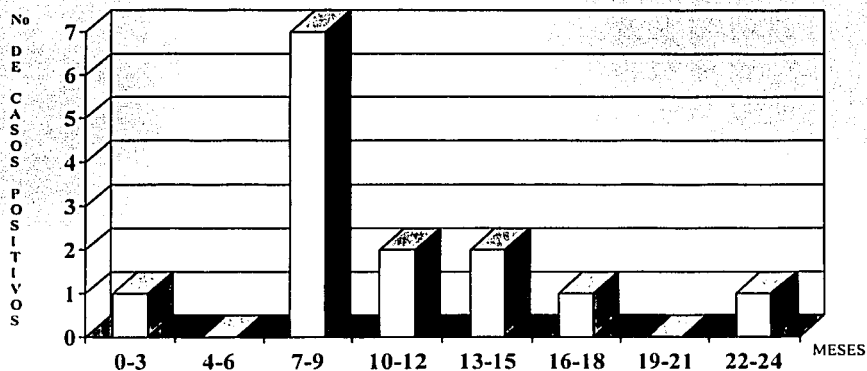
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Graf. 2. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS POSITIVAS.



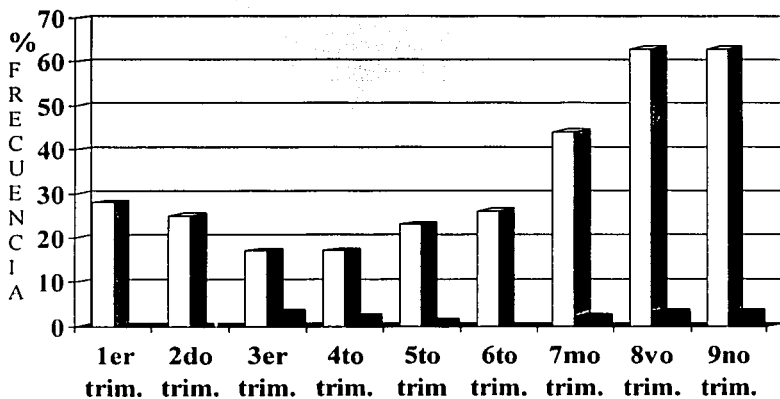
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Graf. 3. FRECUENCIA DE ASTROVIRUS EN NIÑOS CUYAS EDADES SE AGRUPARON POR TRIMESTRE.



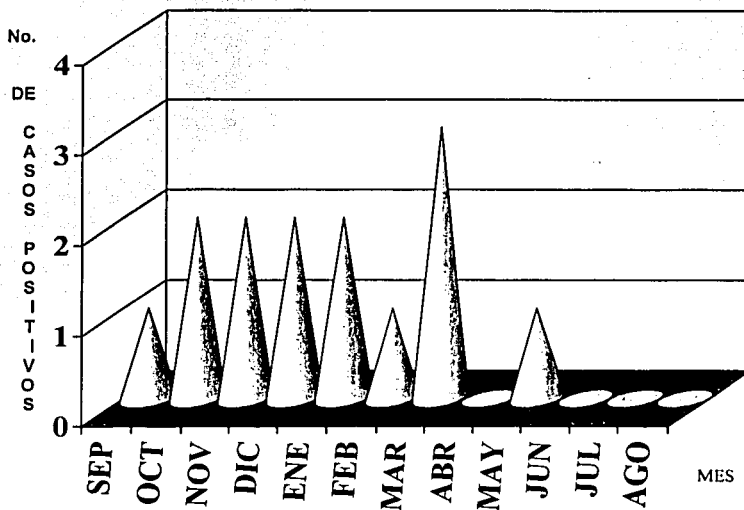
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Graf. 4. DISTRIBUCIÓN TRIMESTRAL DE MARZO DE 1999 A MAYO DEL 2001 DE LAS MUESTRAS PROCESADAS.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Graf. 5. DISTRIBUCIÓN MENSUAL DE LOS CASOS POSITIVOS



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Tabla 4 . Tabla de contingencia entre el número de casos positivos y negativos a astrovirus y la edad del paciente.

EDAD	POS	NEG	TOTAL
0-6	1	74	75
7-12	9	130	139
13-18	3	50	53
19-24	1	25	26
25-30	0	2	2
31-36	0	15	15
37-42	0	3	3
43-48	0	6	6
49-54	0	0	0
55-60	0	1	1
	14	306	320

Ho : La edad es un factor independiente a la infección por astrovirus.

Ha : La edad es un factor dependiente a la infección por astrovirus.

$$\alpha = 1\% = 0.01$$

$$\sum O^2 / \varepsilon = 324.61$$

$$\chi^2_{\text{Calc}} = 4.61$$

$$\chi^2_{\text{Tabla}} = 21.66$$

Conclusión : Se acepta la Ho con  $\alpha = 0.01$  .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5 . Tabla de contingencia entre las muestras analizadas y su agrupación por trimestre de marzo de 1999 a mayo de 2001.

TRIMESTRE	POS	NEG	TOTAL
1°	0	28	28
2°	0	25	25
3°	3	17	20
4°	2	17	19
5°	1	23	24
6°	0	26	26
7°	2	44	46
8°	3	63	66
9°	3	63	66
	14	306	320

Ho : La temporada es independiente a la infección por astrovirus.

Ha : La temporada es dependiente a la infección por astrovirus.

$$\alpha = 1\% = 0.01$$

$$\Sigma O^2 / \varepsilon = 330.77$$

$$\chi^2_{\text{Calc}} = 10$$

$$\chi^2_{\text{Tabla}} = 20.09$$

Conclusión : Se acepta la Ho con  $\alpha = 0.01$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 6. Manifestaciones clínicas de la infección por AstVsH.

Cod. de InDRE	INFLUENZA	VIÑETA	HEPATITIS	OTRAS MANIFESTACIONES
2476	-	-	-	-
2610	-	-	-	-
2660	-	+	-	+
2699	-	-	-	-
2703	+	-	-	+
1343	-	-	-	-
2969	+	+	-	-
0230	-	-	-	-
0447	+	-	-	-
1352	-	-	-	-
1070	+	-	-	+
1454	-	-	-	-
1351	-	+	+	+
2814	-	-	-	-
%	64.28	42.85	21.42	57.14

\*InDRE : Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

Tabla 7. Tabla de contingencia entre el número de evacuaciones por día y los casos positivos y negativos a la infección por astrovirus.

EVACUACIONES	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
DE 0 A 2 EVAC/DIA	9	215	224
3 A 8 EVAC/DIA	5	91	96
	14	306	320

$H_0$  : El número de evacuaciones es un factor independiente a la infección por astrovirus.

$H_a$  : El número de evacuaciones es un factor dependiente a la infección por astrovirus.

$$\alpha = 1\% = 0.01$$

$$\sum O^2/\varepsilon = 320.23$$

$$\chi^2_{\text{Calc}} = 0.23$$

$$\chi^2_{\text{Tabla}} = 6.63$$

Conclusión : Se acepta la  $H_0$  con  $\alpha = 0.01$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8. Tabla de contingencia entre el vómito y los casos positivos y negativos a la infección por astrovirus.

SINTOMA	POS	NEG	TOTAL
PRESENCIA DE VÓMITO	6	103	109
AUSENCIA DE VÓMITO	7	194	201
	13	297	310

Ho : El vómito es un evento independiente a la infección por astrovirus.

Ha : El vómito es un evento dependiente a la infección por astrovirus.

$$\alpha = 1\% = 0.01$$

$$\Sigma O^2/\varepsilon = 310.71$$

$$\chi^2_{\text{Calc}} = 0.71$$

$$\chi^2_{\text{Tabla}} = 6.63$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Conclusión : Se acepta la Ho con  $\alpha = 0.01$ .

Tabla 9. Tabla de contingencia entre la temperatura > 38°C y los casos positivos y negativos a la infección por astrovirus.

SINTOMA	POS	NEG	TOTAL
PRESENCIA DE FIEBRE	3	158	161
AUSENCIA DE FIEBRE	9	126	135
	12	284	296

$H_0$  : La temperatura > 38°C es un evento independiente a la infección por astrovirus.

$H_a$  : La temperatura > 38°C es un evento dependiente a la infección por astrovirus.

$$\alpha = 1\% = 0.01$$

$$\sum O^2 / \varepsilon = 300.36$$

$$\chi^2_{\text{Calc}} = 4.36$$

$$\chi^2_{\text{Tabla}} = 6.63$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Conclusión : Se acepta la  $H_0$  con  $\alpha = 0.01$ .

Tabla 10. Tabla de contingencia entre la deshidratación y los casos positivos y negativos a la infección por astrovirus.

SÍNTOMA	POS	NEG	TOTAL
PRESENCIA DE DESHIDRATACIÓN	8	224	232
AUSENCIA DE DESHIDRATACIÓN	6	70	76
	14	306	320

$H_0$  : La deshidratación es un evento independiente a la infección por astrovirus.

$H_a$  : La deshidratación es un evento dependiente a la infección por astrovirus.

$$\alpha = 1\% = 0.01$$

$$\Sigma O^2 / \varepsilon = 310.62$$

$$\chi^2_{\text{Calc}} = 2.62$$

$$\chi^2_{\text{Tabla}} = 6.63$$

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Conclusión : Se acepta la  $H_0$  con  $\alpha = 0.01$ .

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El ensayo inmunoenzimático es uno de los métodos más rápidos en la detección de astrovirus en muestras fecales humanas, se ha demostrado que tiene una sensibilidad y especificidad del 100 % comparada con inmunomicroscopía electrónica y microscopía electrónica.

En este ensayo se consideraba un resultado como positivo al obtenerse un color azul después de la adición del sustrato y muestras incoloras semejantes al control negativo se consideraban como negativas a la infección por astrovirus, además de la determinación visual se consideró la determinación fotométrica en la cual si se obtenía un valor de 0.5 o más unidades de absorbancia se consideraba como positivo mientras que un valor menor hasta de 0.150 unidades de absorbancia se consideraba como negativo.

Los resultados obtenidos mediante este ensayo inmunoenzimático permitieron determinar la presencia de astrovirus asociados a cuadros de diarrea aguda en la población infantil menor de 5 años.

Asimismo, nos permitió analizar e inferir acerca de la epidemiología de este agente y comparar los resultados obtenidos en base a lo reportado por la literatura .

Es de importancia destacar que, en México sólo ha sido reportado un estudio realizado con diferentes estados del país (Mérida, Monterrey, San Luis Potosí, Tlaxcala y DF.).

Del total de muestras analizadas 14 (4.4%) fueron positivas a AstVsH, lo que correlaciona con lo reportado por otros autores a nivel mundial. Se obtuvieron casos positivos en 6 de los estados incluidos, sin embargo el mayor número de casos se obtuvo en el DF. Al respecto cabe señalar que es de gran importancia el demostrar que este agente circula en nuestro país, ya que la mayoría de la población desconoce su existencia y las consecuencias que puede tener en la población infantil.



Las muestras analizadas para astrovirus durante estos dos años fueron enviadas por algunos estados que conforman la Red de Hospitales de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) y como se puede observar en la Gráfica 4., hubo un aumento en el envío de muestras en el 2001 y principalmente de diciembre a mayo, sin embargo en los dos años de estudio las infecciones por este virus se presentaron principalmente en los meses de octubre a marzo, donde el mayor número de casos se presentó en los meses de octubre, noviembre, diciembre y enero no registrándose ningún caso en los meses de abril, junio, julio y agosto.

Es de importancia señalar que la detección de astrovirus se presentó en los mismos meses de invierno, donde circula rotavirus.

Asimismo fue posible demostrar la circulación de estos agentes en algunos estados de la República Mexicana donde su clima es marcadamente extremo .

En particular resta en gran parte por explicar la distribución estacional de la infección por astrovirus aunque ha sido documentado que la mayoría de las infecciones por astrovirus se presentan durante los meses de invierno en climas templados y durante la época lluviosa en climas tropicales. Aunque existe una alta incidencia durante los meses de invierno, es probable que, en climas tropicales, la temporada de lluvias crea condiciones lo cual incrementa las oportunidades de transmisión y propagación de este virus.

Algunos de los estudios que se han realizado sobre la edad de la infección por astrovirus, indican que el anticuerpo es adquirido antes de los cinco años de edad, otros estudios han visto la prevalencia de astrovirus entre niños menores de cinco años de edad quienes han sido divididos separándolos dentro de grupos de un año de edad ayudando a clarificar la cuestión de edad de distribución .

Nuestros datos obtenidos, demostraron la presencia de estos agentes en muestras fecales de niños donde las edades en las que

se observó la presencia de astrovirus fue de 1-22 meses en donde el grupo de edad más afectado por la infección de astrovirus fue de 7-9 meses de edad. No obstante, en cuanto al número pequeño de muestras positivas obtenidas, no es posible concluir de manera contundente acerca de la distribución de estos agentes en los niños menores de 5 años de edad en la población infantil mexicana.

Las manifestaciones clínicas más sobresalientes de la infección por astrovirus fueron la diarrea presentándose de 3 a 8 evacuaciones por día, vómito, temperatura mayor de 38 °C y deshidratación lo cual correlaciona con las manifestaciones clínicas reportadas por este virus, y a su vez no muestran ninguna diferencia significativa con las manifestaciones clínicas presentadas por otros agentes virales.

Por otro lado analizando los resultados obtenidos estadísticamente tanto de muestras positivas como negativas mediante la prueba Ji-Cuadrada ( $\chi^2$ ) se determinó si la edad y la temporada son eventos dependientes o independientes a la infección por astrovirus, en lo que respecta a la edad se concluye estadísticamente que la edad es un evento independiente a la infección por astrovirus ya que el  $\chi^2_{\text{Calc}}$  cae dentro de la región de aceptación, determinándose por lo tanto que a cualquier edad los niños menores de 5 años en este caso pueden presentar infección por astrovirus.

Mientras que con los datos ordenados por trimestre se concluye que la temporada es un evento independiente a la infección por astrovirus ya que el  $\chi^2$  de tablas es superior a la  $\chi^2_{\text{Calc}}$ . Lo cual nos indica que astrovirus no tiene una estacionalidad determinada pudiendo caer dentro de cualquier mes del año. Interesantemente, la distribución estacional de la infección por astrovirus es diferente de la que se observa para la diseminación de muchos patógenos por vía fecal-oral sin embargo esta es similar al patrón observado para rotavirus.

Analizando los resultados obtenidos para las características clínicas con el mismo estadígrafo de prueba se determinó que el número de evacuaciones, el vómito, la temperatura mayor de 38°C y la deshidratación eran eventos independientes a la infección por astrovirus.

Estos resultados nos confirman lo ya establecido en la literatura respecto a que no hay diferencia significativa entre la sintomatología por astrovirus y otros agentes virales.

Sin embargo muchas preguntas aún continúan con respecto a la epidemiología de astrovirus, por lo que se requieren más estudios epidemiológicos que contemplen también varios años de estudio, en diferentes ambientes para determinar la importancia de la enfermedad por astrovirus, en especial, el riesgo de enfermedad severa en ambientes hospitalarios y los diferentes serotipos en circulación.

La utilización de técnicas inmunoenzimáticas y de biología molecular como RT-PCR sería fundamental para el diagnóstico de este agente en heces; lo cual permitirá tener un conocimiento del papel etiológico de los AstVsH asociados a gastroenteritis.

Estas investigaciones son importantes para determinar si el desarrollo de una vacuna contra la diarrea por astrovirus deberá ser considerado una prioridad de salud pública.

## 10. CONCLUSIONES

En nuestro país la circulación de AstVsH no ha sido ampliamente estudiada y se tienen muy pocos datos sobre la frecuencia, estacionalidad y grupo de edad de este agente por lo que el objetivo general de este trabajo fue detectar la presencia de astrovirus en niños con diarrea aguda, provenientes de algunos estados de la República Mexicana, mediante un ensayo inmunoenzimático, para el diagnóstico de este agente.

Este estudio preliminar permitió determinar la presencia de astrovirus asociados a cuadros de diarrea aguda en la población infantil menor de 2 años, en donde el grupo de edad más afectado por la infección de astrovirus fue de 7-9 meses de edad.

Asimismo fue posible demostrar la circulación de estos agentes en algunos estados de la República Mexicana donde su clima es marcadamente extremo, además de observar que el mayor número de muestras positivas fueron del D. F.

Durante el periodo de estudio (Mar 99-May 01) es importante resaltar que los casos positivos a AstVsH se presentaron principalmente en los meses de octubre a marzo, misma estacionalidad que presenta la infección por rotavirus en nuestro país.

Las manifestaciones clínicas más sobresalientes de la infección por astrovirus fueron diarrea presentándose de 3 a 8 evacuaciones por día, vómito, temperatura mayor de 38 °C y deshidratación.

## 11. ANEXO 1

### FORMULAS ESTADÍSTICAS

$$\text{MEDIA: } \bar{X} = \frac{\sum X_1}{n}$$

NÚMERO DE MUESTRAS =  $n$

PRUEBA Ji-Cuadrada ( $\chi^2$ )

$$\chi^2_{\text{Calc}} = \frac{\sum O^2}{E_{ij}} - n$$

$$O^2 = O_{ij} - E_{ij}$$

GRADOS DE LIBERTAD:  $(C-1)(F-1)$

$C = \text{Columnas}$

$F = \text{Filas}$

NIVEL DE SIGNIFICANCIA :  $\alpha = 1\% = 0.01$

NÚMERO DE LAS FRECUENCIAS OBSERVADAS :  $O_{ij}$

NÚMERO DE LAS FRECUENCIAS ESPERADAS :  $E_{ij}$

## 12. REFERENCIAS

- 1.-Ruth F. Bishop, G. P. Davidson. **Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa from Children with Acute Non-Bacterial Gastroenteritis**, The Lancet, 1973; 8: 1281-1283.
- 2.-C. R. Madeley, B. P. Cosgrove. **28 nm Particles in Faeces in Infantile Gastroenteritis**, The Lancet, 1975; 6: 451-452
- 3.-Kurtz J.B., Lee T.W. **Human Astrovirus Serotypes**, Lancet , 1984, ii; 1405
- 4.-Nell R. Blacklow and Harry B. Greenberg. **Viral Gastroenteritis**, The New England J of Medicine, 1991; 325: 252,253,260.
- 5.-Maureen B. Taylor, Wilhelm O.K. , Grabow. **Propagation of Human Astrovirus in the PLC/PRF/5 Hepatoma Cell Line** , J. of Virological Methods, 1997; 67 : 13-18.
- 6.-Douglas K. Mitchell, Stephan S. M. **Virologic Features of an Astrovirus Diarrhea Outbreak in a Day Care Center Revealed by Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction** , The J. of Infectious Diseases, 1995; 172: 1437-1444.
- 7.-Christine L. Moe, James R. Allen. **Detection of Astrovirus in Pediatric Stool Samples by Immunoassay and RNA Probe** , J. of Clinical Microbiology, 1991; 29: 2390-2395.
- 8.-M. Lourdes Guerrero , MD, MS, Jaqueline S. , Noel. **A Prospective Study of Astrovirus Diarrhea of Infancy in Mexico City**, Pediatric Infect Dis J. , 1998; 17: 723-727.
- 9.-John E. Herrmann, Nancy A. Nowak. **Diagnosis of Astrovirus Gastroenteritis by Antigen Detection with Monoclonal Antibodies**, The J. of Infectious Diseases, 1990, 161: 226-229.

- 10.-Suzanne M. Matsui, Jungsuh p. Kim , Harry B. **Cloning and Characterization of Astrovirus Immunoreactive Epitopes** , J. of Virology , 1993, 67: 17121-1715.
- 11.-John E. Herrmann, Richard W. Hudson. **Antigenic Characterization of Cell-Cultivated Astrovirus Serotypes and Development of Astrovirus-Specific Monoclonal Antibodies**, The J. Infectious Diseases 1988, 158: 182-185.
- 12.-Jose R. Cruz, Alfred V. Bartlett. **Astrovirus-Associated Diarrhea among Guatemalan Ambulatory Rural Children**, J. of Microbiology, 1992; 30: 1140-1144.
- 13.-Manual DAKO para diagnóstico IDEIA para Astrovirus, 1995.
- 14.-Stephan s. Monroe, Sarah E. Stine. **Temporal Synthesis of Proteins and RNAs during Human Astrovirus Infection of Cultured Cells**, J. of Virology 1991; 65: 641-648.
- 15.-Stephan S. Monroe, Baoming Jiang, Sarah E. Stine, Marion Koopmans. **Subgenomic RNA Sequence of Human Astrovirus Supports Classification of Astroviridae as a New Family of RNA Viruses**. J. of Virology, 1993; 67: 1611-1614.
- 16.-Utagawa ET, Nishizawa S., Sekine S. , et al. **Astrovirus as a Cause of Gastroenteritis in Japan** . J. Clin Microbiol, 1994; 32: 1841-1845.
- 17.-Judy F. Lew, Christine L., Stephan S. Monroe, et al. **Astrovirus and Adenovirus Associated with Diarrhea in Children in Day Care Settings**. The Journal of Infectious Diseases, 1991,164:673-678.
- 18.-D.D. Griffin, M. Mendez-Toss y col. **Prevalencia de Astrovirus y Adenovirus de Serotipo 40 y 41 en Niños Mexicanos con Gastroenteritis** Revista Biomédica, 1998, pág. 135.

19.-Romero Guido , P; Méndez,M; Munguia, M. E. Depto. de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología-UNAM, Revista Biomédica, 1998.págs. 102.

20.-John E. Herrmann, Ph. D. David N. Taylor . **Astrovirus as a Cause of Gastroenteritis in Children, The New England.** J. of Medicine, 1991;324:1757-1760.

21.-F.Bon, P. Fascia, M. Dauvergne, D. Tenenbaum. **Prevalence of Group A Rotavirus, Human Calicivirus, Astrovirus, y Adenovirus Type 40 y 41 Infections among Children with Acute Gastroenteritis in Dijon, France.** J of Clinical Microbiology , 1999;37:3055-3058.

22.-Rosa I. Cama, Umesh D. Parashar. **Enteropathogens and Other Factors Associated with Acute Watery Diarrhea in Lima, Peru,** The Journal of Infectious Diseases 1999; 179:1134-1144.

23.-Jacqueline S. Noel, Terry W. Lee. **Typing of Human Astroviruses from Clinical Isolates by Enzyme Immunoassay and Nucleotide Sequencing,** Journal of Clinical Microbiology, 1995;33;797-801.

24.-Judy F. Lew, MD. Roger I. Glass et col. **Six-year Retrospective Surveillance of Gastroenteritis Viruses Identified at Ten Electron Microscopy Centers in the United States and Canada.** *Pediatr Infect Dis J.* 1990; 9:709-714

25.-Marie Riepenhoff-Talty, Linda J. Saif . **Potential Spectrum of Etiological Agents of Viral Enteritis in Hospitalized Infants.** *J of Clinical Microbiology* 1983; 17: 352-356.

26.-Sita Shastri, Anne Martin D. **Prevalence of Astroviruses in a Children's Hospital.** *J of Clinical Microbiology,* 1998; 36: 2571-2574.



27.-Tom O. Jonassen, Elisabeth Kjeldsberg. **Detection of Human Astrovirus Serotype 1 by the Polymerase Chain Reaction.** J. of Virological Methods, 1993; 44: 83-88.

28.-T.W. Lee, J. B. Kurtz **Prevalence of Human Astrovirus Serotypes in the Oxford region 1976-92, with Evidence for Two New Serotypes.** Epidemiology and Infection, 1994; 112: 187-193.

29.-M.M. Willcocks, T.D.K. Brown, **The Complete Sequence of a Human Astrovirus.** J of General Virology, 1994; 75: 1785-1788

30.-Tom O. Jonassen, Chistine Monceyron. **Detection of all Serotypes of Human Astrovirus by the Polymerase Chain Reaction.** J of Virological Methods, 1995; 52: 327-334.

31.-Tatsunori Sakamoto, Hideo Negishi et al., **Molecular Epidemiology of Astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction With Serotype-Specific Primers (1 to 8).** J of Medical Virology 2000; 61: 326-331

32.-O. Traoré, G. Belliot . **RT-PCR Identification and Typing of Astroviruses and Norwalk-like Viruses in Hospitalized Patients With Gastroenteritis: Evidence of Nosocomial Infections.** J of Clinical Virology, 2000; 17: 151-158.

33.-Yvonne Maldonado, Michel Cantwell. **Population-Based Prevalence of Symptomatic and Asymptomatic Astrovirus Infection in Rural Mayan Infants.** The J. of Infectious Diseases, 1998; 178: 334-339.

34.-Aldo Gaggero, Miguel O'ryan, J. N. Noel . **Prevalence of Astrovirus Infection among Chilean Children with Acute Gastroenteritis.** J of Clinical Microbiology, 1998; 36: 3691-3693.

35.-Isao Oishi, Kenji Yamazaki. **A Large Outbreak of Acute Gastroenteritis Associated with Astrovirus among Students and Teachers in Osaka, Japan.** The J. of Infectious Diseases, 1994; 170: 439-443.

36.-M. M. Willcocks and M. J. Carter. **The 3' Terminal Sequence of a Human Astrovirus.** Archives of Virology, 1992; 124: 279-289.

37.-Palombo E. A. , R. F. Bishop. **Annual Incidence, Serotype Distribution and Genetic Diversity of Human Astrovirus Isolates from Hospitalized Children in Melbourne Australia.** J Clin. Microbiol. 1996; 34: 1750-1753.

38.-Huseyin Mustafa, E. A. Palombo. **Epidemiology of Astrovirus Infection in Young Children Hospitalized with Acute Gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a Period of Four Consecutive Years, 1995 to 1998.** . J Clin. Microbiol. 2000; 38: 1058-1062.

39.-Jolan E. W., Douglas K. M. **Molecular Epidemiology of Human Astrovirus Diarrhea among Children from a Periurban Community of Mexico City.** The J. of Infectious Diseases 2001; 183: 681-686.

40.-Hall G.A. **Comparative Pathology of Infection by Novel Diarrhoea Viruses.** In: Bock G. Whelan J. eds. Novel diarrhoea viruses. Ciba foundation symposium 128. Chichester: Wiley, 1987; 202-207.

41.-Alesio Bereciartu, Karin Bok. **Identification of Viral Agents Causing Gastroenteritis among Children in Buenos Aires, Argentina.** J of Clinical Virology, 2002; 17: 151-158.

42.-C.J. McIve, E. A. Palombo, J. C. Doultree. **Detection of Astrovirus Gastroenteritis in Children .** J. of Virological Methods, 2000; 84: 99-105.

43.-Martha Méndez-Toss, Pedro Romero-Guido. **Molecular Analysis of a Serotype 8 Human Astrovirus Genome.** J of General Virology, 2000; 81: 2891-2897.

44.-O. Legeay, Y. Caudrelier. **Simplified Procedure for Detection of Enteric Pathogenic Viruses in Shellfish by RT-PCR.** J. of Virological Methods, 2000; 90: 1-14.

45.-G. M. Belliot, R. L. Fankhauser, S. S. Monroe. **Characterization of Norwalk-like Viruses and Astroviruses by Liquid Hybridization Assay.** J. of Virological Methods, 2001; 91: 119-130.

46.-Ute Geigenmüller, Teri Chew. **Processing of Nonstructural Protein 1a of Human Astrovirus.** J. of Virology 2002; 76: 2003-2008.

47.-Suzanne M. Matsui and Harry B. Greenberg. **Astroviruses.** Fields Virology , Third Edition, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1996; 1: 811-822.

48.-J.B. Kurtz and T. W. Lee **Astroviruses: Human and Animal.** Virology & Public Health Laboratory, Oxford U.K. 1987; 92-103.

49.-Felipe Mota H. **Hidratación Oral y Diarreas.** Editorial McGraw-Hill Interamericana, México D. F. 2000; pág.4-7, 37,143-145.

50.-Hortensia Reyes ,Patricia Tomé y col. **La Mortalidad por Enfermedad Diarreica en México : ¿ problema de acceso o de calidad de atención?** Salud Pública de México 1998; 40: 316-323

51.-Ma. José Marques de Cantú. **Probabilidad y Estadística,** Para Ciencias Químico-Biológicas. Edit. McGRAW-HILL México D. F. 1990,184-186,326, 344.