



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

*Detección de Rotavirus en Pacientes
Lactantes con Diarrea Aguda
por el Método de Elisa*

TRABAJO RECEPCIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTA:

SILVIA LOPEZ RODRIGUEZ

ASESOR
DR. HECTOR GERARDO HERNANDEZ RODRIGUEZ

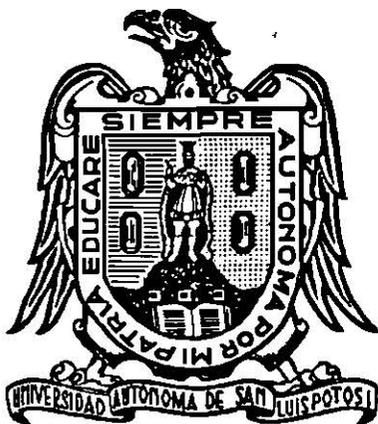
SAN LUIS POTOSI, S. L. P. 1996



T
RJ456
.D5
L6
c.1



1080076917



Universidad Autónoma de San Luis Potosí

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

*Detección de Rotavirus en Pacientes
Lactantes con Diarrea Aguda
por el Método de Elisa*

TRABAJO RECEPCIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

SILVIA LOPEZ RODRIGUEZ

Asesor

DR. HECTOR GERARDO HERNANDEZ RODRIGUEZ

San Luis Potosí, S.L.P.

1996

T
R. 156
D.S.
L6



DEDICATORIA

A la memoria de mi querido hermano Fernando López Rodríguez, médico pediatra neonatólogo.

Quien por sus valiosos consejos y colaborador en la realización de este trabajo, ausente en lo físico pero siempre presente en lo más profundo de mis sentimientos.

*La experiencia sin teoría es ciega. Pero
la técnica sin experiencia es un mero
juego intelectual.*

Kant.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi gratitud a la escuela y maestros ya que con sus conocimientos cimentaron las bases de mi formación.

Agradecimiento Especial

Mi gratitud al Dr. Héctor Gerardo Hernández Rodríguez, profesor investigador de la Facultad de Medicina de la UASLP. Por su tiempo, experiencia y acertadas sugerencias.

Se extiende mi agradecimiento a la QFB Ampara Gómez Chávez y al personal del laboratorio clínico del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto por las facilidades otorgadas para el estudio.

También agradecer la paciencia de mi familia y amigos. Ya que me impulsaron para seguir adelante.

INDICE

	Pág
Resumen	
I.- Introducción	1
a) Antecedentes	1
b) Morfología	3
c) Composición y Biología Molecular de los Rotavirus	4
d) Clasificación	6
e) Patología	6
f) Prevención	10
g) Manifestaciones Clínicas	11
h) Tratamiento	11
i) Incidencia	12
j) Variaciones Estacionales	13
k) Inmunización	13
l) Otras Técnicas para Detección de los Rotavirus	14
m) Otros Grupos de Virus Causantes de Diarrea	14
II.- Objetivos	16
III.- Metodología	17
IV.- Técnicas Experimentales	28
a) Fundamento de la Técnica	28
b) Técnica de Elisa	29
c) Método Directo	29
d) Método Indirecto	30
e) Discusión de las Técnicas de Elisa	32
f) Método utilizado en el Trabajo	32
g) Realización de la Técnica de Elisa para la Determinación del Rotavirus	36

	Pág
V.- Análisis de Resultados	45
Comparación de Patogenicidad Bacteriana con el Grado de Positividad de Rotavirus a la Técnica de Elisa. Cuadro 1	45
Cuadro 1-A	46
Gráfica 1	47
Resultados del Cuadro No. 1 y 1-A	48
Comparación con y sin Alimentación de Seno Materno y el Grado de Positividad de Elisa al Rotavirus. Cuadro No. 2	49
Gráfica No. 2	50
Resultados del Cuadro No. 2	51
Comparación de Pacientes con Diarrea Bacteriana o Viral con Sintomatología de Vómito. Cuadro No. 3	52
Gráfica No. 3	53
Resultados del Cuadro No. 3	54
Comparación de Temperaturas y el Grado de Positividad del Rotavirus a la Técnica de Elisa. Cuadro No. 4	55
Gráfica No. 4	56
Resultados del Cuadro No. 4	57
Comparación de Temperaturas cuando hay Rotavirus Positivos. Cuadro No. 5	58
Comparación de Temperaturas cuando hay Rotavirus Negativos. Cuadro No. 6	59
Resultados de los Cuadros No. 5 y No. 6	60
Comparación de Sintomatología de Neumonía, Rinitis y ambos síntomas con relación al Grado de Positividad de Técnica de Elisa al Rotavirus. Cuadro No. 7	61
Gráfica No.5	62
Resultados del Cuadro No. 7	63
Sintomatología de Deshidratación. Cuadro No. 8	64
Resultados del Cuadro No. 8	65
Incidencia de Rotavirus en las Estaciones del Año. Cuadro No. 9	66
Resultados del Cuadro No. 9	67
Frecuencia en las Edades de los Niños que dieron Rotavirus Positivo para la Técnica de Elisa. Cuadro No. 10	68
Resultados del Cuadro No. 10	69
VI.- Conclusiones	70
VII.- Glosario de Términos	73
VIII.- Bibliografía	75

RESUMEN

La detección del Rotavirus es importante, porque es un agente patógeno que ataca principalmente a los niños en edad temprana causando cuadros diarreicos, éstos ocupan el segundo lugar a nivel mundial como causa de enfermedad y de muerte. Es importante que se tenga en consideración que este virus puede ser agente causal de gastroenteritis.

En este trabajo se hace un estudio en lactantes menores de dos años con cuadros diarreicos, para diferenciar si la infección es producida por bacterias o por Rotavirus. Se hicieron estudios de coprocultivo para el caso de bacterias y para el caso de Rotavirus se realizó un método inmunoenzimático.

Esta investigación se llevó a cabo en el Hospital Central Ignacio Morones Prieto de la ciudad de San Luis Potosí, en 95 niños. Sus edades oscilaron de 1 a 24 meses, de los cuales 64 fueron hospitalizados y 31 fueron pacientes ambulatorios.

La muestra biológica utilizada fue materia fecal (sin conservador) desde que se estableció su diagnóstico diarreico. La muestra se procesó para la determinación de bacterias patógenas por coprocultivo para la Shigella, Salmonella, Proteus, Escherichia coli enteropatógena y para la detección del Rotavirus se aplicó el método Rotazyme de laboratorios Abbot, el cual es un método inmunoenzimático de las técnicas de ELISA, donde se utiliza para la medición un espectrofotómetro de doble longitud de onda Quantum I.

Además se comparó la presencia de vómito y deshidratación; tipo de alimentación, ya sea por biberón o seno materno a los lactantes; la presencia de fiebre, tomando como referencia la temperatura corporal, así como síntomas respiratorios (neumonía, rinitis) y la influencia de las estaciones del año en los casos de diarrea.

El vómito se presentó más frecuentemente en los casos con Rotavirus positivo que en caso de bacteria positivo. La temperatura corporal se valoró desde 37.5° a 40° C. En el caso de infección por bacterias la temperatura corporal promedio fue de 38.2° C; para el caso de Rotavirus positivo el promedio fue 38.6°C. Se observaron temperaturas más altas en el caso de Rotavirus positivo que por causa bacteriana.

En el tipo de alimentación al lactante ya sea por biberón o seno materno y su efecto en los cuadros diarreicos, el 56 % de los niños que fueron alimentados con seno materno dieron resultados negativos para el Rotavirus y también para las bacterias.

La deshidratación se presentó tanto en los cuadros diarreicos por bacterias como por el Rotavirus. En los síntomas respiratorios fue más frecuente la rinitis en los casos de Rotavirus positivo, que en los casos positivo a bacterias.

Se observó más frecuencia de diarrea por bacterias en otoño y en verano más diarrea por Rotavirus.

Por lo anterior se concluye que hay mayor frecuencia de síntomas como rinitis, vómito, temperaturas corporales más altas en los casos de diarrea por Rotavirus que por bacterias y la alimentación del niño por seno materno tiende a protegerlo de los cuadros diarreicos.

Dada la importancia de las diarreas en los niños menores de dos años y la repercusión que en ellos representa, se requiere de estudios más amplios para evaluar el diagnóstico enteral y así poder dar un tratamiento adecuado para el agente patógeno causal de la diarrea.

I.- INTRODUCCION

A.- ANTECEDENTES

La importancia de las diarreas agudas en la infancia es porque está relacionada con la alta morbilidad y mortalidad durante la edad pediátrica; las diarreas ocupan el segundo lugar a nivel mundial como causa de enfermedad y de muerte. El grupo más afectado es el de los lactantes, seguido por los preescolares y los escolares (1).

Solamente en los últimos 14 años se han confirmado las sospechas que muchas de las diarreas en los niños son de origen viral. Desde 1945 se sabía que era posible inducir diarrea en voluntarios con heces de pacientes con enteritis, previamente filtradas para eliminar las bacterias (2).

Posteriormente se demostró que el agente en estos filtrados no podía ser una toxina pues era posible pasarlos sucesivamente por lo menos siete veces de un voluntario a otro (3).

Los numerosos intentos subsiguientes, realizados a lo largo de veinte años, para aislar algún virus que causara diarrea no tuvieron éxito alguno; la falta de éxito en estos intentos se debió probablemente a que en todos ellos se trataba de identificar los posibles virus por su efecto de daño celular en cultivos de células. La identificación exitosa de virus causantes de diarrea no se logró hasta 1972 cuando se observaron directamente al microscopio electrónico en biopsias o en las heces, ya que todos estos virus son muy difíciles de crecer en cultivos de células sin una previa y laboriosa adaptación.

La microscopía electrónica directa es desde entonces la forma general que permite detectar los diversos virus que han sido asociados en los últimos años a una diarrea.

Actualmente no existe un número suficiente de estudios para dar una estimación general de la frecuencia en que se encuentra cada uno de los virus en los casos de diarrea. Además la proporción en que se encuentran ha variado de acuerdo a la región y la temporada. Sólo es posible afirmar que el agente viral de diarrea más común en los niños es el Rotavirus (1).

El concepto de diarrea fue expresado por Hipócrates (460-377 a.C.) *"Evacuaciones que son muy acuosas o blancas o verdes, o muy rojas o espumosas, son todas malas. Es también mala cuando la defecación es escasa y viscosa, o blanca o verdosa, o suave; pero todavía más mortales parecen las que son negras o grasosas o líquidas o muy verdosas o fétidas"*, este concepto prevalece hoy día (4).

Al referirse a la diarrea como síntoma puede decirse que es el aumento súbito en el número de las evacuaciones, acompañadas de una reducción de su consistencia, así como de un incremento anormal en las heces de sangre, moco o pus (4).

Científicos australianos (Bishop y colaboradores) con la ayuda del microscopio electrónico observaron la mucosa duodenal de nueve niños con diarrea aguda no bacteriana; las células epiteliales de la mucosa duodenal observadas mostraron anomalías histológicas con disminución de la absorción de los disacáridos. Histología similar se había observado en adultos voluntarios con gastroenteritis, que habían ingerido filtrado de excremento que contenían partículas virales. (6-8, 13).

En 1969 Mebus y colaboradores reportaron la producción experimental de diarrea en terneras privadas de calostro, inoculándolas por vía oral con materia fecal libre de bacterias. Flewett observó que partículas virales similares habían sido descubiertas en heces de niños en Nebraska y Berkshire (5, 9, 10).

El Rotavirus del humano es morfológicamente similar y comparte ciertos antígenos con el Rotavirus de animales. Empleando pruebas de fijación de complemento se ha visto que se encuentra claramente relacionado con cuatro virus de Nebraska que produce la diarrea de las terneras (NCDV), el virus que produce diarrea en ratones lactantes (EDIM), el virus de simios (SA-II) y el agente Offal (O) de carneros y terneras.

B.- MORFOLOGIA

El nombre de estos virus deriva del latín "*Rota*" (rueda) y adaptado oficialmente para este género fue sugerido originalmente por Flewett. Ya que al observar al microscopio electrónico preparaciones por tinción negativa, las partículas aparecen conformadas por dos capas y las subunidades de la capa interna se aprecian como rayos que sostienen un delgado aro constituido por la capa externa. Esta capa externa se pierde fácilmente, y en las preparaciones obtenidas de las heces de niños con diarrea, se observa una alta proporción de partículas "rugosas" con las subunidades de la capa interna descubiertas. Su genoma se forma de 11 segmentos de ARN de doble cadena (5, 9, 14, 16, 17) (Fig. No. 1).

El diámetro de los viriones es de 60 a 70 nm. Por su forma y composición los Rotavirus, han sido clasificados como un género aparte dentro de la familia *Reoviridae* en la que se encuentran otros dos géneros importantes de virus de vertebrados: los Reovirus y los Orbivirus.

Con el microscopio electrónico se pueden distinguir en heces diarreicas dos tipos de partículas redondas: viriones "lisos" o completos de doble cápside, de 70 nm de diámetro y partículas "rugosas" o incompletas de cápside simple, de 60 a 65 nm de diámetro.

Los Rotavirus son muy resistentes a altas temperaturas, pH ácido, solventes de lípidos y detergentes no iónicos. El cloro es relativamente ineficaz como inactivador de los Rotavirus, mientras que el etanol al 70 % o más es muy eficaz.

Originalmente se creyó que todos los Rotavirus conocidos poseían un antígeno común de grupo, o sea cualquier Rotavirus examinado reaccionaba con los anticuerpos contra otros Rotavirus. Sin embargo en los últimos años se ha acumulado evidencia que indica que varias cepas de Rotavirus que infectan humanos y también animales, a veces pueden no compartir este antígeno común. Estos Rotavirus dan por lo tanto, reacción negativa con los diagnósticos basados en la detección del antígeno, comúnmente empleados (15).

C.- COMPOSICION Y BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS ROTAVIRUS

Los Rotavirus están conformados por cinco clases de proteínas, dos de ellas (VP3 y VP7) conforman la capa externa y tienen un papel fundamental en la infección (*Fig. 1*) (17- 20).

Una de ellas, VP7, parece ser responsable de la adsorción del virus a la célula; la otra, VP3, funcionaría en la penetración del virus y requiere para su función ser activada por un corte específico con tripsina. Una vez en el interior de la célula, los 11 genes del virus, constituidos por 11 moléculas de tRNA, se activan produciendo las cinco clases de proteínas que conforman el virus y otras seis que son necesarias para su producción, finalmente las 11 moléculas de tRNA y las distintas proteínas se van ensamblando, en un proceso complicado y poco entendido, cargando las células de partículas virales hasta destruirlas. Estas células desprenden nuevos virus que infectarán otras células de tejido provocando daño.

Los Rotavirus se pueden distinguir por su análisis electroforético, para ver la conformación de su genoma. Por electroforesis en gel de poliacrilamida los códigos son asignados como sigue: los polipéptidos de la capa interna VP1, VP2 y VP6 fueron asignados a segmentos 1, 2 y 6, la mayor parte de los polipéptidos de la capa externa VP3 y VP7 fueron asignados a segmentos 4 y 9. Segmentos 5, 7 y 8 codifican para los polipéptidos no estructurales con pesos moleculares de 53 000, 34000 y de 35 000, el segmento 10 codifica para un polipéptido con un peso molecular de 20 000 el cual es el precursor de un polipéptido no estructural con un peso molecular de 29 000 y el segmento 11 codifica para un polipéptido con un peso molecular de 26 000 el cual puede ser el precursor de un polipéptido menor VP9 de la capa externa.

MORFOLOGIA DEL ROTAVIRUS ASIGNAMIENTOS DE LA CODIFICACION DEL GENE

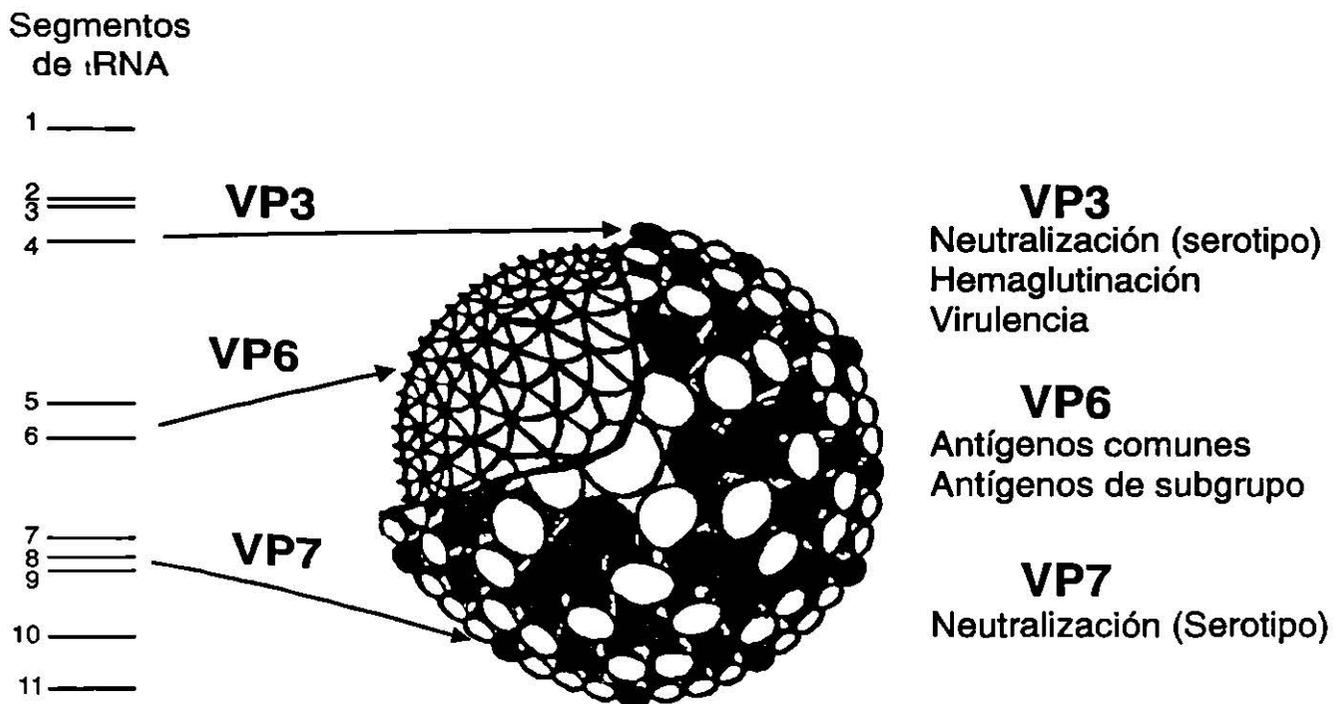


Figura No. 1

D.- CLASIFICACION

Los Rotavirus se clasifican en función a pruebas inmunológicas. Si responden a pruebas de fijación de complemento, Elisa e inmunoadherencia, se les divide en subgrupos, la especificidad de codificación fue encontrada en el segmento 6 del virus. Los subgrupos se designan con números romanos, ejemplo: I, II, etc.

Si se valoran anticuerpos neutralizantes, se les clasifica en serotipos, la capacidad de esta respuesta fue encontrada en el noveno segmento del virus. Se designan con números arábigos, ejemplo: 1,2,3,4.

E.- PATOLOGIA

Los Rotavirus son transmitidos por la ruta fecal-oral y después de un período de incubación de 24 a 48 horas producen una diarrea abundante. Durante este tiempo el niño excreta alrededor de diez millones de partículas virales por gramo de heces.

La diarrea por Rotavirus estudiada en el lechón infectado es el resultado de la infección en el yeyuno, lugar en el que el virus se multiplica destruyendo los enterocitos (25-27).

Biopsias realizadas en niños enfermos indican alteraciones funcionales de las células epiteliales que cubren las vellosidades del intestino delgado. El transporte de sodio acoplado a glucosa es dañado y por lo tanto la absorción de agua es disminuida, también se encuentran disminuidas la absorción de disacáridos (maltosa, sacarosa y lactosa) (Fig. 2).

Digestión Luminal.- La digestión luminal de carbohidratos y proteínas iniciada por acción del jugo gástrico y de las enzimas pancreáticas finaliza en el borde en cepillo de la superficie del enterocito, donde se completa la digestión de fracciones proteicas y de disacáridos por acción de las alfa glucosidasas, beta galactosidasas y hexopeptidasas, para dar lugar a monosacáridos y aminoácidos como productos finales de la digestión.

La estructura cripta-vellosidad se puede considerar como la unidad funcional del intestino delgado. Se encuentra formada por un epitelio de células altamente especializadas, tejido cojuntivo y células inmunocompetentes. Las funciones de esta estructura juegan un papel determinante en los fenómenos de nutrición del organismo, ya que de manera simultánea se realiza la "digestión terminal" y la absorción de los productos terminales. Esta estructura multicelular se encuentra en transformación constante, pues tiene un recambio celular acelerado y sufre modificaciones funcionales, que pueden considerarse de "maduración", durante la emigración de los enterocitos del fondo de la cripta a la punta de la vellosidad.

En un lapso aproximado de 72 hrs., células indiferenciadas se transforman en células absortivas capaces de producir una gran variedad de enzimas; simultáneamente se modifica el número y la bioquímica de los receptores presentes en la membrana apical, lo que hace que las posibilidades de interacción con proteínas exógenas (alimentarias, hormonas, toxinas, etc.) sean totalmente diferentes para las células crípticas que para las células absortivas maduras.

Las células columnares, caliciformes y enterocromafines presentan un proceso de maduración y diferenciación durante su emigración de la cripta a la vellosidad. Lo que se produce en el lapso de 3-4 días, las células Paneth no llevan a cabo este proceso de maduración-emigración y permanecen en la base de las criptas.

Todas estas células de la empalizada cripta-vellosidad tienen un origen común; la célula columnar indiferenciada de la base de la cripta que funciona como una célula madre que tiene la capacidad de originar a todos los tipos de enterocitos mencionados (70).

En la cara luminal de la membrana apical existe una estructura fibrilar de glucoproteínas y agua denominada glucocáliz, en el que se embebe el líquido intestinal, se realiza la digestión terminal de carbohidratos y proteínas por acción de las enzimas presentes en el borde en cepillo. Las disacaridasas actúan sobre la lactosa, sacarosa, maltosa e isomaltosa, dando como productos finales glucosa, galactosa y fructosa. Las peptidasas del borde en cepillo completan la digestión de diversos péptidos dando lugar a aminoácidos.

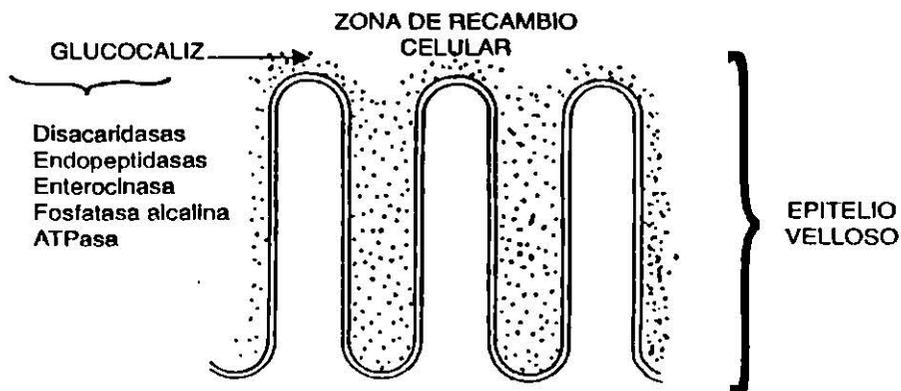
Después de terminada la digestión de los alimentos, los nutrimentos liberados deben ser absorbidos, es decir transportados desde la luz del intestino hasta la sangre, como paso previo a su metabolismo. La membrana del enterocito regula ese transporte mediante mecanismos de difusión pasiva o facilitada y de transporte activo. El agua no se absorbe si no se absorben solutos (70).

Como el Rotavirus se multiplica destruyendo los enterocitos el mal funcionamiento de éstos se explica por el desprendimiento y aplastamiento de las células epiteliales de las vellosidades que producen un acortamiento y desnudamiento de estas últimas, se puede observar la cisterna del retículo endoplásmico fuertemente dilatada (24, 28, 29).

Por lo anterior se produce la diarrea y desnutrición en la infección por Rotavirus.

PATOLOGIA EN LA VELLOSIDAD INTESTINAL POR LO QUE SE VE AFECTADA LA ABSORCION DE SOLUTOS

VELLOSIDAD NORMAL INTESTINAL



VELLOSIDAD INFECTADA



Figura No. 2

F.- PREVENCIÓN

Dentro de las medidas de prevención para la infección por el Rotavirus está la alimentación al seno materno que es una práctica tradicional de alimentación, ya que al suministrar al recién nacido el calostro previene la enfermedad diarreica neonatal. Estudios en animales han demostrado que el calostro usualmente contiene anticuerpos específicos del Rotavirus y previene la enfermedad por Rotavirus en neonatos (30, 33).

También se ha conocido por muchos años que los niños alimentados de seno materno son menos propensos para contraer la gastroenteritis que los niños alimentados de biberón. Se han citado datos demostrativos que niños alimentados por seno materno en cuneros o guarderías endémicas para Rotavirus eran menos propensos a infectarse, y si se enfermaban era menor la infección y excretaban menos virus que los alimentados por biberón (32).

El calostro humano y la leche humana son capaces de neutralizar al Rotavirus *in vitro* (34, 35).

Los anticuerpos específicos al Rotavirus están presentes en leche y calostro. Datos preliminares han demostrado que la IgM sérica es específica en la respuesta primaria a la infección, seguida de IgG. Un grupo demostró este anticuerpo específico al Rotavirus, que está presente en las heces de los niños alimentados al seno materno.

Los niveles de IgA específicas para el Rotavirus en leche están elevados inmediatamente en el posparto y caen al quinto día, como lo hacen los niveles de IgG específicas para el Rotavirus, el anticuerpo a Rotavirus en leche humana se ha detectado por tanto tiempo como 9 meses de lactación (36, 37).

G.- MANIFESTACIONES CLINICAS

Por la infección de Rotavirus son: inicio súbito de diarrea, fiebre, vómito con deshidratación en 24 a 48 hrs, se presentan evacuaciones líquidas, las cuales ocasionalmente contienen moco; éstas persisten por cuatro a cinco días. El paciente mejora en forma progresiva y en 10 a 14 días se mejora por completo, algunos niños cursan con diarrea crónica como consecuencia de deficiencia de disacáridos; puede cursar asociado a un cuadro de vías respiratorias superiores o inferiores. La diarrea por causa de Rotavirus la asocian con 20 a 60 % de los casos que ameritan hospitalización (38, 39).

H.- TRATAMIENTO

En una diarrea con deshidratación severa y una diarrea en un lactante menor de 3 meses, obligan a observar una actitud vigilante y a indicar hospitalización ante la menor duda. El objetivo del tratamiento consiste en asegurar rápidamente la corrección de la depresión hidroelectrolítica y mantener un estado nutricional correcto.

Tratamiento de hidratación por vía oral.- La aparición y la utilización muy extendida de las soluciones de rehidratación, ampliamente proporcionadas por las campañas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), constituyen uno de los progresos terapéuticos más importantes a escala mundial sobre la morbilidad y la mortalidad de las diarreas agudas infantiles.

Las bases fisiopatológicas de la eficacia de estas soluciones se basan esencialmente en la capacidad residual de absorción del intestino que resulta suficiente para restablecer el equilibrio hidroelectrolítico, parcialmente gracias al transporte asociado glucosa-alanina-sodio.

La Sociedad de Gastroenterología de Pediatría Europea aconseja para los países templados: 60 mmol/L de Na, 74-111-mmol/L de glucosa, 20 mmol/L de K, 10 mmol/L de citratos y una osmolaridad de 200-250 mOsm/L.

El aporte de glucosa está limitado por la osmolaridad de la solución, idealmente inferior a 300 mOsm/L. La utilización de soluciones que aporten menos de 40 mmol/L de sodio puede conducir a una hiponatremia.

I.- INCIDENCIA

La gastroenteritis por Rotavirus es generalmente una enfermedad de recién nacidos y menores de cinco años y tiene una distribución mundial. La frecuencia de infecciones por Rotavirus va del 20 hasta el 50 % de los casos de gastroenteritis y el porcentaje más alto se encuentra entre los grupos de niños de 6 a 24 meses, con un pico de incidencia de los 9 meses a los 12 meses (1, 40, 41).

Los datos de estudios obtenidos en poblaciones abiertas son muy escasas y de acuerdo con la información en diferentes partes del mundo, la frecuencia de Rotavirus en comunidades que presentan casos de diarrea es de aproximadamente 10 a 25 %. Resultados similares se han encontrado en poblaciones de la República Mexicana (42, 43).

Es común la infección generalmente leve o asintomática en contacto con los niños de los hermanos mayores y los adultos que están en contacto con los niños infectados por Rotavirus.

Se han notificado brotes esporádicos de diarrea grave causada por Rotavirus en adultos y en ancianos que se encontraban hospitalizados. En estos pacientes la gastroenteritis puede ser signo de disminución de la inmunidad (1).

Es posible que los adultos actúen como reservorios de la infección y que los Rotavirus circulen en la comunidad sin producir síntomas. Investigaciones recientes señalan que los individuos que han sufrido infecciones con un serotipo determinado no quedan protegidos contra otro serotipo.

J.- VARIACIONES ESTACIONALES

La distribución estacionaria en los países desarrollados con clima templado presenta un pico característico durante los meses más fríos. En Washington, durante el mes de enero, el 71 % de los niños afectados de gastroenteritis excretaron Rotavirus. En Japón el 79 % de niños afectados de gastroenteritis fue de diciembre a marzo. La infección se observa todo el año en Sudáfrica; durante el verano en Taiwán; durante las lluvias en Etiopía; todo el año en los climas tropicales con un pequeño pico en los meses más fríos. La influencia de la temperatura y de la humedad relativa ha sido estudiada en Japón, la infección aparecía bruscamente cuando una temperatura inferior a 5° C se prolongaba durante más de 10 días consecutivos (44, 45).

K.- INMUNIZACION

Basados en los reportes sobre la elevada morbilidad y la posible alta mortalidad de casos con gastroenteritis por Rotavirus, especialmente en países en proceso de desarrollo, existe gran interés en producir una vacuna.

El desarrollo de una vacuna para el hombre incluye el encontrar una cepa atenuada de Rotavirus que desarrolle anticuerpos tanto de tipo entérico (IgA) secretoria como en suero (IgG) después de su administración.

Se está tratando de solucionar el problema de la dificultad en el cultivo del Rotavirus humano empleando un Rotavirus heterólogo que proporcione protección cruzada contra la infección por Rotavirus humano. En Finlandia se ha producido una vacuna oral con una cepa de Rotavirus de bovino vivo para evaluar su inmunogenicidad en el humano: los resultados obtenidos son alentadores (49-51).

El desarrollo de programas de vacunación deberá plantearse después de conocer mejor la epidemiología de los Rotavirus y las diferencias geográficas de los diferentes subtipos.

L.- TECNICAS PARA DETECCION DE LOS ROTAVIRUS.

Microscopía electrónica, Inmunoelectroforesis, Fijación de Complemento, Inmunofluorescencia, Radioinmunoanálisis.

M.- OTROS GRUPOS DE VIRUS CAUSANTES DE DIARREA

Coronavirus.- A pesar de estar bien comprobado que los coronavirus producen diarreas severas en los animales, hasta ahora no ha sido posible demostrar la existencia de cepas claramente patógenas en humanos.

Adenovirus.- Sólo los serotipos 40 y 41 pueden causar diarrea. La mayoría de los otros producen sintomatología respiratoria, pero, como aún en estos casos pueden ser excretados en las heces, para conocer la epidemiología de los serotipos 40 y 41 se deben realizar además de la microscopía, técnicas relativamente más difíciles, que permitan determinar el serotipo del adenovirus observado. Los reactivos necesarios para esta tipificación son aún difíciles de obtener (1).

Virus Fecales Pequeños.- El examen al microscopio electrónico de las heces de niños con diarrea ha permitido observar una serie de virus más o menos redondos con diámetros de 20 a 40 nm. En base a la estructura de estas partículas a veces es muy difícil de observar, se ha propuesto dividirlo en dos grupos principales: estructurados y no estructurados. Entre los virus estructurados se encuentran los grupos que recibieron mayor atención como Calicivirus, Astrovirus y Norwalk.

Sin embargo, aunque existe evidencia clara que demuestra la infección de niños por estos tres virus, midiendo la respuesta inmune, sólo los virus del grupo Norwalk ha sido implicado como una causa importante de gastroenteritis en humanos.

Los virus del grupo Norwalk han sido detectados en baja frecuencia en niños de los Estados Unidos de Norteamérica. Sin embargo, constituyen una causa mayor de brotes de diarrea no bacteriana que ocurre en comunidades, escuelas, etc., afectando a los adultos, niños en edad escolar y algunos niños menores. Estos brotes de diarrea por Norwalk ocurren a lo largo de todo el año en los Estados Unidos de Norteamérica, sin distribución estacional.

La inmunidad de los virus Norwalk ha sido difícil de entender ya que no se observa el patrón característico en otras enfermedades virales. En este caso los adultos muestran un alto grado de susceptibilidad.

El diagnóstico de los virus Norwalk se realiza generalmente por inmunoelectromicroscopía o radioinmunoensayo, ambos poco accesibles a laboratorios no especializados en virus fecales pequeños (1).

II.- OBJETIVOS

Las enfermedades diarreicas constituyen uno de los problemas de salud pública más importantes en los países en vías de desarrollo. En la epidemiología de las diarreas de los niños en México precisa atender muy variados aspectos; el deficiente desarrollo socioeconómico del país, sus hábitos y costumbres, el nivel educativo, las condiciones de saneamiento ambiental, la disponibilidad de agua potable y la accesibilidad de los servicios de atención médica primaria.

A pesar de innumerables esfuerzos encaminados a explicar el origen de las enfermedades diarreicas por medio de los más diversos mecanismos, el factor infeccioso continúa siendo el más importante sin duda por su carácter contagioso.

Además del papel que los microorganismos enteropatógenos clásicos como *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Salmonella*, serotipos enteropatógenos de *Escherichia coli* y *Entamoeba histolytica* juegan en la etiología de las diarreas en los últimos decenios, se han descubierto nuevos agentes, que son los Rotavirus, que constituyen parte importante del problema de gastroenteritis.

Por lo cual se realiza el presente trabajo para la detección del Rotavirus en cuadros diarreicos en lactantes, por un método inmunoenzimático absorbente de la técnica de ELISA, el Rotazyme, que es una técnica específica y sensible hacia el Rotavirus.

Así mismo se compara la etiología de la diarrea ya sea por causa bacteriana o viral, así como la sintomatología de vómito, deshidratación, alimentación con seno materno y/o por biberón, temperatura corporal y rinitis, en niños en los primeros meses de vida.

III.- METODOLOGIA

Se investigó la presencia del Rotavirus en 95 lactantes menores de dos años, las edades fluctuaron de 1 a 24 meses, de los cuales 64 eran hospitalizados y el resto fue de consulta externa, el trabajo se llevó a cabo en el Hospital Central Ignacio Morones Prieto de San Luis Potosí.

El estudio se realizó durante un año, comprendiendo las temporadas de primavera, verano, otoño e invierno. Se recolectaron las muestras biológicas de heces fecales de cada paciente desde el momento del diagnóstico diarreico.

Se detectó el Rotavirus mediante la técnica de Laboratorios Abbot Rotazyme, el cual utiliza el sistema "sandwich", técnica en fase sólida del sistema inmunoenzimático absorbente de la técnica ELISA, las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro Quantum I de Laboratorios Abbot.

Se hicieron estudios comparativos con respecto al coprocultivo y el Rotavirus para poder ver la incidencia de bacterias patógenas o por virus como la causa de la diarrea, y así mismo comparar la sintomatología de vómito, deshidratación, variación de temperatura corporal, neumonía y rinitis, así como la alimentación por seno materno o por biberón en el lactante.

Se consideró coprocultivo positivo cuando la bacteria era patógena como Shigella, Salmonella, Proteus, Escherichia coli enteropatógena. En la flora normal de heces fecales generalmente se encuentra Escherichia coli pero no enteropatógena, Klebsiella, Bacteriodes y Clostridia.

La cantidad de bacterias patógenas en las heces fecales varía considerablemente según la gravedad y el tipo de infección y el estadio en que se encuentre.

Para el caso de coprocultivo el material necesario es:

- 1.- Muestra biológica de heces fecales (sin conservador).
- 2.- Placas de agar E.M.B. (agar-eosina y azul de metileno), S.S. (medio para Salmonella-Shigella, contiene citrato con sales biliares) y Desoxicolato-citrato.
- 3.- Tubos con medio de Kligler, SIM y Urea-Sacarosa (surraco) y demás utensilios necesarios para estudios microbiológicos.

METODO

- 1.- Se siembra la muestra de heces fecales, en medios de cultivo en placa estéril E.M.B., S.S. y Desoxicolato-citrato estéril, se incuba a 37° C por 24 horas.
- 2.- En el período siguiente, se examinan las placas sembradas buscando colonias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. Se resiembran en los medios ya mencionados los distintos tipos de colonias que se observan, incubando a 37° C por 24 horas.
- 3.- Se clasifican el o los organismos aislados de acuerdo con las características bioquímicas.

Escherichia coli enteropatógena.- En los medios de E.M.B. da un color azul negro con brillo metálico. En medios de S.S. y Desoxicolato-citrato tiene un color rojo.

Salmonella-Shigella.- Son incoloras en los medios de E.M.B., en S.S. y Desoxicolato-citrato agar son de color rosa opaco rodeada de una zona de color rojo.

Proteus.- Se siembra en medios de E.M.B. o en agar sangre. La colonia no permanece compacta y discreta, sino que se extiende rápidamente y en oleadas, sobre la superficie de agar forma películas delgadas apenas visibles.

ESTUDIOS BIOQUIMICOS

Medio de Kliger.- En este medio de cultivo (de color azul) se observa la fermentación de la glucosa, lactosa, producción de hidrógeno y gas.

El agar se prepara en un tubo de ensayo y en plano inclinado, formando una capa profunda y con una superficie inclinada relativamente corta. Se toca el centro de la colonia del cultivo original con un alambre recto que luego se hace penetrar en la capa de agar (cuidando de no pinchar el fondo del tubo), luego se pasa el alambre por encima de la superficie inclinada. Se incuba 24 horas a 37° C.

OBSERVACION DE LOS TUBOS

El fondo amarillo en el medio de cultivo es por fermentación de glucosa, la superficie amarilla por fermentación de lactosa. Trayectoria de la picadura en negro es por producción de sulfuro de hidrógeno. La producción de gas se ve por la aparición de burbujas en el medio de la trayectoria de la punción y alrededor de ésta.

MEDIO DE CULTIVO SIM

En el medio de cultivo (de color ámbar) se puede observar la producción de sulfuro de hidrógeno, de indol y la movilidad del germen. Se siembra por picadura durante 24 horas a 37° C.

La trayectoria de la picadura en negro es por producción de sulfuro de hidrógeno, cuando se colorea con el reactivo de Kovac y da color rojo indica producción de indol.

Cuando el germen se desarrolla en la trayectoria de la picadura y se extiende a los lados es móvil.

MEDIO DE CULTIVO UREA-SACAROSA (SURRECO)

En este medio (de color rosa pálido) se puede ver la fermentación de la sacarosa y la hidrólisis de la urea. Si se observa en el medio de cultivo color morado es porque hidroliza la urea. Si se observa color amarillo es porque fermenta la sacarosa.

PRUEBAS BIOQUIMICAS

Bacteria	Glucosa	Lactosa	H ₂ S	Motilidad	Indol	Urea	Gas
Escherichia coli enteropatógena	+	+	-	±	+	-	±
Proteus	-	-	+	-	-	+	+
Salmonella	-	+	±	+	-	-	+
Shigella	+	+	-	-	-	-	±

TEMPERATURA CORPORAL

Se tomó la variación de 37.5° C a 40° C como temperaturas febriles y de 37° C para temperaturas normales.

ALIMENTACION

La alimentación se valoró la diferencia con biberón o por seno materno al lactante.

DESHIDRATACION

La deshidratación se catalogó como leve, moderada o grave de acuerdo a la proporción de agua en relación al peso corporal (la cual la realizó el médico pediatra).

En el lactante las pérdidas hídricas agudas en proporción menor o igual al 5 % del peso corporal, corresponden habitualmente a pacientes con deshidratación de grado leve. Las pérdidas en proporción al 6 a 10 % del peso corporal caracteriza al estado de deshidratación de grado moderado. Las pérdidas de 11 a 15 % del peso corporal son consideradas graves.

Los signos clínicos de deshidratación descritos comúnmente en el lactante son: fontanelas anteriores deprimidas, ojos hundidos, labios, mucosa oral y lengua seca y pérdida de elasticidad de la piel. La deshidratación grave se valora mediante la exploración del llenado capilar periférico, la determinación de la frecuencia cardiaca y la presión arterial. En el niño recién nacido deshidratado puede observarse fiebre, inquietud, lengua seca y fontanelas deprimidas.

PRESENCIA DE SINTOMATOLOGIA DE NEUMONIA Y RINITIS

Rinitis es congestión nasal intermitente de la membrana mucosa nasal, permeabilidad anormal de las cavidades nasales.

METODOLOGIA DE LAS PRUEBAS ESTADISTICAS

Para el manejo estadístico de datos son: la media aritmética, la prueba de hipótesis basada en la distribución binomial, distribución de Chi-cuadrada, distribución de T de Student.

Una medida descriptiva calculada a partir de los datos de una muestra recibe el nombre de estadístico.

Media aritmética.- Es la medida de tendencia central, más conocida comúnmente como promedio. La media se obtiene sumando todos los valores en una población o muestra y dividiendo entre el número de valores que se sumaron.

Probabilidad.- Empírica de un suceso, se toma como la frecuencia relativa de la aparición del suceso. La probabilidad de ocurrencia de algún evento, puede ser medida por un número entre cero y uno, mientras menos probable sea el evento tiene una probabilidad cercana de cero y un evento que con seguridad ocurra tiene una probabilidad de uno. Se representa por una P.

Significancia estadística.- Es la probabilidad más baja posible (habitualmente menor de 0.05) de que las diferencias observadas en dos o más grupos sean debidas al azar.

PRUEBAS DE HIPOTESIS

El propósito de las pruebas de hipótesis es ayudar al investigador, o a cualquier otra persona a tomar una decisión referente a una población, examinando una muestra de esa población.

- 1.- **Datos.-** Debe comprenderse la naturaleza de los datos que forman la base de los procedimientos de pruebas, ya que ésta determina la prueba particular que debe emplearse.

2.- Suposiciones.- Las suposiciones que tienen importancia en la estimación también la tienen en la prueba de hipótesis.

3.- Hipótesis.- En la prueba de hipótesis se trabaja con dos hipótesis que deben enunciarse explícitamente. La primera es la hipótesis que debe probarse, por lo común conocida como hipótesis nula y que se designa por el símbolo H_0 ya que es una proporción de conformidad con condiciones verdaderas en la población de interés. En general la hipótesis nula se establece para ser desacreditada. Como consecuencia, la opuesta a la conclusión que el investigador desea alcanzar se convierte en el enunciado de hipótesis nula. La hipótesis nula se rechaza o bien no se rechaza, si la hipótesis nula no se rechaza se dirá que los datos sobre los cuales se basa la prueba no proporcionan evidencia suficiente que provoque rechazo. Si el procedimiento de prueba conduce al rechazo se concluirá que los datos disponibles no son compatibles con la hipótesis nula, pero con apoyo de alguna otra hipótesis. Esta otra hipótesis se conoce como alternativa y se designa con el símbolo H_A .

La distribución de la estadística de prueba.- Es la clave para la inferencia estadística.

Regla de decisión.- Los valores de la estadística de prueba que comprende la región de rechazo son aquellos que tienen la menor probabilidad de ocurrencia si la hipótesis nula es verdadera, mientras los valores que forman la región de aceptación son los que tienen mayor probabilidad de ocurrir si la hipótesis nula es verdadera.

1.- DISTRIBUCION BINOMIAL

La distribución se obtiene de un proceso conocido como ensayo de Bernoulli en honor del matemático James Bernoulli. Cuando un solo ensayo de algún proceso o experimento puede conducir sólo a uno de dos resultados mutuamente exclusivos, tales como muerto o vivo, enfermo o saludable.

- a) Cada ensayo conduce a uno de dos resultados posibles, mutuamente exclusivos. Uno de los resultados posibles se denota arbitrariamente como éxito y el otro se denota como fracaso.
- b) La probabilidad de éxito denotado por p , permanece constante de ensayo a ensayo. La probabilidad de fracaso $(1-p)$ se denota por q .
- c) Los ensayos son independientes, es decir, el resultado de cualquier ensayo particular no es afectado por el resultado del otro. Se utiliza para muestras pequeñas.

La distribución binomial se basa en la ecuación:

$$P\{1,2,\dots,X\} = \sum_{i=0}^X {}_N C_X p^x q^{(n-x)}$$
$${}_N C_X = \frac{N!}{X!(N-X)!}$$

X = Exitos

N = Ensayos

$N-X$ = Número de fallos

$!$ = Factorial

${}_N C_X$ = Combinaciones de N elementos con X a la vez

p = Proporción de "éxitos"

$q = (1-p)$ Proporción de fracaso.

P = Probabilidad

2.- LA PRUEBA DE CHI-CUADRADA

Es una medida de la discrepancia que existe entre las frecuencias observadas y las esperadas. La prueba de Chi-Cuadrada se basa en la ecuación:

$$X^2 = \sum \frac{(O - C)^2}{C}$$

en donde

O = Son las frecuencias observadas.

C = Son las frecuencias calculadas a partir de la hipótesis nula.

3.- DISTRIBUCION NORMAL

Los límites normales son habitualmente definidos a ser los puntos que encierran o engloban 95% de los valores obtenidos en los ensayos estudiados.

4.- DISTRIBUCION T DE STUDENT

Se utiliza para pequeñas muestras.

$$t_{(n_1+n_2-2)} = \frac{X_1 - X_2}{\sigma_{X_1-X_2}}$$

Error de la diferencia de medias:

$$\sigma_{X_1-X_2} = \sqrt{S_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

Varianza ponderada:

$$S_p^2 = \frac{s_1^2 + s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

X = Media aritmética muestral

n = Número de datos

S = Desviación típica

La probabilidad se obtiene según las ecuaciones para cada tipo de distribución.

IV.- TECNICAS EXPERIMENTALES

A.- FUNDAMENTO DE LA TECNICA

El inmunoensayo enzimático fue descrito por primera vez en el año de 1971 por Avrameas, quien utilizó enzimas como marcadores inmunoquímicos en sustitución de los radioisótopos, para su uso en los análisis de enlace competitivo (53).

Los métodos más conocidos comprendidos dentro de las técnicas de inmunoensayo son:

- 1.- **ELISA** (Enzyme-Liked Immunoabsorbent assay) o Análisis de Inmunoabsorción Enzimática.
- 2.- **EMIT** (Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique) o Técnica de Inmunoanálisis con Multiplicación Enzimática.
- 3.- **EIA** (Enzyme Immunoassay) o Inmunoanálisis Enzimático (52, 53).

Los inmunoensayos enzimáticos generalmente son de dos tipos:

- a) **Ensayos homogéneos**, en donde el marcador libre y fijado deben separarse físicamente antes de su identificación (EMIT).
- b) **Ensayos heterogéneos**, en donde es posible distinguir el marcador libre ante un marcador fijado (ELISA).

El término ELISA fue usado por vez primera en 1971 por Engvall y Perlman (53, 58).

Por su sensibilidad y especificidad en la cuantificación de una gran variedad de compuestos biológicos importantes el método ELISA tuvo un inmenso impacto en muchas áreas de la medicina.

B.- TECNICA DE ELISA

Utiliza reactivos anticuerpo anti-inmunoglobulina unidos a una enzima. Estos anticuerpos reaccionan con las inmunoglobulinas combinadas con su antígeno. La reacción se visualiza agregando un sustrato específico de la enzima que se utilizó. La técnica de ELISA puede utilizarse para la búsqueda tanto de antígenos como de anticuerpos (52).

La identificación de los antígenos microbianos utilizando ELISA puede realizarse mediante dos métodos: el directo y el indirecto.

C.- METODO DIRECTO

La técnica de Emparedado utiliza un anticuerpo específico fijado a un soporte a fase sólida (placa de microtitulación). Se hace un lavado para eliminar el exceso del anticuerpo (bloqueo de placa) y se coloca el antígeno microbiano (suero problema). Este se adherirá al anticuerpo específico al soporte. Se efectúa otro lavado y se añade una solución del anticuerpo específico enlazado covalentemente con una enzima.

Un tercer lavado se realiza con el objeto de eliminar el exceso de complejo enzima y anticuerpo no fijado. Se añade a los pozos de la placa el sustrato correspondiente para la enzima conjugada. La cantidad de antígeno determinará la cantidad de enzima y anticuerpo, lo que a su vez repercutirá en la intensidad de la reacción manifestada por un cambio de color.

La desventaja de este método es que requiere de un conjugado separado de enzima y de anticuerpo específico para la identificación de cada antígeno.

D.- METODO INDIRECTO

El anticuerpo específico fijado a la base sólida será de una especie animal. Después se agrega al antígeno, se añade un anticuerpo específico no marcado de otra especie de animal que reaccionará con el antígeno fijado en la fase sólida. Se elimina el exceso de anticuerpo no fijado mediante un lavado. Se añadirá un tercer anticuerpo unido a la enzima dirigido contra la globulina de la segunda especie animal.

Como resultado habrá un cambio de color, que estará determinado por la cantidad de antígeno encontrado en la muestra. Este método elimina la desventaja de la técnica directa.

PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS

Se utiliza el antígeno que se encuentra fijado (directamente), se agrega al suero problema, si posee anticuerpos se unirán al antígeno causando una reacción. Esto es evidente con el reactivo enzimático y sus sustratos. Es importante mencionar que en cada paso se deben realizar los lavados para eliminar todo el excedente de cualquiera de los reactivos, antígeno o anticuerpos libres.

El método puede llevarse a cabo en los tubos de ensaye de poliestireno o en placas de microtitulación del mismo material. La desventaja del poliestireno es que las proteínas pueden unirse directamente sin ningún tratamiento previo. Es más conveniente utilizar las placas de microtitulación porque requieren volúmenes más pequeños de todos los reactivos y por ende se puede comprobar un número mayor de muestras.

La técnica de ELISA identifica pequeñas cantidades de reactivos inmunológicos y la reacción antígeno-anticuerpo no modifica la actividad del marcador enzimático en comparación con otras técnicas, en las que la interacción antígeno-anticuerpo si modula la actividad de la enzima EMIT. Además ha sido adaptada para sistemas de microtitulación y equipos colorimétricos con el fin de cuantificar el producto final, ya que esto facilita el procedimiento y disminuye el costo (52, 53, 55-57).

ESQUEMATIZACION DE LA TECNICA DE ELISA

- A. Método Directo
- B. Método Indirecto

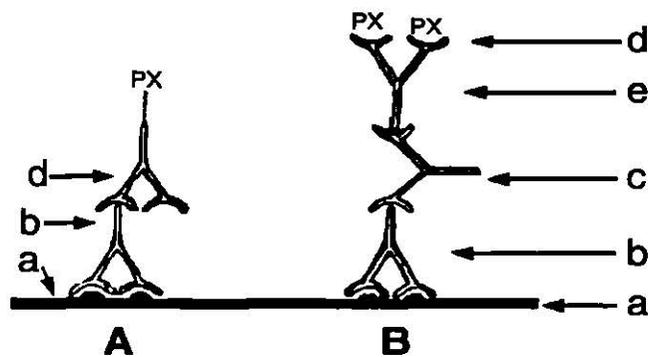


Figura No. 3

- a.- Anticuerpo específico fijado a la base sólida.
- b.- Antígeno (suero problema).
- c.- Anticuerpo específico no marcado de otra especie de animal.
- d.- Anticuerpo unido a la enzima dirigido contra la globulina de la segunda especie de animal.
- e.- Px Peroxidasa de rábano picante.

E.- DISCUSION DE LAS TECNICAS DE ELISA

VENTAJAS DE LAS TECNICAS DE ELISA

- 1.- La realización de análisis sensibles.
- 2.- Los reactivos son de bajo costo y pueden almacenarse durante largo tiempo.
- 3.- Pueden desarrollarse una amplia gama de configuraciones analíticas.
- 4.- Se pueden efectuar múltiples análisis simultáneos.
- 5.- No hay peligro de contaminación por radiación durante el marcado o la eliminación de los residuos.

INCONVENIENTES

- 1.- La cuantificación de la actividad enzimática puede ser más compleja que la de algunos otros radioisótopos.
- 2.- La actividad enzimática puede verse afectada por los componentes del plasma.
- 3.- Los marcadores enzimáticos pueden conducir a una menor sensibilidad por el impedimento estérico de la reacción antígeno-anticuerpo causada por la enzima.
- 4.- Los marcadores enzimáticos son técnicamente complejos de preparar (57, 59).

F.- METODO UTILIZADO EN EL TRABAJO

El método utilizado fue el ELISA directo para la determinación del antígeno Rotavirus.

Se trabajó con un equipo de Rotazyme Anticuerpo (de cerdo) contra el antígeno Rotavirus: conjugado a la Peroxidasa (rábano picante).

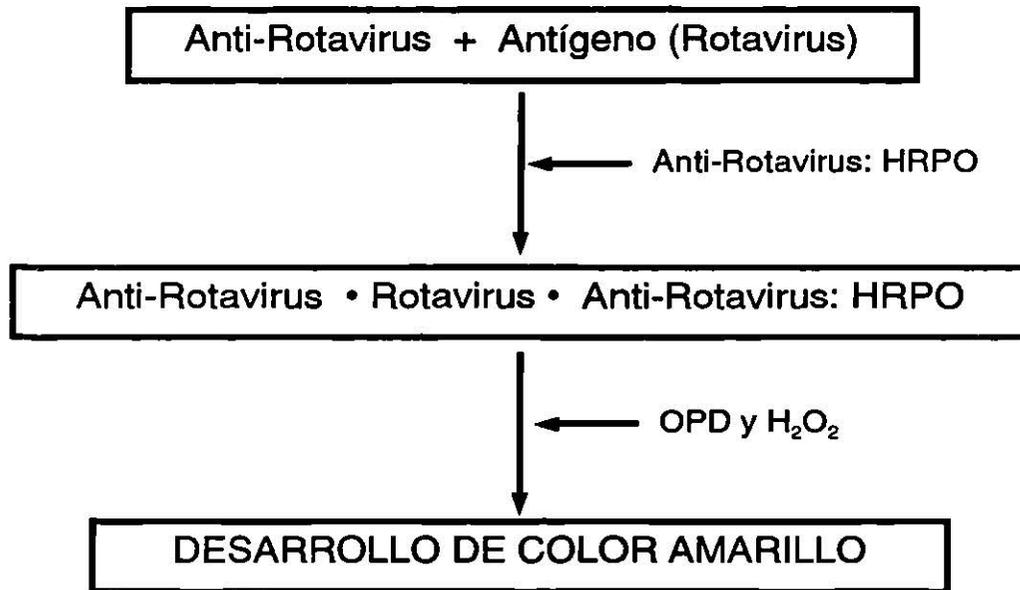
NOMBRE Y FINALIDAD

Rotazyme es una marca registrada de los laboratorios Abbot para un ensayo enzimático cualitativo para la determinación del antígeno Rotavirus en material fecal humano.

RESUMEN DE TEST Y PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El Rotazyme utiliza el sistema sandwich (método directo) para medir el antígeno Rotavirus de las heces fecales. Las perlas (esferas) cubiertas con el anticuerpo (cerdo) es incubada con la alícuota de la suspensión de heces fecales, todos los antígenos presentes en la prueba se unen al anticuerpo en fase sólida. Luego se aspira el material no unido y después de lavar las esferas se agrega anti-Rotavirus (de conejo) conjugado con la peroxidasa de rábano picante (anti-HRV:HRPO) que se deja reaccionar con el complejo antígeno-anticuerpo en la esfera.

El conjugado enzimático no unido se aspira y se lavan las esferas. Luego se añade a las esferas una solución de O-fenilendiamina (OPD), que contiene Peróxido de Hidrógeno y después de la Incubación se desarrolla un color amarillo que es proporcional a la cantidad de Rotavirus unido a la esfera.



El color amarillo desarrollado se lee con una longitud de onda de 492 nm. La reacción enzimática se suspende agregando ácido sulfúrico. La adsorción de los controles y de las pruebas se miden con un espectrofotómetro. Las pruebas que den valores de adsorción iguales o mayores al valor de los controles positivos se consideran reactivas para el Rotavirus.

MATERIAL

Material Biológico: Heces fecales (sin conservador).

REACTIVOS

- 1.- Anti-Rotavirus (cerdo de Guinea) cubierta las perlas (esferas) Rotazyme.
- 2.- Anti-Rotavirus (conejo) • Peroxidasa (rábano picante) conjugado concentrado no menos que 0.2 microgramos/ml en buffer salino de fosfatos con proteína como estabilizador, conservador Timerosal.

- 3.- Control positivo Rotazyme inactivado Rotavirus de simio SA-II equivalente a 10^8 partículas virales/ml en solución salina de fosfatos y 0.1 % albumina de suero bovino, conservador Timerosal.
- 4.- Diluyente de muestras Rotazyme 0.01 M buffer salino de fosfatos conteniendo 0.025 M EDTA.
- 5.- OPD tabletas de O-fenilendiamina · 2 HCL 12.8 mg/tableta.
- 6.- Diluyente para OPD (O-fenilendiamina · 2HCL) tampón de citratofosfatos con 0.02 % de Peróxido de Hidrógeno.
- 7.- Acido Sulfúrico 1N.
- 8.- Agua destilada.

MATERIAL DE LABORATORIO

- 1.- Gradillas.
- 2.- Pipetas de 5 y 10 ml.
- 3.- Vaso de precipitado.
- 4.- Placas de reacción con 20 cavidades.
- 5.- Folios adhesivos para las placas de 20 cavidades.
- 6.- Tubos de ensaye con etiquetas de identificación (para transferir las esferas desde las placas de reacción).
- 7.- Pipetas de precisión para medir 0.2 ml, 0.3 ml y 1 ml.
- 8.- Un sistema de administración de líquidos de lavado, jeringas Conwall.
- 9.- Un sistemas de aspiración, para los lavados de las esferas recubiertas.
Bomba de vacío y una trampa para retener el aspirador.
- 10.-Baño María.
- 11.-Termómetro.
- 12.-Micropipetor.

G.- REALIZACION DE LA TECNICA DE ELISA PARA LA DETERMINACION DEL ROTAVIRUS

Dilución de la muestra. La muestra puede ser ensayada con previa clarificación, esto es recomendado que un 10 % de la dilución preparada con el diluyente Rotazyme, un aplicador puede ser usado para la transferencia de la muestra a 200 microlitros del diluyente para dar una solución de trabajo. Deben realizarse un control negativo y un control positivo en cada conjunto de las pruebas desconocidas. Asegúrese que todas las placas de reacción que contienen los controles y las pruebas sean sometidas al mismo tiempo de incubación. Una vez comenzado el ensayo deberán completarse los pasos sin interrupción (*Fig. 4*).

- 1.- Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente, antes de comenzar el ensayo. Agitarlos cuidadosamente antes del uso. Ajustar la temperatura del baño María a 45° C.
- 2.- Identificar las cavidades de la placa de reacción para pruebas y control en las hojas de protocolo. Pipetear 0.2 ml de cada muestra, tanto los controles como las pruebas de ensayo, en cada cavidad, cuidando de no salpicar la prueba fuera de las cavidades o de rebosar los bordes de las cavidades, ya que no se removerán en los lavados subsiguientes y pueden transferirse a los tubos causando interferencias en el ensayo.
- 3.- Distribuir una esfera recubierta en cada cavidad.
- 4.- Cubrir cada placa con un folio adhesivo, para asegurarse que las esferas estén cubiertas ligeramente con la prueba y que las burbujas de aire puedan salir, golpeando ligeramente las placas cuidando de no salpicar líquido en el folio adhesivo.
- 5.- Incubar las placas en baño María a 45° C por espacio de 3 horas \pm 2 minutos.

- 6.- Al final del período de incubación retirar el folio, aspirar el contenido de las cavidades y lavar cada esfera tres veces con 4 a 5 ml de agua destilada o desionizada hasta que el volumen total sea de 12 a 15 ml.
- 7.- Pipetear 0.200 ml de anti-Rotavirus (conejo) Peroxidasa (rábano picante) dentro de cada tubo.
- 8.- Cubrir con un folio adhesivo.
- 9.- Incubar las placas al baño María por 60 minutos.
- 10.-Durante los últimos 5-10 minutos de incubación preparar la solución de sustrato, pipeteando 5 ml del sustrato por cada pastilla, calculando el necesario para las determinaciones necesarias.
- 11.-Al final del período de incubación de una hora sacar las placas del baño María, retirar el folio y desecharlo, aspirar el contenido de las cavidades y lavar las esferas tres veces. Transferir inmediatamente las esferas a los tubos de ensayo en un portatubos, darle vuelta sobre la placa apretando bien y proseguir a dar vuelta a los tubos y a las placas juntos, para que las esferas caigan dentro de los tubos respectivos.
- 12.-En cada tubo que contiene una esfera y dentro de dos vacíos blancos de sustrato pipetear 0.3 ml de solución de sustrato OPD recién preparada.
- 13.-Incubar los tubos a una temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 14.-Después de los 30 minutos de incubación suspender la reacción enzimática por adición de 1 ml de ácido sulfúrico 1 N en cada tubo.
- 15.-Colocar el aparato Quantum en el modo 0, leer el blanco, usando el blanco tubo de sustrato, leer los controles positivo y negativo, proseguir con las pruebas desconocidas.

ESQUEMATIZACION DE LA TECNICA ROTAZYME

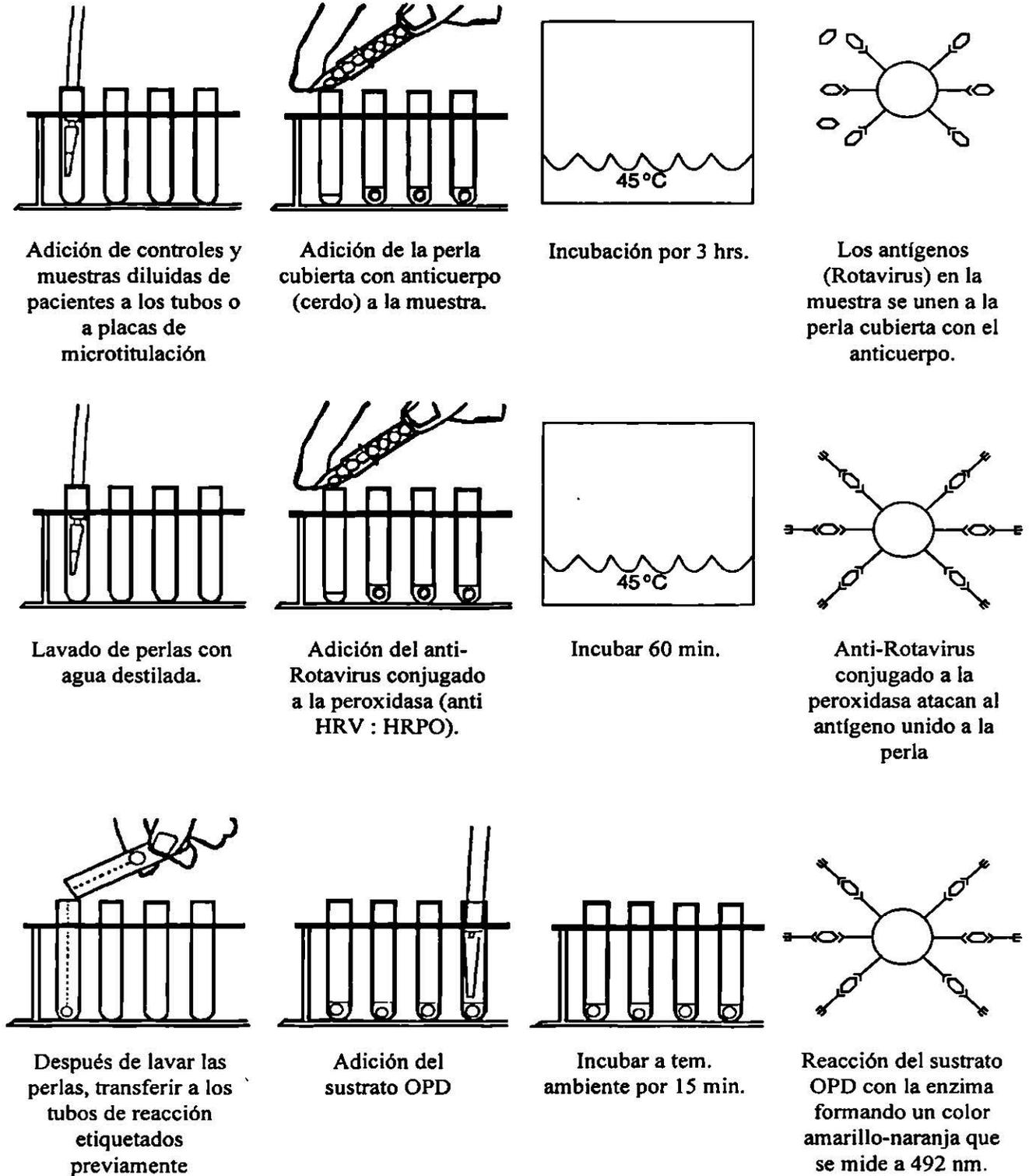


Figura No. 4

El aparato utilizado para medir las lecturas fue un analizador de doble longitud de onda.

QUANTUM I

El analizador de doble longitud de onda Quantum I, mide las diferencias de absorbancia (factor de absorción) de las muestras líquidas y convierte los valores medidos en valores analíticos. El aparato puede suministrar tanto información cuantitativa como cualitativa utilizada en los procedimientos de diagnóstico In vitro (60) (Fig. 5).

Este aparato consta de una consola de mandos, el fotómetro con filtros de doble longitud de onda, la impresora, el procesador de datos y el panel de alimentación electrónica.

La consola de mandos contiene el teclado de los mandos utilizados para manejar el aparato y los indicadores dispuestos en el panel de presentación visual. El fotómetro con filtros de doble longitud de onda. Situados en la parte delantera del Quantum I contiene el receptáculo para colocar las muestras. La impresora situada en la parte izquierda del aparato suministra un registro impreso y permanente de las pruebas. El microordenador que procesa los datos ejecuta los programas alimentados en las memorias permanentes. El panel de alimentación eléctrica de red y además el conmutador de ON/OFF. Una lámpara que se ilumina al caldearse (la lámpara de tungsteno), y se apaga al colocarse la muestra en el receptáculo para las muestra, vuelve a encenderse al retirarse las muestras.

En el fotómetro se encuentran el portatubos, el conjunto de filtros y una placa de circuitos de amplificador/convertidor. El filtro presenta visualmente en nanómetros las longitudes de onda centrales de los filtros de interferencia de paso a banda. Por ejemplo, en el pico (o cresta) de la banda 452 y en la banda lateral 600 (60) (Fig. 5).

El Quantum I contiene los modos programados para realizar los análisis de distintas clases, la fecha, el tiempo y los filtros se procede al hacer las lecturas.

Las muestras son colocadas en el Quantum I, en la secuencia fijada de antemano, definida por el protocolo. La primera lectura medida por el aparato es la muestra en blanco, seguida por una o más muestras patrón utilizadas para calibrar y ajustar el aparato. Después de las muestras patrón podrá medirse una muestra de control de valores conocidos para verificar el calibrado. Luego podrán medirse un número indeterminado de muestras de valor desconocido. Apareciendo impresos los resultados de todas las lecturas de absorbancia, especificando cuáles están positivos y cuáles negativos en relación con los controles.

QUANTUM I

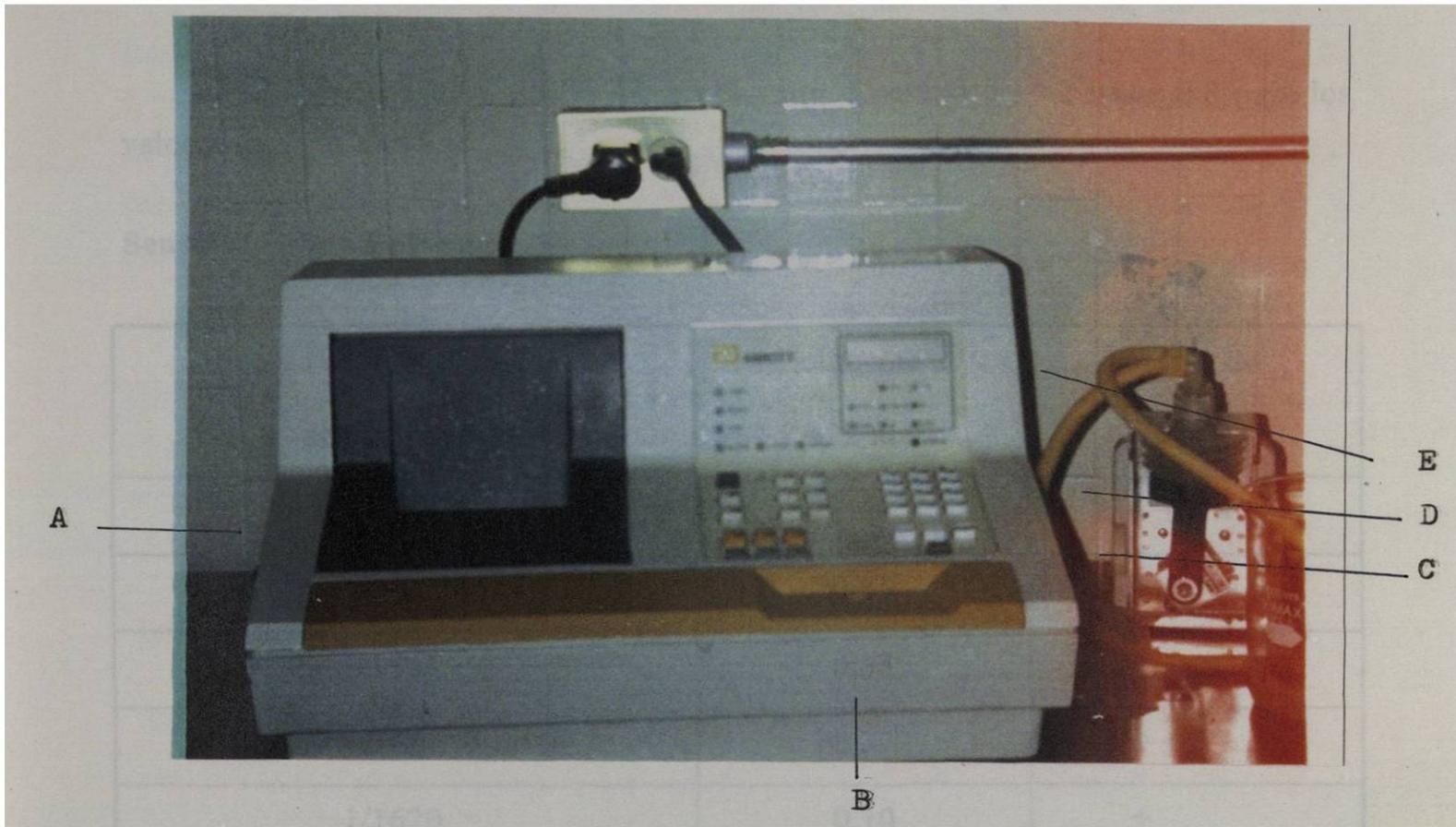


Figura No. 5

Analizador de doble longitud de onda, empleado en el presente trabajo.

- A. Impresora.**
- B. Fotómetro.**
- C. Consola de mandos.**
- D. Panel de alimentación eléctrica.**
- E. Procesador de datos.**

INTERPRETACION DE LA TECNICA DE ELISA PARA EL ROTAVIRUS

La presencia o ausencia del Rotavirus se determina por comparación de la absorción de los controles negativos (absorción no menores que 0.07).

El control positivo deben dar en el valor esperado de 0.2 hasta 0.8 para los valores de ++ a ++++.

Sensibilidad de Rotazyme

Dilución de 10^{10} partículas de Rotavirus/ml	Rotazyme a 492 nm	Color de la carta
1/20	1.60	++++
1/60	0.86	++++
1/180	0.53	+++
1/540	0.32	++
1/1620	0.10	+

FUNDAMENTO DE LA REACCION DE LA PEROXIDASA

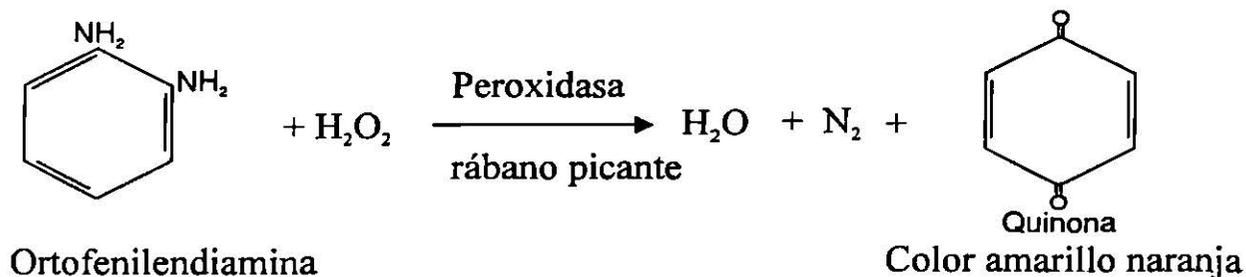
Las peroxidases son proteínas con hierro y porfirina, el hierro permanece en forma férrica y no experimenta modificaciones de valencia durante la reacción. Las hidropoxidases son inhibidas por cianuros, ácidos, sulfuros e hidroxilaminas; en general las peroxidases son abundantes en tejidos vegetales. Las peroxidases en la presencia de H_2O_2 oxida varios compuestos fenólicos y aminas, tales como el pirogalol, guayacol, hidroquinona, tirosina, etc (61).

Se considera que los sustratos son el peróxido de hidrógeno o los hidropéroxidos alquílicos. La reacción general entraña reducción del sustrato por virtud de los átomos de hidrógeno aportados por una molécula del donador; los productos finales son el sustrato reducido y un donador oxidado (62, 63).

REACCION GENERAL



REACCION PARTICULAR



COMENTARIOS SOBRE LA TECNICA DE ROTAZYME PARA EL ROTAVIRUS

Como la técnica del Rotazyme es una determinación hacia el Rotavirus previamente estandarizada por los laboratorios Abbot, en la realización del trabajo no se tuvieron modificaciones en la elaboración.

Si se quisiera una modificación de la técnica se recomienda ver las referencias (58, 64- 67), en ellas se comentan variables de temperaturas, cantidades de antígeno-anticuerpo, adición de sustratos, peróxido de hidrógeno, convenientes para optimizar una técnica de ELISA.

V.- ANALISIS DE RESULTADOS

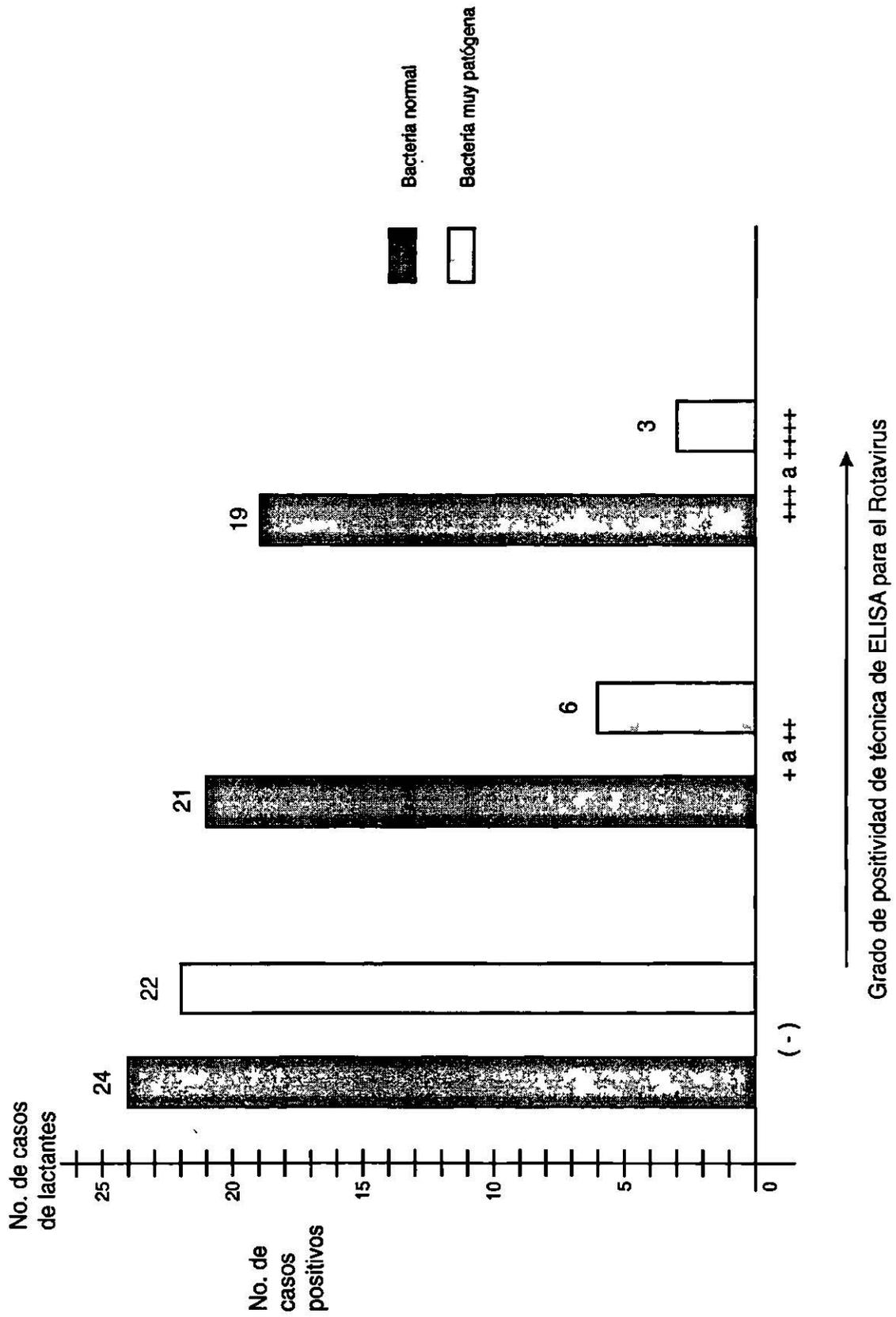
CUADRO No. 1

COMPARACION DE PATOGENICIDAD BACTERIANA CON EL GRADO DE POSITIVIDAD DE ROTAVIRUS A LA TECNICA ELISA						
	COPROCULTIVO					
	Positivo		Negativo		Total	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Rotavirus Negativo a ELISA	22	71.0	24	37.5	46	48.4
Rotavirus Positivo ELISA + a ++	6	19.3	21	32.8	27	28.4
Rotavirus Positivo ELISA +++ a ++++	3	9.7	19	29.7	22	23.2
Total de casos	31	100.0	64	100.0	95	100.0

CUADRO No. 1A

COMPARACION DE PATOGENICIDAD BACTERIANA CON EL GRADO DE POSITIVIDAD DE ROTAVIRUS A LA TECNICA ELISA				
	COPROCULTIVO			
	Positivo	Negativo	Total Casos	% Coprocultivo +
Rotavirus Negativo	22	24	46	47.8
Rotavirus Positivo	9	40	49	18.4
Total No. de casos	31	64	95	32.6
% Rotavirus Positivo	29	62.5		

GRAFICA No. 1
COMPARACION DE INFECTIVIDAD BACTERIANA CON EL GRADO DE
POSITIVIDAD DE ROTAVIRUS A LA TECNICA DE ELISA



RESULTADOS DEL CUADRO No. 1 Y CUADRO No. 1A

- 1.- El estudio se realizó durante un año, en el cual se analizaron 95 casos de diarrea en lactantes. Se valoró la diarrea causada por bacteria patógena como Salmonella, Shigella, Proteus, Escherichia coli enteropatógena, la cual se valoró como coprocultivo positivo, cuando la flora bacteriana era normal se consideró coprocultivo negativo. La valoración del Rotavirus hacia la técnica de ELISA se determinó negativo cuando la técnica fue negativa para el Rotavirus; para el caso de Rotavirus positivo se comparó el grado de positividad del Rotavirus hacia la técnica de ELISA de + a +++++.
- 2.- Cuando existe Rotavirus negativo a la técnica de ELISA hay mayor probabilidad de que la diarrea sea causada por bacteria.
Binomial: $P = 0.00002$
- 3.- Cuando el coprocultivo fue negativo, el 62.5% de los casos resultó positivo para el Rotavirus siendo estadísticamente significativa.
Binomial: $P = 0.0004$

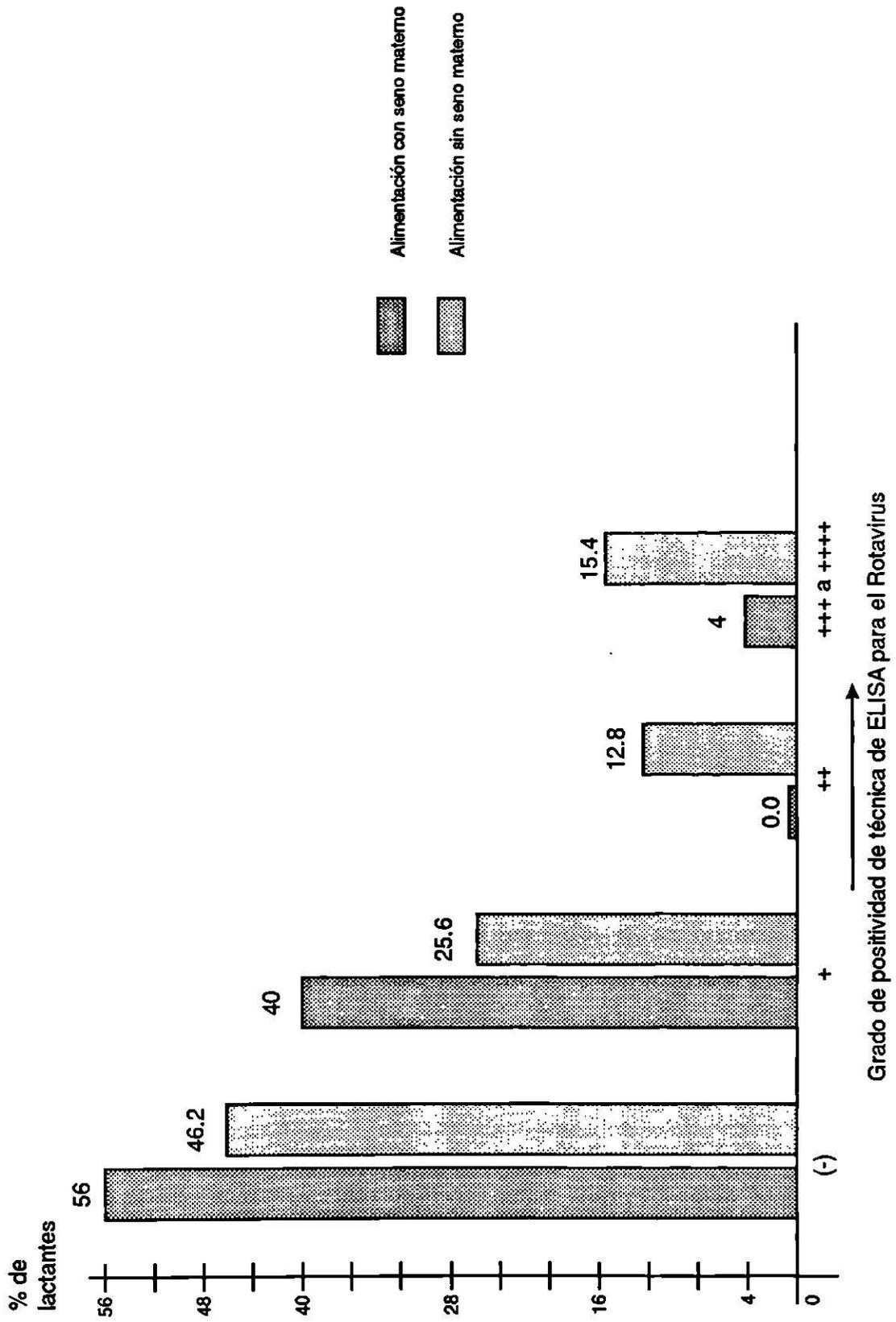
COMENTARIOS

Se concluye que aproximadamente 2 de cada 3 diarreas con coprocultivo negativo es producida por Rotavirus. Se utilizó la distribución binomial para ver las diferencias en las frecuencias de un grupo a otro; la significancia estadística se tomó de probabilidad $P \leq 0.05$, para ver la probabilidad de azar en las diferencias. Por lo que si se da un valor mayor de P (probabilidad) no es significativo y la frecuencia puede ser la misma de un grupo a otro. La distribución binomial se usa predominantemente cuando la escala de medición es nominal (Rotavirus positivo o negativo), la muestra usada es relativamente pequeña ($n < 30$) y alguna de las frecuencias observadas también es pequeña ($k < 5$). En la ecuación de la distribución binomial se tomó como número de éxitos los casos de Rotavirus positivo, como número de fallos o fracasos los casos de Rotavirus negativo.

CUADRO No. 2

COMPARACION CON Y SIN ALIMENTACION DE SENO MATERNO Y EL GRADO DE POSITIVIDAD DE ELISA AL ROTAVIRUS						
	ALIMENTACION					
	Sin seno materno		Con seno materno		Total	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Rotavirus Negativo	18	46.2	14	56	32	50.00
Rotavirus Positivo ELISA +	10	25.6	10	40	20	31.25
Rotavirus Positivo ELISA ++	5	12.8	0	0	5	7.81
Rotavirus Positivo ELISA +++ a ++++	6	15.4	1	4	7	10.94
Total de casos	39	100.0	25	100	64	100.00

GRAFICA No. 2
RELACION DE LA ALIMENTACION CON SENO MATERNO Y
LA TECNICA DE ELISA AL ROTAVIRUS



RESULTADOS DEL CUADRO No. 2

- 1.- El 56% de los niños alimentados con seno materno resultaron negativos al Rotavirus , o sea que hay una probabilidad discretamente mayor de ser negativo al Rotavirus cuando se alimenta al niño con seno materno, pero esto no es significativo.

Binomial: $P = 0.16$

- 2.- En el 46.2% de los niños que no fueron alimentados con seno materno fueron negativos al Rotavirus, pero esta diferencia tampoco es significativa estadísticamente.

Binomial: $P = 0.210$

Puede decirse que la alimentación con seno materno tiende a proteger más al niño contra la infección por Rotavirus, por la presencia de las inmunoglobulinas, aún cuando no se encontró significancia estadística.

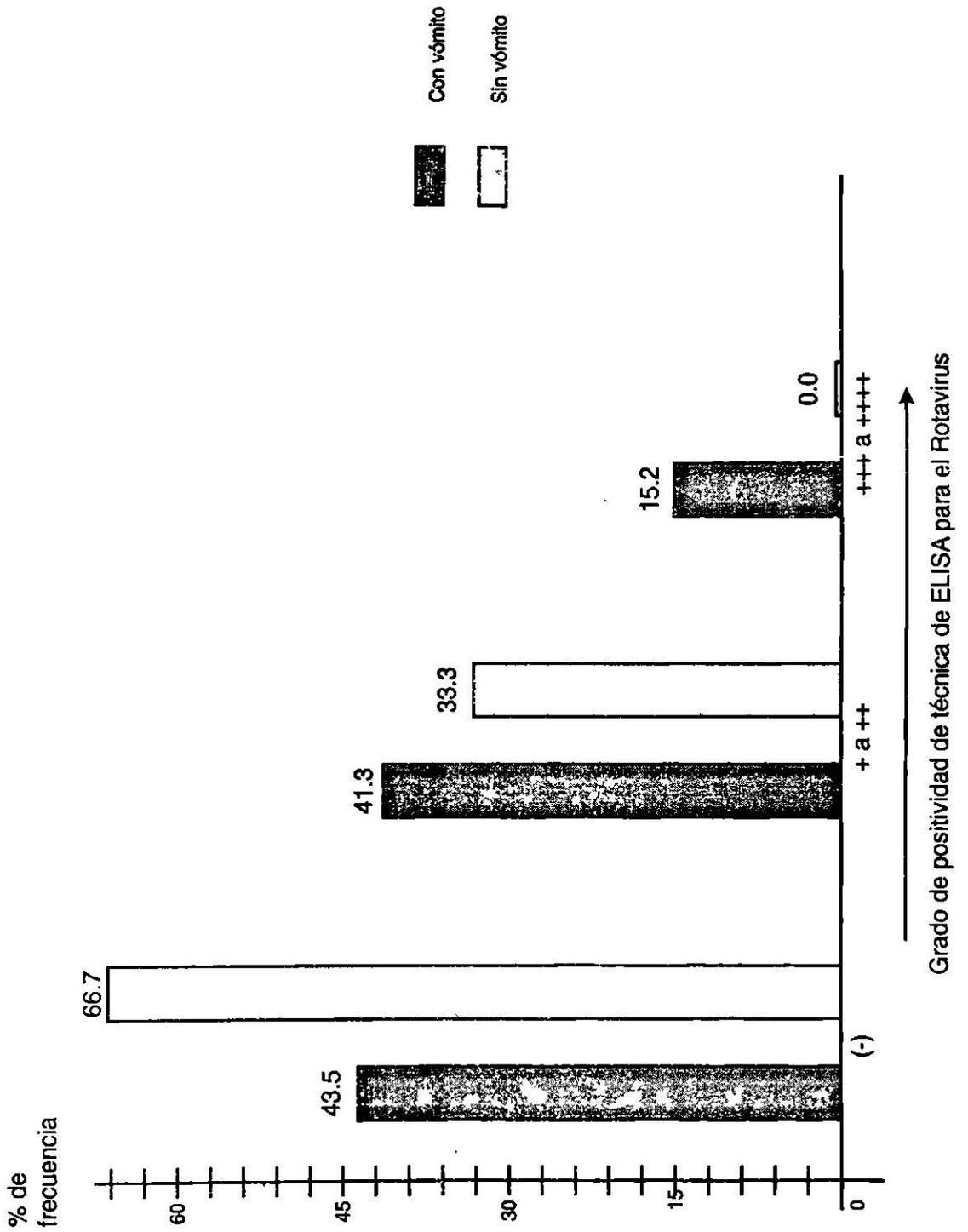
Se utilizó la distribución binomial para ver las diferencias en las frecuencias de un grupo a otro; la significancia estadística se tomó de probabilidad $p \leq 0.05$, para ver la probabilidad de azar en las diferencias. Por lo que si se da un valor mayor de la probabilidad no es significativo y la frecuencia puede ser la misma de un grupo a otro.

En la ecuación de la distribución binomial dada anteriormente se tomó como número de éxitos los casos de Rotavirus positivo, como número de fallos o fracasos los casos de Rotavirus negativo.

CUADRO No. 3

COMPARACION DE PACIENTES CON DIARREA BACTERIANA O VIRAL CON SINTOMATOLOGIA DE VOMITO						
	VOMITO					
	Con Vómito		Sin Vómito		Total	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Rotavirus Negativo	20	43.5	12	66.7	32	50.0
Rotavirus Positivo ELISA + a ++	19	41.3	6	33.3	25	39.1
Rotavirus Positivo ELISA +++ a ++++	7	15.2	0	0	7	10.9
Total de casos	46	100.0	18	100.0	64	100.0

GRAFICA No. 3
RELACION DE SINTOMATOLOGIA DE VOMITO CON
LA TECNICA DE ELISA AL ROTAVIRUS



RESULTADOS DEL CUADRO No. 3

- 1.- El 56 % de los niños que presentaron vómito resultaron positivos al Rotavirus, distribución Binomial: $P = 0.0515$

Se puede decir que el Rotavirus produce vómito con más frecuencia.

- 2.- El 66.7 % de los niños que no presentaron vómito fueron negativos para el Rotavirus, Binomial: $P = 0.0004$, ésto es estadísticamente significativo.

O sea que si el niño no tiene vómito hay más probabilidad que no sea viral.

Se utilizó la distribución binomial para ver las diferencias en las frecuencias de un grupo a otro; la significancia estadística se tomó de probabilidad $p \leq 0.05$, para ver la probabilidad de azar en las diferencias. Por lo que si da un valor mayor de la probabilidad no es significativo y la frecuencia puede ser la misma de un grupo a otro.

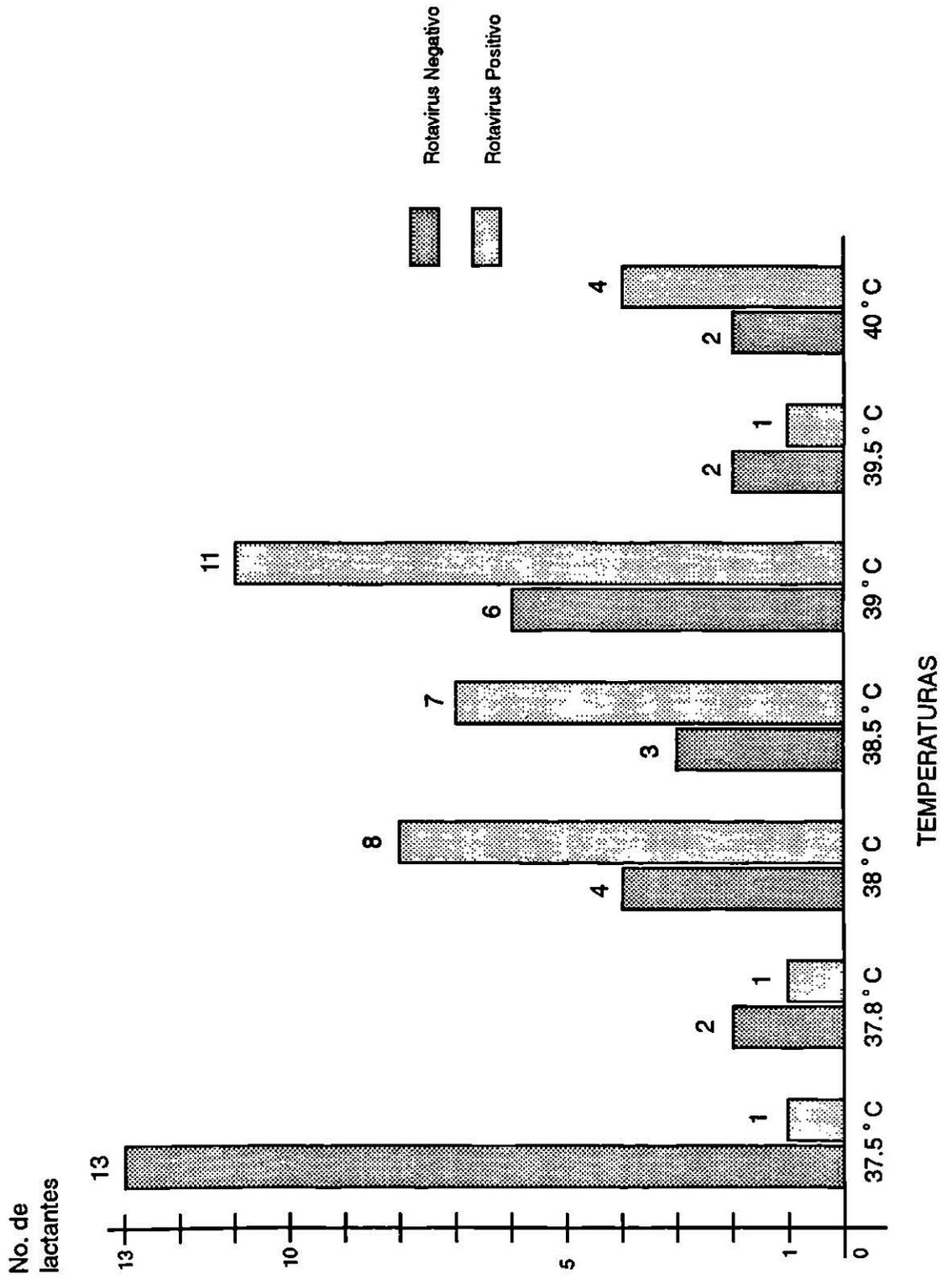
En la ecuación de la distribución binomial dada anteriormente se tomó como número de éxitos los casos de Rotavirus positivo, como número de fallos o fracasos los casos de Rotavirus negativo.

CUADRO No. 4

COMPARACION DE TEMPERATURAS Y EL GRADO DE POSITIVIDAD DEL ROTAVIRUS A LA TECNICA DE ELISA

		TEMPERATURA EN °C															
		37.5		37.8		38.0		38.5		39.0		39.5		40.0		Total	
		Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Rotavirus Negativo		13	92.9	2	66.7	4	33.3	3	30.0	6	35.4	2	66.7	2	40.0	32	50.0
Rotavirus Pos. ELISA +		0	0.0	1	33.3	8	66.7	4	40.0	5	29.4	1	33.3	1	20.0	20	31.3
Rotavirus Pos. ELISA ++		1	7.1	0	0.0	0	0.0	1	10.0	3	17.6	0	0.0	0	0.0	5	7.8
Rotavirus Pos. ELISA +++		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	10.0	3	17.6	0	0.0	1	20.0	5	7.8
Rotavirus Pos. ELISA ++++		0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	10.0	0	0.0	0	0.0	1	20.0	2	3.1
Total		14	100.0	3	100.0	12	100.0	10	100.0	17	100.0	3	100.0	5	100.0	64	100.0

GRAFICA No. 4
COMPARACION DE TEMPERATURAS CON RESPECTO A
ROTAVIRUS POSITIVO Y NEGATIVO



COMPARACION DE TEMPERATURAS Y EL GRADO DE POSITIVIDAD DEL ROTAVIRUS A LA TECNICA DE ELISA METODO ESTADISTICO T DE STUDENT

Rotavirus Negativo No. total de casos n = 32

Promedio de temperatura $\bar{X} = 38.23^{\circ} C$

Desviación Estándar S = 0.8186

RESULTADOS DEL CUADRO No. 4

Positivo al Rotavirus la Técnica de ELISA + No. de casos n = 20

Promedio de temperatura $\bar{X} = 38.515^{\circ}C$

Desviación Estándar S = 0.606

Positivo al Rotavirus la técnica de ELISA ++ No. de casos n = 5

Promedio de temperatura $\bar{X} = 38.6^{\circ}C$

Desviación Estándar S = 0.652

Positivo al Rotavirus la técnica de ELISA +++ No. de casos n = 5

Promedio de temperatura $\bar{X} = 39.1^{\circ}C$

Desviación Estándar S = 0.548

Positivo al Rotavirus la Técnica de ELISA ++++ No. de casos n = 2

Promedio de temperatura $\bar{X} = 39.25^{\circ}C$

Desviación Estándar S = 1.061

COMENTARIOS

Se puede observar que conforme aumenta el grado de Positividad de ELISA hacia el Rotavirus hay ascenso en la temperatura.

CUADRO No. 5

COMPARACION DE TEMPERATURAS CUANDO HAY ROTAVIRUS POSITIVOS	
Temperaturas °C	No. de Casos
37.5	1
37.8	1
38.0	8
38.5	7
39.0	11
39.5	1
40.0	3

Total No. de casos $n = 32$

Promedio de temperatura $\bar{X} = 38.67^\circ$
Desviación estándar $S = 0.650$

CUADRO No. 6

COMPARACION DE TEMPERATURAS CUANDO HAY ROTAVIRUS NEGATIVOS	
Temperaturas °C	No. de Casos
37.5	13
37.8	2
38.0	4
38.5	3
39.0	6
39.5	2
40.0	2

Total No. de casos $n = 32$

Promedio de temperatura $\bar{X} = 38.23^\circ$
Desviación estándar $S = 0.8186$

RESULTADOS DE LOS CUADROS No. 5 Y No. 6 COMPARACION DE TEMPERATURAS DE ROTAVIRUS POSITIVO Y NEGATIVO

Para saber si hay significancia en la diferencia de temperaturas en Rotavirus Positivo y Negativo, se hizo una prueba de Hipótesis con distribución T de Student.

- 1.- La Hipótesis H_0 (nula) cuando no hay variación de temperaturas en Rotavirus Positivo y Negativo.

$$\bar{X}_p = \bar{X}_n$$

\bar{X}_p = Promedio de temperaturas de Rotavirus positivo

\bar{X}_n = Promedio de temperaturas de Rotavirus negativo

- 2.- La Hipótesis H_1 (alternativa) cuando hay aumento mayor de temperaturas en Rotavirus Positivo que en Rotavirus Negativo con grado de significancia de $p = 0.0500$

- 3.- Regla de Decisión; se acepta H_0 si $T_{62} < 1.6698$; se rechaza H_0 si $T_{62} \geq 1.6698$

- 4.- Estadística de prueba

$$T = \frac{X_p - X_n}{\sigma_{X_p - X_n}} \quad 2.316 \quad P = 0.0119$$

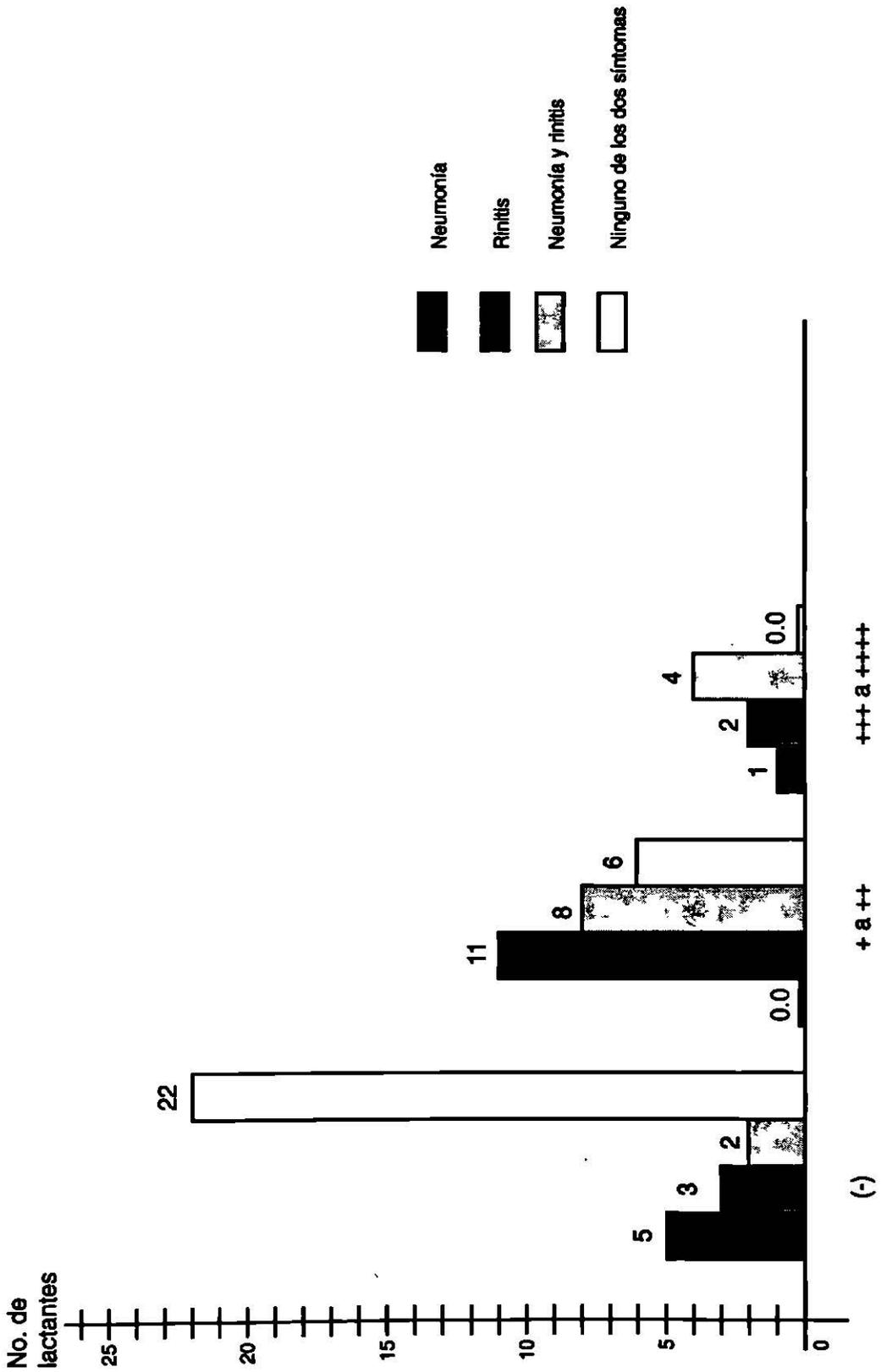
- 5.- Por lo tanto los casos de Rotavirus positivos tienen temperatura significativamente más alta

$$T_{62} = 2.316 \quad p = 0.0119$$

CUADRO No. 7

COMPARACION DE SINTOMATOLOGIA DE NEUMONIA, RINITIS Y AMBOS SINTOMAS CON RELACION AL GRADO DE POSITIVIDAD DE TEC. ELISA AL ROTAVIRUS														
	NEUMONIA			RINITIS			AMBOS SINTOMAS							
							Positivo			Negativo			Total	
	Casos	%		Casos	%		Casos	%		Casos	%		Casos	%
Rotavirus Negativo	5	83.3		3	18.8		2	14.3		22	78.6		32	50.0
Rotav. Pos. ELISA + a ++	0	0.0		11	68.7		8	57.1		6	21.4		25	39.1
Rotav. Pos. ELISA +++ a ++++	1	16.7		2	12.5		4	28.6		0	0.0		7	10.9
Total de casos	6	100.0		16	100.0		14	100.0		28	100.0		64	100.0

GRAFICA No. 5
CUADRO RESPIRATORIO CON RELACION AL GRADO DE
POSITIVIDAD AL ROTAVIRUS A LA TECNICA DE ELISA



RESULTADOS DEL CUADRO No. 7

- 1.- La neumonía no se asocia estadísticamente al Rotavirus. Binomial: $P = 0.25$.
- 2.- En el caso de la rinitis se asocia con el Rotavirus como positividad para ELISA + a ELISA ++ ($P = 111.76 \times 10^{-9}$), sin embargo, al ver ELISA en forma semicuantitativa +++ a +++++, no hay diferencia significativa entre positivos y negativos. ($P = 0.8$)
- 3.- En cuanto a la presencia de los dos síntomas, rinitis y neumonía, sucede algo semejante, hay asociación pero no la hay cuando el Rotavirus es ELISA +++ a +++++ ($P = 0.10$).

COMENTARIOS

Se puede apreciar que cuando empieza a detectarse el virus hay rinitis, al elevarse la cantidad de virus (antígeno) hay menos síntomas respiratorios, por lo que puede pensarse que el virus pasó al tracto gastrointestinal.

Se utilizó la distribución binomial para ver las diferencias en las frecuencias de un grupo a otro; la significancia estadística se tomó de probabilidad $P \leq 0.05$, para ver la probabilidad de azar en las diferencias. Por lo que si da un valor mayor de la probabilidad no es significativo y la frecuencia puede ser la misma de un grupo a otro. En la ecuación de la distribución binomial se tomó como número de éxitos los casos de Rotavirus positivo, como número de fallos o fracasos los casos de Rotavirus negativo.

CUADRO No. 8

SINTOMATOLOGIA DE DESHIDRATACION. SE VALORO MODERADA Y SEVERA TANTO EN ROTAVIRUS POSITIVO COMO EN ROTAVIRUS NEGATIVO						
	DESHIDRATACION					
	Moderada		Severa		Total	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Rotavirus Positivo	25	54.4	9	50.0	34	53.1
Rotavirus Negativo	21	45.6	9	50.0	30	46.9
Total de casos	46	100.0	18	100.0	64	100.0

RESULTADOS DEL CUADRO No. 8

La deshidratación tiene la misma probabilidad de presentarse en Rotavirus positivo como en Rotavirus negativo.

$$X^2 = 0.104 \quad P = 0.75 \text{ (probabilidad)}$$

Se utilizó la distribución de Chi-cuadrada para ver las diferencias de un grupo a otro. La significancia estadística para la probabilidad se tomó de $p \leq 0.05$.

Se utilizó la ecuación previamente mencionada para la Chi-cuadrada.

Como $P > 0.05$ concluimos que no hay diferencia de un grupo a otro, por lo que las frecuencias están muy parecidas en ambos grupos.

Las frecuencias observadas son el número de casos de Rotavirus positivos y negativo; las frecuencias esperadas se calculan a partir de los totales, con base en la hipótesis nula.

La distribución de Chi-cuadrada se usa en forma semejante a la binomial, pero su potencia aumenta cuando las frecuencias observadas no son pequeñas ($k \geq 5$).

$X^2 =$ Me dice que tan cercanos o alejados están los grupos. Si el valor es pequeño están cerca los grupos. Grande cuando están alejados.

CUADRO No. 9

INCIDENCIA DE ROTAVIRUS EN LAS ESTACIONES DEL AÑO						
Estación del año	ROTAVIRUS					
	Positivo		Negativo		Total	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Primavera	6	12.2	6	13.0	12	12.6
Verano	23	46.9	16	34.7	39	41.0
Otoño	14	28.5	18	39.1	32	33.6
Invierno	6	12.2	6	13.0	12	12.6
Total de casos	49	100.0	46	100.0	95	100.0

RESULTADOS DEL CUADRO No. 9

Se observó poca diferencia en las estaciones del año; las frecuencias fueron similares en las diarreas por bacteria o por el Rotavirus, aunque se ve un ligero aumento en la estación de otoño para el caso de bacterias y de verano para el Rotavirus.

Se utilizó la distribución de Chi-cuadrada, para ver las diferencias de un grupo a otro. La significancia estadística para la probabilidad se tomó de $P \leq 0.05$.

$$X^2 = 1.67 \quad P = 0.35$$

Se utilizó la ecuación previamente mencionada para la Chi-cuadrada.

Como $P > 0.05$, se dice que no es significativo, se ve que no hay diferencia de un grupo a otro, por lo que las frecuencias están muy parecidas de un grupo a otro.

Las frecuencias observadas son el número de casos de Rotavirus positivos y negativo; las frecuencias esperadas se calculan a partir de los totales, con base en la hipótesis nula.

La distribución de Chi-cuadrada se usa en forma semejante a la binomial, pero su potencia aumenta cuando las frecuencias observadas no son pequeñas ($k \geq 5$)

$X^2 =$ Me dice que tan cercanos o alejados están los grupos. Si el valor es pequeño están cerca los grupos. Grande cuando están alejados.

CUADRO No. 10

FRECUENCIA EN LAS EDADES DE LOS NIÑOS QUE DIERON ROTAVIRUS POSITIVO PARA LA TECNICA DE ELISA				
Edad en meses	Niño		Niña	
	Casos	%	Casos	%
0 a 3	0	0.0	2	14.28
4 a 7	6	33.3	2	14.28
8 a 11	3	16.6	3	21.4
12 a 15	5	27.7	4	28.5
16 a 19	3	16.6	2	14.28
20 a 23	0	0.0	1	7.14
24 a 27	1	5.5	0	0.0
Total de casos	18	100.0	14	100.0

RESULTADOS DEL CUADRO No. 10

Hay una ligera frecuencia en los meses de 4 a 7 meses y de 8 a 12 meses.

--

En la bibliografía estudiada se observó una semejanza con las frecuencias en la incidencia de los meses *(1, 40, 41)*.

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- Se observó que la Técnica de Rotazyme para la detección del Rotavirus en las heces fecales, para ver en que casos de diarrea el agente causal es un virus y así tener en consideración la presencia del virus en los casos de gastroenteritis.

Se valoró la presencia tanto del virus como las bacterias patógenas en los casos de diarrea, para ver sus frecuencias en ellas y se observó la comparación de los síntomas de la infección en los lactantes, para ver si hay diferencias en los casos de diarrea producida por bacterias patógenas y por el Rotavirus.

- 2.- Al comparar los estudios de las diarreas producidas por bacterias y por el Rotavirus, se observó que cuando las bacterias patógenas producen diarrea, hay menos riesgo de que esté presente el Rotavirus. Al obtener mayor grado de positividad de Rotavirus por la técnica de ELISA, hay menos presencia de bacterias patógenas en la diarrea. Por lo que se puede comentar que cuando la diarrea es por causa bacteriana es menos probable que se encuentre el Rotavirus ($P = 0.00002$). Se observó en el estudio, que de 3 diarreas con coprocultivo negativo, 2 eran causadas por el Rotavirus.
- 3.- Cuando se comparó la alimentación del lactante y el tipo de diarrea, se observó que el 56 % de los niños alimentados con seno materno fueron negativos al Rotavirus. De los niños que no fueron alimentados con seno materno el 46% resultó negativo al Rotavirus, aunque esto no fue significativo estadísticamente ($P = 0.16$). Sin embargo, se observó menor incidencia del Rotavirus cuando el niño fue alimentado con seno materno. Se puede pensar que es por la presencia de anticuerpos en la leche materna hacia el Rotavirus.

Se puede pensar que es por la presencia de anticuerpos en la leche materna hacia el Rotavirus.

- 4.- Al comparar la sintomatología de vómito en el niño, se observó que cuando el Rotavirus estuvo en la diarrea el 56 % de los niños presentaron vómito ($P=0.0515$). Cuando el niño fue a la prueba de ELISA Rotavirus negativo, el 66.7 % de los pacientes no tenían vómito. Por lo que puede decirse que cuando el niño presenta diarrea pero sin vómito es más probable que la diarrea no sea por Rotavirus.
- 5.- Se encontró que la temperatura corporal del niño era más elevada cuando la diarrea era producida por Rotavirus que por bacterias patógenas.
- 6.- En los casos de diarrea con Rotavirus se encontró con más frecuencia la rinitis. En la bibliografía hay pocos artículos de la asociación de síntomas de neumonía y rinitis y la presencia del Rotavirus, pero la asocian cuando la temporada es fría y el Rotavirus se encuentra en la diarrea.
- 7.- En la deshidratación no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos de niños, ya sea la causa de la diarrea por Rotavirus o por bacterias.
- 8.- En cuanto a las estaciones del año y la presencia de diarrea en los niños, ya sea por bacterias o por Rotavirus, se pudo observar una ligera elevación de diarreas en épocas de verano para el Rotavirus (41 %) y en otoño para las bacterias (33 %).

Se puede concluir que cuando el niño presenta diarrea, vómito, temperatura corporal alta, deshidratación y en varios casos también rinitis es más probable que la diarrea sea por causa de Rotavirus que por bacterias.

Se puede decir que los Rotavirus causan cuadros diarreicos severos que requieren hospitalización, como también diarreas benignas que se manejan en forma ambulatoria, con frecuencia variable, dependiendo de la edad del paciente, estados de nutrición, tipo de alimentación (leche materna ó industrializada) y/o la coexistencia de otros agentes enterales, o enfermedades a otro nivel sobre todo del árbol respiratorio.

En virtud de que se demostró que la técnica de ELISA Rotazyme para la determinación del Rotavirus es sensible y específica, considero que es útil en el uso de estudios de cuadros diarreicos.

VII.- GLOSARIO DE TERMINOS

Disacáridos.- Azúcares como la lactosa, sacarosa, maltosa y galactosa.

Hiponatremia.- Como la situación caracterizada por una concentración de sodio inferior a 130 mEq/L en suero c.n. 136 - 145 mEq/L.

Osmolaridad.- Sérica como el número de partículas por litro, se puede calcular por

$$2 (\text{Na meq/L}) + \frac{\text{Glucosa (mg/dl)}}{18} + \frac{\text{BUN (mg/dl)}}{2.8}$$

Rango normal: 285 - 295 mOsm/L

Rinitis.- Caracterizada por congestión vascular intermitente de la membrana mucosa nasal, permeabilidad anormal de las cavidades nasales.

Promedio.- Es un valor que es típico o representativo de un conjunto de datos, como tales valores tienden a situarse en el centro del conjunto de datos ordenados según su magnitud, los promedios se conocen como medida de centralización.

Variación o dispersión.- El grado en que los datos numéricos tienden a extenderse alrededor de un valor medio.

Desviación Típica.- (S) Es la raíz cuadrada del cuadrado medio de las desviaciones a la media, o raíz del cuadrado medio de las desviaciones.

Coefficiente de variación o coeficiente de dispersión.-

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{S}{\bar{X}} \quad \begin{array}{l} \text{(desviación)} \\ \text{(promedio de datos)} \end{array}$$

Fontanelas.- Son unas pequeñas zonas no osificadas que están en el cráneo del recién nacido. La fontanela anterior tiene forma de rombo y se localiza en la unión de los dos parietales con los dos frontales. Generalmente se cierran entre los 12 y los 18 meses de edad.

Llenado capilar.- Presionar con un dedo una zona de la piel, el área pasará de un color rosado a casi blanco. Una vez retirada la presión el color rosado debe recuperarse en uno o dos segundos.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Torregrosa L y J. Olarte. *Enfermedades Diarreicas en el Niño*, 9a. Edición. Ediciones Médicas del Hospital de México Federico Gómez, México, 1988.
- 2.- Raiman, H.A. y A. H. Price, "*The cause of epidemic diarrhea nausea and vomiting (viral dysentery?)*", Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **8**, pp 59-61, (1945).
- 3.- Gordon J. y S. K. Meneely, "*Clinical Laboratory Studies in experimentally induced epidemic no bacterial gastroenteritis*", J. Lab. Clin. Med., **41** pp 112-115 (1953).
- 4.- Ramírez Mayans J. A., *El Niño con Diarrea Crónica*, De. Interamericana, México, 1983.
- 5.- McNulty M.S., "*Review Article Rotavirus*", J. Virol., **40**, pp 1-18 (1978)".
- 6.- Flewett T. H. y A. S. Bryden, "*Diagnostic electron microscopy of faeces, I the viral flora of faeces as seen by elec. microscopy*", J. Clin. Path, **27**, pp 603-614, (1974).
- 7.- Bishop R.F. y G.P. Davidson, "*Virus Particles in Epithelial Cell of Duodenal Mucosa from Children with acute Non-bacterial gastroenteritis*", The Lancet, **8** pp 1281-1283 (1973).
- 8.- Bishop R. y G. P. Davidson, "*Detection of a New Virus by Electron Microscopy of Extracts from Children acute Gastroenteritis*", The Lancet, **2**, February, pp 149-151, (1974).
- 9.- Flewett T.H. y A.S. Bryden, "*Relation between Virus form Acute Gastroenteritis of Children and Newborn Calves*", The Lancet, **13**, July, pp 61-63 (1974).

- 9.- Flewett T.H. y A.S. Bryden, "*Relation between Virus form Acute Gastroenteritis of Children and Newborn Calves*", *The Lancet*, 13, July, pp 61-63 (1974).
- 10.- Flewett T.H. y H. Davies, "*Acute gastroenteritis associated with reovirus-Like particles*", *J. Clin. Path.*, 27, pp 608-614, (1974).
- 11.- Steinhoff M., "*Rotavirus: The First Five Years*", *The Journal of Pediatrics*", 96, No. 4, pp 611-622, (1980).
- 12.- Scientific working Group WHO, "*Rotavirus and other diarrheas*", *Bull. of the World Health Organization*, 58, No. 2 pp 184-198 (1980).
- 13.- Blacklow N.R., "*Viral Gastroenteritis*", *New England J. of Medicine*, 304, pp 397-406, (1981).
- 14.- Rodger S. y R.D. Schnagi, "*Biochemical and Biophysical Characteristics of Diarrhea Virus of Human and Calf origin*", *Journal of Virology*, 16, No. 5 pp 1229-1235, (1975).
- 15.- Woode G.N. y J.C. Bridger, "*Morphological and Antigenic Relationships between virus (Rotavirus) from acute Gastroenteritis of Children, Calves, Piglets, Mice and Foals*", *Infection and Immunity*, 14, No. 3 pp 804-810, (1976).
- 16.- Newman J.F. y F. Brown, "*Characterisation of a Rotavirus*", *Nature*, 258, No. 18 pp 631-633, (1975).
- 17.- Hruska J.F. y M.F. Notter, "*RNA polymerase associated with Human Rotavirus in Diarrhea stools*", *Journal of Virology*, 26, No. 2, pp 544-546, (1978).

- 18.- Both G.W. y J.S. Mattick, "*Serotype-specific Glycoprotein of Simian II Rotavirus; coding assignment and gene sequence*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, may, pp 3091-3095, (1983).
- 19.- Dyall M.L. y I. Lazdins, "*Location of the antigenic sites involved in Rotavirus serotype-specific neutralization*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, may, pp 3465-3468, (1986).
- 20.- Hoshino Y. y M. Sereno, "*Independent segregation of two antigenic specificities (VP₃ and VP₇) involved in neutralization of rotavirus infectivity*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, december, pp 8701-8704, (1985).
- 21.- Thouless M.E. y A.S. Bryden, T.H. Flewett, "*Serotypes of Human rotavirus*", The Lancet, **7**, january, pp 39, (1978).
- 22.- Pothier P. y J. Cohen, "*survey of Human rotavirus Propagation as studied by electrophoresis of Genomic RNA*", The Journal of Infectious Diseases, **149**, No. 5, pp 668-693, (1984).
- 23.- Gerna G. y N. Passarani, "*Characterization of serotypes of Human Rotavirus strains by solid-phase Immune electronmicroscopy*", The Journal of Infection Diseases, **52**, No. 6, pp 1143-1151, (1985).
- 24.- Blacklow N. y R. Dolin, "*Acute infectious Nonbacterial Gastroenteritis Etiology and Pathogenesis*", Annals of Medicine, **76**, pp 993-1008, (1972).
- 25.- Shodgrass D.R. y A. Ferguson, "*Small Intestinal Morphology and Epithelial cell*", Gastroenterology, **76**, pp 477-484, (1979).
- 26.- Davidson G. y G. Gall, "*Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets (Intestinal structure and Transport)*", The Journal of Clinical Investigation, **60**, december, pp 1402-1409, (1977).

- 27.- Kerzner M.H. y D.G. Gall, "*Transmissible Gastroenteritis: Sodio transport and the intestinal epithelium during the course of viral enteritis*", *Gastroenterology*, **72**, No. 3, pp 457-461, (1977).
- 28.- Sack D. y M. Rhoads, "*Carbohydrate malabsorption in infante with rotavirus diarrhea*", *The American Journal of Clinial Nutrition*, **36**, december, pp 1112-1118, (1982).
- 29.- Holmes I.H. y S.M. Rodger, "*Is lactase the receptor and uncoating enzime for infantile enteritis (rota) viruses?*", *The Lancet*, **26**, pp 1387-1388, (1978).
- 30.- Greenberg H.B. y R.L. Gehard, "*Antibodies to viral Gastroenteritis viruses in Crohns disease*", *Gastroenterology*, **76**, No. 2, pp 349-351, (1979).
- 31.- Parrino T. y D. Schreber, "*Clinical immunity in acute Gastroenteritis caused by Norwalk agent*", *The New Englad Journal of medicine*, **297**, No. 2 pp 86-89, (1977).
- 32.- Bishop R.F. y L. Barnes", "*Clinical Immunity after neonatal rotavirus infection*", *The new England Journal of Medicine*, **309**, No. 2 pp 72-76, (1983).
- 33.- Corthier G. y P. Vannier, "*Production of Coproantibodies and Immune complexes in piglets infected with rotavirus*", *The Journal of Infectious iseases*, **147**, No. 2 pp 293-296, (1983).
- 34.- Cook D.A. y A. Zbitnew, "*Detection de antibody to rotavirus by counterinmuno electrophoresis in human serum, colostrum and milk*", *The Journal of Pediatrics*, **93**, No. 3, pp967-969, (1978).
- 35.- Yolken R. y R. Wyatt, "*Secretory antibody directed againt rotavirus in Human milk-measuremente by means of enzymelinked inmusorbent assay*", *The Journal of Pediatrics*, **93**, No. 6, pp 916-921, (1978).

- 36.- Matthews T.H. y M.K. Lawrence, "*Antiviral activity in milk of possible clinical importance*", *The Lancet*, **25**, pp 1387-1389, (1976).
- 37.- Ogra S.S: y D. Weintraub, "*immunologic aspects of Human colostrum and milk gastrointestinal tract of the Newborn*", *The Journal of Immunology*, **119**, No. 1, pp 245-248, (1977).
- 38.- Rodríguez W. y H.W. Kim, "*Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agente in infants and young children*", *The Journal of Pediatrics*, **91**, No. 2, pp 188-193, (1977).
- 39.- Dearlove J y P. Latham, "*Clinical range of neonatal rotavirus gastroenteritis*", *British Medical Journal*, **286**, pp 1473-1475, (1983).
- 40.- Champsaur H. y M.E. Amar, "*Rotavirus Carriage, asyntomatic infection and Disease in the Firts two years of Life 1. Virus shedding*", *The Journal of Infectious Diseases*, **149**, No. 5, pp 667-672, (1978).
- 41.- Champzaur H. y M.E. Amar, "*Rotavirus carriage, asyntomatic infection and Disease in the firts years of life II. Serological response*", *The Journal Infectious Diseases*, **149**, No. 5, pp 675-682, (1984).
- 42.- Muñoz O. y P. Coellos, "*Gastroenteritis infecciosa aguda, etiología y su correlación con las manifestaciones clínicas y el moco fecal*", *Arch. Invest. Med. (mex)*, **610**, pp 135-145, (1979).
- 43.- Espinoza E.L. y J Colorado, "*Frecuencia de gastroenteritis infecciosa aguda por Rotavirus en niños de diversas poblaciones de la República Mexicana*", *Bol. Med. Hosp. Infantil Mes.*, **40**, No. 4, pp 188-191, (1983).
- 44.- Hierber J.P. y s. Shelton, "*Comparason of human rotavirus Disease in tropical and temperate setting*", *Am. J. Dis. Child.*, **32**, pp 853-858, (1978).

- 45.- Konno T. y H. Suzuki, *"Influence of temperature and relative humidity on human Rotavirus infection in Japan"*, The J. of Infectious Disease, **147**, No. 1, pp 125-128, (1983)
- 46.- Sack D. y A. Eusof, *"Oral hidratación in rotavirus diarrhea; a Doble blind comparason of sucrose with glucosa electrolyte solution"*, The Lancet, **5**, pp 280-282, (1978).
- 47.- Scientific working Group WHO, *"Nomenclature of humanrotaviruses Designation of Subgroup and Serotypes"*, Bull. of the World Health Organization, **62**, No. 3, pp 501-503, (1984).
- 48.- Ward R., y D. Bernstein, *"Effects of Antibody to Rotavirus on Protection of adults challenged with a human Rotavirus"*, The Journal of Infectious Diseases, **159**, No. 1, pp 79-87, (1989).
- 49.- Vesikari T. y E. Isolauri, *"Increased take rate of oral rotavirus vaccine in infants after milk feeding"*, The Lancet, **22**, pp 700 (1984).
- 50.- Kapikian A. y J. Flores, *"Rotavirus: The major etiologic agent of severa Infantile Diarrhea may be controllable by a "Jennerian" approach to vaccination"*, The J. of Infectious Disease, **153**, No. 5, pp 815-821, (1986).
- 51.- Anderson E. y R. Belshe, *"Evaluation of Rhesus vaccine (MMU 18006) in infants and young children"*, The J. of Infectious Disease, **153**, No. 5, pp 823-831, (1986).
- 52.- Voller A y A. Bartlett, *"Enzyme immunossays with special reference to Elisa technique"*, Jounal of Clinical Patology, **31**, pp 507-520, (1978).
- 53.- Wisdom B, *"Enzyme - Immunoassay"*, Clin-Chem., **22**, No. 8 pp 1243-1255, (1976).

- 54.- Alvarez M.T. y colb., "*Comparación de las Técnicas de Electroforesis del RNA viral, Elisa y Fijación de Complemento con la Microscopia Electrónica para demostrar Rotavirus*". Arch. Invest. Med. (Mex), **13**, pp 145-1550, (1982).
- 55.- Rubenstein A. y M. Miller, "*Comparison of an Enzyme Immunoassay with Electron microscopic procedures for Detecting Rotavirus*", Experimental Biology and Electron Microscopy Laboratories, Abbot Laboratories, North Chicago ILL 60064.
- 56.- Yolken R. y F. Leisterm "*Evaluation of Enzyme Immunoassays for detection of Human Rotavirus*", The Journal of Infectious Diseases, **144**, No. 4, pp 145 (1981).
- 57.- Ekins R., "*Elisa; A replacement for Radioimmunoassays?*", The Lancet, **11**, pp 569-570, (1976).
- 58.- Engvall E. y P. Perlmann, "*II. Quantitativa Assay of Protein antigen, immunoglobuling G, by means of Enzyme-Labelled and antibody-coated tubes*", Biochimica et Biophysica acta, **251**, pp 427-434, (1971).
- 59.- Beards G.M. y A. Bryden, "*Evaluation of New enzyme-linked immunosorbent assay test for rotavirus antigen in faeces*" J. Clin. Pathol., **34**, pp 1388-1391, (1981).
- 60.- Quantum I, *Analizador de doble longitud de onda*, Manual del operador., México, Lab. Abbot, (1982).
- 61.- Boyer L Myrback, "*The Enzymes*". Kinetic thermodynamics mechanian basic propities, Second Edition, New York, (1978).
- 62.- Devore G. y E. Muñoz Mena, *Química Orgánica*, 5 de. Publicaciones Cultural S.A. Mex. 1982.

- 63.- Lenz del Rio A., *Química Orgánica Elemental*, 4 de. De. Patria, Mex., (1979).
- 64.- Van Weemen y A. Schuurs, "*Inmunoassay using antigen-enzyme conjugates*", *Febs Letters*, 15, No. 3, pp 232-235, (1971).
- 65.- Nakane P. y A. Kawaoi, "*Peroxidase-Labelled antibody a new method of conjugation*", *The J. of Histochemistry and Cytochemistry*, 22, No. 12, pp 1084-1091, (1974).
- 66.- Boorsma D.M. y G.L. Kalsbeek, "*A comparative study of Horseradish Peroxidase conjugates prepared with a one-step and a two-step method*", *The Journal of Histochemistry and cytochemistry*, 23 No. 3, pp 200-207, (1975).
- 67.- Omira K. y T. Matsuura, "*The Hydroxilation of phenolls by the photo-decomposition of Hydrogen Peroxide in aquesus media*", *Tetrahedron*, 24, pp 3475-3487, (1968).
- 68.- Wayne W.D., *Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud*, cuarta reimpresión, Limusa, Mex. (1983).
- 69.- Murray R. Spiegel, *Estadística*, Libros McGraw-Hill de Mex. (1978).
- 70.- Ramos Galván, *Alimentación normal en niños y adolescentes*, Primera edición, Manual moderno, Mex. (1985)

