

DIAGNOSTICO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA Y PRUEBA DE LATEX DE LA ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA POR ROTAVIRUS

HOSPITAL PEDIATRICO DOCENTE DE CENTRO HABANA

Dr. Raúl L. Riverón Corteguera,* Dra. Olga Lidia Zarragoitia Rodríguez,** Dr. Humberto Horta Fernández,*** Lic. Alexandra de Bernard,**** Lic. Marta M. Comellas,***** Dr. José González Hernández***** y Dra. Daris González Hernández*****

RESUMEN

Durante el periodo de octubre a diciembre de 1986 se procedió a realizar estudios virológicos por microscopia electrónica y con látex (ROTALEX) a 64 pacientes ingresados en el Servicio de Enfermedades Diarreicas Agudas del Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana. Se procedió a recoger las heces de los pacientes y un número de ellas (37) se envió al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) para su estudio por microscopia electrónica y 27 se procesaron en el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM); se utilizó ROTALEX de la firma Orion de Finlandia. Los resultados encontrados fueron los siguientes: el 48,6 % de las muestras de heces examinadas por microscopia electrónica y el 52,0 % de las que fueron estudiadas con ROTALEX fueron positivas a rotavirus. Hubo 4 muestras repetidas que se estudiaron por ambos métodos, y se encontró el 50,0 % de positividad. El 56,2 % de los pacientes con diarreas por rotavirus pre-

* Profesor Auxiliar. Jefe del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina "General Calixto García". Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana.

** Asistente del Departamento de Pediatría. Facultad de Medicina "General Calixto García". Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana.

*** Especialista en Bioestadística. Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana.

**** Departamento de Virología. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM).

***** Licenciada en Bioquímica. Centro de Investigaciones Biológicas.

***** Médico Interno. Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana.

sentó infecciones mixtas asociadas con bacterias y parásitos; el 25,0 % se asoció con *Giardia lamblia* y el 12,5 % se asoció con varios serotipos de *E. coli* enteropatógena. Todos los pacientes estudiados procedían de los distintos municipios de Ciudad de La Habana. El 56,2 % de los pacientes era menor de 7 meses y de éstos, el 25,0 % era menor de 3 meses. El 62,5 % correspondía al sexo masculino. El 18,8 % de los padres de los pacientes era menor de 20 años y el 93,8 % de ellos tenía un nivel educacional por encima del noveno grado. La diarrea se presentó en el 100 % de los pacientes positivos a rotavirus, como único síntoma en el 37,5 %; y asociada con vómitos y fiebre en el 31,2 %. Se destaca la alta positividad de los rotavirus como agente causal de diarrea, lo cual debe ser un elemento que oriente al pediatra para no prescribir antimicrobianos en el tratamiento de las diarreas, hasta no demostrar la presencia de otro tipo de infección en el paciente.

INTRODUCCION

Los avances alcanzados en los últimos 15 años en el campo de la Microbiología, han permitido identificar a los agentes virales como los principales causantes de diarrea aguda en los niños menores de 2 años de edad.^{1,3} Dentro de este grupo de agentes virales, los rotavirus han surgido como el grupo individual más importante de los agentes patógenos entéricos que causan diarreas en todo el mundo, tanto en los países desarrollados como en los subdesarrollados, principalmente en los niños menores de 2 años.^{4,6} El hallazgo de agentes víricos de 70 nm de diámetro, expresado casi simultáneamente por diferentes autores,^{7,9} ha permitido esclarecer la causa de muchas diarreas que eran diagnosticadas como inespecíficas.¹⁰ A partir del descubrimiento de los rotavirus, los mismos se han encontrado en todos los lugares donde han sido investigados: Australia, Inglaterra, Estados Unidos de América, Bangladesh, México, Costa Rica, Canadá, Unión Soviética, Argentina y otros muchos.

Los estudios realizados en dichos países ofrecen una incidencia que fluctúa entre el 15 y el 70 % en niños menores de 5 años.^{11,12} Los estudios realizados en Venezuela muestran una prevalencia del 30 al 40 % en niños hospitalizados por diarreas agudas.^{13,14} En los países escandinavos es el principal agente causal de diarrea aguda en la infancia.¹⁵ En la actualidad se cuenta con una serie de medios para estudiar los rotavirus, los cuales han sido de gran utilidad para el desarrollo de la Clínica Pediátrica; entre ellos, destacar la microscopia electrónica, la inmunomicroscopia electrónica, el ensayo inmunoabsorbente enzima conjugada (ELISA), posiblemente el método de más amplio uso; la contrainmunolectroforesis en gel de agarosa, la prueba de látex y el gel de poliacrilamida, entre otros.

Nosotros realizamos este trabajo basados en el estudio de un número limitado de pacientes con microscopia electrónica y otro grupo con la prueba de látex.

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 64 pacientes menores de 2 años, procedentes de los distintos municipios de Ciudad de La Habana, que ingresaron en el Servicio de Enfermedades Diarreicas Agudas del Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana durante el periodo de octubre a diciembre de 1986.

El objetivo de este estudio fue determinar la incidencia de rotavirus en menores de 2 años por diferentes métodos (microscopia electrónica y prueba de látex), así como conocer los agentes causales bacterianos o parasitarios asociados.

Las muestras de heces fueron recogidas en recipientes plásticos, cuyo contenido era superior a 1 g. Un grupo de estas muestras (37) se envió al Centro de Investigaciones Biológicas, donde se realizó el procesamiento de dilución de las muestras que fueron observadas en el microscopio electrónico del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC). El otro grupo de muestras (27) se envió al Departamento de Virología del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM), donde se hizo la identificación de los rotavirus mediante el test de aglutinación por látex. Para realizar esta prueba se utilizó un kit de ROTALEX de la firma Orion Diagnostic Espoo de Finlandia.¹⁶

Los datos utilizados en esta investigación fueron recogidos por interrogatorio directo a las madres, en cuestionarios que registraban los datos de identidad personal, procedencia, edad, sexo, color de la piel, edad y escolaridad de la madre y motivo de ingreso. Posteriormente se procedió a registrar los resultados provenientes de la identificación de los rotavirus por microscopia electrónica y por la prueba de aglutinación de látex y además se registraron los resultados de los coprocultivos y los coproparasitológicos, para conocer los agentes bacterianos y parasitarios asociados con los rotavirus. Las muestras de heces para estudios bacteriológicos y parasitológicos, fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana.

Los datos recogidos fueron registrados en hojas columnares para elaborar las tablas y los gráficos y realizar su análisis y posterior comparación con la literatura médica mundial.

RESULTADOS

En la tabla 1 se aprecia que el 46,8 % de los pacientes portadores de rotavirus procedían de las áreas de atracción del hospital, y el 53,2 % fue de los demás municipios de Ciudad de La Habana. El 56,2 % de los pacientes positivos a rotavirus tenía 6 meses o menos, y el 31,3 % tenía entre 7 y 12 meses. El 37,5 % se encontraba por encima del año (figura 1). Predominó el sexo masculino en el 62,5 % de los pacientes con diarreas por rotavirus (figura 2).

TABLA 1. Municipios de procedencia

Municipios	Rotavirus		Negativos		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Centro Habana	8	25,0	7	21,8	15	23,4
Habana Vieja	7	21,8	9	28,2	16	25,0
Otros municipios	17	53,2	16	50,0	33	51,6
Total	32	100,0	32	100,0	64	100,0

Fuente: Datos recogidos de los cuestionarios de la investigación.

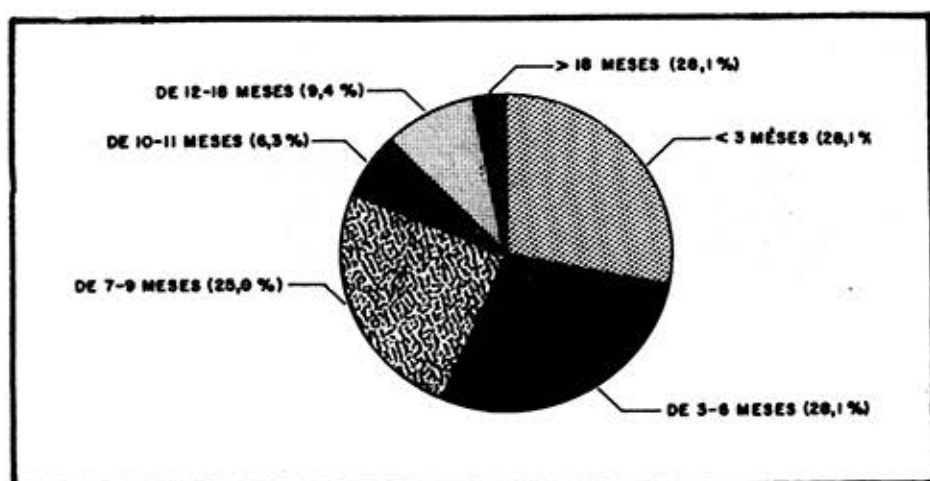


FIGURA 1. Distribución por grupos de edades.

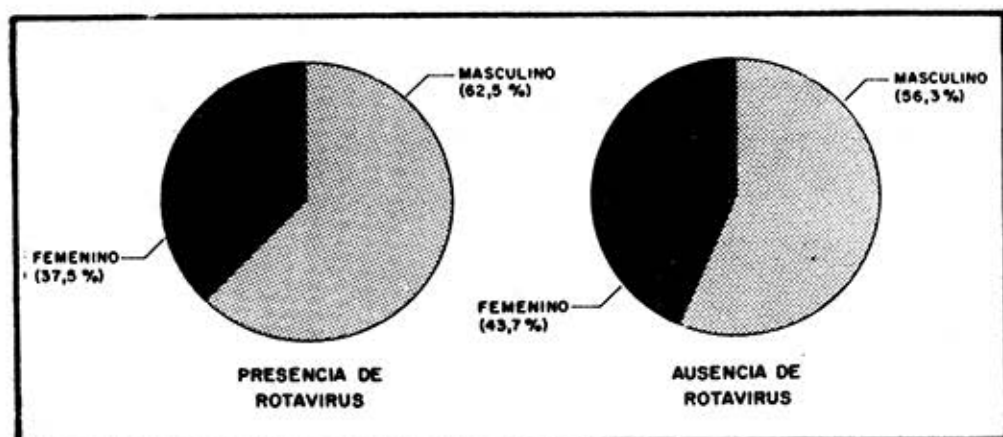


FIGURA 2. Sexo.

El color de la piel predominante fue el blanco, tanto en los pacientes positivos como en los negativos o rotavirus. En los que presentaron rotavirus fue del 60,8 % mientras que el 31,2 % eran mestizos y negros (figura 3).

El 18,8 % de las madres cuyos hijos contrajeron diarreas por rotavirus tenía menos de 20 años de edad, y se concentró el mayor número de pacientes en el grupo de madres de 10 a 30 años de edad (tabla 2). El 93,8 % de las madres tenía una escolaridad superior a secundaria, y de éstas, el 53,2 % era de graduadas de preuniversitario o universitarias (tabla 3), lo que coincide con la estructura educacional de la población de Ciudad de La Habana.

En relación con el motivo de ingreso, la diarrea soia o asociada con vómitos y fiebre estuvo presente en el 100 % de nuestros pacientes. La triada diarreas, vómitos y fiebre se observó en la tercera parte de los

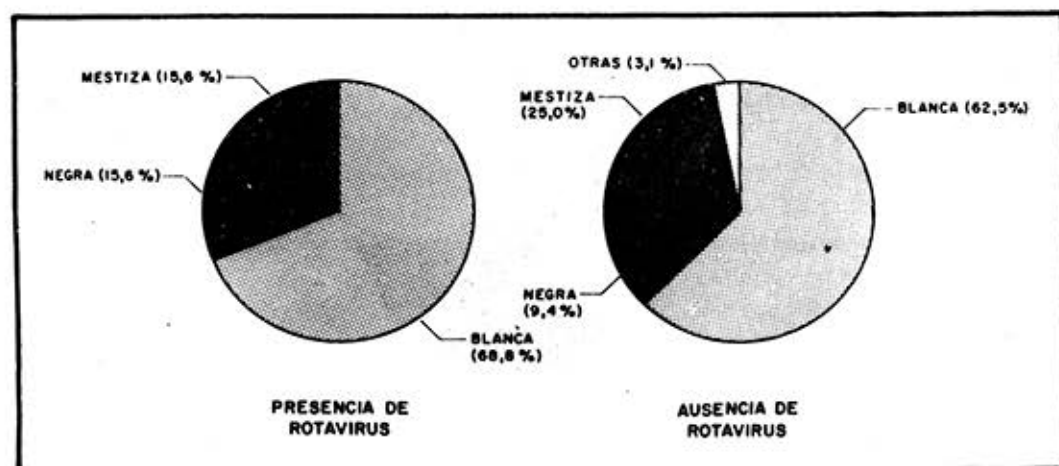


FIGURA 3. Color de la piel.

TABLA 2. Edad de la madre

Edad	Rotavirus		Negativos		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Menos de 20 años	6	18,8	5	15,6	11	17,2
20 - 30 años	20	62,4	19	59,4	39	60,9
Mayores de 30 años	6	18,8	8	25,0	14	21,9
Total	32	100,0	32	100,0	64	100,0

Fuente: Datos recogidos de los cuestionarios de la investigación.

pacientes encuestados (figura 4), lo cual coincide con lo reportado en la literatura mundial.

En la tabla 4 se observa cómo por microscopia electrónica se registró el 48,6 % de positividad a rotavirus, y por la prueba de látex la positividad fue del 51,9 %; al agrupar ambos métodos se halló el 50,0 % de positividad a rotavirus.

Para concluir nuestro estudio, agrupamos algunos agentes bacterianos y parasitarios que se asociaron con rotavirus como se muestra en la figura 5, los rotavirus aislados se encontraron en el 42,8 % de los pacientes, asociados con *Giardia lamblia* en el 25,0 % y con *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) en el 12,5 %. También en una menor incidencia se asociaron

TABLA 3. Escolaridad de las madres

Escolaridad	Rotavirus		Negativos		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Primaria	2	6,2	5	15,6	7	10,9
Secundaria	13	40,6	12	37,5	25	39,1
Preuniversitario	11	34,4	9	28,1	20	31,2
Universitaria	6	18,8	6	18,8	12	18,8
Total	32	100,0	32	100,0	64	100,0

Fuente: Datos recogidos de los cuestionarios de la investigación.

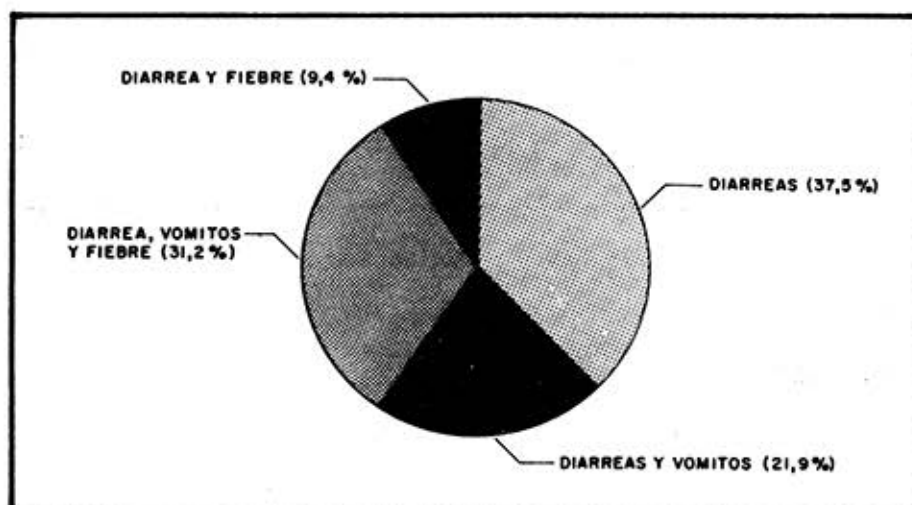


FIGURA 4. Motivo de ingreso.

con la *Entamoeba histolítica* en el 9,4 % y en una menor proporción con la *Entamoeba histolítica*, la *Salmonella* y la *Shigella*.

TABLA 4. Positividad según medio de diagnóstico

Medio de diagnóstico	Rotavirus				Total	
	Positivo		Negativo			
	No.	%	No.	%	No.	%
Microscopia electrónica	18	48,6	19	51,4	37	100,0
ROTALEX	14	51,9	13	48,1	27	100,0
Total	32	50,0	32	50,0	64	100,0

Fuente: Datos recogidos de los cuestionarios de la investigación.

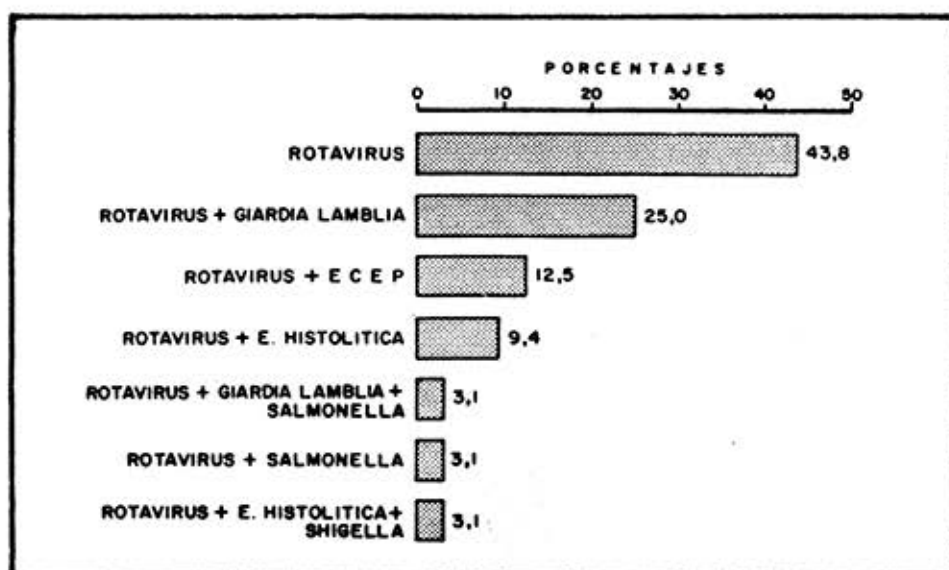


FIGURA 5. Agentes bacterianos y parasitarios asociados con rotavirus.

DISCUSION

Los rotavirus son considerados una de las principales causas de muerte asociada con diarreas en la infancia. Se estima que anualmente fallece en el mundo 1 millón de niños por diarreas producidas por rotavirus. ^{16,20}

Teniendo en cuenta el aumento de la morbilidad por enfermedades diarreicas agudas que se presenta en los meses de invierno en nuestro país, y que en ocasiones resulta superior a la que tradicionalmente se presenta en

los meses de verano, nos propusimos realizar este estudio de octubre a diciembre de 1986. La incidencia del 48,6 % de rotavirus por microscopia electrónica y del 51,9 % en la prueba de látex, son cifras comparables con otros estudios realizados en otros países. En Venezuela se encontró una positividad del 73 % de rotavirus por microscopia electrónica.¹³ En México, sin embargo, Espejo encontró sólo el 25 % de positividad por microscopia electrónica en 242 pacientes estudiados.²¹ En Italia, en un estudio de 70 niños, se encontró una incidencia de 40 % de rotavirus.²² Estudios realizados en un hospital de maternidad de Caracas en 1982, dieron por resultado una incidencia de 57 %.²³

En Cuba se han realizado algunos trabajos en pacientes ingresados por enfermedades diarreicas agudas en determinados meses del año, y se han registrado cifras del 20 al 30 % menores que las encontradas en esta investigación.^{24,25} Alvarez et al. realizaron un estudio entre noviembre de 1985 a enero de 1986 en Ciudad de La Habana, con la prueba de aglutinación de látex y encontraron el 46,6 % de positividad a rotavirus, lo cual fue muy similar a nuestros resultados.²⁶

En esta investigación hubo un predominio de los pacientes de 6 meses y menos, lo cual está de acuerdo con lo que plantean algunos autores.^{27,28} Sin embargo, otros señalan una mayor incidencia en el grupo de mayores de 6 meses.^{1,29} El sexo predominante fue el masculino, con lo cual coincidimos con algunos autores que señalan un predominio del sexo masculino hasta el 20 % mayor que en el femenino.²⁹

Los hallazgos que predominaron desde el punto de vista clínico en nuestra investigación fueron: la diarrea, el vómito y la fiebre como triada característica de los rotavirus. Champasaur encontró manifestaciones clínicas similares.³⁰

La asociación de los rotavirus con otros agentes patógenos entéricos se ha encontrado en infecciones mixtas. En ellas habría que determinar cuál de los agentes asociados ha sido el causante de la diarrea o si existe sinergismo entre los mismos, que provoque el desenlace de la enfermedad.^{31,32}

En nuestra casuística, el mayor número de pacientes presentó como agente causal aislado a los rotavirus. Cuando éstos se asociaron con otros patógenos intestinales, lo hicieron con la *Giardia lamblia* y con la *E. coli* enteropatógena en su mayoría.

Consideramos de un gran valor la determinación de la causa viral de la diarrea, pues esto determina el no uso de antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades diarreicas agudas y el manejo con sales de rehidratación oral y medidas dietéticas. Tanto la microscopia electrónica como la prueba de aglutinación por látex contribuyen eficientemente a detectar los rotavirus, aunque pensamos que la prueba de látex resulta más apropiada en nuestro medio por su fácil manejo.

SUMMARY

Virologic studies by electronic microscopy and latex (ROTALEX) were performed to 64 patients hospitalized at the Centro Habana Teaching Pediatric Hospital, Department of Acute Diarrheic Diseases, from October to December, 1986. Feces of patients were collected and some of those samples (37) were sent to the Center of Biologic Researches (CBR) to be studied by electronic microscopy and 27 were studied at the National Institute of Hygiene, Epidemiology and Microbiology (NIHEM); ROTALEX from ORION, in Finland, was used. Results found were as follows: 48.6 % of feces samples examined by electronic microscopy and 52.0 % of those examined with ROTALEX, were positive to rotavirus. There was four repeated samples, which were studied by both methods, and 50.0 % positiveness was found. Of the patients with diarrheas caused by rotavirus, 56.2 % presented mixed infections associated with bacteria and parasites; 25 % was associated with *Giardia lamblia* and 12.5 % with various serotypes of enteropathogen *E. coli*. All the patients under study came from different municipalities of Havana City; 56.2 % of the patients were less than seven months and of them 25.0 % were less than three months, and 62.5 % corresponded to male sex. Of the patients' parents, 18.8 % were less than 20 years and 93.8 % of them had a school level higher than ninth grade. Diarrhea occurred in 100 % of positive diarrheic patients, as single symptom in 31.2 % and associated with vomiting and fever in 31.2 %. High positiveness of rotavirus as causal diarrheic agent is pointed out, therefore, it must be an element guiding pediatricians in not prescribing antimicrobials for treating diarrheas, until presence of other type of infection is demonstrated.

RESUME

Pendant la période allant d'octobre à décembre 1986, les selles de 64 enfants admis dans le Service de Maladies Diarrhéiques Aiguës de l'Hôpital Pédiatrique Universitaire de la municipalité Centro Habana ont été soumises à des études virologiques en microscopie électronique et au latex (ROTALEX). Trente-sept échantillons ont été envoyés au Centre des Recherches Biologiques (CIB) pour leur étude en microscopie électronique et 27 ont été examinés à l'Institut National d'Hygiène, d'Epidémiologie et de Microbiologie (INHEM) par le test au latex (ROTALEX, de la maison ORION de Finlande). Les résultats obtenus ont été les suivants: 48,6 % des échantillons de selles examinés en microscopie électronique et 52,0 % des échantillons étudiés au ROTALEX ont été positifs aux rotavirus. Quatre échantillons répétés ont été étudiés par les deux méthodes et ils ont montré 50,0 % de positivité. Sur le total de malades avec des diarrhées à rotavirus 56,2 % a présenté des infections mixtes associées à des bactéries et à des parasites; 25,0 % était associé à *Giardia lamblia* et 12,5 % était associé à divers sérotypes de *E. coli* entéropathogène. Tous les malades étudiés provenaient des différentes municipalités de La Havana-Ville. Il est à signaler que 56,2 % des malades était âgé de moins de 7 mois, dont 25,0 % était au-dessous 3 mois. En ce qui concerne le sexe 62,5 % correspondait au sexe masculin. Les parents des enfants étaient âgés de moins de 20 ans dans 18,8 % des cas et 93,8 % avait un niveau scolaire supérieur au novième degré. Tous les malades dont les résultats des examens ont été positifs aux rotavirus ont présenté des diarrhées, étant le seul symptôme dans 31,2 % des cas et associées à des vomissements et à de la fièvre dans 31,2 %. Il est à souligner la haute positivité des rotavirus en tant qu'agent étiologique de la diarrhée, ce qui constitue un élément sur lequel compte le pédiatre pour ne pas indiquer des antimicrobiens dans le traitement des diarrhées jusqu'à ce que la présence d'un autre type d'infection ne soit pas démontrée.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Rotavirus and other viral Diarrhoeas. WHO Scientific Working Group. Bull WHO 58: 183, 1980.
2. _____: Scientific Working Group on Viral Diarrhoeas. Recent advances in Knowledge of Rotavirus Diarrhoea. Report of the Second Meeting of Scientific Working Group on Viral Diarrhoeas: microbiology. Epidemiology, Immunology and vaccine Development. Geneva, Switzerland, Feb., 1982.
3. _____: Report of the Third Meeting of the Scientific Working Group of Viral Diarrhoeas. WHO/CDD/VID/84.4. Geneva, Switzerland, 1984.
4. BLACKLOW, N. R.; G. CUCKOR: Viral gastroenteritis. N Engl J Med 304: 397, 1981.
5. PENICKER, C. K. J. ET AL.: Rotavirus and Diarrhoeal disease in children in a southern Indian coastal town. Bull WHO 60: 123, 1982.
6. SCHCREIBER, D. S.; K. S. TRIER; N. R. BLACKLOW: Recent advances in viral gastroenteritis 73: 174, 1977.
7. BISHOP, R. F. ET AL.: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet 2: 1281, 1973.
8. FLEWETT, T. H. ET AL.: Virus particles in Gastroenteritis. Lancet 2: 1947, 1973.
9. _____: Diagnostic electron microscopy of faeces. I. The viral flora of the faeces as seen by electron microscope. J Clin Pathol 27: 603, 1974.
10. SIMMON, A. ET AL.: Diagnóstico de rotavirus por microscopia electrónica y ensayo inmunosorbente enzima conjugada (ELISA). Bol Of Sanit Panam 86: 391, 1979.
11. GEENBERG, H. B. ET AL.: Perspective in Virology. In: New Insights in Viral Gastroenteritis. Allan R. Lise Inc. New York, 1981, pp. 163-187.
12. KAPIKIAN, A. Z. ET AL.: Viral Diarrhoea: Etiology and Control. Am J Clin Nutr 31: 2219, 1978.
13. ESPARZA, J. ET AL.: Rotaviruses M. Venezuelan children with Gastroenteritis. Am J Trop Med Hyg 26: 148, 1977.
14. VIERA, B. ET AL.: Epidemiological aspects of Rotavirus Infection in hospitalized Venezuelan children with Gastroenteritis. Am J Trop Med Hyg 27: 567, 1978.
15. MAKI, M.: A prospect clinical study of Rotavirus Diarrhoea in young children. Acta Paediatr Scand 70: 107, 1981.
16. BRICOUT, F.; J. C. NICOLAS: Essais de Detection des Rotavirus humains dans les selles au moyen du test Rotalex (Orion). Feuilletts Biol 24: 6, 1985.
17. DAVIDSON, G. P. ET AL.: Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. Lancet 1: 242, 1975.
18. CARLSON, J. A. F. ET AL.: Fatal Rotavirus Gastroenteritis: an analysis of 21 cases. Am J Dis Child 132: 477, 1978.
19. VESIKARI, T. ET AL.: Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain Rit 4237 in adult and young children. Lancet 2: 807, 1983.
20. DUPONT, H. I.: Rotavirus gastroenteritis- Some recent developments. J Infect Dis 149: 663, 1984.
21. ESPEJO, R. T. ET AL.: Presence of two distinct types of Rotavirus in infant and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico City 1977. J Infect Dis 139: 74, 1979.
22. CLEMENTI, M. ET AL.: Diagnosis of Human Rotavirus Infection: comparison of an electrophoretic method, a modified Complement Fixation Test and Electron Microscopy for Rotavirus Detection. Arch Virol 67: 341, 1981.
23. PEREZ-SCHAEEL, I. ET AL.: Rotavirus Shedding by Newborn children. J Med Virol 14: 127, 1984.

24. MAS LAGO, P. ET AL.: Investigación de Rotavirus en casos de Gastroenteritis. Bol Epidemiol (INHEM) 4: 67, 1982.
25. ESQUIVEL RIVERO, M. ET AL.: Aplicación de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida para el diagnóstico de rotavirus. Trabajo de Terminación de Residencia. La Habana, abril, 1984.
26. ALVAREZ, M. ET AL.: Estudio clinicoepidemiológico de un grupo de niños con diarreas por rotavirus. Ciudad de La Habana, 1986. Rev Cubana Hig Epidemiol (en prensa).
27. DEWILDE, A. ET AL.: Incidence virales dans les diarrhées de l'enfant. Ann Pediatr 30: 422, 1983.
28. PETITJEAN, J. ET AL.: Infection a Rotavirus chez le nouveau-ne' enquete epidemiologique. Ann Pediatr 34: 111, 1987.
29. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD: Los Rotavirus. Bol Epidemiol 3: 12, 1982.
30. CHAMPASAU, H. E. ET AL.: Rotavirus carriage, asymptomatic infection and disease in the first two years of life. II Serological response. J Infect Dis 149: 675, 1984.
31. MATA, L. ET AL.: Epidemiology of Rotavirus in a cohort of 45 Guatemalan Mayan Indians observed from birth to the age of three years. J Infect Dis 148: 452, 1983.
32. LINARES, A. C. ET AL.: Acute diarrhoeal associated with Rotavirus among children living in Belen. Trans-Royal Met Hyg 77: 212, 1983.

Recibido: 12 de abril de 1988. Aprobado: 25 de mayo de 1988.

Dr. Raúl Riverón. Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana. Benjumeda y Morales s/n. Ciudad de La Habana 10300, Cuba.