

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Microbiología**



**GASTROENTERITIS AGUDA EN NIÑOS DEL ÁREA  
SANITARIA IX DE MADRID: ANÁLISIS  
MICROBIOLÓGICO, CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO DE  
LA PATOLOGÍA ASOCIADA AL VIRUS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Isabel Wilhelmi de Cal

Bajo la dirección de los doctores

Francisco Soriano García

Alicia Sánchez Fauquier

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-2086-2**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**TESIS DOCTORAL**

**GASTROENTERITIS AGUDA EN  
NIÑOS DEL AREA SANITARIA  
IX DE MADRID**

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO, CLÍNICO Y  
EPIDEMIOLÓGICO DE LA PATOLOGÍA  
ASOCIADA A VIRUS.

**ISABEL WILHELMI DE CAL**  
Madrid, junio 2001

A mis padres, por su apoyo incondicional y su paciencia.

A todos mis hermanos y a mis sobrinos,  
por estar siempre a mi lado.

# AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que con su ayuda han hecho posible la realización de esta tesis y en especial:

Al **Dr. Francisco Soriano García**, jefe de Servicio de Microbiología de la Fundación Jiménez Díaz, con quien me formé en la especialidad de Microbiología y Director de esta tesis, por su inestimable ayuda en la realización de la misma.

A la **Dra. Alicia Sánchez Fauquier**, Jefe de Sección de Virus productores de gastroenteritis del Centro Nacional de Microbiología y Codirectora de esta tesis, ya que sin su estímulo constante, sus ideas, sus consejos y el entusiasmo que ha sabido infundir en todo momento, no hubiera sido posible la realización de este trabajo. En el Laboratorio de su Sección se ha realizado la mayor parte de este trabajo.

Al **Dr. Carlos Domingo**, ya que fue durante el tiempo de su dirección del Centro Nacional de Microbiología cuando se realizó este trabajo.

A la **Dra. Enriqueta Román** y a todo el Servicio de Pediatría del Hospital Severo Ochoa, en especial a la Unidad de Lactantes por su constante ayuda a lo largo de todo el estudio.

A todos mis compañeros del Servicio de Microbiología, **Dres. Soledad Cuétara, Mar Páez, Pilar Reyes, Aurelio Velasco**, por haberme facilitado y animado en todo momento y muy en especial al **Dr. Manuel del Alamo** por la realización desinteresada del análisis estadístico de este estudio así como por sus enseñanzas sobre ello.

A la **Dra. Rosa M<sup>a</sup> Moreno**, investigadora y a **D. Eusebio Cubero**, de la Sección de Virus productores de gastroenteritis del Centro Nacional de Microbiología, por su contribución desinteresada y en todo momento, en la realización de este estudio, así como a la **Dra. P. Pérez Breña**, Jefe del Servicio de Virología.

Al **Dr. Javier Colomina** del Servicio de Microbiología del Hospital de la Ribera de Alcira, Valencia, a quien agradezco el asesoramiento y los consejos ofrecidos a lo largo de todo este estudio.

Al Dr. **Roger Glass**, de los Centers for Disease Control de Atlanta, USA, y al **Dr. Baoming Jiang**, del mismo Centro por su colaboración en el estudio del Rotavirus del grupo C.

A todo el resto del **Servicio de Microbiología del Hospital Severo Ochoa**, ya que sin ellos hubiera sido imposible la realización de este trabajo. A las Dras. Dolores Martín y Yolanda Gil, por su ayuda en las labores de impresión del trabajo y al resto de los Residentes que han pasado por el Servicio en este tiempo, por estar siempre dispuestos a colaborar. A los Técnico Especialistas del Laboratorio por su ayuda en la recogida, preparación y almacenamiento de las muestras.

**Al todo el Departamento de Microbiología I** de la Facultad de Medicina, por la amable acogida que siempre he recibido por su parte y por ayudarme a resolver mis dudas sobre los trámites burocráticos.

Al Laboratorio **Wyeth-Lederle**, por su apoyo en la infraestructura en el primer año de estudio de este trabajo.

## INDICE DE TABLAS

TABLA I	Características de las proteínas estructurales y no estructurales de Rotavirus grupo A.
TABLA II	Clasificación de los Calicivirus humanos.
TABLA III	Escala de gravedad clínica (Ruusca y Vesikari).
TABLA IV	Secuencia de los oligonucleótidos específicos de cada genotipo G.
TABLA V	Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la caracterización de la VP4.
TABLA VI	Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la detección de los Rotavirus del grupo C.
TABLA VII	Secuencias de los oligonucleótidos específicos de los genogrupos I y II de Calicivirus humanos.
TABLA VIII	Parámetros clínicos constatados al ingreso en Urgencias, incluidos en la escala de gravedad.
TABLA IX	Edad en meses de los pacientes que necesitaron hospitalización (1 <sup>er</sup> periodo)
TABLA X	Distribución de los casos de GEA según la etiología (1 <sup>er</sup> periodo).
TABLA XI	Microorganismos implicados en los casos de coinfección (1 <sup>er</sup> periodo)
TABLA XII	Edad media de los pacientes según la etiología viral o bacteriana (1 <sup>er</sup> periodo)
TABLA XIII	Distribución de los pacientes por tramos de edad según los agentes etiológicos responsables (1 <sup>er</sup> periodo)
TABLA XIV	Puntuación media de gravedad de los distintos grupos etiológicos.
TABLA XV	Puntuación de gravedad mayor o menor de 11, según los grupos etiológicos.
TABLA XVI	Gravedad de los casos según la etiología vírica o bacteriana.
TABLA XVII	Gravedad de los casos según la etiología bacteriana frente a Rotavirus del grupo A.

TABLA XVIII	Distribución de los casos según la necesidad de ingreso hospitalario (1 <sup>er</sup> periodo).
TABLA XIX.-	Edad en meses de los pacientes según el virus responsable de GEA (1 <sup>er</sup> periodo).
TABLA XX.	Porcentaje de los diferentes virus, según los grupos de edad (1 <sup>er</sup> periodo).
TABLA XXI	Distribución de los casos de GEA viral por meses del año (1 <sup>er</sup> periodo).
TABLA XXII	Puntuación de gravedad según el virus responsable.
TABLA XXIII	Puntuación de gravedad de los casos de GEA viral con y sin coinfección.
TABLA XXIV	Puntuación de gravedad de la infección por Rotavirus A frente a los otros virus.
TABLA XXV	Puntuación media de gravedad de las coinfecciones con Rotavirus frente al resto de coinfecciones.
TABLA XXVI	Puntuación media de gravedad de Rotavirus grupo A como microorganismo único y en coinfección.
TABLA XXVII	Evolución de los pacientes según el agente etiológico (1 <sup>er</sup> periodo).
TABLA XXVIII	Etiología de la gastroenteritis aguda de los niños ingresados (2 <sup>o</sup> periodo).
TABLA XXIX	Edad y estancia media de los niños con y sin eliminación viral (2 <sup>o</sup> periodo).
TABLA XXX	Marcadores epidemiológicos en el primer periodo de estudio.
TABLA XXXI	Marcadores epidemiológicos en el segundo periodo de estudio.
TABLA XXXII	Incidencia de infección adquirida en el hospital y eliminación asintomática.
TABLAXXXIII	Distribución de los serotipos y genotipos G.
TABLA XXXIV	Distribución de los serotipos G1 y G4 según la existencia de coinfección.
TABLA XXXV	Distribución de los serotipos G de los casos de GEA hospitalaria.

## INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Partículas de Rotavirus humanos observadas por técnica de microscopía electrónica.
- FIGURA 2 A) Estructura tridimensional de Rotavirus  
B) Representación esquemática de la partícula de Rotavirus.
- FIGURA 3. Partículas de Adenovirus humanos observadas por técnica de microscopía electrónica.
- FIGURA 4 A) Reconstrucción tridimensional de la partícula de Adenovirus  
B) Representación esquemática del Adenovirus.
- FIGURA 5 Partículas de Astrovirus observadas por técnica de microscopía electrónica.
- FIGURA 6 Partículas de Calicivirus humanos observados por técnica de microscopía electrónica.
- FIGURA 7 Estructura tridimensional de Calicivirus tipo Norwalk.
- FIGURA 8. Distribución de los casos por meses de edad de los niños con GEA adquirida en la comunidad (1<sup>er</sup> periodo).
- FIGURA 9. Distribución de los casos de GEA adquirida en la comunidad, según los meses del año (1<sup>er</sup> periodo).
- FIGURA 10 Esquema de los resultados del análisis microbiológico (1<sup>er</sup> periodo).
- FIGURA 11 Distribución de los casos de GEA vírica por estaciones del año (1<sup>o</sup> periodo)
- FIGURA 12 Distribución de los niños ingresados por GEA adquirida en la comunidad, según los meses del año (2<sup>o</sup> periodo).
- FIGURA 13 Resultados del análisis microbiológico realizado en los niños ingresados por GEA adquirida en la comunidad (2<sup>o</sup> periodo).
- FIGURA 14 Resultados del análisis microbiológico en los niños ingresados por patologías diferentes a GEA.
- FIGURA 15 Distribución por meses de los serotipos G1 y G4 a lo largo del año de estudio.
- FIGURA 16 Genotipos G de Rotavirus del grupo A detectados por RT-PCR.
- FIGURA 17 Genotipos P de Rotavirus del grupo A detectados por RT-PCR.

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
bcARN	Acido bicatenario
BSA	Seroalbúmina bovina
Ca	Calcio
cADN	Acido desoxiribonucleico complementario
CDC	Centers for disease Control
DE	Desviación estandar
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfoxido
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Etilen diamino tetracetato sodico
EIA	Enzimoimmunoensayo
GEA	Gastroenteritis aguda
HRP	Peroxidasa de rábano
IC	Intervalo de confianza
ICG	Inmunocromatografía
kD	Kilodalton
LA	Aglutinación con partículas de látex
ME	Microscopía electrónica
μl	Microlitro
ORF	Secuencias de lectura abierta ("open reading frames")
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBSB	PBS - BSA
PBST	Tampón PBS tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa
STF	Suero fetal de ternera
TBE	Tampón tris borato EDTA
TCG	Tiocianato de guanidina
TMB	Tetrametil bencidina
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
TST	Tampón tris salino tween 20
TST-B	TST BSA
TST-Ca	TST calcio
UA	Unidades de absorbancia

# INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b>	
<b>1.1 Historia de la gastroenteritis aguda viral</b>	2
<b>1.2 Descripción de los virus productores de gastroenteritis</b>	4
1.2.1 Rotavirus	4
1.2.1.1 Morfología	4
1.2.1.2 Estructura proteica	5
1.2.1.3 Clasificación	7
1.2.1.4 Patogénesis y respuesta inmune	8
1.2.2 Adenovirus entéricos	10
1.2.2.1 Morfología	10
1.2.2.2 Estructura proteica	10
1.2.2.3 Clasificación	11
1.2.2.4 Patogénesis y respuesta inmune	11
1.2.3 Astrovirus	13
1.2.3.1 Morfología	13
1.2.3.2 Estructura proteica	14
1.2.3.3 Clasificación	14
1.2.3.4 Patogénesis y respuesta inmune	16
1.2.4 Calicivirus	16
1.2.4.1 Morfología	16
1.2.4.2 Estructura proteica	18
1.2.4.3 Clasificación	18
1.2.4.4 Patogénesis y respuesta inmune	19
<b>1.3 Importancia e impacto de la enfermedad</b>	21
<b>1.4 Mecanismos de transmisión</b>	23
<b>1.5 Variación estacional</b>	24
<b>1.6 Características Clínicas</b>	25
<b>1.7 Diagnóstico Microbiológico</b>	27
1.7.1 Aislamiento en cultivos celulares	27
1.7.2 Técnicas de microscopía electrónica	27
1.7.3 Técnicas de detección de Antígeno	28
1.7.4 Técnicas de biología molecular	29
1.7.5 Técnicas de serotipado/genotipado	30
<b>1.8 Tratamiento de la enfermedad</b>	30

<b>1.9 Desarrollo de vacunas</b>	31
<b>II. OBJETIVOS</b>	34
<b>III. PACIENTES Y METODOS</b>	
<b>3.1 Lugar de estudio</b>	36
<b>3.2 Diseño del estudio</b>	36
<b>3.3 Población de estudio</b>	37
3.3.1 Criterios de inclusión y exclusión	37
3.3.2 Muestra de estudio	38
<b>3.4 Análisis de las características clínicas</b>	38
<b>3.5 Metodología del análisis microbiológico</b>	40
3.5.1 Obtención de las muestras	40
3.5.2 Estudio microbiológico	41
3.5.3 Productos químicos e inmunoquímicos	41
3.5.4 Soluciones y Tampones	42
3.5.5 Oligonucleótidos	43
<b>3.6 Técnicas de detección de Rotavirus grupo A</b>	44
3.6.1 Detección de antígeno de Rotavirus grupo A en heces por EIA	45
3.6.2 Técnica de serotipado G	46
3.6.5 Técnica de genotipado G y P	47
<b>3.7 Detección de Rotavirus del grupo C</b>	48
<b>3.8 Detección de Adenovirus</b>	50
3.8.1 Detección de antígeno de Adenovirus en heces por EIA	50
3.8.2 Detección de antígeno de Adenovirus entéricos (serotipo 40-41) por ICG	50
<b>3.9 Detección de antígeno de Astrovirus</b>	51
<b>3.10 Detección de Calicivirus</b>	52
<b>3.11 Marcadores epidemiológicos</b>	53
<b>3.12 Análisis estadístico</b>	56

## **IV RESULTADOS**

<b>4.1 Gastroenteritis aguda adquirida en la Comunidad</b> .....	58
4.1.1 Primer periodo	58
4.1.1.1 Características de la población de estudio	58
4.1.1.2 Resultados del análisis microbiológico	60
4.1.1.3 Análisis de los casos según el grupo etiológico	63
4.1.1.4 Análisis de los casos según el virus responsable	66
4.1.2 Segundo periodo	74
<b>4.2 Gastroenteritis aguda adquirida en el Hospital</b> .....	76
4.2.1 Características generales de la población de estudio	77
4.2.2 Resultados del análisis microbiológico	78
<b>4.3 Marcadores epidemiológicos</b> .....	80
4.3.1 Gastroenteritis aguda adquirida en la Comunidad	80
4.3.2 Gastroenteritis aguda adquirida en el Hospital	82
<b>4.4 Epidemiología molecular de Rotavirus grupo A</b> .....	82
4.4.1 Distribución de los serotipos/genotipos en el primer periodo (1996-97)	82
4.4.2 Distribución de los serotipos/genotipos en el segundo periodo (1996-97)	87

## **V DISCUSION**

<b>5.1 Gastroenteritis aguda adquirida en la Comunidad</b> .....	90
5.1.1 Primer periodo	90
5.1.1.1 Características de la población de estudio	90
5.1.1.2 Microbiología de la gastroenteritis aguda	91
5.1.1.3 Análisis de los casos según el virus responsable	94
5.1.2 Segundo periodo	97
<b>5.2 Gastroenteritis aguda adquirida en el Hospital</b> .....	98
5.2.1 Pacientes ingresados sin gastroenteritis aguda	99
5.2.2 Pacientes con gastroenteritis aguda nosocomial	99
<b>5.3 Marcadores epidemiológicos</b> .....	100
5.3.1 Gastroenteritis aguda adquirida en la Comunidad	100
5.3.1.1 Primer periodo	100
5.3.1.2 Segundo periodo	101
5.3.2 Gastroenteritis aguda adquirida en el Hospital	102
<b>5.4 Distribución de los serotipos/genotipos del Rotavirus grupo A</b> .....	103

<b>VI CONCLUSIONES</b> .....	107
------------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	109
---------------------------	-----

## INTRODUCTION

La gastroenteritis aguda es una de las enfermedades más comunes en el hombre (115), siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en niños de todo el mundo. Se estima que anualmente se producen más de 700 millones de casos de diarrea aguda en niños menores de 5 años (300). La mortalidad asociada con la gastroenteritis es muy alta con cifras entre 3,5 y 5 millones de casos de fallecimientos al año, la mayoría de ellos en los países en vías de desarrollo (24,132,335).

### 1.1 HISTORIA DE LA GASTROENTERITIS AGUDA VIRAL

A pesar de los avances en el conocimiento de la bacteriología, parasitología y virología durante el siglo pasado, la etiología de la mayoría de los casos de enfermedad diarreica permanecía desconocida (165). Hasta principios de los años 70 se presumía que los virus debían ser una causa importante de GEA ya que las bacterias o los parásitos se encontraban en una baja proporción (244). Por otra parte, en estudios realizados en los años 40 y 70 se consiguió reproducir un cuadro de diarrea en voluntarios, utilizando filtrados de heces libres de bacterias procedentes de brotes de diarrea (86,165).

En 1972 Kapikian *et al.* descubrieron por primera vez partículas virales de 27 x 32 nm en filtrados de heces derivadas de un brote de diarrea ocurrido en 1968 en una escuela elemental en Norwalk (Ohio), mediante inmunomicroscopía electrónica, siendo este el primer virus descrito como agente causal de la gastroenteritis aguda (167).

Otro importante descubrimiento fue el realizado en 1973 por Bishop *et al.* que observaron partículas víricas de unos 70 nm en células epiteliales de la mucosa duodenal de niños con diarrea aguda (30) que se denominaron con el nombre latino de *rotavirus* por su forma característica de rueda (100). Poco tiempo después se encontraron Rotavirus en las heces de un gran número de niños con diarrea (75).

Los Astrovirus fueron identificados por primera vez en heces de niños con diarrea en 1975, mediante técnicas de Microscopía Electrónica (ME) por Madeley y Cosgrove (196).

En este mismo año se describió la presencia de Adenovirus “no cultivables” en heces de niños con GEA (99).

Desde entonces se ha ido incrementando progresivamente el número de virus asociados con la gastroenteritis aguda. Sin embargo, en muchos de ellos no se ha establecido el papel etiológico sobre la base de criterios previamente establecidos: (i) identificación del virus con mayor frecuencia en sujetos con diarrea que en controles (ii) demostración de respuesta inmune frente al agente específico y (iii) demostración de que el comienzo y final de la enfermedad coincide con el comienzo y final de la eliminación fecal del virus (171). Según dichos criterios está demostrado el papel etiológico de Rotavirus, Astrovirus, Adenovirus entéricos y Calicivirus humanos (13).

Los Coronavirus (49), Picobirnavirus y Picotrnavirus (52, 131, 194), pestivirus (345) y Torovirus (20), asociados con enfermedad diarreica en animales, son virus emergentes en la etiología de la gastroenteritis para los que se necesitan más estudios que determinen su verdadera incidencia y significado clínico (152,168,171).

Otros virus como los Adenovirus “no-grupo F” y varios enterovirus (Coxsackie A y B) se encuentran en las heces de individuos sanos y enfermos en una proporción similar (171), por lo que no ha podido establecerse por ahora su significado clínico.

El estudio de Rotavirus, Astrovirus y Adenovirus entéricos se ha facilitado mucho gracias al cultivo celular que ha permitido además la producción de reactivos para el diagnóstico, así como una mejor comprensión de la inmunidad y del ciclo vital de estos virus. Entre los virus con papel causal definitivamente demostrado, los únicos que no se ha logrado cultivar son los Calicivirus humanos. Sin embargo, el reciente desarrollo de técnicas de biología molecular para el estudio de los mismos, ha hecho que aumente mucho el conocimiento sobre este grupo de virus (13).

## 1.2 DESCRIPCION DE LOS VIRUS PRODUCTORES DE GASTROENTERITIS

### 1.2.1 ROTAVIRUS

#### 1.2.1.1 Morfología

El género Rotavirus se clasifica dentro de la familia *Reoviridae* (202) cuyos miembros se caracterizan por ser virus icosaédricos sin envoltura, de 60-80 nm de diámetro y por contener un genoma compuesto de ARN de doble cadena (84,164,233).

Las partículas maduras, de aproximadamente 70 nm de diámetro, presentan una cápside proteica de doble capa que consiste en una cubierta externa y otra interna. Dentro de la cubierta interna hay una tercera capa, el core, el cual encierra al genoma. Cuando se observan las partículas completas por ME mediante tinción negativa presentan apariencia de rueda con espículas, rodeada de un fino borde que le proporciona apariencia lisa (Figura 1). Este virus se caracteriza también por presentar 132 canales que atraviesan ambas cubiertas y que unen la superficie externa con el core interno. Desde la superficie de la cápside y hacia afuera se proyectan 60 espículas finas (344). La estructura tridimensional del virus, que ha sido determinada por criomicroscopía electrónica y posterior procesamiento digital de las imágenes, (257) se presenta en la figura 2A. La figura 2B representa un esquema de las cubiertas del virus: La externa formada por las proteínas estructurales VP7 y VP4, la interna formada por la proteína VP6 y la tercera capa o core, con forma hexagonal, que encierra el genoma viral.

El genoma viral está compuesto por 11 segmentos de ARN de doble cadena, numerados del 1 al 11 en función de su movilidad electroforética (221). La naturaleza segmentada del ARN facilita los reordenamientos del genoma cuando las células se infectan con diferentes cepas de Rotavirus. Por ello, cuando se produce una coinfección celular se puede producir un virus resortante, con segmentos de ARN de cada uno de los virus progenitores, lo que ha hecho de base en el desarrollo de vacunas (84). Cada uno de los

segmentos genómicos codifica una proteína vírica. Estas son las proteínas estructurales que se denominan con las iniciales VP (*viral protein*) seguido de un número (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y las proteínas no estructurales. Estas últimas se designan con las letras NS (*nonstructural*) seguido de su peso molecular en KiloDaltons, aunque hoy día se prefiere designarlas como NSP seguida de un número: NSP1 (NS53), NSP2 (NS35), NSP3(NS34), NSP4(NS28) Y NSP5(NS26). (83).

#### **1.2.1.2 Estructura proteica**

En la tabla I se exponen de forma esquemática las características de las proteínas estructurales y no estructurales del Rotavirus del grupo A.

Las proteínas estructurales VP7 y VP4 constituyen la cubierta externa. La VP7 corresponde a la parte lisa de la cubierta y la VP4 a la parte espiculada, dando lugar a 60 espículas cortas. Ambas proteínas son los únicos antígenos virales conocidos hasta ahora que inducen, independientemente, la formación de anticuerpos neutralizantes (102,344).

La VP4 constituye el 2.5% de la masa vírica, es la hemaglutinina del virus y probablemente la responsable de la unión a la célula. Debido a la tripsina, la VP4 se divide en las subunidades proteicas VP5 y VP8, las cuales se asocian con funciones de penetración del virus en la célula (32). La VP7 es la proteína más importante de la cubierta externa, constituye el 30% del peso del virión y es una glicoproteína (233). La VP6 forma mayoritariamente la cubierta interna (Figura 2B) constituyendo el 50% del peso de la partícula vírica (257). Recientemente se ha descrito el papel de esta proteína en la infectividad viral y en el desarrollo de la inmunidad (42). La proteína VP2 constituye la envoltura del core, donde se sitúan también la VP1 y VP3. La VP1 parece constituir la polimerasa viral (248), necesitándose la presencia de VP2 para su actividad (249,346).

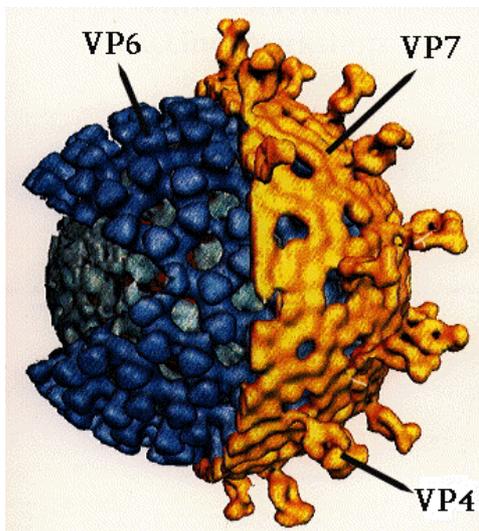
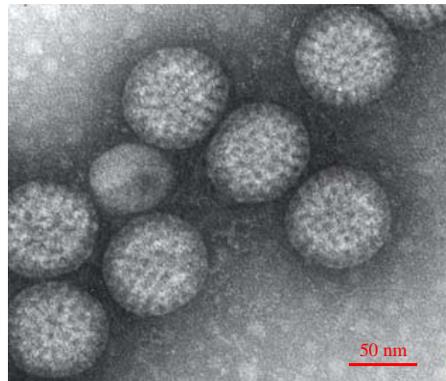
**Figura 1.** Partículas de Rotavirus humanos observadas por microscopía electrónica en filtrado de muestra clínica preparada a partir de heces de un niño con gastroenteritis (cortesía de la Dra. A. Sánchez-Fauquier).

### 1. Figura 2-A

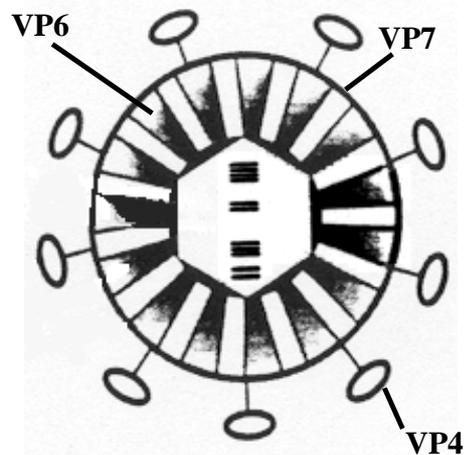
### Figura 2-B

**Figura 2:** A) Estructura tridimensional de Rotavirus (partícula completa). Desde fuera: cápside externa (amarillo), cápside interna (azul marino) y core (azul pálido) (tomado de Prasad *et al.*, 1988<sup>260</sup>). B) Representación esquemática de la partícula de Rotavirus. Se señalan la VP4, la VP6 y la VP7 (tomado de Kapikian., 1996<sup>168</sup>).

**Figura 1.** Partículas de Rotavirus humanos observadas por microscopía electrónica en filtrado de muestra clínica preparada a partir de heces de un niño con gastroenteritis (cortesía de la Dra. A. Sánchez-Fauquier).



**Figura 2-A**



**Figura 2-B**

**Figura 2:** A) Estructura tridimensional de Rotavirus (partícula completa). Desde fuera: cápside externa (amarillo), cápside interna (azul marino) y core (azul pálido) (tomado de Prasad *et al.*, 1988<sup>54</sup>). B) Representación esquemática de la partícula de Rotavirus. Se señalan la VP4, la VP6 y la VP7 (tomado de Kapikian.,1996<sup>2</sup>).

Se conoce menos la actividad de las proteínas no estructurales aunque se sabe que intervienen en los procesos de replicación y ensamblaje del virus (7,36). La NSP4 tiene un interés particular, ya que parece que tiene actividad semejante a una enterotoxina siendo capaz por sí sola de producir diarrea en el ratón (14,173).

Tabla I. Características de las proteínas estructurales y no estructurales de Rotavirus A

Segmento genómico	Proteína	Localización en la partícula viral	Función
1	VP1	core	ARN Polimerasa
2	VP2	core	Unión al ARN
3	VP3	core	guanililtransferasa
4	VP4 (VP5+VP8)	cápside externa	Hemaglutinina, ag. neutralización, sensible a proteasa (serotipos P), unión a la célula.
5	NSP1	no estructural	Unión al ARN
6	VP6	cápside interna	Ag. de grupo- subgrupo
7,8,9	NSP3	no estructural	Unión al ARN
7,8,9	VP7	cápside externa	Glicoproteína (serotipos G), ag. neutralización,
8	NSP2	no estructural	Replicación viral
10	NSP4	no estructural	Ensamblaje viral, enterotoxina?
11	NSP5	no estructural	Unión al ARN

### 1.2.1.3 Clasificación

Los Rotavirus se clasifican en grupos, subgrupos y serotipos según las propiedades antigénicas de las proteínas de su cápside.

La proteína VP6 es la determinante de reactividad de grupo, es en la que se basan la mayoría de los ensayos diagnósticos y contiene también los antígenos de subgrupo. En la actualidad existen 7 grupos denominados con las letras de la A a la G y 2 subgrupos, el I y II (96). Los grupos A, B y C son los que producen infección en el hombre. Los grupos D, E, F y G únicamente han sido descritos en animales hasta el momento (66). La clasificación en serotipos se basa en las diferencias antigénicas de las proteínas de la cubierta externa VP7 y VP4. La primera determina los serotipos "G", denominados así por la naturaleza glicosilada de esta proteína y la segunda a los serotipos "P" debido a su sensibilidad a la proteasa.

Actualmente se reconocen 14 serotipos G, del G1 al G14, siendo G1, G2, G3 y G4 los predominantes en todo el mundo (53, 57,121). Se han descrito también infecciones por los serotipos G5, G6, G8, G9, G10 y G12 (33,121,264,285,316). Los serotipos circulantes pueden variar incluso dentro de la misma región a lo largo de las distintas temporadas (71,109,134,342), hecho que se ha descrito también en nuestro país (39, 41,339).

Los serotipos P, se han clasificado mediante técnicas de neutralización en varios serotipos y 2 subtipos P: 1A, 1B, 2A, 3, 4, 5 y 8 (53). Hoy día se utiliza más la clasificación según las técnicas de genotipado y se recomienda incluir en corchetes el número de genotipo para diferenciarlo del serotipo determinado por neutralización (109). Hasta el momento se han descrito 20 genotipos P, siendo los más encontrados los genotipos P[8] (P-serotipo 1A), P[4] (P-serotipo 1B) y P[6] (P-serotipo 2) (109). Aunque los serotipos G y P son independientes, existen asociaciones que se repiten con mayor frecuencia como son G1, G3 y G4 con el genotipo P [8] (serotipo P 1A) y el G 2 con el P[4] (serotipo P 1B) (109).

#### **1.2.1.4 Patogénesis y Respuesta Inmune**

Los Rotavirus infectan los enterocitos maduros absortivos del epitelio vellosos de los dos tercios superiores del intestino delgado. Esto lleva a la atrofia vellositaria y muerte celular, dando lugar, de forma compensatoria, a la repoblación del epitelio por células inmaduras de tipo secretor con hiperplasia secundaria de las criptas (282).

No se conocen bien los mecanismos que llevan a la producción del daño celular, aunque se propone que la lesión es secundaria a la isquemia vellositaria (98). En cuanto al mecanismo que induce la producción de diarrea, parece ser el principal, la menor absorción de agua y electrolitos en relación con la infección selectiva de las células absorptivas, conservándose funcionalmente intactas las células secretoras de las criptas. Esto da como resultado la secreción neta de líquido. Por otra parte se produce una disminución de las disacaridasas de la pared intestinal, con malabsorción consiguiente de carbohidratos y un factor osmótico de diarrea. En la actualidad está cobrando importancia el papel del sistema nervioso entérico en la diarrea por Rotavirus. Este agente induciría la secreción hidroelectrolítica intestinal mediante la estimulación del sistema nervioso de la pared intestinal, hecho demostrado recientemente en ratones lactantes (195).

Es sabido que los niños que sufren una infección primaria quedan protegidos frente a episodios graves de diarrea (92,114,159,279,324). Sin embargo todavía no se conocen bien los mecanismos inmunológicos responsables de esta protección parcial. Se ha demostrado en diversos estudios que la inmunidad local intestinal protege de sucesivos episodios graves de diarrea (28,62,244). En la fase aguda de la enfermedad está comprobado el predominio de las inmunoglobulinas de clase IgM, con una respuesta sérica IgG e IgA en la fase convaleciente (62). En el intestino predominan los anticuerpos secretores IgA, observándose respuesta de coproanticuerpos en el 70-84% de los niños con infección sintomática. Se ha demostrado que estos anticuerpos son un marcador más sensible de reinfección que la seroconversión o la detección de virus en heces (28). Parece ser que solo los anticuerpos dirigidos contra las proteínas VP4 o VP7 pueden neutralizar al virus y proteger al huésped susceptible.

Se ha descrito que la respuesta a la primera infección es homotípica (respuesta frente al virus infectante y otros virus con glicoproteína VP7 similar), apareciendo respuestas heterotípicas con infecciones sucesivas (32,94,120). La protección serotipo-específica ha sido difícil de demostrar en humanos, ya que no se ha detectado asociación entre títulos de anticuerpos neutralizantes serotipo-específicos después de la infección y la existencia

de protección (334). Aquí entraría el papel de la inmunidad celular, demostrándose recientemente que la proteína NSP4, produce una respuesta mediada por la inmunidad celular (162).

## **1.2.2 ADENOVIRUS ENTERICOS**

### **1.2.2.1 Morfología**

Los Adenovirus humanos pertenecen a la familia *Adenoviridae*, género Mastadenovirus, (331). Dentro del género, la mayoría de los Adenovirus entéricos descritos hasta ahora pertenecen al subgénero F (18).

Son virus ADN, sin envoltura. La partícula vírica presenta un tamaño de 70 nm de diámetro (Figura 3). La reconstrucción tridimensional de la estructura conseguida por criomicroscopía electrónica se muestra en la figura Fig.4 A (304).

La cápside, de naturaleza proteica, se compone de 252 capsómeros que conforman una estructura icosaédrica. Dichos capsómeros pueden ser de 3 tipos morfológicos: hexones, pentones y unas estructuras que se proyectan al exterior, llamadas fibras que presentan un nódulo terminal (figura 4B). La longitud de las fibras difiere de unos subgéneros a otros (331).

El genoma consiste en una molécula lineal de ADN de doble cadena que representa el 15% de la masa del virus. En la actualidad se están asignando funciones a las diferentes regiones y se han identificado las regiones que codifican las tres proteínas de la cápside.

### **1.2.2.2 Estructura proteica**

Los tres principales antígenos del virus son las proteínas de la cápside. Estas, como ya se ha comentado, son de 3 tipos morfológicos: el hexón que limita con 6 capsómeros y se encuentra en las caras triangulares del virión; el pentón que limita con 5 capsómeros y se localiza en los vértices y la fibra, que es una hemaglutinina (Figura 4 B) (331). El hexón contiene antígenos comunes a los adenovirus humanos y los antígenos de la fibra son

tipo-específicos, con especificidad de grupo, mientras que el pentón base es común a la familia *Adenoviridae* (18). Además de estas proteínas estructurales existen al menos otras 8 que constituyen el core (293) y que tienen función de mantenimiento de la integridad del genoma y participan en la actividad enzimática.

### 1.2.2.3 Clasificación

Los serotipos que con mayor frecuencia se asocian a la GEA por Adenovirus entéricos son el 40 y 41, pertenecientes al subgénero F. Más raramente se han implicado los serotipos 31, 12 y 18 del subgénero A (331) y los serotipos 1, 2, 5 y 6 del subgénero C (18,144).

### 1.2.2.4 Patogénesis y respuesta inmunitaria

Las fibras parecen intervenir en la unión del virus a los receptores de la célula huésped a través de sus núdulos terminales (38).

No se conoce todavía bien la razón del tropismo de los diferentes serotipos. Al igual que en la GEA producida por Rotavirus, la lesión que producen los serotipos 40 y 41 en los enterocitos llevan a una atrofia vellositaria e hiperplasia compensatoria de las criptas, con la consiguiente malabsorción y pérdida de fluidos (38,98).

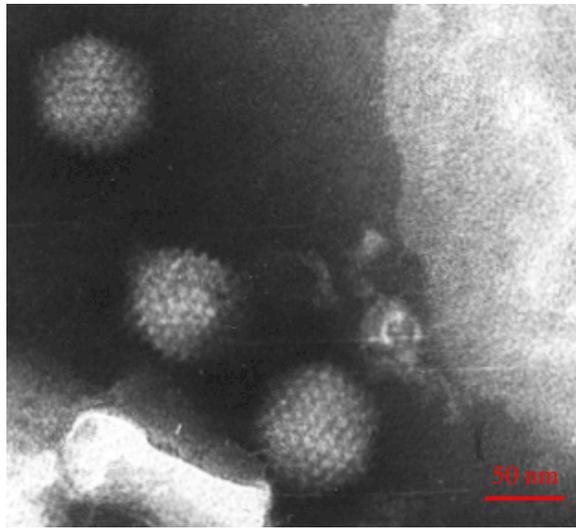
Después de la infección se desarrollan anticuerpos específicos en la mayoría de los casos, neutralizantes o no neutralizantes. Los anticuerpos no neutralizantes específicos de grupo son útiles para medir la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos neutralizantes

**Figura 3.** Partículas de adenovirus humanos observadas por microscopía electrónica mediante la técnica de tinción negativa (cortesía de la Dra. A. Sánchez-Fauquier).

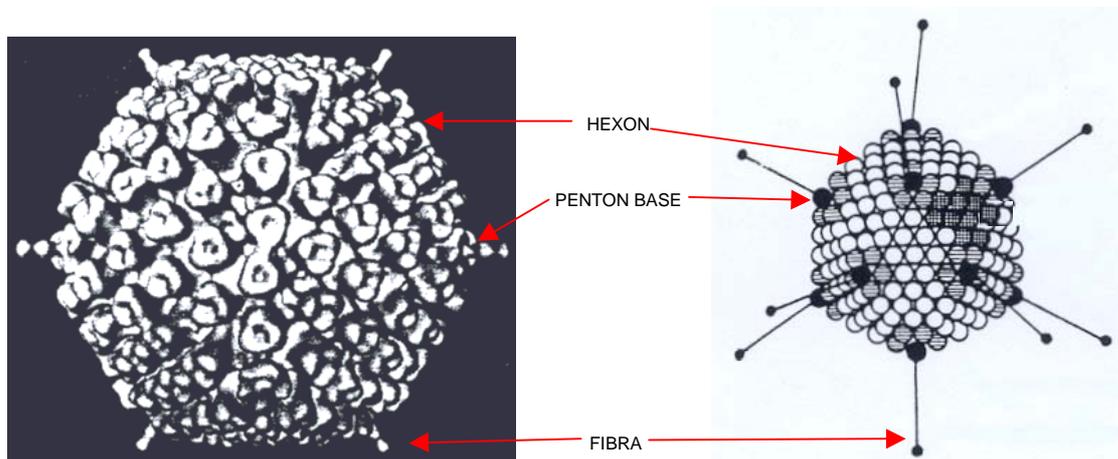
Figura 4-A

Figura 4-B

Figura 4: A) Reconstrucción tridimensional de la partícula de Adenovirus intacta (tomado de Steward *et al.*, 1991<sup>310</sup>); B) Representación esquemática del Adenovirus y sus principales componentes (tomado de Baum., 2000<sup>18</sup>).



**Figura 3.** Partículas de Adenovirus humanos observadas por microscopía electrónica mediante la técnica de tinción negativa (cortesía de la Dra. A. Sánchez-Fauquier).



**Figura 4-A**

**Figura 4-B**

**Figura 4:** A) Reconstrucción tridimensional de la partícula de Adenovirus intacta (tomado de Steward *et al.*, 1991<sup>218</sup>); B) Representación esquemática del Adenovirus y sus principales componentes (tomado de Baum., 2000<sup>214</sup>).

tipo específico pueden proteger tanto en la enfermedad actual como en las reinfecciones por el mismo serotipo, aunque los pacientes pueden seguir eliminando el virus en sus heces, de forma intermitente, meses después de una respuesta humoral efectiva (144).

### **1.2.3 ASTROVIRUS**

#### **1.2.3.1 Morfología**

En 1993 se estableció la familia *Astroviridae* dentro de los virus ARN (215) con un único género, el Astrovirus, el cual engloba los virus animales y humanos (201).

*Madeley y Cosgrove* describieron los Astrovirus como virus pequeños redondos de 28 nm con un aspecto característico de estrella de 5 o 6 puntas por visualización directa por ME y de ahí su nombre (*astron*, estrella en griego) (196). Sin embargo, *Risco et al*, han comprobado recientemente que este virus presenta una morfología diferente con apariencia icosaédrica, que miden 41 nm de diámetro y tienen espículas bien definidas. Cuando estos virus se someten a un pH elevado se transforman y presentan la típica morfología de estrella descrita inicialmente (272). (Figura 5 A y B).

En la actualidad se está realizando la reconstrucción tridimensional del Astrovirus humano serotipo 2. Los resultados preliminares indican que el virión posee dos capas proteicas. La externa, extremadamente porosa, estaría constituida por la proteína VP26 que forma las típicas proyecciones que se observan tanto por tinción negativa como por criomicroscopía. La capa interna formaría una superficie continua y estaría integrada mayoritariamente por otra proteína denominada VP32. (272).

El genoma de los Astrovirus humanos está constituido por una cadena de ARN simple de polaridad positiva. Este ARN presenta tres secuencias de lectura abierta (“open reading frames”, ORFs). Las ORF1a y ORF1b codifican la proteasa y polimerasa viral respectivamente. La ORF 2 codifica el precursor proteico de la cápside y se encuentra en el extremo 3` del genoma (47,70,201).

### **1.2.3.2 Estructura proteica**

La estructura proteica de Astrovirus no se conoce todavía bien en la actualidad. Sin embargo parece que el precursor de las proteínas de la cápside, una poliproteína de 87 kD, da lugar al menos a las proteínas estructurales de la cápside VP32, VP29 y VP26, (214). Mediante la secuenciación de los extremos amino terminales de la PV29 y PV26 se han podido localizar dentro de la poliproteína de 87kD en los aminoácidos 361 y 394 respectivamente (282).

Los ensayos con anticuerpos monoclonales frente a Astrovirus humano sugieren que la VP26 y/o la VP29 pueden ser importantes en la neutralización, la inmunidad heterotípica y la unión del virus a las células diana (16,282). Estas proteínas, especialmente la VP26, parecen ser las responsables de la variación antigénica observada entre los distintos serotipos (47).

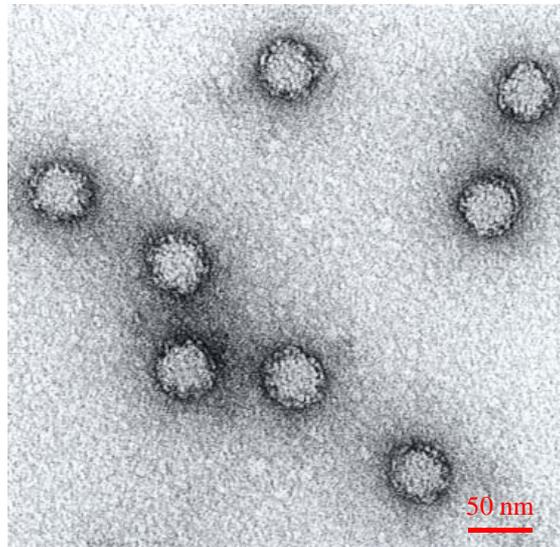
### **1.2.3.3 Clasificación**

Los Astrovirus se clasifican en serotipos basándose en la reactividad de las proteínas de la cápside con sueros policlonales y anticuerpos monoclonales (185,201). También pueden clasificarse en genotipos sobre la base de la secuencia de nucleótidos de una región de 348 pb del ORF2, comprobándose una buena correlación con los serotipos (225). Existen 7 serotipos establecidos que se corresponden con 7 genotipos. Se sugiere la existencia de un octavo genotipo debido a la secuencia de un serotipo 8 putativo (219). El serotipo 1 es el predominante en la mayoría de los estudios, seguido del 2,3,4 y 5 con menor frecuencia. El 6, 7 y 8 se detectan raramente (185,106,203,219,238,317).

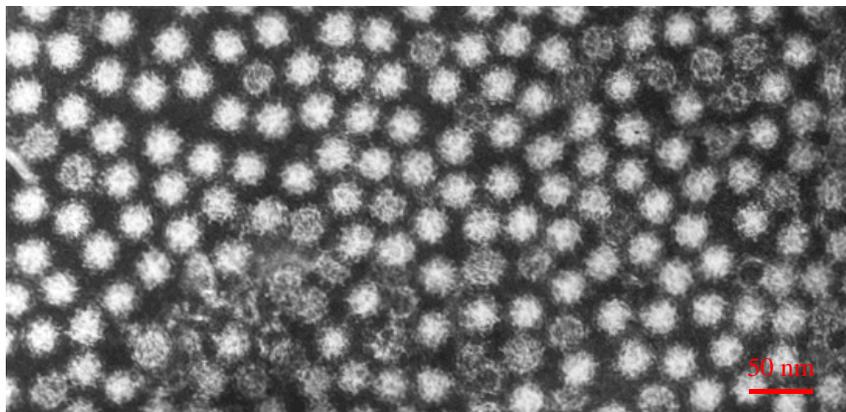
**Figura 5-A.** Es visible un contorno de espículas en la mayoría de los viriones. No se observa ninguna partícula con forma de estrella (cortesía de la Dra. A.Sánchez-Fauquier).

**Figura 5-B.** El tratamiento de la muestra a pH 10 da como resultado partículas con la morfología de estrella de 28 nm. descrita inicialmente (cortesía de la Dra. A.Sánchez-Fauquier).

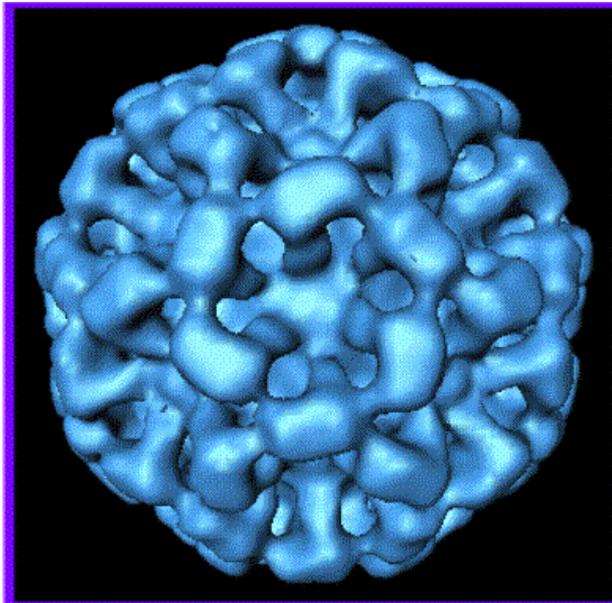
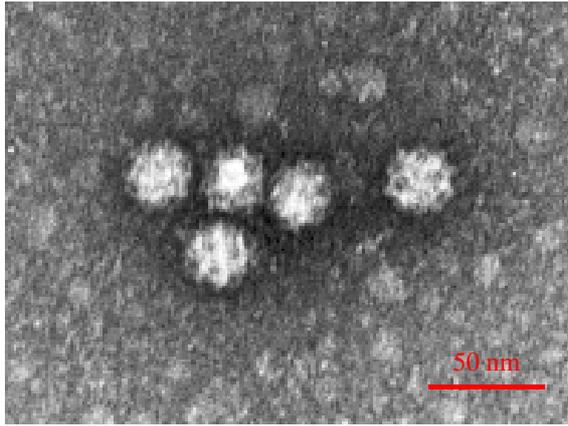
La figura 5 (A y B) muestra estructuras de Astrovirus visualizadas por microscopía electrónica mediante tinción negativa y su transformación a forma típica de estrella (Gaggero-107)



**Figura 5-A.** Es visible un contorno de espículas en la mayoría de los viriones. No se observa ninguna partícula con forma de estrella (cortesía de la Dra. Alicia Sánchez-Fauquier)



**Figura 5-B.** El tratamiento de la muestra a pH 10, da como resultado partículas con la morfología de estrella de 28 nm descrita inicialmente (cortesía de la Dra. Alicia Sánchez-Fauquier)



#### **1.2.3.4 Patogénesis y Respuesta Inmune**

La patogenia de la enfermedad inducida por Astrovirus no se ha establecido todavía, aunque se sugiere que la replicación del virus ocurre en el tejido intestinal (201,253). Los estudios en adultos voluntarios no aclaran tampoco los mecanismos patogénicos (180,208) y son los estudios en animales los que aportan gran parte del conocimiento. En ellos se observa una atrofia de las vellosidades intestinales e infiltrados inflamatorios en la lámina propia (313), dando lugar, al igual que Rotavirus, a la disminución de la actividad de las disacaridasas y producción de diarrea osmótica.

La infección sintomática por Astrovirus incide principalmente en los niños pequeños y en los ancianos, lo que sugiere una disminución de los anticuerpos en los últimos años, pero los determinantes de la inmunidad no se conocen bien (201). Los estudios en adultos voluntarios indican que las personas con niveles detectables de anticuerpos no desarrollan la enfermedad (180).

Hasta la fecha se han descrito 4 anticuerpos monoclonales neutralizantes, desarrollados por *Sanchez-Fauquier et al.* frente a Astrovirus humano del serotipo 2 (282) y por *Bass et al.* frente a Astrovirus del serotipo 1 (16). Todos reaccionan con la proteína de la cápside VP26, implicada en la neutralización de los Astrovirus humanos.

### **1.2.4 CALICIVIRUS HUMANOS**

#### **1.2.4.1 Morfología**

Los Calicivirus humanos pertenecen a la familia de virus ARN denominado *Caliciviridae*. Tras la secuenciación del genoma del virus Norwalk (157) y de otros virus de la familia (182), el Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus estableció la existencia de 4 géneros dentro de la familia *Caliciviridae* (126), dos de ellos de Calicivirus de animales

(Lagovirus y Vesivirus) y dos de Calicivirus humanos, los virus tipo Norwalk (*Norwalk like viruses* = NLVs) y virus tipo Sapporo (*Sapporo like viruses* = SLVs)

Los viriones se componen de una única proteína estructural de la cápside. Las técnicas de criomicroscopía electrónica revelan la estructura de simetría icosaédrica de la cápside (255). La proteína estructural, constituida por 180 moléculas, se pliega en 90 dímeros formando una cubierta continua con protuberancias en forma de arco (Figura 7). Una característica clave es la existencia de 32 depresiones en forma de copa, situadas en los ejes del icosaedro, de cuya denominación latina, *calix*, deriva su nombre (13).

El genoma de los Calicivirus humanos consiste en una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva. El genoma de los NLVs se organiza en tres secuencias de lectura abierta (ORF). La ORF1 codifica una poliproteína precursora de las proteínas no estructurales, la ORF2 codifica la proteína de la cápside y la ORF3 codifica una proteína pequeña cuya función no se conoce (13). Estudios recientes indican que se trata de una proteína estructural menor (112).

El genoma de los SLVs difiere del anterior, de manera que la ORF1 codifica las proteínas no estructurales y, además, la proteína estructural de la cápside (191,192). La ORF2 codifica una proteína pequeña de función desconocida similar a la ORF3 del virus Norwalk. En los SLVs se ha visto también un ORF3 de significado incierto todavía. Los estudios sobre las diferencias entre ambos genomas han llevado a la subdivisión en géneros dentro de los genogrupos.

#### 1.2.4.2 Clasificación

Los Calicivirus humanos se clasifican actualmente en dos genogrupos en los virus tipo Norwalk y uno en los tipo Sapporo (47,70,154,313,327), como se muestra a continuación:

**NLVs**    Genogrupo I:    • virus Norwalk, Southampton, Desert Shield, Queens Arms, Winchester, Musgrove, Sindlesham.

Genogrupo II:    • virus Snow Mountain, Hawaii, Toronto, Mexico y Lordsdale, Bristol, Camberwell, Melksham, Hillingdon, Leeds.

---

**SPLVs**    Genogrupo III    • virus Sapporo, Manchester, London, Parkville.

#### 1.2.4.3 Estructura proteica

Los Calicivirus, como ya se ha comentado, poseen una única proteína estructural que mantiene la integridad estructural y tiene capacidad inmunógena e infectiva (256). Se ha demostrado en estudios recientes que esta proteína podría ser determinante de especificidad de las diferentes cepas (255). La principal proteína no estructural parece ser una ARN-polimerasa dependiente de ARN, pudiendo detectarse también funciones helicasa y proteasa. (313).

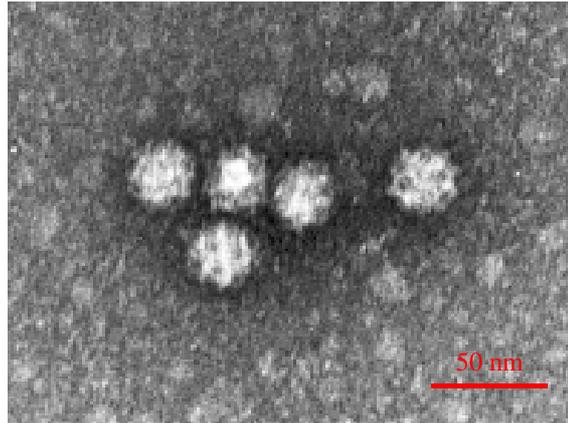
#### **1.2.4.4 Patogénesis y Respuesta Inmune**

La patogénesis de la enfermedad por Calicivirus se basa en estudios en voluntarios sanos. En ellos se observa un ensanchamiento de las vellosidades intestinales del intestino delgado proximal. Las células epiteliales permanecen conservadas y existe un acortamiento de las microvellosidades y aumento del espacio intercelular (289,290,313). No se conoce bien el mecanismo por el que se produce el cuadro de diarrea y vómitos asociado a malabsorción de D-xylosa y grasa. Se ha sugerido que pueda intervenir el retraso marcado en el vaciamiento gástrico observado en el caso de GEA inducida por virus Norwalk (205).

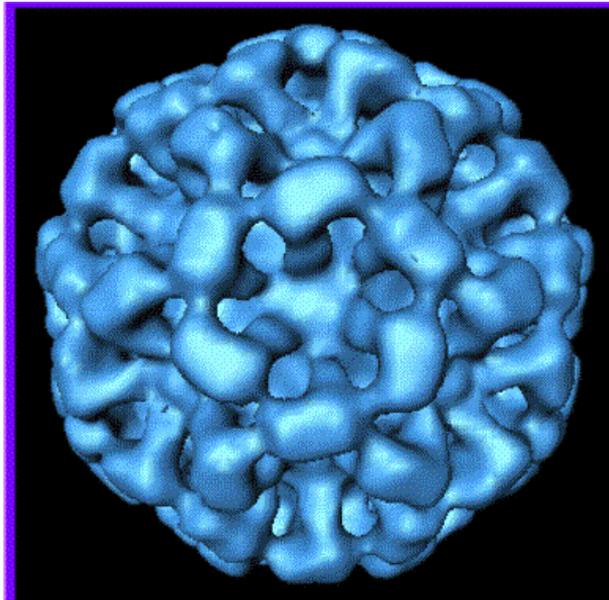
La infección por virus Norwalk induce una respuesta específica de anticuerpos séricos IgG, IgA e IgM, aunque haya habido una exposición previa (313). Se ha demostrado aumento en la síntesis yeyunal de IgA dos semanas después de la infección por virus Norwalk (2). Después de la infección por virus Norwalk, la mayoría de los pacientes presentan una resistencia a la reinfección durante 4 a 6 meses (313), pero se observa una falta de protección a largo plazo (208).

**Figura 6:** Partículas de Calicivirus humanos observados por microscopía electrónica mediante tinción negativa en un filtrado de heces procedente de un niño con gastroenteritis (cortesía de la Dra. Alicia Sánchez-Fauquier).

**Figura 7:** Estructura tridimensional de Calicivirus tipo Norwalk, determinada por procesamiento de imagen de micrografías electrónicas (tomado de Prasad *et al.*, 1996<sup>315</sup>).



**Figura 6.** Partículas de Calicivirus humanos observados por microscopía electrónica mediante tinción negativa en un filtrado de heces procedente de un niño con gastroenteritis (cortesía de la Dra. Alicia Sánchez-Fauquier)



**Figura 7.** Estructura tridimensional de Calicivirus tipo Norwalk, determinada por procesamiento de imagen de microfotografías electrónicas (tomado de Prasad et al, 1996-315)

### 1.3 IMPORTANCIA E IMPACTO DE LA ENFERMEDAD

Los Rotavirus son los principales agentes responsables de la diarrea grave en niños menores de 5 años, siendo causa de más de 130 millones de episodios anuales en todo el mundo (118) y de 600.000 a 870.000 muertes al año (114), la inmensa mayoría de ellas en los países en desarrollo (45,67,72,318).

En los países industrializados en los que la mortalidad debida a GEA por Rotavirus es muy baja (116), el impacto de la enfermedad viene dado por su alta morbilidad y por la frecuencia de hospitalización que produce. Diversos estudios europeos señalan al Rotavirus como responsable del 20 al 60% de los casos de GEA que requieren hospitalización, mientras disminuye su porcentaje en los que pueden manejarse de forma ambulatoria (46,161,175,200,218,278,307). En Australia se encuentran cifras similares (15). En EEUU se ha estimado que 1 de cada 73 niños se habrá hospitalizado por diarrea por Rotavirus A en los primeros 5 años de vida (116).

En España son limitados los conocimientos sobre la epidemiología de la GEA viral. Según los datos del Sistema de Información Microbiológica se atribuye a Rotavirus el 22% de los casos de GEA en menores de 5 años (148). En diversos trabajos realizados desde 1981 hasta 1987 y recopilados por *Román* (276) se estiman incidencias de GEA por Rotavirus grupo A, que abarcan del 2% al 44% (23,44,88,146,209,236,267,270,273, 274,297,323,314,276). Es muy escasa también la información sobre hospitalización por este virus en nuestro país, estimándose entre el 2 y 3 /1000 menores de 5 años/año (56,330).

En cuanto a los Rotavirus “no grupo A”, se han identificado Rotavirus del grupo B en brotes epidémicos de diarrea grave en adultos en el sudeste asiático desde 1982 (97) y en infecciones sintomáticas en niños. Se han detectado brotes de diarrea debidos a Rotavirus del grupo C en Asia (237), América del sur (301) y Europa (35,48). También se han comunicado casos de GEA esporádica en niños en USA (156), en Japón (181) y en

el Reino Unido (149), con frecuencias del 1% al 6,8% de los casos de GEA. En estudios de seroprevalencia se han demostrado tasas de seropositividad entre el 30 y 45% de los adultos estudiados (150,224,271,302). No existen estudios hasta el momento de Rotavirus grupo C en nuestro país.

Los Adenovirus entéricos presentan incidencias de infección variables. En países industrializados varía del 1 al 8% en niños hospitalizados con GEA (76,130,178,296,341) y del 3 al 6,5% en los atendidos fuera del hospital por esta patología (34,76,161,178,242). En los países en desarrollo se publican cifras del 2 al 31% (68,172,216,261,305). En España, las diferentes series publicadas encuentran cifras de incidencia entre el 1 y el 9% de Adenovirus totales, no específicamente entéricos (137,235,236, 250,267,270,314).

En los estudios iniciales de Astrovirus mediante ME realizados en diversos países, el virus era detectado en alrededor del 1% de los casos (117, 190,214) ocurriendo lo mismo en nuestro país (297). Actualmente gracias al desarrollo de técnicas de EIA que utilizan anticuerpos monoclonales (139,141) se detectan incidencias más altas, desde el 2 al 11% en niños atendidos en hospitales, con pocas variaciones entre los países en desarrollo (67,261,138) y los desarrollados (177,189,203,219). En el ámbito extrahospitalario, Astrovirus representa del 4 al 10% de los casos de GEA (34,106,133,243,317), incluso llegando incluso a constituir la primera causa de esta enfermedad (197). En España, se han comunicado incidencias del 4 al 12,5% de los casos de GEA (88,119,193,314).

Los Calicivirus humanos se identificaron desde un principio como causa de brotes de diarrea no bacteriana, inicialmente utilizando técnicas de ME (9,85,166,167,309). En estudios recientes, con la aplicación de los nuevos ensayos como EIA y RT-PCR, ha cambiado el conocimiento de la epidemiología de los Calicivirus humanos, especialmente de los virus tipo Norwalk (13). Así, estos virus se reconocen como la principal causa de los brotes de diarrea no bacteriana y las nuevas estimaciones sugieren que son la causa más común de enfermedad de origen alimentario (103,174,204,222,328). De igual forma, los estudios recientes que investigan Calicivirus en casos esporádicos de GEA en niños encuentran que los virus tipo Norwalk constituyen la segunda causa de GEA viral después de Rotavirus y los estudios de seroprevalencia demuestran que la infección es frecuente

en niños en los países desarrollados (34,125,153,188,239,241,246). Hasta el momento, no se conocen datos en nuestro país sobre incidencia de Calicivirus salvo en algunos casos de brotes, en los que se detectaron partículas semejantes al virus Norwalk (12).

En diversas series se describen casos de coinfección sobre todo con Rotavirus del grupo A. Así, en un estudio realizado en Francia las coinfecciones constituyeron el 16,7% de los casos (34) y en otro estudio un tercio de las infecciones por Astrovirus se acompañaban de Rotavirus del grupo A (138). No se encontraron diferencias en la gravedad de las infecciones monomicrobianas y polimicrobianas (34,138).

#### **1.4 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN**

El principal mecanismo de transmisión de los virus productores de GEA (Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus) es a través de la vía fecal-oral (61,115,166,180 206,208, 254).

La excreción de partículas virales en las heces puede producirse en los días previos al cuadro clínico y en los siguientes a su resolución (61,254,312,315,320), con una máxima eliminación fecal coincidiendo con el cuadro diarreico (53,207). Aunque normalmente la duración de la excreción viral es de 1 o 2 semanas, se han descrito cuadros de excreción prolongada de más de un mes o incluso de meses después del comienzo de los síntomas (206,210,186,269).

Otra vía de diseminación es a partir de diversos vehículos como las manos y superficies inanimadas, donde el virus puede sobrevivir horas e incluso días, se demuestra principalmente en el caso de Rotavirus (7) y de Calicivirus (136).

El agua contaminada y los alimentos como vía de transmisión se ha descrito en brotes de GEA por Rotavirus (7) y en Calicivirus (60,288,295,313). Más controvertida es la transmisión de Astrovirus por esta vía (117,136,201).

Se discute la vía respiratoria como una posible puerta de entrada para la infección por Rotavirus (7,134). Sin embargo, hasta el momento no ha podido ser demostrada experimentalmente esta vía de transmisión, siendo negativa la detección de Rotavirus en secreciones respiratorias en la mayoría de los estudios realizados (208). Parece más probable que esta vía de diseminación se asocie a la manipulación de heces contaminadas a través de partículas en aerosol, donde se ha comprobado que los virus pueden permanecer infectivos a las 24 horas (147). Tanto en el caso de Astrovirus (89) como de Calicivirus (60,103,166), se ha planteado también este modo de transmisión mediante aerosoles.

Hasta ahora no se ha descrito en estos virus la vía de transmisión de animal a humano. Sin embargo, en estudios recientes, el hallazgo de Calicivirus humanos (tipo Norwalk) en las heces de 33 (44%) terneros y en 2 (2%) de los cerdos estudiados, abre la posibilidad de una zoonosis o de que estos animales sean el reservorio de la enfermedad (319).

## **1.5 VARIACION ESTACIONAL**

La GEA viral producida por Rotavirus del grupo A y Astrovirus se diagnostica en países tropicales a lo largo de todo el año mientras que en los países de clima templado estas infecciones predominan en general en los meses más fríos (29,65,134). En el caso de Rotavirus del grupo A se ha observado en algunos países que los picos de incidencia de la infección ocurren de forma secuencial. Así, en USA la infección comienza en el sudoeste, entre octubre y diciembre y termina en abril o mayo en el nordeste del país. En Europa comienza en España (diciembre), le sigue Francia (febrero), Reino Unido (febrero y marzo) y Holanda y Finlandia (marzo) (143,175,310).

En una revisión reciente se demuestra en casi todos los estudios que la GEA esporádica por virus tipo Norwalk es también más frecuente en los meses de invierno. Por el contrario la GEA producida por Adenovirus no muestra en general variación estacional (140,17,178)

aunque en España se ha observado un ligero predominio en algunos meses del año (137,250,267).

## **1.6 CARACTERISTICAS CLINICAS**

La gastroenteritis aguda viral es desde el punto de vista clínico indistinguible de la GEA producida por otros microorganismos como las bacterias. Esta enfermedad puede presentarse en forma de brotes epidémicos o bien tratarse de casos esporádicos. Los síntomas principales son la diarrea y los vómitos. También son frecuentes el dolor abdominal, la fiebre, que aparece con mayor frecuencia en el caso de Rotavirus y Astrovirus, y también pueden aparecer otros síntomas como cefalea (32,60,115,165, 166, 313). Se ha descrito la aparición de síntomas respiratorios concomitantes en los casos de diarrea por Rotavirus y Adenovirus, entre el 20 al 70% de los casos (178,179,250,279). Sin embargo no se conoce el significado de ello y no se han encontrado estos virus en las secreciones respiratorias (32).

La edad más frecuente de presentación de la GEA viral esporádica, causada por los principales agentes virales, es de los 6 a los 24 meses de edad (29,60,130,133,134,140, 152,164,165,197,219,267,238).

En el periodo neonatal la infección por Rotavirus es la mayoría de las veces asintomática, posiblemente debido a factores como la presencia de anticuerpos maternos, factores inhibidores en la leche materna y la inmadurez de la tripsina, necesaria para la infectividad viral. Otro factor sería la naturaleza atenuada de ciertas cepas, detectadas con frecuencia en neonatos con infección sintomática y asintomática (, 29,73,134,265). En los 2 primeros años de vida se producen infecciones repetidas que van siendo menos graves con los sucesivos episodios, siendo asintomáticas un 50% de ellas (92,159,160,279,324) indicando que se produce al menos una protección parcial. En el resto de los virus son también frecuentes las infecciones asintomáticas evidenciándose en diversos estudios la eliminación fecal asintomática de Adenovirus y Astrovirus. Se estima que alrededor de un 50% de las infecciones por Calicivirus son asintomáticas (60,67,133,178,241,197).

El periodo de incubación oscila entre 24 y 72 horas en el caso de Rotavirus y Calicivirus, (60,169,241) siendo algo más prolongado en el caso de Astrovirus (3-4 días) y de Adenovirus que puede llegar a ser de 10 días (115,178,180,253).

La GEA producida por virus es en general un proceso autolimitado, con una duración de la diarrea entre 1 y 7 días (32,233,252), prolongándose por lo general más de 1 semana en el caso de Adenovirus (130,152,178,242). Normalmente la curación se produce en 1 o 2 semanas aunque se han descrito casos de diarrea persistente asociada a Adenovirus (179,315) y Astrovirus (317).

Se ha visto que la gravedad de la GEA y la necesidad de ingreso es mayor cuando se asocia a Rotavirus del grupo A que los casos asociados al Adenovirus (130,152,242,267), al Astrovirus (133,138,178,243) y al Calicivirus (34, 239,241).

Los virus productores de GEA son una causa importante de infección nosocomial en las unidades de ingreso pediátricas. Entre el 20 y el 50% de la GEA por Rotavirus en hospitales se consideran de origen nosocomial (53,64,206,207,267,273,274) y se han descrito incidencias de diarrea nosocomial por Rotavirus en el 2 - 6% de niños ingresados (22,87,273). La infección nosocomial por Adenovirus y Astrovirus representa también un problema importante, como se demuestra en diversos estudios (101,177, 292,317). Existen menos datos sobre la incidencia de infección nosocomial por Calicivirus, aunque en los trabajos publicados se estima que es alta, siguiendo en frecuencia al Rotavirus del grupo A, con cifras hasta del 78% de los ingresados por GEA causada por este virus (190,306,101,187) y se han descrito también brotes de infección nosocomial (43).

La prevalencia de infección nosocomial probablemente esté subestimada debido al gran número de pacientes asintomáticos (81,199,201) que dificultan el control del problema. Por otra parte, la transmisión nosocomial se ve favorecida probablemente por la alta concentración de partículas virales en las heces de los niños, la alta contaminación

ambiental y la relativa resistencia a desinfectantes habituales (234,287). No puede olvidarse el papel del personal sanitario en la transmisión de la infección (223).

## **1.7 DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO**

### **1.7.1 Aislamiento en cultivos celulares**

En la actualidad el cultivo de los virus productores de gastroenteritis no se considera útil para el diagnóstico por ser técnicas laboriosas y lentas. Si tiene valor para estudios de investigación, de caracterización de los virus y para la elaboración de test diagnósticos. No se ha conseguido aún la propagación en medios celulares de los Calicivirus, Torovirus humanos ni Coronavirus (53,252)

### **1.7.2 Técnicas de Microscopía electrónica**

El diagnóstico de la GEA producida por virus se ha basado, clásicamente, en las técnicas de visualización directa con Microscopía electrónica (ME) que siguen siendo útiles en la actualidad sobre todo para Rotavirus de los grupos no A y otros virus entéricos, aunque esta técnica se realiza solo en determinados laboratorios de referencia (13,53,164,201, 252,294).

### **1.7.3 Técnicas de detección de antígeno**

En los últimos años se han desarrollado una amplia variedad de ensayos comerciales de detección directa de antígeno en muestras fecales, basados en enzimoanálisis (EIA), aglutinación con partículas de látex (LA) y, más recientemente, inmunocromatografía (ICG), disponibles para Rotavirus del grupo A y Adenovirus (252).

Las técnicas de EIA se han mostrado más sensibles que la visualización directa por ME (53,80,298), presentando también una alta especificidad en la detección de Rotavirus

grupo A, sobre todo cuando se utilizan anticuerpos monoclonales (82,111,308). La técnica de LA presenta muy buena especificidad (55,82,308) pero con una sensibilidad inferior a las técnicas de EIA (53,54,308). Las técnicas de ICG son comparables a las de EIA siendo rápidas y muy sencillas técnicamente (79,338).

Los Rotavirus del grupo C pueden detectarse en muestras de heces mediante técnicas de inmunoanálisis descritas recientemente que utilizan diferentes antígenos o anticuerpos monoclonales, (105,149,156) y que son más sensibles que los métodos de ME.

En el caso de Adenovirus muchas de estas técnicas detectan antígeno común de grupo de los Adenovirus humanos (236,301), comprobándose en diversos estudios que entre el 45% y el 93% de las muestras positivas para grupo correspondían a serotipos entéricos 40/41 (124,130,140,178,216,228). Existen técnicas comerciales que detectan específicamente estos serotipos entéricos 40 y 41 (142,228). Se ha comunicado en ocasiones el fallo en la detección de estos serotipos con métodos comerciales (216,291).

En la actualidad se dispone de técnicas de EIA para detección de Astrovirus gracias al desarrollo de anticuerpos monoclonales frente a este virus (139,141,213) que resultan más sensibles que las técnicas de ME, desarrollándose posteriormente otros anticuerpos (16,292). Existe una técnica comercial de EIA de reciente aparición que utiliza anticuerpos monoclonales y que ha sido evaluada frente a técnicas de ME y RT - PCR con buenos resultados de sensibilidad y especificidad (203, 260).

Para la detección en heces de Calicivirus humanos se utilizaba en una primera etapa suero de pacientes infectados como suero hiperinmune y así se desarrollaron técnicas de radioinmunoensayo y de EIA que detectaban virus Norwalk (13). Desde que en 1990 se pudo clonar y caracterizar el genoma del virus Norwalk (157), se han desarrollado nuevos métodos de EIA, mediante la expresión de antígenos de la cápside en sistemas de baculovirus que ha permitido la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales por medio de inmunización animal (128,153). Estos métodos presentan una mayor sensibilidad que los de primera generación y aunque todavía demasiado específicos y de

uso limitado a laboratorios de investigación parece un método prometedor para un futuro próximo (13).

#### **1.7.4 Técnicas de biología molecular**

En la actualidad se han desarrollado técnicas de PCR para muchos de los virus productores de gastroenteritis, aunque no se utilizan de forma rutinaria. Estas técnicas son más sensibles que los métodos de inmunoensayo (40,53,69,220,252), se suelen aplicar para confirmar los resultados de otras técnicas y son también útiles para el estudio de muestras como LCR o suero y muestras ambientales, como ocurre en el caso de Rotavirus con las técnicas de transcripción inversa y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) (40,53,240,337). Los estudios de RT-PCR para la investigación de Rotavirus del grupo C se utilizan de forma restringida, sobre todo para confirmar los resultados de los inmunoensayos.

Se han utilizado también métodos de PCR para la detección específica de Adenovirus entéricos (3) y de subgéneros del virus (170).

Las técnicas de RT – PCR para detección de Astrovirus se aplican para confirmar resultados de inmunoensayo (106,210) y recientemente se ha conseguido una sensibilidad muy alta (219). En el caso de Calicivirus humanos la técnica de RT –PCR se describió poco después de la clonación del virus Norwalk (77,155) siendo la más sensible y ampliamente usada en la actualidad para la detección de estos virus. Actualmente, se dispone de oligonucleótidos iniciadores desarrollados por diversos grupos que permiten detectar los virus tipo Norwalk genogrupos I y II (6,127,184,212,329,343) así como los virus tipo Sapporo (23,326,333).

#### **1.7.5 Técnicas de serotipado/genotipado**

En la actualidad, el serotipado de las cepas de Rotavirus del grupo A se lleva a cabo mediante EIA que utiliza anticuerpos monoclonales específicos, existiendo comercializados los más prevalentes, serotipos G1, G2, G3 y G4 (233). Se han desarrollado técnicas de RT-PCR para genotipar Rotavirus del grupo A con iniciadores tipo-específicos para genotipos G y P (110,121).

El serotipado de Astrovirus puede realizarse por EIA y RT-PCR (185,213,215,225). La RT-PCR se ha utilizado también para confirmar las técnicas de EIA, con buena correlación entre ambas (131,211). En el caso de Calicivirus el genotipado se realiza por RT-PCR (6,186).

## **1.8 TRATAMIENTO**

El tratamiento de la gastroenteritis producida por virus es sintomático y su fin es prevenir o tratar la deshidratación secundaria al proceso. Para ello es importante instaurar de forma precoz el aporte de líquidos para corregir déficit hídrico y combatir las pérdidas debidas a los vómitos y la diarrea (91,286). En los casos con incapacidad de ingesta oral, deshidratación grave o afectación clínica importante es necesario el ingreso hospitalario con administración de fluidoterapia e incluso alimentación parenteral.

Hoy día está recomendado el comienzo precoz de la alimentación para favorecer la nutrición y la recuperación funcional del enterocito (285). Se plantea la administración de inmunoglobulinas orales (74) y alimentos probióticos como los *Lactobacillus* (321) que producen un efecto beneficioso con acortamiento del cuadro clínico y del periodo de excreción viral.

La interrupción de la transmisión de la infección es un aspecto primordial, sobre todo en hospitales y centros de cuidados de niños pequeños. Para ello es necesario reforzar las medidas de higiene con una limpieza adecuada de manos, objetos empleados en la manipulación de los niños y también la limpieza de las superficies con desinfectantes adecuados (7,22,201,234). Por otra parte sería necesario, obviamente, reducir al máximo

las fuentes potenciales de diseminación como son los alimentos y aguas contaminadas (288,313).

## **1.9 DESARROLLO DE VACUNAS**

Los estudios con vacunas frente al Rotavirus se empezaron a desarrollar en 1982. Las primeras vacunas se basaron en el modelo jenneriano y utilizaron cepas de Rotavirus animales. En los estudios iniciales se obtuvieron resultados muy variables, con poco beneficio en los países en vías de desarrollo (208). Posteriormente, mediante la coinfección en cultivos celulares con cepas de Rotavirus animales y humanos surgió la segunda generación de vacunas, las llamadas “vacunas resortantes”, entre Rotavirus humano y de mono *rhesus* y entre humano y bovino (11). La primera desarrollada fue la vacuna de Rotavirus resortante *rhesus*-humano tetravalente que induce protección frente a los cuatro serotipos principales (G1, G2 y G3 y G4).

Los estudios de eficacia demostraron una disminución en la aparición de gastroenteritis grave por Rotavirus entre un 69 y un 91% de los niños vacunados (161,268). En Agosto de 1998 fue aprobada y recomendada en EEUU (1,4,51). Sin embargo en los estudios de seguimiento de efectos adversos se detectó un aumento del riesgo de invaginación intestinal tras la vacunación que provocó la suspensión temporal de la vacuna en Julio de 1999 (50) y la definitiva en octubre del mismo año (1,4). Posteriormente se han desarrollado otras 2 vacunas resortantes bovino-humano (58,59). En la actualidad se están investigando las vacunas de tercera generación que incluyen el desarrollo de partículas sin ARN viral, con los antígenos mayores del Rotavirus, y vacunas de ADN plasmídico, que codifica proteínas víricas específicas (37,233).

En lo que respecta a otros virus, actualmente se está profundizando en el desarrollo de vacunas para Calicivirus (93).

No existen vacunas orales frente a Astrovirus ni Adenovirus entéricos (63). Sin embargo, los estudios realizados en Finlandia con vacuna de Rotavirus tetravalente han mostrado,

por mecanismos no comprendidos, una disminución en la duración e intensidad de la diarrea por Adenovirus en niños que habían recibido las tres dosis de vacuna antirotavirus (242).

## **II OBJETIVOS**

## **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la etiología viral de la Gastroenteritis aguda (GEA) en niños menores de 4 años pertenecientes al área sanitaria IX de Madrid, incluyendo un grupo de niños con GEA adquirida en la comunidad y otro grupo de niños ingresados en la Unidad de Lactantes.

## **1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Estudiar, en niños atendidos en la Unidad de Urgencias, con GEA adquirida en la comunidad, los siguientes parámetros:
  1. Incidencia de Rotavirus grupo A, Astrovirus, Calicivirus humanos, Adenovirus y Rotavirus del grupo C.
    - 1.1. Distribución de los serotipos/genotipos G y P del Rotavirus del grupo A.
  2. Gravedad del proceso clínico según los diferentes virus productores del cuadro.
  
- Estudiar, en los niños que ingresan en la Unidad de Lactantes, los siguientes parámetros:
  3. Incidencia de Rotavirus grupo A, Astrovirus, Calicivirus y Adenovirus en los niños que ingresan con diagnóstico de GEA.
    - 3.1. Distribución de los serotipos G del Rotavirus del grupo A.
  4. Eliminación fecal asintomática del Rotavirus grupo A y Astrovirus en los niños que ingresan por otras patologías y sin síntomas de GEA, en el mismo periodo de tiempo.
  5. Infección nosocomial por los virus productores de GEA.



### **3.1. LUGAR DEL ESTUDIO**

El estudio se llevó a cabo en el Servicio de Microbiología Clínica y en las Unidades de Urgencias de Pediatría y Lactantes del Hospital Severo Ochoa de Leganés, perteneciente al Área Sanitaria IX de la Comunidad de Madrid. Dicho Hospital atiende una población de 348.000 habitantes (según datos del padrón de Mayo de 1996) y comprende 4 municipios: Leganés, Fuenlabrada, Humanes de Madrid y Moraleja de Enmedio.

El Servicio de Microbiología es un Servicio independiente que procesa todas las muestras para estudio microbiológico del área sanitaria, con una media de 100.000 muestras al año.

La Unidad de Urgencias de Pediatría asiste una media de 28.000 casos anuales, incluyendo a pacientes hasta los 14 años. La Unidad de hospitalización de Lactantes tiene una media de 800 ingresos anuales, admitiendo a pacientes desde 1 hasta los 24 meses de edad.

Desde Septiembre de 1996 se mantiene una colaboración con la Sección de Virus Productores de Gastroenteritis del Servicio de Virología del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) para el estudio virológico de las gastroenteritis agudas de nuestra población infantil.

### **3.2. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se trata de un estudio prospectivo y longitudinal, que se ha desarrollado a lo largo de dos años, utilizando protocolos clínicos y virológicos.

En el primer año (1-10-1996 al 30-9-1997) se estudiaron los niños menores de 4 años que acudieron a la Unidad de Urgencias por un cuadro de GEA adquirida en la comunidad, para obtener datos de la etiología viral de la GEA, así como de la gravedad clínica según los distintos agentes virales y de la distribución de los serotipos/genotipos G y P de los Rotavirus del grupo A identificados.

En el segundo año (1-6-1998 al 31-5-1999) se estudiaron los niños que ingresaron en la Unidad de Lactantes. En éstos se determinó la incidencia de la GEA producida por

virus como motivo de ingreso, la tasa de eliminación viral asintomática, la incidencia de infección nosocomial por virus productores de gastroenteritis y la distribución de los serotipos de los Rotavirus del grupo A.

### **3.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

#### **3.3.1. Criterios de inclusión y exclusión**

En el primer año (1-10-1996 al 30-9-1997) se valoraron todos los niños menores de 4 años atendidos en la Unidad de Urgencias por un cuadro clínico de GEA adquirida en la comunidad.

El diagnóstico clínico de gastroenteritis aguda se estableció por la presencia de deposiciones de consistencia menor y/o con una frecuencia mayor de lo habitual, con menos de 14 días de evolución, no habiendo otra causa evidente para dicho síntoma.

Se consideró que un paciente presentaba un episodio nuevo de GEA si entre la primera y segunda visita se había producido un tránsito intestinal normal.

En el segundo año (1-6-1998 al 31-5-1999) se incluyeron los niños menores de 2 años que ingresaron en la Unidad de Lactantes considerando los siguientes grupos:

- Niños ingresados por GEA, según la definición clínica anteriormente expuesta, adquirida en la comunidad.
- Niños ingresados por otras patologías:
  - Sin síntomas de GEA en el momento del ingreso y en los que se estudió la eliminación fecal de Rotavirus y Astrovirus.
  - Con infección nosocomial:
    - a) Sintomática: aparición de un cuadro clínico de GEA en pacientes ingresados por otras patologías, sin síntomas de GEA en el momento del ingreso hospitalario y con aparición de dichos síntomas desde 72 horas después de su ingreso en la Unidad hasta las 72 horas siguientes al alta hospitalaria.

- b) Asintomática: niños ingresados por otras patologías distintas de GEA, en los que el estudio de eliminación viral era negativo al ingreso y positivo pasadas 72 horas de éste.

### **3.3.2. Muestra de estudio**

En el primer año se estudiaron en Urgencias un total de 976 niños menores de 4 años con GEA. De ellos, en 822 casos (84,2% del total) se obtuvo muestra fecal para análisis etiológico, constituyendo estos pacientes el grupo estudiado.

En el segundo año se valoraron los 801 niños menores de 2 años que ingresaron en la Unidad de Lactantes. De ellos, 135 casos ingresaron por GEA y 606 por otras patologías diferentes.

### **3.4. ANALISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

La valoración clínica se realizó mediante la recogida de datos en un protocolo preestablecido, registrándose en el momento de ser asistidos los pacientes, las siguientes variables:

- Sexo.
- Edad.
- Mes del año de la consulta.
- Gravedad clínica del proceso (primer año).
- Necesidad de ingreso hospitalario.
- Duración de la estancia hospitalaria

Para el análisis de la variabilidad estacional de cada uno de los virus estudiados se agruparon los meses del año según estaciones climáticas: el invierno desde el 21 de diciembre al 20 de marzo, la primavera desde el 21 de marzo al 20 de junio, el verano desde el 21 de junio al 20 de septiembre y el otoño desde el 21 de septiembre al 20 de diciembre.

Para el estudio de la gravedad clínica en el primer año, se utilizó la escala de Ruuska y Vesikari (278,279) (Tabla III), con la que se puede alcanzar una puntuación máxima de 20 puntos. Para ello, se recogieron los siguientes datos:

- Duración previa de la diarrea (número de días).
- Frecuencia máxima de deposiciones por día.
- Duración previa de los vómitos (número de días).
- Frecuencia máxima de vómitos por día.
- Temperatura axilar máxima registrada.
- Existencia de deshidratación y grado según la pérdida de peso estimada (leve del 1 al 5%, moderada del 5 al 10% y grave sí más del 10%).
- Tratamiento recibido (ninguno, rehidratación oral o ingreso hospitalario).

**Tabla III.** Escala de gravedad clínica (278, 279).

SÍNTOMAS Ó SIGNOS	PUNTUACIÓN
Duración previa de la diarrea (días)	
1-4	1
5	2
≥ 6	3
Frecuencia máxima de deposiciones/día	
1-3	1
4-5	2
≥6	3
Duración de los vómitos (días)	
1	1
2	2
≥3	3
Frecuencia máxima de vómitos/día	
1	1
2	2
3	3
Temperatura máxima (°C)	
37,1-38,4	1
38,5-38,9	2
≥39	3
Deshidratación (%)	
1-5	2
≥6	3
Tratamiento	

Ninguno	0
Rehidratación oral	1
Hospitalización	2

Se ha considerado, de acuerdo con lo establecido por otros grupos de trabajo (278), como punto de corte de gravedad moderada la puntuación igual o mayor a 11.

Según el protocolo establecido se procedió al ingreso hospitalario y a la administración de fluidoterapia en los casos con incapacidad de ingesta de líquidos por boca, deshidratación moderada-grave o afectación clínica importante.

En el segundo periodo de estudio se registraron también las distintas patologías motivo de ingreso en la Unidad de Lactantes, las cuales se agruparon en las siguientes categorías:

- Patología respiratoria.
- Síndrome febril.
- Infección urinaria.
- Otros procesos infecciosos no-GEA.
- Otras patologías.

Para estimar la incidencia de GEA nosocomial en los niños ingresados por otras patologías distintas de GEA se registró la aparición de síntomas de GEA a lo largo del ingreso y, además, se realizó una entrevista telefónica entre los 3 y 5 días posteriores al alta hospitalaria, interrogando sobre la aparición de síntomas de GEA en las 72 horas siguientes al alta.

### **3.5. METODOLOGIA DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

#### **3.5.1. Obtención de las muestras**

La recogida de heces se realizó mediante emisión directa durante las 24 horas siguientes a ser atendidos los niños en la Unidad de Urgencias.

En los niños ingresados en la Unidad de Lactantes las muestras se obtuvieron de la siguiente forma:

- En el grupo de pacientes con GEA, en el momento del ingreso.
- En el grupo de pacientes ingresados por otras patologías las heces se recogieron en el momento del ingreso, cada 3 días de su estancia hospitalaria y siempre que se presentara un cuadro clínico de GEA.

Todas las muestras se conservaron a 4°C durante 24-48 horas, hasta proceder a su análisis y a -80°C posteriormente.

### **3.5.2. Estudio microbiológico**

En todos los pacientes se realizó coprocultivo en el Servicio de Microbiología del Hospital Severo Ochoa para estudio rutinario de bacterias enteropatógenas (*Salmonella* spp. , *Shigella* spp. , *Yersinia* spp. , *Aeromonas* spp. y *Campylobacter* spp.). No se llevó a cabo la detección de los *E.coli* productores de GEA por no ser esta técnica de aplicación rutinaria en el laboratorio de nuestro hospital, por la escasez de hallazgos positivos en estudios realizados en otros centros (46,258). No se incluyó tampoco el estudio de parásitos, al no haber sido realizado de forma sistemática en todas las muestras.

El análisis virológico, realizado en el laboratorio de la Sección de Virus Productores de Gastroenteritis del Centro Nacional de Microbiología, incluyó estudio de Rotavirus del grupo A y C, Adenovirus, Astrovirus y Calicivirus por los métodos descritos en los apartados 2.6. al 2.10. En los niños ingresados por patologías diferentes a GEA se llevó a cabo la detección periódica del antígeno de Rotavirus del grupo A y de Astrovirus.

### **3.5.3. Productos químicos e inmunoquímicos empleados**

Las sales inorgánicas, ácidos, bases, y compuestos orgánicos (etanol), así como los colorantes para electroforesis y detergentes fueron suministrados en su mayoría por Merck (Darmstad, Alemania) y Sigma (St. Louis, MO, USA). Merck proporcionó también la seroalbúmina bovina (BAS) y el etilen diamino tetracetato sódico (EDTA). El dietil pirocarbonato (DEPC) se obtuvo de Sigma. El Tween 20 fue suministrado por Bio-Rad (Hércules, California, USA).

La detección de antígeno en heces de Rotavirus grupo A, Adenovirus y Astrovirus se realizó por técnicas comerciales de Enzimoimmunoensayo (EIA) suministradas por Dako (Cambridgeshire, UK), como referencia.

La detección de antígeno de 40/41 de Adenovirus se llevó a cabo por la técnica comercial de ICG de Fastia diagnostic (Materlab)

Para el serotipado de Rotavirus grupo A, se emplearon los anticuerpos monoclonales G1, G2, G3, G4 y un anticuerpo policlonal anti -Rotavirus, proporcionados por Silenus Laboratories (Hawthorn, Australia). EL sustrato TMB fue suministrado por Sigma.

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el sistema comercial Rnaid® (BIO 101, Inc. , La Jolla, CA, USA) que requiere la preparación de solución de tiocianato de guanidina. Para ella se utiliza: tiocianato de guanidina (Fluka), citrato sódico (Sigma), N-Sarkosyl (Sigma), y 2 - Met (Bio-Rad).

La transcripción inversa y amplificación se realizaron utilizando el sistema comercial Acces RT-PCR System de Promega (Madison, WI, USA), que contiene todos los productos y enzimas necesarios para la reacción. La agarosa Sea – Kem LE fue proporcionada por FMC y el bromuro de etidio por Sigma. Bio-Rad suministró el azul de bromofenol y xilencianol. Se utilizaron los marcadores del tamaño de DNA (III, IV) de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania).

#### 3.5.4. Soluciones y tampones utilizados

- **AEH – TMB** (acetato, EDTA y agua oxigenada): Acetato 0.1M pH 5.0; EDTA 1mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,3 mM; TMB (0.2 mg/ml).
- **Agua-DEPC**: (agua destilada estéril con DEPC): H<sub>2</sub>O con DEPC al 0,1%.
- **CB pH 9,6** (tampón carbonato-bicarbonato): Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 15 mM; NaHCO<sub>3</sub> 34 mM.
- **PBS pH 7,4** (solución tamponada de fosfatos): NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM.
- **PBS-B**: seroalbúmina bovina (BSA) al 2% en solución de PBS.
- **PBS-T**: Tween 20 al 0.05% en solución de PBS.

- **TB pH 8,2** (tampón de biotina). NaHCO<sub>3</sub> 100 mM; NaCl 11,9 mM; KCl 2,7 mM.
- **TBE** (tampón tris borato con EDTA): Tris 90 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 0,01m.
- **TCG** (solución de tiocianato de guanidina): Tiocianato de guanidina 6M, citrato sódico 25 mM pH 7, N-Sarkosyl 0,5% y 2 - Met 0,1 M en Agua-DEPC.
- **TST** (tampón tris salino con Tween 20): NaCl 150 mM; Tween 20 al 0.05% en solución de Tris pH 7,5 20 mM.
- **TST-Ca**: CaCl<sub>2</sub> 2mM en solución de TST.
- **TST-Ca-B**: seroalbúmina bovina (BSA) al 1% en solución de TST-Ca.
- **TST-Ca-L**: leche descremada comercial al 2,5% en solución de TST-Ca.

### 3.5.5. Oligonucleótidos empleados

Todos los oligonucleótidos utilizados en este estudio han sido sintetizados por Amersham- Pharmacia.

Las secuencias de los empleados en la caracterización de los genotipos G y P de los Rotavirus del grupo A se exponen en las Tablas IV y V.

**Tabla IV.** Secuencia de los oligonucleótidos específicos de cada genotipo G (Das *et al*, 1994<sup>73</sup>)

	Secuencia (5'-3')	Genotipo
<b>9Con1</b>	TAGCTCCTTTAATGTATGG	
<b>9T1-1</b>	TCTTGRCAAAGCAAATAATG	G1
<b>9T1-2</b>	GTTAGAAATGATTCTCCACT	G2
<b>9T-3P</b>	GTCCAGTTGCAGTCTTAGC	G3
<b>9T-4</b>	GGGTCGATGGAAAATTCT	G4
<b>9T-9B</b>	TATAAAGTCCATTGCAC	G9

**Tabla V.** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la caracterización de la VP4 (Gentsch *et al.*, 1992 <sup>110</sup>).

	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Genotipo (serotipo)</b>
<b>CON3</b>	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	
<b>CON2</b>	ATTTCCGACCATTATAACC	
<b>5 T-1</b>	ATCATAGTTAGTAGTCGG	10 (4)
<b>2 T-1</b>	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	4 (1B)
<b>4 T-1</b>	TGAGACATGCAATTGGAC	9 (3)
<b>1 T-1</b>	TCTACTTGATAACGTGC	8 (1A)
<b>3 T-1</b>	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	6 (2A)

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la detección de los Rotavirus del grupo C se expone en la Tabla VI.

**Tabla VI.** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la detección de los Rotavirus del grupo C (Jiang *et al.* , 1995 <sup>155</sup>).

	<b>Secuencia (5'-3')</b>
<b>1</b>	GGCATTAAAAAAGAAGAAGCTG
<b>2</b>	AGCCACATGATCTTGTTT
<b>3</b>	CTACCAAATGCAGCCCAT
<b>4</b>	TGTTTGGAGATGTGATGA

Las secuencias de los oligonucleótidos usados como iniciadores para la detección de Calicivirus humanos de los genogrupos I y II se exponen en la tabla VII.

**Tabla VII.** Secuencias de los oligonucleótidos específicos de los genogrupos I y II de Calicivirus humanos (Vinjé *et al.* , 1996 <sup>329</sup>).

	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Genogrupo</b>
<b>JV12</b>	ATA CCA CTA TGA TGC AGA TTA	I y II
<b>JV13</b>	TCA TCA TCA CCA TAG AAA GAG	I y II

### 3.6. TECNICAS DE DETECCION DE ROTAVIRUS DEL GRUPO A

En todas las muestras fecales estudiadas se realizó detección de antígeno de Rotavirus del grupo A mediante la técnica de EIA que se expone en el apartado 2.6.1.

En todas las muestras positivas por EIA se efectuó determinación del serotipo G por técnica de inmunoanálisis con anticuerpos monoclonales específicos de serotipo (apartado 2.6.2.). En las muestras con resultado indeterminado se utilizó un método de genotipado G mediante la técnica de RT-PCR (apartado 2.6.3.).

El estudio de genotipos P se realizó sobre un grupo de muestras representativo de los distintos serotipos/genotipos G previamente detectados. Para ello se empleó, como en el estudio de genotipos G, una técnica de RT-PCR (apartado 4.6.5.).

### **3.6.1. Detección de antígeno de Rotavirus grupo A en muestras fecales por EIA.**

Se ha utilizado un EIA comercial (IDEIA™ de Dako Diagnostics) tipo “sandwich”, de fase sólida y en microplaca, que utiliza un anticuerpo policlonal que detecta proteínas específicas de los Rotavirus del grupo A, especialmente la proteína mayoritaria de la cápside interna (VP6).

El sistema comercial proporciona todos los reactivos necesarios para la realización de la prueba como son los controles positivo y negativo, diluyente de muestras, anticuerpo conjugado con HPRO, la solución de lavado y el TMB. La técnica tiene un tiempo mínimo de realización de 90 minutos y la lectura de los resultados se efectúa midiendo las unidades de absorbancia (UA) a 450 nm. Según las instrucciones del fabricante, es capaz de detectar concentraciones de hasta  $7,8 \times 10^5$  partículas virales/ml, y frente a la ME muestra una correlación, sensibilidad y especificidad del 99,5%, 100% y 99,2% respectivamente. En todos los ensayos se incluye un control positivo (Rotavirus bovino inactivado) y al menos dos negativos. El procedimiento técnico consiste básicamente en lo siguiente:

- Los 96 micropocillos están recubiertos con un anticuerpo policlonal de conejo específico para Rotavirus del grupo A. Sobre ellos se añaden las muestras previamente diluidas al 10% en el tampón de dilución de muestras.
- Seguidamente se añade el anticuerpo policlonal conjugado con HPRO. En los casos positivos, el antígeno presente en la muestra es capturado entre el anticuerpo de la fase sólida y el correspondiente conjugado.

- Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, se realizan 6 lavados sucesivos con la solución de lavado y a continuación se añade el sustrato cromógeno.
- Interpretación de los resultados: para validar el ensayo, el control negativo (o el valor medio de ellos) debe tener un valor inferior a 0,150 UA y el control positivo debe ser superior a 0,500 UA. El valor del punto de corte se calcula añadiendo 0,100 UA al valor medio de los controles negativos, considerándose positivas las muestras con valores superiores.

### 3.6.2. Técnica de serotipado G

Como ya se ha comentado, las muestras positivas para Rotavirus del grupo A se tipificaron frente a los serotipos G mediante técnica de EIA tipo “sandwich”, utilizando un anticuerpo policlonal frente a Rotavirus del grupo A y 4 anticuerpos monoclonales con especificidad para los serotipos G1, G2, G3 y G4 (Silenus Laboratories), según el método descrito por los fabricantes. El procedimiento es el siguiente:

- Las microplacas (Nunc High Binding) se cubren con 100  $\mu$ l/pocillo del anticuerpo policlonal diluido 1:500 en PBS pH 7.4 y se incuban una noche a 4°C en cámara húmeda.
- Las muestras de heces, previamente homogenizadas en PBS al 25%, se diluyen 1:4 en la solución TST-Ca-L y se dispensan en cinco pocillos cada una, a razón de 100  $\mu$ l/pocillo.
- Después de 3 horas de incubación a 37°C en cámara húmeda y de 4 lavados sucesivos con TST-Ca, se añaden 100  $\mu$ l/pocillo de cada anticuerpo monoclonal diluido 1:200 en TST-Ca-B en cuatro pocillos y 100  $\mu$ l de TST-Ca-B solo en el quinto pocillo, como control negativo.
- Tras incubar 2 horas a 37°C en cámara húmeda y realizar 4 nuevos lavados con TST-Ca, se añade el anticuerpo policlonal conjugado con HPRO, diluido 1:4000 en TST-Ca-B y se vuelve a incubar 1 hora a 37°C.
- Seguidamente y después de 4 lavados, se añaden 100  $\mu$ l/pocillo del sustrato cromógeno (TMB en solución AEH).

- La lectura de las placas se realiza midiendo las UA a 450 nm.
- Interpretación de los resultados: para validar el ensayo, el control negativo debe tener un valor inferior a 0,150 UA. El valor del punto de corte se calcula añadiendo 0,150 UA al valor del control negativo, considerándose positivas las muestras con valores superiores.

### 3.6.3. Técnica de genotipado G Y P

Las muestras que mostraron un resultado indeterminado tras la técnica de serotipado por EIA para Rotavirus del grupo A fueron genotipadas utilizando una técnica de RT-PCR. Los genotipos P se investigaron utilizando la misma técnica.

Para ello, en un primer paso, se llevó a cabo la extracción del ARN de las muestras y, a continuación, se procedió a realizar una transcripción inversa y amplificación de las secuencias conservadas de los genes 9 y 4 del virus que codifican, respectivamente, las proteínas estructurales VP7 y VP4. Posteriormente, se procedió a amplificar las regiones variables intragen específicas de un determinado genotipo G o genotipo P. Se incluyeron controles positivos (cepas de Rotavirus adaptadas a cultivos celulares y muestras previamente serotipadas por la técnica de EIA descrita) y negativos (muestras fecales negativas). Los métodos empleados se describen a continuación.

#### **Extracción del ARN:**

El ARN vírico se aisló y purificó de las muestras fecales siguiendo el método descrito por Buesa *et al.*<sup>193</sup> utilizando el sistema comercial Rnaid® (BIO 101, Inc. , La Jolla, CA, USA). El procedimiento consiste en mezclar 250 µl de solución TCG 6M con el mismo volumen de muestra fecal previamente diluida al 25% en PBS. A continuación se añaden 12 µl de matriz (Rnaid® “glass powder”) y se incuba en agitación 10 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 1 minuto y lavar tres veces el sedimento, se centrifuga finalmente a 12.000 r.p.m. durante 2 minutos. A continuación se seca el sedimento, que contendrá el ARN vírico ligado a la matriz y se resuspende en 40 µl de agua- DEPC. Se incuba 10 minutos a 65°C y se centrifuga a 12.000 r.p.m. 2 minutos. El sobrenadante se mantiene a -20°C hasta realizar la RT-PCR.

### Transcripción inversa y PCR:

Las reacciones de transcripción inversa y amplificación se realizaron utilizando reactivos comerciales (Acces RT-PCR System de Promega). La metodología empleada consiste en lo siguiente:

- Se mezclan 2 µl del ARN vírico previamente extraído con 46 µl de una solución que contiene: 1x de tampón de reacción; 2 U de inhibidor de ribonucleasas (RNAsin®); 1,5 mM de SO<sub>4</sub>Mg; 0,5 mM de dNTPs; 1µmol de los apropiados (tablas IV y V) y la cantidad suficiente de agua-DEPC.
- Tras desnaturalizar 3 minutos a 96°C, la mezcla se enfría y se añaden las enzimas necesarias (5 U de transcriptasa inversa y 5 U de ADN-polimerasa).
- En un termociclador se realiza secuencialmente una primera fase de transcripción inversa (45 minutos a 45°C), un ciclo de desnaturalización (2 minutos a 94°C), 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 94°C, 2 minutos a 45°C y 2 minutos a 70°C) y un ciclo de extensión final (7 minutos a 70°C).
- Los productos de PCR se visualizaron bajo luz ultravioleta, previa electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. El análisis de los mismos se realizó por densitometría, con ayuda de un marcador de pesos moleculares incluido en la electroforesis.
- Interpretación de resultados: los productos obtenidos en la amplificación presentaban el siguiente tamaño: Genotipo 1 (158 pb), Genotipo 2 (244 pb), Genotipo 3 (466 pb) y Genotipo 4 (403 pb). El genotipo P[8] presenta un tamaño de 345 pb, el P[6] 267 pb, el P[9] 391, el P[4] 483 pb y el P[10] 583 pb.

### 3.7. DETECCION DE ROTAVIRUS DEL GRUPO C

En las muestras en las que fue negativa la detección de otros agentes (Rotavirus del grupo A, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus y bacterias enteropatógenas) se realizó el estudio de Rotavirus del grupo C.

Este análisis se realizó en colaboración con el CDC, utilizando un EIA específico según especificaciones de Jiang *et al.*<sup>72</sup>. El método emplea como captura un policlonal específico de grupo proveniente de cerdo gnotobiótico hiperinmune frente a la cepa

Cowden (anti-Cowden 1) y otro anticuerpo policlonal biotinilado como detector (anti-Cowden 2). El procedimiento se describe a continuación:

- Se aplican 100  $\mu$ l/pocillo del policlonal anti-Cowden 1 diluido 1:2000 en tampón CB en los pocillos de las columnas A-D de la microplaca (Nunc Maxisorp) y 100  $\mu$ l/pocillo de suero de cerdo preimmune en los pocillos de las columnas E – H, que serán utilizadas como controles negativos.
- Se incuba una noche a 4°C y secuencialmente se realizan 3 lavados con PBS-T, se bloquea con 200  $\mu$ l/pocillo de PBS-B y se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Durante esta incubación se preparan las muestras a ensayar diluyéndolas 1:5 en PBS-T, agitándolas y clarificándolas mediante centrifugación a 6.000 r.p.m. durante 5 minutos.
- Después de realizar 3 lavados con PBS-T, se aplican 100 $\mu$ l/pocillo de las muestras a analizar en todos los pocillos, filas A-F, incubando 2 horas a 37°C.
- Tras lavar 4 veces con PBS-T, se añade 100  $\mu$ l del policlonal anti- Cowden 2 diluido 1:2.000 en TB y se vuelve a incubar a 37°C durante 1 hora.
- Tras 5 lavados con PBS-T, se añade 100  $\mu$ l/pocillo de HRP-estreptavidina diluida 1:2000 en PBS-T y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Después de 6 lavados con PBS-T se añade 100  $\mu$ l/pocillo de AEH-TMB y se incuba a temperatura ambiente durante otros 30 minutos. La reacción se para con 100  $\mu$ l/pocillo de HCl 1 N. La lectura de la absorbancia se realiza a 450 nm.
- Interpretación de los resultados: Se considera positivo cuando la relación positivo/negativo es  $\geq 1,7$  UA o bien cuando la resta positivo – negativo es  $\geq 0,07$  UA.

Las muestras positivas de remitieron para confirmación por RT-PCR a los Centers for disease Control (CDC).

### **3.8. DETECCION DE ADENOVIRUS**

En todas las muestras estudiadas se llevó a cabo determinación de Adenovirus por técnica de EIA. En las muestras positivas se realizó además la detección de los principales Adenovirus entéricos, serotipos 40 y 41, mediante una prueba de inmunocromatografía.

#### **3.8.1. Detección de antígeno de Adenovirus en muestras fecales por EIA**

Se utilizó un EIA comercial (IDEIA™ Dako Diagnostics) tipo “*sandwich*”, de fase sólida en microplaca, que utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido al antígeno del hexon específico de género presente en todos los serotipos conocidos de Adenovirus humanos.

El sistema comercial proporciona todos los reactivos necesarios para la realización de la prueba como son los controles positivo y negativo, diluyente de muestras, anticuerpo conjugado con HPRO, la solución de lavado y el TMB. El tiempo mínimo de realización es de 90 minutos y la lectura de los resultados se efectúa midiendo las UA a 450 nm. Según las instrucciones del fabricante, es capaz de detectar concentraciones de Adenovirus de hasta  $3,0 \times 10^5$  partículas virales/ml, y muestra, frente a la ME, una correlación, sensibilidad y especificidad del 99,5%; 99,1% y 99,0%. El procedimiento e interpretación de resultados sigue el mismo esquema que el descrito en el apartado 1.2.2.3.1. , usando como control positivo Adenovirus tipo 7 inactivado.

#### **3.8.2. Detección de antígeno de Adenovirus entéricos (serotipos 40 y 41) en muestras fecales por ICG**

Se aplicó una técnica comercial basada en un sistema homogéneo de ICG que utiliza tiras reactivas como soporte de reacción (40/41 Adeno – Strip®, Fastia diagnostics). El método emplea anticuerpos monoclonales marcados con partículas de oro coloidal, dirigidos contra las proteínas 40 y 41 de Adenovirus humano<sup>357</sup>. La muestra diluida al 5%, junto con el combinado de oro, migran por capilaridad a lo largo de la tira hasta la primera zona reactiva fijada con anticuerpos policlonales anti-Adenovirus. Si éste se

encuentra en la muestra queda capturado y la inmunoreacción da lugar a una banda coloreada. La muestra continúa migrando hasta una segunda zona reactiva fijada con anticuerpos IgG anti-ratón que constituyen el control interno indicativo del funcionamiento correcto de la prueba. Según datos del fabricante, esta técnica presenta, frente a un EIA con anticuerpos monoclonales, una sensibilidad y especificidad del 99% y 100% respectivamente.

### **3.9. DETECCION DE ASTROVIRUS**

En todas las muestras fecales estudiadas se practicó la detección de antígeno de Astrovirus por la técnica de EIA comercial (IDEIA™, Dako Diagnostics).

Esta técnica permite la detección de antígeno de Astrovirus humanos utilizando una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de género. El sistema comercial proporciona todos los reactivos necesarios para la realización de la prueba como son los controles positivo y negativo, diluyente de muestras, anticuerpo policlonal y el conjugado con HPRO, la solución de lavado y el TMB. El tiempo mínimo de realización es de 140 minutos y la lectura de los resultados se efectúa midiendo las UA a 450 nm. Según el fabricante la sensibilidad, especificidad y correlación del ensayo frente a ME es de 100%, 98,9% y 99,1%, respectivamente. Para todos los ensayos se incluye un control positivo (proteína recombinante de Astrovirus tipo 1) y al menos dos negativos. El procedimiento técnico consiste básicamente en lo siguiente:

- A los 96 pocillos de la microplaca recubiertos con el anticuerpo monoclonal se añaden las muestras de heces diluidas previamente al 10% en el tampón de dilución. En los casos positivos, el antígeno de Astrovirus presente en la muestra será capturado en la fase sólida.
- Se incuba 60 minutos a 37°C y, tras cuatro lavados con el tampón de lavado, se añade el anticuerpo policlonal, se incuba 30 minutos a 37°C y, tras un lavado, se añade el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HPRO.
- Después de otra incubación de 30 minutos a 37°C y un tercer lavado, se añade el sustrato cromógeno proporcionado en el sistema comercial.

- Interpretación de los resultados: El control negativo debe ser inferior a 0,150 UA y el positivo superior a 0,500. El valor del punto de corte se calcula añadiendo 0,150 UA al valor medio de los controles negativos, considerándose positivas las muestras con valores superiores al calculado.

### 3.10. DETECCION DE CALICIVIRUS

En las muestras estudiadas en las que no se detectaron Rotavirus, Astrovirus, Adenovirus ni bacterias enteropatógenas se llevó a cabo la determinación de Calicivirus mediante una técnica de RT-PCR.

La extracción del RNA viral así como la realización de la RT-PCR se llevó a cabo, siguiendo la técnica descrita previamente (apartado 4.6.5.) utilizando los iniciadores JV12 y JV13, los cuales generan un amplicón de 326 pb común a los genogrupos I y II de Calicivirus humanos.

El método consiste en:

- Se mezclan 2 µl de ARN con 46 µl de una solución en agua-DEPC que contiene: 1 U/µl de inhibidor de ribonucleasas (RNAsin®), 1,5 mM de SO<sub>4</sub>Mg, 0.5 mM de dNTPs, 1 µM de cada uno de los y 1x de tampón de reacción.
- Tras desnaturalizar 3 minutos a 96°C, la mezcla se enfría, se añaden 5 U de transcriptasa inversa y 5 U de ADN polimerasa, y se incuba todo 10 minutos a temperatura ambiente.
- En un termociclador se realiza secuencialmente una primera fase de transcripción inversa (45 minutos a 45°C), un ciclo de desnaturalización (2 minutos a 94°C), 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 94°C, 1.5 minutos a 45°C y 2 minutos a 70°C) y un ciclo de extensión final (7 minutos a 70°C).
- Los productos de PCR se visualizaron bajo luz ultravioleta, previa electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. El análisis de los mismos se realizó por densitometría, con ayuda de un marcador de pesos moleculares incluido en la electroforesis.

### 3.11. MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS

Se han aplicado los indicadores epidemiológicos según la metodología descrita por Rothman (277). Los datos de incidencia anual de GEA esporádica por 1.000 niños menores de 4 años que precisaron atención en la Unidad de Urgencias procedentes del área sanitaria se obtuvieron dividiendo el número de casos atendidos en el intervalo de tiempo considerado (1996-1997) por la población susceptible (15.126 niños menores de 4 años, según datos de la renovación padronal de Mayo de 1996).

#### **Incidencia anual de GEA esporádica en menores de 4 años =**

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ casos de GEA infantil durante 1996-97}}{15.126} \times 1.000$$

La estimación de la incidencia de GEA esporádica asociada a los diferentes virus que requiere atención hospitalaria por 1.000 niños menores de 4 años se llevó a cabo extrapolando los resultados obtenidos en el grupo de pacientes con muestra al total de la población estudiada, y dividiendo el número de casos obtenidos por la población susceptible. Se consideraron solo los casos en que en el estudio etiológico se encontró el agente viral como único agente.

#### **Incidencia de GEA esporádica asociada a los diferentes virus =**

$$\frac{\frac{\text{n}^{\circ} \text{ casos de GEA debidos a un virus}}{\text{población con muestra fecal}} \times \text{población total estudiada}}{15.126} \times 1.000$$

La incidencia anual de hospitalización por GEA esporádica en menores de 4 años se obtuvo dividiendo el número de casos ingresados por la población susceptible (15.126 niños menores de 4 años).

**Incidencia anual de hospitalización por GEA esporádica en menores de 4 años =**

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ casos de GEA ingresados durante 1996-97}}{15.126} \times 1.000$$

**Incidencia anual de hospitalización por GEA esporádica asociada a los diferentes virus en menores de 4 años =**

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ casos de GEA ingresados debidos a un virus}}{15.126} \times 1.000$$

En el segundo año, la frecuencia de GEA asociada a los distintos agentes virales como motivo de ingreso en niños menores de 2 años se determinó dividiendo el número de casos detectado de cada agente viral por el número total de niños ingresados.

**Frecuencia de GEA esporádica como motivo de ingreso en menores de 2 años =**

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ casos de GEA ingresados durante 1998-99}}{\text{n}^\circ \text{total de niños ingresados}} \times 100$$

**Frecuencia de GEA esporádica asociada a los distintos agentes virales como motivo de ingreso en menores de 2 años =**

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ casos de GEA ingresados debidos a un virus}}{\text{n}^\circ \text{total de niños ingresados}} \times 100$$

Así mismo en el segundo año, se estimó la incidencia de ingreso hospitalario por un determinado agente por 1.000 niños menores de 2 años dividiendo el número de casos identificados por la población susceptible (6.892 niños menores de 2 años según datos citados de la última renovación censal).

**Incidencia anual de ingreso hospitalario por GEA esporádica asociada a los distintos virus en menores de 2 años =**

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ casos de GEA ingresados debidos a un virus}}{6.892} \times 1.000$$

La incidencia de eliminación asintomática de Rotavirus y Astrovirus en el periodo de tiempo considerado se estimó dividiendo el número de casos en que se detectó excreción viral, sin síntomas clínicos de GEA, por el número total de casos controlados.

**Incidencia de eliminación asintomática de Rotavirus y Astrovirus =**

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ casos con detección viral positiva}}{\text{n}^{\circ} \text{ de casos controlados}} \times 100$$

La incidencia de infección nosocomial sintomática y asintomática se ha estimado dividiendo el número de casos identificados de infección nosocomial por el número total de pacientes ingresados por otras patologías en la Unidad de Lactantes durante el intervalo de tiempo que duró el estudio.

**Incidencia de infección nosocomial sintomática/asintomática en menores de 2 años =**

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de casos de infección nosocomial sintomática/asintomática}}{\text{n}^{\circ} \text{ de niños ingresados sin GEA}} \times 100$$

La incidencia de infección nosocomial por Rotavirus del grupo A y por Astrovirus se ha obtenido dividiendo la suma del número de casos de infección sintomática y el de infección nosocomial asintomática asociados a cada agente por el número de niños ingresados sin GEA.

**Incidencia de infección nosocomial por Rotavirus del grupo A y por Astrovirus en menores de 2 años =**

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ casos GEA nosocomial} + \text{n}^{\circ} \text{ casos infección nosocomial asintomática}}{\text{n}^{\circ} \text{ de niños ingresados sin GEA}} \times 100$$

### 3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de las variables cuantitativas se han expresado como media, desviación estándar y rango (valores mínimo y máximo). En los casos en los que la variable no se ajustaba a una distribución normal se ha añadido la mediana.

Los valores de las variables cualitativas se han expresado como frecuencias y porcentajes.

Las variables cuantitativas han sido comparadas, en el análisis univariante, mediante la prueba “t” de Student. Para la comparación global de más de dos muestras se ha empleado el análisis de la varianza. Las comparaciones múltiples *a posteriori* (tomadas de dos en dos) se han analizado mediante la prueba de Scheffé.

Se utilizaron técnicas de análisis multivariante para evaluar la contribución independiente de cada variable a la gravedad registrada (primer periodo de estudio).

Las variables cualitativas se compararon mediante la prueba de la “chi-cuadrado”, aplicando la prueba exacta de Fischer cuando era requerido.

Se fijó el nivel de significación estadística en una p menor de 0,05.

Los datos y el análisis estadístico de este estudio han sido realizados utilizando el programa SPSS versión 8.0.

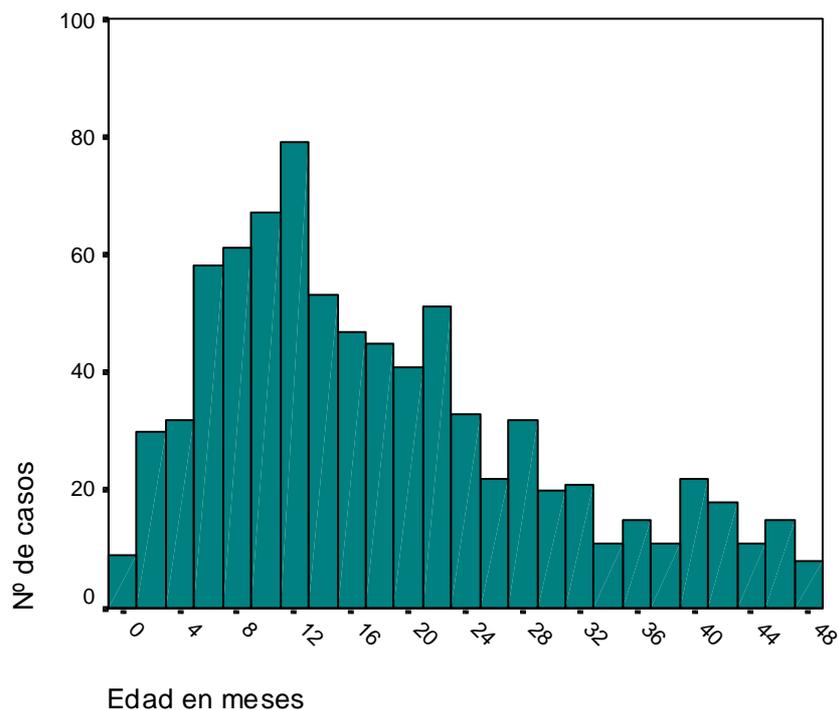
## 4.1. GASTROENTERITIS AGUDA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

### 4.1.1. Primer periodo

#### 4.1.1.1. Características de la población de estudio

Durante el periodo 1-10-1996 al 30-09-1997, se valoraron en la Unidad de Urgencias de Pediatría un total de 976 casos de GEA en niños menores de 4 años. Se obtuvo muestra fecal para estudio microbiológico en 820 casos (84%), constituyendo estos el grupo de estudio.

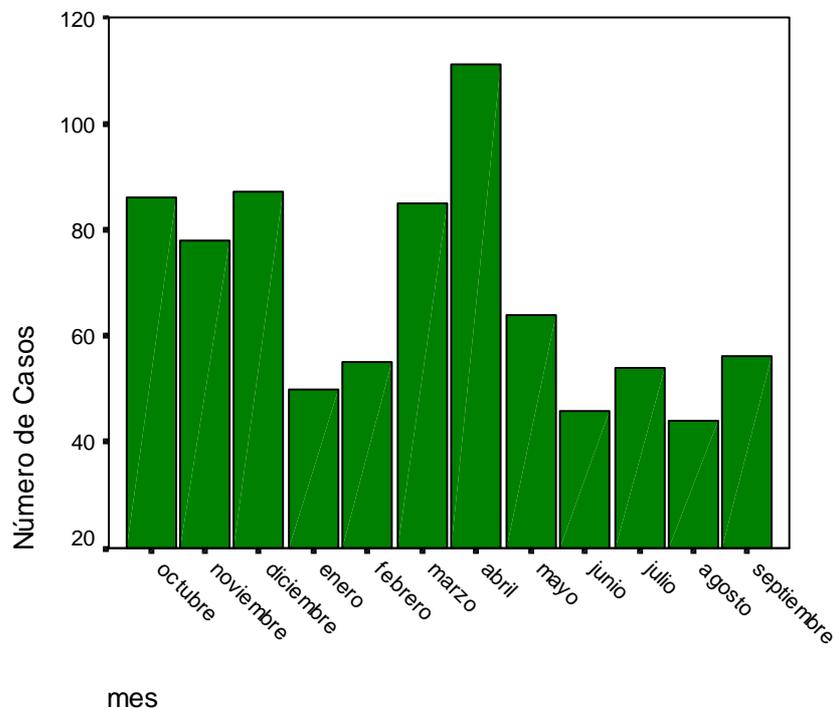
La media de edad fue de 18,4 meses (DE=11,7; rango=0-48). La distribución por meses de edad mostró un predominio de los niños menores de 24 meses, siendo la mediana de edad de 15,6 meses (Figura 8).



**Figura 8.** Distribución de los casos por meses de edad

Un 52,8% (431 casos) eran varones y un 47,2% (385 casos) mujeres. La media de edad de las mujeres fue de 17 meses (DE=11,4; rango=0-48) y la de los varones 19.5 (DE=12,0; rango=0-48), resultando una diferencia media de 2,4 meses (95%IC=0,84-4,07). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p= 0.003$ ).

La distribución de los casos según la fecha de consulta se muestra en la figura 9. El mayor número de ellos tuvo lugar en el mes de abril con 111 de los 820 casos, seguido de diciembre en el que se produjeron 87 de ellos. Existe una variación estacional que, como se observa en la figura, presenta unas frecuencias mayores en los meses de octubre a diciembre, y de marzo a abril.



**Figura 9.** Distribución de los casos de GEA según los meses del año

La puntuación media en la escala de gravedad fue de 8,9 (DE=3,07; rango=1-18). En 239 casos (29.4%) se constató una gravedad de moderada a grave (puntuación  $\geq 11$ ). En la tabla VIII se exponen los valores de las variables clínicas utilizadas como parámetros en la escala de gravedad.

**Tabla VIII:** Parámetros clínicos constatados al ingreso en Urgencias (escala de gravedad).

	<i>N*</i>	<i>Media</i>	<i>D E</i>	<i>Rango</i>
Duración diarrea (días)	<b>814</b>	2,40	2,11	1-14
Nº deposiciones/día	<b>814</b>	6,03	3,64	1-25
Duración vómitos (días)	<b>814</b>	1,16	1,32	0-13
Nº vómitos/día	<b>814</b>	2,26	2,61	0-20
Temperatura máxima	<b>814</b>	37,32	1,17	36-41
<b>Puntuación gravedad</b>	<b>814</b>	<b>8,90</b>	<b>3,07</b>	<b>1-18</b>

\* número de casos en los que se determinó la variable

Se valoró la presencia de deshidratación en 814 casos. De ellos, en 567 (69,7%) no se objetivaron signos de deshidratación, en 211 (26,0%) fue leve y en 36 casos se observó deshidratación de moderada a grave (4,3%).

Necesitaron ingreso hospitalario 83 pacientes (10,6%), los cuales presentaron una estancia media hospitalaria de 4,17 días (DE=2,22; rango=1-14). La media de edad de los niños ingresados fue de 16,8 meses (DE=22; rango=1-48) y el sexo fue de 51 varones (61,4%) y 32 mujeres (38,6%). Por tramos de edad (tabla IX), la mayoría de los niños tenían menos de 2 años (75,6%).

**Tabla IX.** Edad en meses de los pacientes que necesitaron hospitalización

<u>Grupos de edad en meses</u>					
Número (%)					
< 6	6 - 11	12 - 23	24 - 35	36 - 47	Total*
16 (19,5)	17 (20,7)	29 (35,4)	12 (14,6)	8 (9,8)	82 (100)

\* número de casos en los que se determinó la variable

#### 4.1.1.2. Resultados del análisis microbiológico

Los resultados del estudio microbiológico realizado se resumen en la figura 10. La distribución de los microorganismos se muestra en las tablas X y XI. De los 820 pacientes, Rotavirus del grupo A se detectó en 234 (28,5%), 205 de ellos como microorganismo único. Los Adenovirus, por detección de antígeno de grupo, se encontraron en 52 casos (6,3%), confirmándose por técnica de inmunocromatografía como serotipos entéricos 40-41, 40 casos (4,8% del total), 25 de ellos como

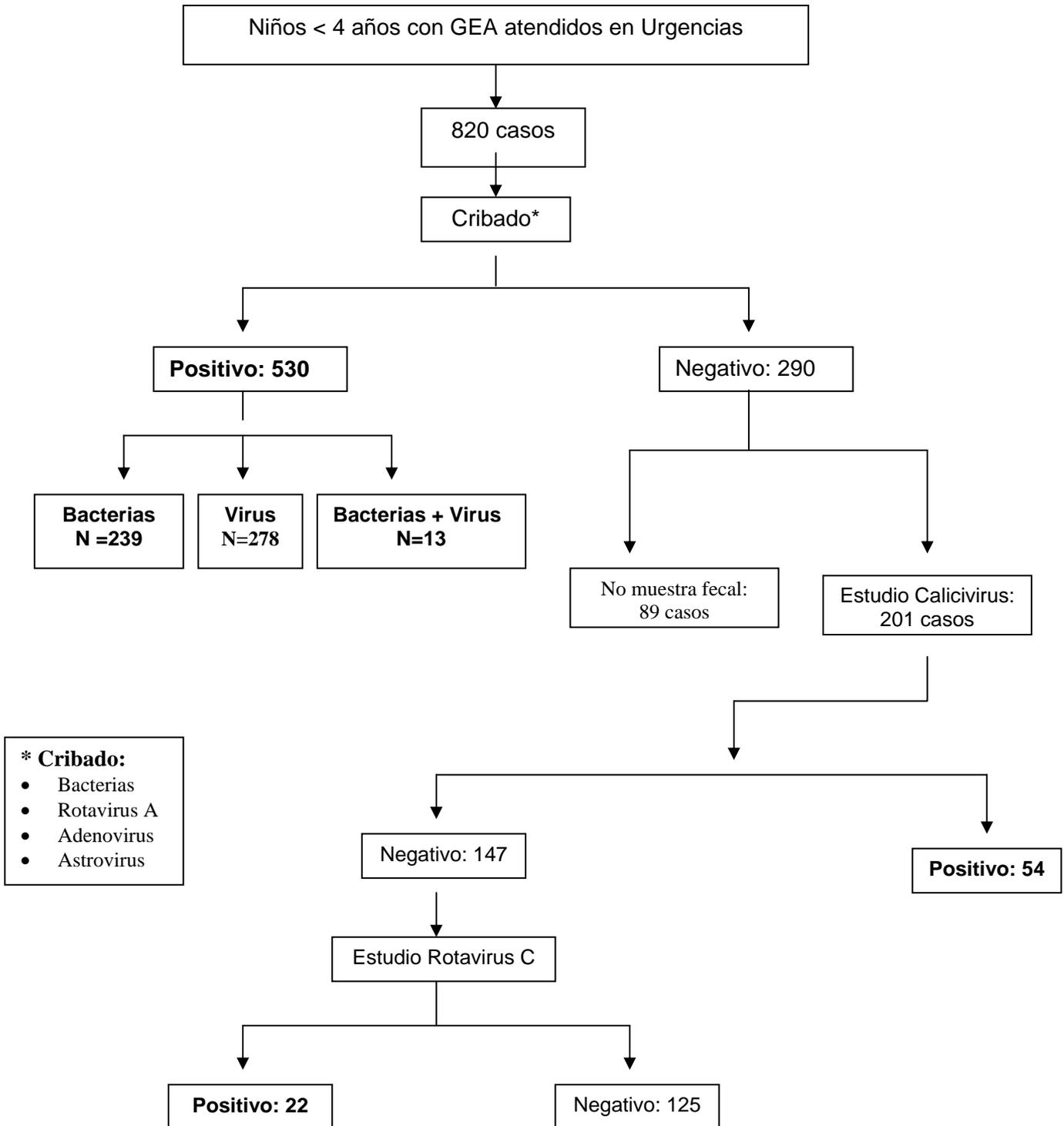
microorganismo único. Los Astrovirus, presentes en 44 casos fueron responsables de 23 casos como único microorganismo (5,3%). En 252 casos (30,8%) el cultivo fue positivo para bacterias enteropatógenas, 238 de ellos como infección monomicrobiana, *Salmonella spp* en 87, *Campylobacter spp* en 154 y *Yersinia enterocolitica* en 12 de ellos. Se detectó más de un agente causal en 39 casos (4,75%) que se exponen en la tabla XI.

Los estudios microbiológicos iniciales de cribado (coprocultivo y técnicas para Rotavirus, Adenovirus y Astrovirus) fueron negativos en 290 casos. De ellos en 201 muestras se investigó, mediante RT-PCR, la presencia de Calicivirus tipo Norwalk (genogrupo I y II) que se detectó en 54 casos (6,6% de los 820 pacientes estudiados y 26,9% de los 201 estudiados para Calicivirus).

Los 147 casos restantes que permanecían sin diagnóstico etiológico y de los que se disponía de muestra fecal se ensayaron mediante técnica de EIA para Rotavirus del grupo C, obteniéndose un total de 23 positivos. De ellos, 22 se confirmaron por método de RT-PCR y se consideraron verdaderos positivos (2,7% de los 820 casos y 15% de los 147 estudiados para Rotavirus del grupo C). El 26,1% (n=214) del total de casos fueron negativos para todos los estudios realizados.

**Tabla X:** Distribución de los casos según la etiología

	<i>N</i>	<i>Porcentaje</i>
Rotavirus grupo A	205	25,0
Adenovirus 40-41	25	3,0
Astrovirus	23	2,8
Calicivirus	54	6,6
Rotavirus del grupo C	22	2,7
Bacterias enteropatógenas	238	29,0
Coinfecciones	39	4,8
Sin diagnóstico etiológico	214	26,1
Nº Total de casos	820	100



**FIGURA 10.-** Esquema de los resultados del análisis microbiológico (primer periodo)

**Tabla XI:** Microorganismos implicados en los casos de coinfección

	<i>N</i>	<i>Porcentaje</i>
Rotavirus grupo A + Adenovirus 40-41	10	25,6
Rotavirus grupo A + Astrovirus	13	33,3
Rotavirus grupo A + Adenovirus40-41+Astrovirus	1	2,6
Rotavirus grupo A + Campylobacter spp.	3	7,7
Rotavirus grupo A + Salmonella spp.	1	2,6
Rotavirus grupo A + Astrovirus + Campylobacter spp.	1	2,6
Adenovirus 40-41 + Astrovirus	1	2,6
Adenovirus 40-41 + Campylobacter spp.	2	5,1
Adenovirus 40-41 + Salmonella spp.	1	2,6
Astrovirus + Salmonella spp.	5	12,8
Campylobacter spp. + Yersinia	1	2,6
Nº Total de casos	39	100

#### 4.1.1.3. Análisis de los casos según el grupo etiológico

##### Edad

Los niños con GEA producida por virus eran una media de 4,9 meses menores que los que presentaban GEA bacteriana (IC 95%=de 3,1 a 6,8 meses), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). (Tabla XII).

**Tabla XII:** Edad media según la etiología viral o bacteriana

<i>Edad en meses</i>	<i>N</i>	<i>Media de edad (meses)</i>	<i>DE</i>
Etiología bacteriana	236	21,7	11,7
Etiología viral	363	16,8	11,1

Cuando se analizaron los casos por microorganismos y tramos de edad (Tabla XIII) se observaron diferencias significativas en la distribución de los casos ( $p < 0,0001$ ). Se observa un predominio de GEA por Rotavirus del grupo A en los niños menores de 1 año, esta proporción se iguala a las de etiología bacteriana en los niños de 12 a 24 meses y a partir de entonces predomina esta última.

**Tabla XIII:** Distribución de los pacientes por tramos de edad según los agentes etiológicos

	GRUPOS DE EDAD (en meses)					
	Número (%)					
	< 6	6-11	12-23	24-35	36-47	Total*
Rotavirus A	22 (21,8)	63 (33)	85 (28,8)	25 (19,4)	8 (8,3)	203
Adenovirus 40-41	7 (6,9)	5 (2,6)	5 (1,7)	2 (1,6)	6 (6,3)	25
Astrovirus	4 (4)	4 (2,1)	6 (2)	4 (3,1)	5 (5,2)	23
Calicivirus	7 (6,9)	13 (6,8)	19 (6,4)	5 (3,9)	9 (9,4)	53
Rotavirus C	1 (1)	8 (4,2)	7 (2,4)	4 (3,1)	1 (1)	21
Bacterias	17 (16,8)	35 (18,3)	94 (31,9)	51 (39,5)	38 (39,6)	235
Coinfecciones	3 (3)	14 (7,3)	14 (4,7)	4 (3,1)	4 (4,2)	39
Sin diagnóstico	40 (39,6)	49 (25,7)	65 (22)	34 (26,4)	25 (26)	213
	101 (100)	191 (100)	295 (100)	129 (100)	96 (100)	812

\* número de casos en los que se determinó la variable

### Gravedad clínica y evolución

La puntuación media de gravedad de los diferentes grupos etiológicos se muestra en la tabla XIV. Rotavirus del grupo A fue como microorganismo único, el que presentó la mayor puntuación media de gravedad.

**Tabla XIV:** Puntuación media de gravedad de los distintos grupos etiológicos

Grupo etiológico	N*	Media gravedad	DE	rango
Rotavirus grupo A	205	9,61	3,06	1-16
Adenovirus 40-41	25	8,12	3,66	2-18
Astrovirus	23	8,30	2,22	4-12
Calicivirus	54	9,09	3,04	2-16
Rotavirus grupo C	22	9,09	3,39	3-15
Bacterias	233	8,38	2,95	1-16
Coinfecciones	39	10,72	2,89	3-17
Sin diagnóstico	213	8,55	3,02	1-16
Total	814			

\* número de casos en los que se determinó la variable

En la tabla XV se muestran los diferentes grupos etiológicos y su distribución según la puntuación de gravedad mayor o menor de 11 en la escala de Ruusca y Vesikari (siendo 11 el punto de corte de gravedad moderada – grave).

Se observa una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de etiologías, entre ambos grupos de pacientes ( $p < 0,001$ ). En el grupo con puntuación menor de 11 predominó la etiología bacteriana (31,7%), mientras que Rotavirus del grupo A representó el 33,1% de los casos de GEA con puntuación mayor de 11.

**Tabla XV.-** Puntuación de gravedad mayor o menor de 11, según los grupos etiológicos

	N*	Puntuación N (%)	
		≥ 11	≤ 11
Rotavirus grupo A	205	79 (33,1)	126 (21,9)
Adenovirus 40-41	25	5 (2,1)	20 (3,5)
Astrovirus	23	4 (1,7)	19 (3,3)
Calicivirus	54	19 (7,9)	35 (6,1)
Rotavirus del grupo C	22	7 (2,9)	15 (2,6)
Bacterias enteropatógenas	233	51 (21,3)	182 (31,7)
Coinfecciones	39	20 (8,4)	19 (3,3)
Sin diagnóstico etiológico	213	54 (22,6)	159 (27,7)
Nº Total de casos	814	239 (100)	575 (100)

\* número de casos en los que se determinó la variable

De igual forma, se obtuvo una diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ) al comparar la puntuación media de gravedad de los pacientes con infección vírica frente a los que padecían una GEA bacteriana, con diferencia media entre ambos grupos de 1,04 puntos (IC de 95% de 0.54 a 1.54) mayor en las infecciones virales. (Tabla XVI).

**Tabla XVI.-** Gravedad según la etiología vírica y bacteriana

	N	Media de gravedad	DE	rango
Etiología bacteriana	234	8,39	2,95	1-16
Etiología viral	367	9,44	3,11	1-18

Debido a ello, se comparó también la gravedad del grupo de etiología bacteriana con el de Rotavirus grupo A por ser éste el más importante tanto en frecuencia como en

gravedad. Se obtuvo una diferencia media entre ellos de 1,23 puntos (IC 95% = 0,66 a 1,79) mayor el Rotavirus grupo A ( $p= 0.0001$ ). (Tabla XVII).

**Tabla XVII.** Gravedad de la etiología bacteriana frente a Rotavirus grupo A

	<i>N</i>	<i>Media de gravedad</i>	<i>DE</i>	<i>rango</i>
Rotavirus grupo A	205	9,62	3,06	1–16
Etiología bacteriana	234	8,39	2,95	1-16

Necesitaron ingreso hospitalario 83 niños (tabla XVIII). De ellos, 40 (48,2%) presentaban infección por Rotavirus grupo A y 7 coinfección (5 de estas con participación de Rotavirus del grupo A). Por tanto, un total de 45 (54,2%) de los pacientes que ingresaron padecían una infección por Rotavirus del grupo A. Entre los tratados de forma ambulatoria las bacterias constituyeron la causa más frecuente siendo el 31,6% (221 de los 700 casos).

**Tabla XVIII.-** Distribución de los casos según el ingreso hospitalario

	<u>Ingreso</u>		<u>No ingreso</u>		<u>Total</u>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
Rotavirus grupo A	40	48,2	165	23,6	205
Astrovirus	-	-	23	3,3	23
Adenovirus 40-41	6	7,2	19	2,7	25
Calicivirus	8	9,6	46	6,6	54
Bacterias	7	8,4	221	31,6	228
Rotavirus grupo C	-	-	21	3	21
Coinfección	7	8,4	29	4,1	36
Sin diagnóstico etiológico	15	18,07	176	25,1	191
Total	83	100	700	100	783

#### 4.1.1.4. Análisis de los casos según el virus responsable

##### Edad media y sexo

La comparación de las medias de edad de los pacientes según el agente vírico responsable, mediante el análisis de la varianza, no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,09$ ), (tabla XIX).

**Tabla XIX.-** Edad en meses según el agente etiológico

	N	Media	D. E.	Rango
Rotavirus grupo A	203	15,43	9,25	1 - 45
Adenovirus 40-41	25	19,23	16,43	2 - 48
Astrovirus	23	20,61	13,70	3 - 42
Calicivirus	53	19,11	13,30	0 - 48
Rotavirus grupo C	21	17,49	10,25	6 - 48
Coinfecciones	38	16,53	10,71	2 - 42
Total*	363	16,79	11,10	0 - 48

\* número de casos en los que se determinó la variable

Sin embargo, cuando se compara la media de edad del grupo de niños con GEA por Rotavirus grupo A, ya sea como agente único o en coinfección (232 casos), frente al grupo de GEA producidas por otros virus (131 casos) se encuentra una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,001$ ), siendo los niños con Rotavirus del grupo A una media de 4,5 meses menores que el resto (IC 95% = 1,9 a 7,2). En la distribución por sexos no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos.

En la tabla XX se expone el porcentaje de cada uno de los virus responsables según el grupo de edad, observándose que todos ellos son más frecuentes en los niños menores de 24 meses, con máxima prevalencia entre los 6 y 24 meses de edad. El Adenovirus presentó su máxima frecuencia en los niños menores de 6 meses mientras que el Astrovirus lo fue a la edad de 12 a 24.

El Rotavirus del grupo C presentó también su máxima frecuencia entre los 6 y 24 meses de edad, observándose tan solo un 4,8% de ellos en pacientes mayores de los 3 años.

**Tabla XX.** Porcentaje de los diferentes virus, según los grupos de edad.

	GRUPOS DE EDAD (en meses)					
	Número(%)					
	< 6	6-11	12-23	24-35	36-47	Total*
Rotavirus A	22 (10,8)	63 (31)	85 (41,9)	25 (12,3)	8 (3,9)	203 (100)
Adenovirus 40-41	7 (28)	5 (20)	5 (20)	2 (8)	6 (24)	25 (100)
Astrovirus	4 (17,4)	4 (17,4)	6 (26,1)	4 (17,4)	5 (21,7)	23 (100)
Calicivirus	7 (13,2)	13 (24,5)	19 (35,8)	5 (9,4)	9 (17)	53 (100)
Rotavirus C	1 (4,8)	8 (38,1)	7 (33,3)	4 (19)	1 (4,8)	21 (100)
Coinfecciones	3 (7,9)	14 (36,8)	13 (34,2)	4 (10,5)	4 (10,5)	38 (100)
	44	107	135	44	33	363

\* número de casos en los que se determinó la variable

### Distribución de los casos según la fecha de consulta

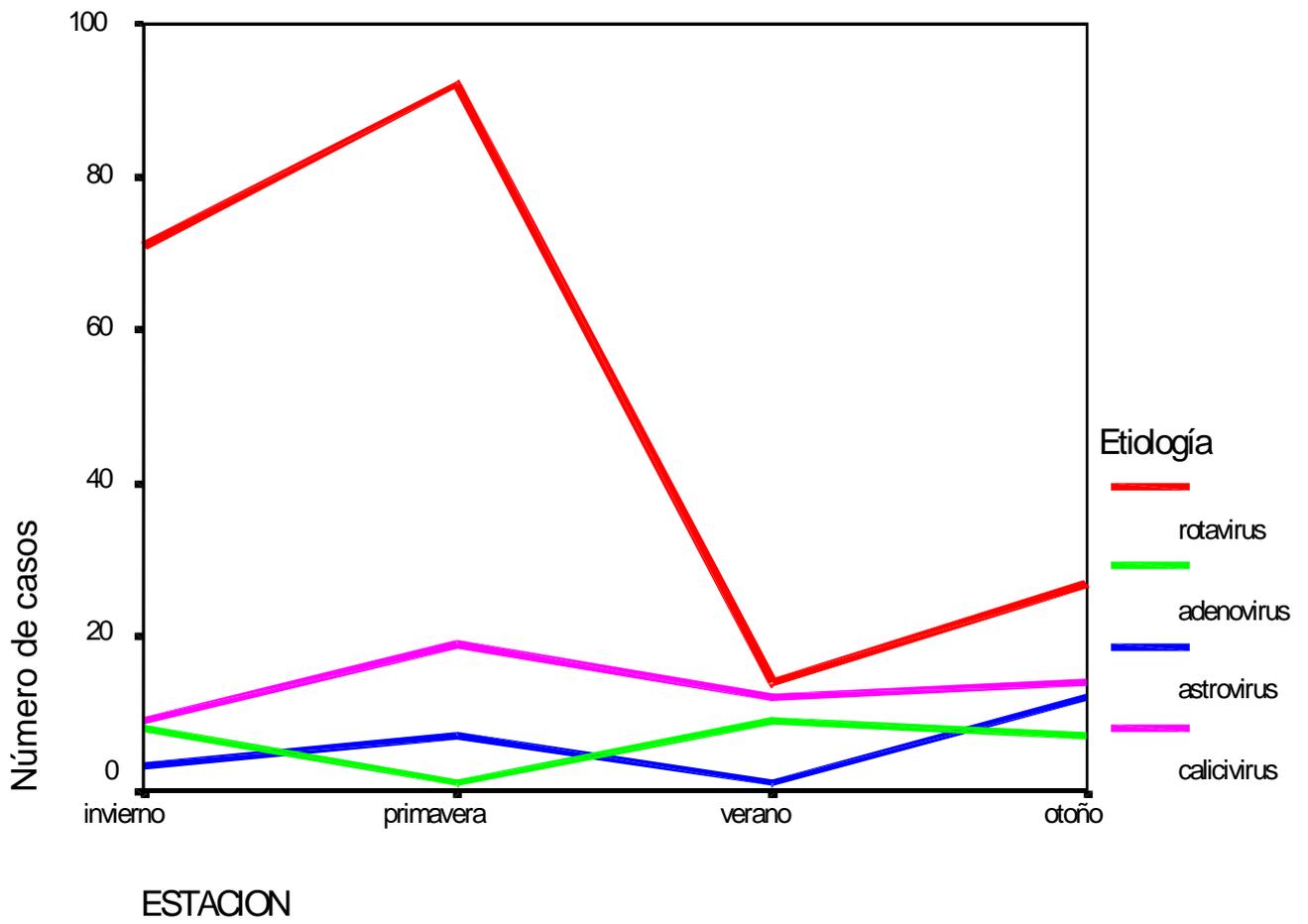
La distribución por meses del año de los virus productores de GEA se expresa en la Tabla XXI y la distribución por estaciones climáticas en la Figura 11.

El análisis comparativo evidenció una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la distribución de los casos según el agente, tanto por meses del año como por estaciones climáticas, con un mayor porcentaje de casos de GEA por Rotavirus del grupo A en los meses de diciembre y abril, de Adenovirus 40-41 en diciembre, de Astrovirus en octubre y noviembre y de Calicivirus en abril y octubre.

**Tabla XXI.-** Distribución de los casos de GEA viral por meses del año. Número (%)

	Rotavirus A	Adenovirus	Astrovirus	Calicivirus	Rotavirus C
Octubre	1 (0,5)	4 (16,0)	5 (21,7)	11 (20,4)	4 (19)
Noviembre	10 (4,9)	-	5 (21,7)	1 (1,9)	3 (14,3)
Diciembre	28 (13,7)	8 (32,0)	3 (13,0)	1 (1,9)	1 (4,8)
Enero	17 (8,3)	-	-	4 (7,4)	-
Febrero	24 (11,8)	3 (12,0)	2 (8,7)	1 (1,9)	-
Marzo	35 (17,2)	-	-	9 (16,7)	1 (4,8)
Abril	50 (24,5)	-	4 (17,4)	11 (20,4)	3 (14,3)
Mayo	23 (11,3)	1 (4,0)	2 (8,7)	2 (3,7)	-
Junio	5 (2,5)	2 (8,0)	1 (4,3)	1 (1,9)	2 (9,5)
Julio	4 (2,0)	1 (4,0)	1 (4,3)	4 (7,4)	3 (14,3)
Agosto	1 (0,5)	2 (8,0)	-	5 (9,3)	1 (4,8)
Septiembre	6 (2,9)	4 (16,0)	-	4 (7,4)	3 (14,3)
total	204 (100)	25 (100)	23 (100)	54 (100)	21 (100)

Por estaciones del año (figura 11), la mayoría de las infecciones por Rotavirus grupo A se presentaron en primavera (n=92; 45%) y en invierno (n=71; 34,8%). Los Calicivirus también presentaron una variación estacional con el mayor número de casos en primavera (n=19; 35,2%) seguido de otoño (n=14; 25,9%). Más de la mitad de los casos de GEA por Astrovirus (n= 12; 52,2%) tuvieron lugar en otoño y otro tercio de ellos en primavera (N=7; 30,4%) mientras que el número de episodios producidos por los Adenovirus se mantuvo uniforme durante el verano (36%), otoño (28%) e invierno (32%) con una disminución importante en primavera (4%). Los Rotavirus del grupo C no presentaron variación estacional.



**Figura 11.** Distribución de los casos por estación del año

### Gravedad clínica

En la Tabla XXII se exponen las medias de puntuación de gravedad según el virus responsable. La comparación global de las medias de gravedad mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), siendo el grupo de las coinfecciones el que presentó la puntuación media mayor.

**Tabla XXII.** Puntuación de gravedad según el virus responsable

	N	Media	D E	rango
Rotavirus grupo A	205	9,61	3,06	1-16
Adenovirus 40-41	25	8,12	3,65	2-18
Astrovirus	23	8,30	2,22	4-12
Calicivirus	54	9,09	3,03	2-16
Rotavirus grupo C	22	9,09	3,39	3-15
Coinfecciones	38	10,68	2,92	3-17
Total	358	9,44	3,11	1-18

Se procedió entonces a comparar la media de gravedad de los pacientes con coinfección viral frente a los que padecían una infección por un solo virus (Tabla XXIII), encontrándose una diferencia media de 1,4 puntos (IC= 95% de 0,35 a 2,43), con significación estadística ( $p=0,009$ ).

**Tabla XXIII.-** Puntuación de gravedad de los casos de GEA viral con y sin coinfección

	N	Media de gravedad	DE
Coinfección	38	10,68	2,92
No coinfección	329	9,29	3,10

Debido a que Rotavirus del grupo A está presente en 29 de las 38 coinfecciones virales (76,3%), se comparó, por una parte, la media de gravedad del grupo de pacientes con infección por Rotavirus grupo A frente a la obtenida en los casos de infección por los restantes virus. Se obtuvo una diferencia media de 0,87 puntos (IC 95% de 0,18 a 1,56), con significación estadística ( $p=0,014$ ). (Tabla XXIV).

**Tabla XXIV.** Puntuación de gravedad de la infección por Rotavirus A frente a los otros virus

	N	Media de gravedad	DE
Infección Rotavirus A	205	9,62	3,06
Infección otros virus	124	8,75	3,10

Por otra parte se compararon las puntuaciones medias de gravedad de las coinfecciones en las que participa Rotavirus grupo A frente a las que este virus no está presente, resultando ser no significativo ( $p=0,39$ )

**Tabla XXV.** Puntuación media de gravedad de las coinfecciones por Rotavirus y por el resto

	N	Media de gravedad	DE
Coinfección con Rotavirus A	28	10,39	2,93
Coinfección con otros virus	10	11,40	2,83

Se compararon también las medias de gravedad de Rotavirus del grupo A (infección monomicrobiana) frente a las coinfecciones que incluyen Rotavirus A, resultando ser no significativo estadísticamente ( $p > 0,05$ ).

**Tabla XXVI.-** Puntuación media de gravedad de Rotavirus grupo A como microorganismo único y en coinfección.

	N	Media de gravedad	DE
Rotavirus A (coinfección)	28	10,39	2,93
Rotavirus A (no coinfección)	205	9,63	3,06

En el análisis de un modelo multivariable de regresión lineal, las únicas variables que mostraron relación independiente con la gravedad cuantificada según la escala de Ruusca y Vesikari, fueron la presencia de Rotavirus grupo A, la edad y la existencia de coinfección. Los efectos medios estimados, por la recta de regresión obtenida, para cada una de estas variables sobre la media de gravedad son los siguientes:

Edad: 0,04/mes de edad (IC 95%= 0,02-0,06); Presencia de Rotavirus del grupo A: 1,14 (IC 95%= 0,67-1,62); Presencia de coinfección 1,44 (IC 95%= 0,45-2,43).

Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con extrema precaución ya que la recta de regresión obtenida explica tan solo un 5,3% de la variabilidad mostrada por los datos (coeficiente de determinación  $R^2$  ajustado = 0,053). En resumen, con los datos obtenidos no se puede concluir, si la presencia o no de coinfección tienen valor pronóstico independiente o si la gravedad se debe a que en este grupo hay un mayor porcentaje de Rotavirus grupo A.

### Necesidad o no de ingreso hospitalario

La mayor proporción de casos de GEA viral que requirieron ingreso hospitalario se debieron a Rotavirus del grupo A, 40 de 61 casos (65,6%). Entre los pacientes con infección por Adenovirus 40-41, un 24% precisó ingreso hospitalario, un 19,5% de los que la tenían por Rotavirus del grupo A, un 14,8% en el caso de Calicivirus y un 20% en los casos de coinfección. No fue necesario el ingreso en ningún caso de GEA producida por Astrovirus o Rotavirus del grupo C. (Tabla XXVII).

**Tabla XXVII.-** Evolución de los pacientes según el agente etiológico.

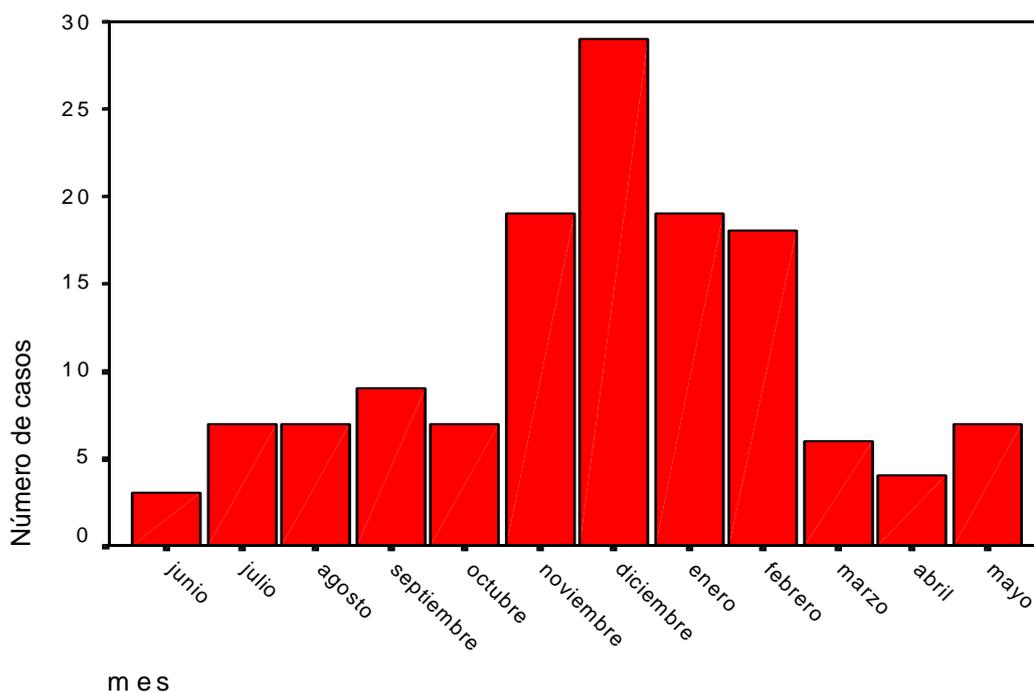
	No Ingreso		Ingreso		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	%
Rotavirus grupo A	165	80,5	40	19,5	205	100
Adenovirus 40-41	19	76,0	6	24,0	25	100
Astrovirus	23	100	-	-	23	100
Calicivirus	46	85,2	8	14,8	54	100
Rotavirus grupo C	22	100	-	-	22	100
Coinfección	29	80,6	7	19,4	36	100
Total	295	83,1	61	16,8	356	100

Los días de estancia media hospitalaria fueron superiores en los pacientes con GEA por Adenovirus 40-41 (media de 5,8; DE=2,8; rango=1-10 días), seguido de los casos de coinfección (media de 4,8; DE=1,9; rango=3-8 días), Rotavirus del grupo A (media de 4,2; DE=2; rango=1-14 días) y Calicivirus (media de 3,1; DE=1,4; rango=1-5 días) aunque sin evidenciarse diferencias estadísticamente significativa ( $p>0,05$ ) entre los grupos.

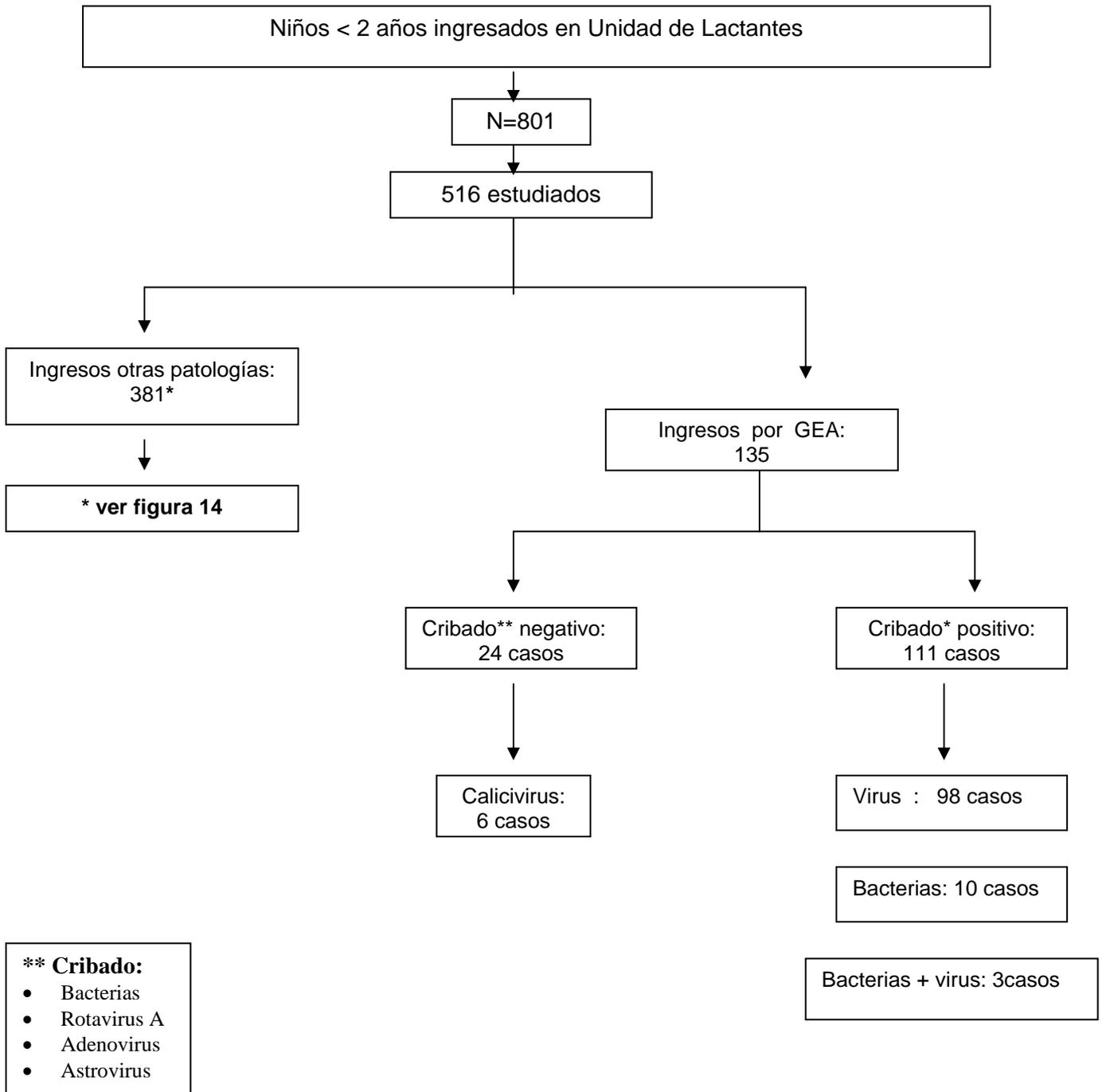
#### 4.1.2. Segundo periodo

Durante el segundo periodo de estudio (1-junio-1998 a 31-5-1999) ingresaron en la Unidad de Lactantes 135 niños con diagnóstico de GEA adquirida en la comunidad (16,8% del total de ingresos en el mismo periodo), constituyendo este diagnostico el segundo motivo de ingreso entre los pacientes ingresados durante el mismo periodo. La media de edad fue de 10,9 meses (DE=5,81, rango=1-24), correspondiendo un 55% a varones y un 45% a mujeres. La distribución de los casos según el mes de ingreso hospitalario se muestra en la figura 12, donde se observa una máxima frecuencia de los casos entre los meses de noviembre y febrero. La estancia media hospitalaria fue de 4,7 días (DE=1,61; rango= 1-37).

En la figura 13 se exponen los resultados globales del análisis microbiológico realizado a los niños con GEA que ingresaron durante el segundo periodo de estudio.



**Figura 12.-** Distribución de los 135 casos ingresados por GEA según los meses del



**Figura 13. Resultados del análisis microbiológico realizado en los niños ingresados por GEA adquirida en la comunidad.**

En la tabla XXVIII se exponen los microorganismos responsables de los 135 casos de GEA ingresados por este motivo. Rotavirus del grupo A fue el agente causal más frecuente, encontrándose en 97 de los 135 casos (71,9%). Las bacterias constituyeron el segundo grupo en frecuencia apareciendo en 13 casos (9,6%), seguido de Calicivirus tipo Norwalk, 6 (4,4%), 4 Astrovirus (3%) y Adenovirus 2 (1,5%). Se detectó más de un agente 6 casos (4,4%) y en 18 (13,3%) todo el estudio etiológico realizado fue negativo.

Tabla XXVIII.- Etiología de la gastroenteritis aguda de los niños ingresados

	<i>N</i>	<i>Porcentaje</i>
Rotavirus del grupo A	92	68.15
Adenovirus 40-41	1	0.74
Astrovirus	2	1.48
Calicivirus tipo Norwalk	6	4.44
Campylobacter spp.	6	4.44
Salmonella spp.	4	2.96
Rotavirus del grupo A + Campylobacter sp	1	0,74
Rotavirus del grupo A + Salmonella sp	1	0,74
Rotavirus grupo A+Adenovirus 40-41	1	0,74
Rotavirus grupo A+Astrovirus	2	1,48
Astrovirus + Salmonella sp	1	0,74
Sin diagnóstico	18	13,33
Nº Total de casos	135	100

#### 4.2. GASTROENTERITIS AGUDA ADQUIRIDA EN EL HOSPITAL

Entre el 1 de junio de 1998 y el 31 de mayo de 1999 ingresaron en la Unidad de Lactantes 801 niños menores de 2 años. Durante este tiempo se estudiaron los siguientes grupos de niños:

- Niños con GEA, adquirida en la comunidad, como motivo de ingreso: 135 casos (ver punto 3.1.2.)
- Niños que ingresaron por otras patologías: 666 casos. De ellos:
  - En 60 casos se presentó un cuadro de GEA nosocomial

- Los 606 restantes no presentaron síntomas de GEA durante todo el tiempo de estudio. En 329 de estos pacientes se estudió la eliminación fecal asintomática de Rotavirus del grupo A y Astrovirus.

Se realizó seguimiento telefónico en 226 casos de los 329 pacientes del último grupo (68,69%), con el fin de detectar la GEA tras 72 horas del alta hospitalaria.

#### **4.2.1. Características generales de la población estudiada**

##### **4.2.1.1. NIÑOS QUE INGRESAN POR OTRAS PATOLOGIAS, SIN GEA**

En este grupo se estudiaron 329 de los 666 niños que ingresaron por patologías diferentes a GEA. La media de edad fue de 7,56 meses (DE=8,24; rango= 1-24) y la distribución por sexos fue de 55% varones y 45% mujeres.

El motivo de ingreso más frecuente fue la patología respiratoria, 184 casos (56% de los 329 pacientes estudiados) seguida de infección urinaria en 49 casos (15%), síndrome febril en 30 casos (9%), otras infecciones diferentes a GEA en 19 casos (6%) y otros en 47 casos (14% del total).

El mayor número de casos se observó en los meses de invierno, con el máximo número de casos en el mes de diciembre, 47 de los 329 casos estudiados.

La estancia media hospitalaria fue de 6,71 días (DE= 4,65; rango=1-37).

##### **4.2.1.2. NIÑOS CON GASTROENTERITIS AGUDA NOSOCOMIAL**

En total, 60 pacientes padecieron una GEA nosocomial sintomática, presentándose 31 de ellos (52%) durante el ingreso hospitalario y 29 (48%) tras el alta. De estos últimos, 21 casos se detectaron gracias al seguimiento telefónico y los 8 restantes (13%) por reingreso con GEA en el plazo de 72 horas tras el alta. La media de edad fue de 7,75 meses (DE= 5,15; rango= 1-23) correspondiendo un 62% a varones y un 38% a mujeres.

No existieron diferencias estadísticamente significativas en la media de edad, el sexo ni en la distribución de los casos por meses con respecto al grupo de niños que no

presentaron GEA. El mayor número de casos se presentó en diciembre, 17 de los 60 casos (28,33%).

Los motivos de ingreso tampoco presentaron diferencias significativas con el grupo de niños sin GEA, siendo el principal la patología respiratoria que ocurrió en 32 casos, seguido de infección urinaria en 9 casos, síndrome febril en 6 casos, otras infecciones en 2 casos y otras patologías en 11 casos.

Los días de estancia media hospitalaria fueron de 8,55 días (DE= 5,81; rango =1-30) en el grupo de niños con GEA nosocomial, siendo estadísticamente significativo ( $p<0,01$ ) respecto del grupo de niños que no padecieron GEA y cuya media de estancia fue de 6,71 días (DE=4,65; rango=1-37).

#### **4.2.2. Resultados del análisis microbiológico**

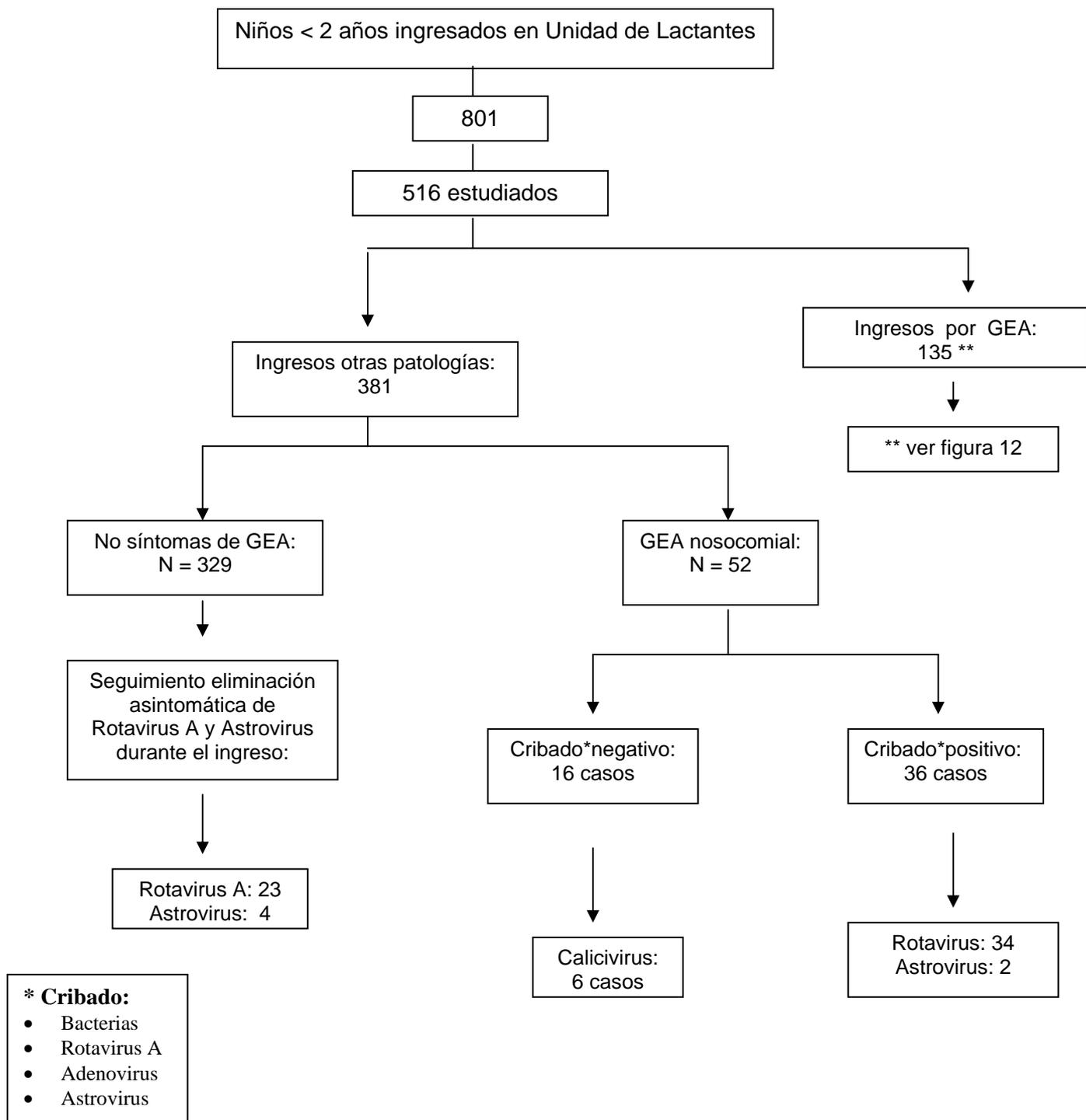
En la figura 14 se exponen los resultados globales obtenidos tras el estudio microbiológico realizado.

##### **4.2.2.1. NIÑOS QUE INGRESAN POR OTRAS PATOLOGIAS, SIN GEA**

En 27 de los 329 casos estudiados (8,20%) se detectó eliminación viral asintomática, 13 de ellos (3,95%) en el momento del ingreso y 14 (4,25 %) tras 72 horas del ingreso. El Rotavirus del grupo A fue el responsable de 23 de los casos (6,99%) que se identificaron al ingreso en 10 ocasiones y en 13 pasadas 72 horas. Se identificó Astrovirus en 4 casos (1,21% de los 329 estudiados), 3 de ellos al ingreso y 1 caso tras 72 horas de éste.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la media de edad, días de estancia hospitalaria ni en la distribución de los casos por el mes de ingreso entre el grupo de niños con eliminación viral asintomática de los que no la presentaban (tabla XXIX). El mayor número de casos se presentó en el mes de diciembre en el grupo sin eliminación viral (13,20%) y en enero (29,6%) en los que eliminaban virus.

Tampoco se encontraron diferencias en los motivos de ingreso de ambos grupos, constituyendo la patología respiratoria el motivo de más del 50% de los casos.



**Figura 14.-** Resultados del análisis microbiológico en los niños ingresados por patologías diferentes a GEA

**Tabla XXIX.** Edad y estancia media de los niños con y sin eliminación viral

	Sin eliminación viral	Con eliminación viral
Media de edad (meses)	7,87 (DE=8,46)	4,11 (DE=3,69)
Estancia media (días)	8,55 (DE= 5,12)	6,54 (DE= 4,57)

#### 4.2.2.2. NIÑOS CON GASTROENTERITIS AGUDA NOSOCOMIAL

Se realizó estudio microbiológico en 52 de los 60 casos con GEA nosocomial. Se detectó Rotavirus del grupo A en 34 de ellos (65,38%), Calicivirus tipo Norwalk (genogrupos I y II) en 6 (11,53%) y Astrovirus en 2 casos (3,84%). En 10 casos (19,2%) todo el estudio realizado fue negativo.

### 4.3. MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS

#### 4.3.1. Gastroenteritis aguda adquirida en la comunidad

En las tablas XXX y XXXI se exponen los marcadores epidemiológicos de la GEA adquirida en la comunidad en el primero (niños menores de 4 años) y segundo periodo de estudio (niños menores de 2 años), respectivamente.

**Tabla XXX.** Marcadores epidemiológicos en el primer periodo de estudio

	<b>Casos/1000 niños &lt; 4 años/año</b>
Incidencia de GEA adquirida en la comunidad que requieren atención hospitalaria	64,5
Incidencia de GEA viral adquirida en la comunidad	28,9
- Rotavirus grupo A	18,4
- Astrovirus	3,5
- Adenovirus 40-41	3,1
- Calicivirus (tipo Norwalk)	4,2
- Rotavirus grupo C	1,7
Incidencia de ingreso por GEA adquirida en la comunidad	5,5
Incidencia de hospitalización por GEA asociada a virus	4,0
- Rotavirus grupo A	3,0
- Adenovirus 40-41	0,5
- Calicivirus (tipo Norwalk)	0,5

**Tabla XXXI.** Marcadores epidemiológicos en el segundo periodo de estudio

	<b>Casos/ 100 niños &lt; 2 años ingresados /año</b>
Frecuencia de GEA adquirida en la comunidad, como motivo de ingreso	16,8
Frecuencia de GEA viral como motivo de ingreso	13,3
- Rotavirus grupo A	12,1
- Astrovirus	0,2
- Adenovirus 40-41	0,1
- Calicivirus (tipo Norwalk)	0,7
	<b>Casos/1000 niños &lt; 2 años/año</b>
Incidencia de hospitalización por GEA	19,5
Incidencia de hospitalización por GEA asociada a virus	15,5
- Rotavirus grupo A	14,0
- Astrovirus	0,3
- Adenovirus 40-41	0,1
- Calicivirus (tipo Norwalk)	0,9

### 4.3.2. Gastroenteritis aguda adquirida en el hospital

En la tabla XXXII se exponen los datos de incidencia de la gastroenteritis aguda adquirida en el hospital así como de la eliminación fecal asintomática.

**Tabla XXXII.** Incidencia de infección adquirida en el hospital y eliminación asintomática

	<b>Casos/100 niños &lt; 2 años ingresados sin GEA/año</b>
Incidencia de eliminación fecal asintomática	8,2
Incidencia de eliminación asintomática de Rotavirus grupo A	6,9
Incidencia de eliminación asintomática de Astrovirus	1,2
Incidencia de GEA nosocomial	9
- Rotavirus grupo A	5,1
- Astrovirus	0,3
- Calicivirus (tipo Norwalk)	0,9

## 4.4. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ROTAVIRUS DEL GRUPO A

### 4.4.1. Distribución de los serotipos/genotipos de Rotavirus grupo A en el primer periodo de estudio (1996 – 1997)

Se determinaron los serotipos G1, G2, G3 y G4 de Rotavirus grupo A en 231 de los 234 casos positivos para Rotavirus del grupo A, mediante la técnica de EIA, logrando el serotipado de 208 de ellos. En los 23 casos no serotipables se realizó genotipado mediante la aplicación de RT – PCR. Los resultados se exponen en la tabla XXXIII.

La Figura 16 muestra un ejemplo de los productos amplificados por RT-PCR de los distintos genotipos encontrados.

**Tabla XXXIII:** Distribución de los serotipos y genotipos G.

	SEROTIPADO (EIA)	GENOTIPADO (RT – PCR)	TOTAL (%)
G1	158	8	166 (71,8)
G2	-	-	-
G3	1	-	1 (0,4)
G4	47	15	62 (26,8)
G1 + G4	2	-	2 (0,8)
TOTAL (%)	208 (90,04)	23 (9,96)	231 (100)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de las medias de gravedad de los serotipos/genotipos G1 y G4 que resultaron ser de 9,58 (DE= 3,1; rango: 1-16) y de 9,9 (DE= 2,7; rango: 3-16) respectivamente ( $p>0,05$ ).

En cuanto a la distribución de los serotipos G más prevalentes (G1 y G4) a lo largo del año de estudio no se encontró diferencias entre ellos que presentaron una distribución superponible, con 2 picos de máxima incidencia en los meses de abril y de diciembre, coincidiendo ambos con los picos de infección por Rotavirus grupo A (Fig. 15). Cuando se analizaron los serotipos causantes de infección por Rotavirus grupo A como agente único y en coinfección, se encontró que la proporción del serotipo G1 en las coinfecciones (91,7%) fue mayor de lo esperado con respecto al grupo total de Rotavirus grupo A (G1=72,6%) y al que no presentó coinfección (70,3%), obteniéndose significación estadística ( $p= 0.027$ ). (Tabla XXXIV).

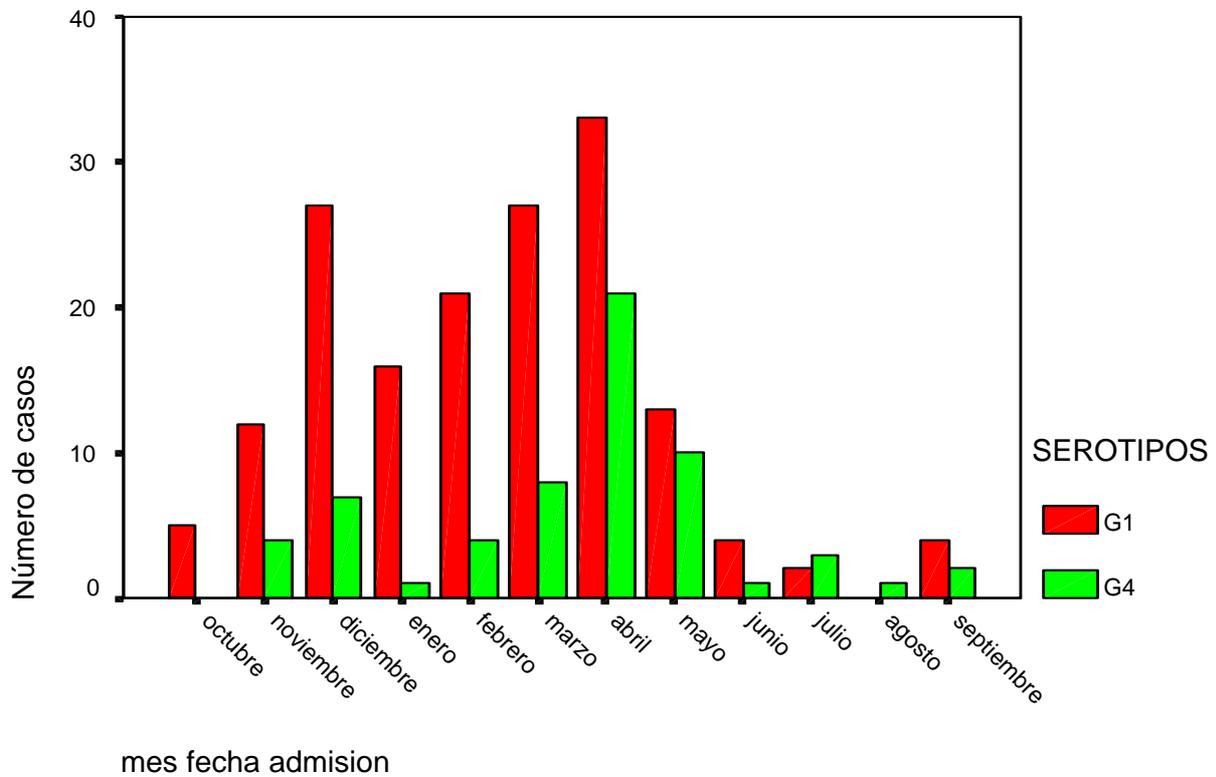
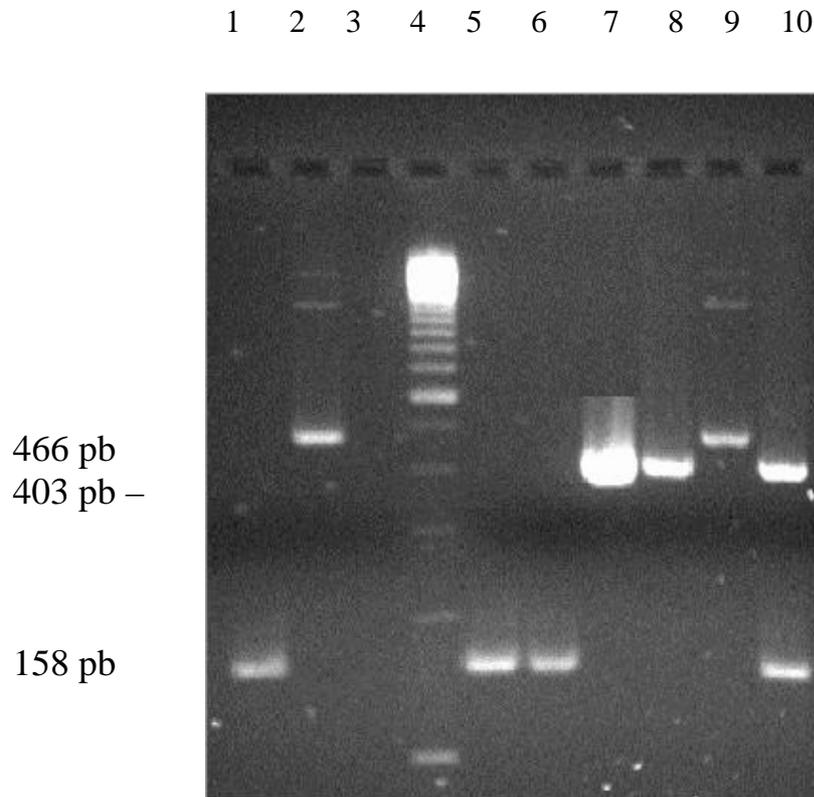


Figura 15. Distribución de los serotipos G1 y G4 por meses del año

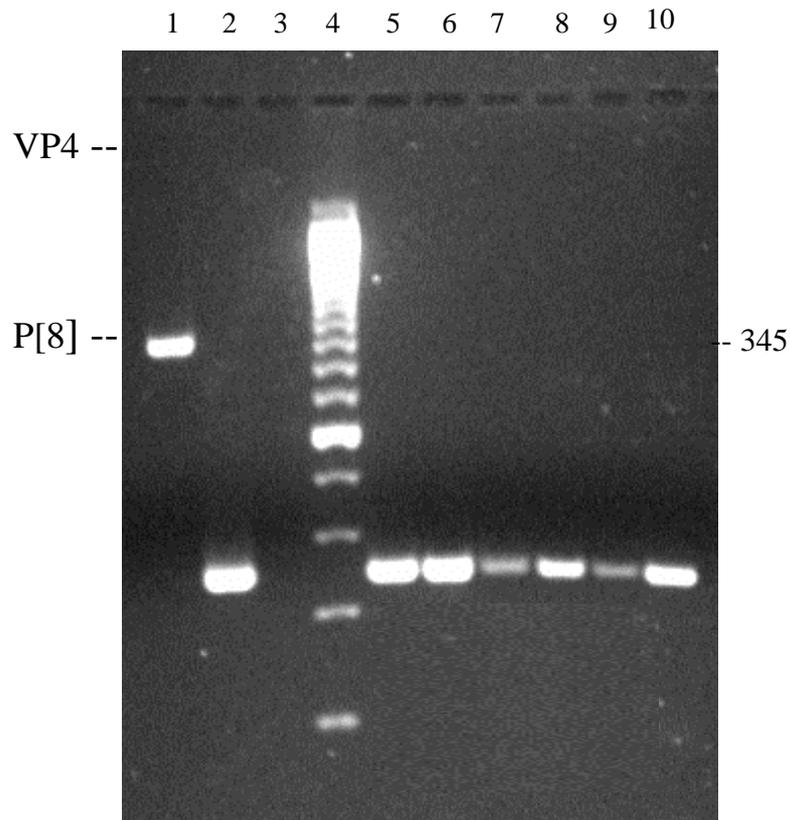
**Tabla XXXIV.-** Distribución de los serotipos G1 y G4 según la existencia de coinfección.

	G1	G4	total
COINFECCION	22 (91,7%)	2 (8,3%)	24
NO COINFECCION	142 (70,3%)	60 (29,7%)	202
TOTAL ROTAVIRUS	164 (72,6)	62 (26,8)	226



**Figura 16:** Genotipos G (VP7) de Rotavirus detectados por RT-PCR. 1: genotipo G1; 2: genotipo G3; 3: control negativo (heces Rotavirus negativo); 4: marcador de pesos moleculares; 5-6: genotipo G1; 7-8: genotipo G4; 9: genotipo G3; 10: infección mixta G1 + G4.

Para el estudio de los genotipos P (VP4) se seleccionaron 25 muestras, 15 que correspondían al serotipo/ genotipo 1, 7 al G4, 1 al G3 y 2 al G1+G4. En todas se obtuvo un producto de amplificación de 345 pb, correspondiente al genotipo P[8] (Figura 17).



**Figura 17:** Genotipos P (VP4) de Rotavirus del grupo A analizados por RT-PCR. 1-2: amplificación del gen 4 de Rotavirus (que codifica la proteína VP4) y de la región variable intragen correspondiente al genotipo P[8] respectivamente. 3: control negativo (heces Rotavirus negativo). 4: marcador de pesos moleculares. 5-10: genotipos P[8] encontrados en todos los casos analizados.

#### 4.4.2. Distribución de los serotipos G de Rotavirus grupo A en el segundo periodo de estudio (1998 – 1999)

Durante este periodo se llevó a cabo el serotipado G de 82 casos de los que ingresaron por GEA por Rotavirus del grupo A y 32 más del grupo que padeció GEA nosocomial. El serotipado se llevó a cabo en todos los casos por técnica de EIA (Tabla XXXIV).

**Tabla XXXV.-** Distribución de los serotipos G de los casos de GEA hospitalaria.

	Ingresados por GEA	GEA Nosocomial	TOTAL (%)
G1	7	4	11 (9,6)
G2	-	1	1 (0,9)
G3	-	-	-
G4	36	13	49 (43)
G1 + G4	-	1	1 (0,9)
No serotipable	39	13	52 (45,6)
TOTAL	82	32	114 (100)

La gastroenteritis aguda (GEA) es una de las enfermedades más comunes en el hombre y la principal causa de muerte en niños menores de 5 años en los países en vías de desarrollo. En los países industrializados esta enfermedad produce una elevada morbilidad y es responsable de un alto porcentaje de ingresos hospitalarios, lo que conlleva un gran coste social y sanitario. Esta enfermedad es además una causa frecuente de infección nosocomial en las Unidades Pediátricas.

Los virus juegan un papel importante en la etiología de la gastroenteritis aguda, especialmente en la infancia. Los Rotavirus del grupo A constituyen la causa más frecuente de GEA en niños menores de 4 años. Este virus es además un patógeno nosocomial frecuente, lo que se ve favorecido por la existencia de eliminación viral asintomática. Los serotipos G1, G2, G3 y G4 son los que con mayor frecuencia se han detectado en todo el mundo y particularmente en Europa.

Actualmente se considera a los Astrovirus como la segunda causa de gastroenteritis viral. En los estudios iniciales se atribuía a este virus una escasa importancia debido a la dificultad de detección mediante técnicas de microscopía electrónica (ME). Hoy día existen técnicas de enzimoimmunoanálisis y de detección de ácidos nucleicos que han permitido aclarar su verdadera frecuencia en los estudios epidemiológicos.

Debido a la morfología característica de Adenovirus entéricos que facilita su visualización con ME, estos virus se han considerado clásicamente como una causa importante de GEA y junto con el Rotavirus del grupo A se detectan de rutina en muchos laboratorios de Microbiología clínica gracias a la existencia de test comerciales sencillos de realizar.

El hecho de que todavía permanezca un número considerable de casos de GEA en los que no se llega al diagnóstico etiológico potencia la búsqueda continua de nuevos agentes virales responsables. Es así como se ha encontrado que los Calicivirus humanos y los Rotavirus del grupo C juegan un papel más relevante de lo que en principio se pensaba, aunque todavía son escasos los estudios debido, en parte, a que las técnicas de detección no están suficientemente estandarizadas. Otros virus emergentes en la etiología de la gastroenteritis son los Torovirus, Coronavirus y Picobirnavirus para los que se necesitan más estudios epidemiológicos que determinen su verdadera frecuencia y significado clínico.

En nuestro medio, los estudios sobre los diversos agentes virales de la gastroenteritis aguda son limitados. Los datos que existen al respecto inciden sobre todo en los Rotavirus del grupo A y Adenovirus. En cambio, los trabajos sobre Astrovirus, Calicivirus humanos y Rotavirus del grupo C son muy escasos o inexistentes.

Por ello, en nuestro trabajo hemos abordado de forma prospectiva el estudio no solo de la incidencia de infección por Rotavirus del grupo A y Adenovirus entéricos, sino que además se analiza el papel de Astrovirus, Calicivirus humanos y Rotavirus del grupo C. Hay que destacar que los datos sobre Calicivirus y Rotavirus del grupo C, en la GEA esporádica, son los primeros que se obtienen en niños españoles.

## **5.1. GASTROENTERITIS AGUDA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD**

### **5.1.1. Primer periodo**

#### **5.1.1.1. Características generales de la población de estudio**

Durante el primer periodo de estudio se valoraron 820 (84%) de los 976 niños diagnosticados de GEA en Urgencias, en los que se pudo obtener una muestra fecal para el estudio microbiológico. Este alto porcentaje de muestras obtenidas permite estimar cifras fiables de incidencia y frecuencia.

La edad media fue de 18,4 meses con un predominio de los pacientes entre los 6 y 24 meses de edad, constituyendo más de la mitad de los casos (58,8%) y coincidiendo con la mayoría de las series publicadas (132, 281,336). Se observó un ligero predominio de los varones sobre las mujeres que también confirman otros autores (15,151,281,322,336). Se encontró una diferencia significativa entre la edad media de las mujeres y los varones, siendo éstos 2,4 meses de edad mayor que las mujeres. Este dato no se ha encontrado reflejado en la literatura consultada.

La distribución por meses del año presentó una variación estacional con frecuencias superiores en los meses de octubre a diciembre y de marzo y abril, correspondiendo la mayor incidencia a este último mes. En países no tropicales se observa en la mayoría de los trabajos una frecuencia superior de la GEA infantil en los meses fríos del año, siendo considerablemente inferior el número de casos en los meses de verano, lo que

coincide con la variación propia de Rotavirus del grupo A (15, 132,158,169). También se ha publicado un predominio estacional en invierno y primavera (17,238) incluyendo estudios españoles (314).

Se utilizó como medida de gravedad la escala de Ruuska y Vesikari (278,279) con la que se constató que algo más de dos tercios de los casos presentaron una GEA leve mientras que en el 29% de ellos fue de moderada a grave (puntuación en la escala mayor o igual a 11). En total, 83 de los 820 pacientes estudiados necesitaron ingreso hospitalario (10,1%). Otros autores, utilizando la misma escala, encuentran un 18% de los niños con puntuación igual o por encima de 11 (278).

### **5.1.1.2. Microbiología de la gastroenteritis aguda**

En nuestro trabajo los virus fueron la causa del 42% de los casos (N=345) mientras que las bacterias constituyeron el 29%, lo que confirma que también en nuestro medio, los virus son la causa más importante de GEA en los niños menores de 4 años, como se describe en otros países desarrollados (78,88,132,135,165).

El Rotavirus del grupo A, presente en 234 casos (28,5%), en 205 de ellos como microorganismo único (25%), fue el primer microorganismo causal de GEA adquirida en la comunidad, coincidiendo nuestros datos con la inmensa mayoría de las series de todo el mundo (115,123,169). En nuestro país las cifras de incidencia oscilan entre el 9 y el 46% (44,146,183,209,236,258,267,270,273,274,297,314,323) y en otros países europeos se han publicado cifras que van desde el 3 hasta más del 60%, tanto en niños hospitalizados (46,161,176,218,307) como en los tratados de forma ambulatoria (34,46,161, 176,278).

El Adenovirus 40-41 se encontró en un total de 40 casos (4,87%) y como microorganismo único en 25 (3%) de ellos. Este hallazgo coincide con los datos de nuestro país cuando se analizan los serotipos entéricos (250, 270), entre el 1 y el 5%, así como con otros países desarrollados (34,46,76,178,242,296,341) que presentan frecuencias desde el 1 al 8%.

En nuestra serie se encontró Astrovirus en un total de 44 casos (5,37%), apareciendo como microorganismo único solo en 23 casos (2,8%). Llama la atención el bajo porcentaje encontrado en nuestro trabajo. En las publicaciones de nuestro país se encuentran, utilizando la misma técnica, frecuencias del 12,5% (5% monomicrobiana)

en Galicia (314), del 5,5% en Zaragoza (193), del 4,3% (en el 3,5% como microorganismo único) en Madrid y del 3% de los casos en Valladolid (88,119).

En otros países se estiman cifras de GEA por Astrovirus, comprendidas entre el 4 y el 26% (34,67,133,138,139,141,177,189,197,203,219,243,261,317). La variabilidad en estos estudios se debe a la diversidad tanto de métodos diagnósticos como de las características de la población estudiada.

En nuestro caso, el bajo porcentaje de casos podría estar influido por el tipo de pacientes analizados los cuales requerían atención hospitalaria, mientras que este virus se asocia con frecuencia a los casos más leves, atendidos de forma ambulatoria. Por otra parte, la técnica utilizada (EIA comercial) pudo no detectar un porcentaje de casos ya que es menos sensible que otras técnicas como la RT-PCR (69,210). De hecho, por estudios realizados por nuestro grupo con posterioridad a este trabajo y utilizando la técnica de RT-PCR, el porcentaje de casos de GEA por este agente podría pasar a ser del 10%.

Los Calicivirus humanos tipo Norwalk (genogrupos I y II) constituyeron la segunda causa en nuestra serie (6,58%). Este es el primer estudio de incidencia de este virus en la GEA esporádica infantil en nuestro país. En la literatura existen pocos trabajos sistematizados, con cifras de incidencia entre el 3 % y el 20% en GEA infantil esporádica dependiendo de la metodología utilizada (34,174,239,241,261,336,340). Nuestros casos podrían estar por debajo de la cifra real de infecciones por Calicivirus humanos debido a que solo se examinaron las heces negativas para otros patógenos entéricos y por el hecho de no haber estudiado los Calicivirus tipo Sapporo.

La detección de Rotavirus del grupo C se ha realizado también por primera vez en España, obteniéndose una cifra del 2,7%. Esta cifra es superior a los trabajos en los que se utiliza la técnica de EIA (149) y semejante a la obtenida en el trabajo de *Jiang et al.* (155) que emplean la técnica de RT-PCR para detectar este virus con una cifra del 3% de niños menores de 2 años. En nuestro caso, la frecuencia podría ser mayor si se hubiese aplicado a todas las muestras.

Entre las bacterias *Campylobacter spp* (18,78%) fue la principal causa seguida de *Salmonella spp* (10,60%), y *Yersinia spp* (1,46%), datos semejantes a los obtenidos recientemente en nuestro medio, donde *Campylobacter spp* constituyó también la primera causa bacteriana de GEA (119,258).

En 39 de los 820 casos estudiados (4,7%) se encontró una infección mixta, con Rotavirus del grupo A como participante en 29 de ellos (74,4%). Esta cifra de coinfección es baja si nos comparamos con las series en las que se utiliza una metodología semejante, que presentan cifras hasta del 16% (34,138,314). En estos trabajos se encuentra que la asociación de Calicivirus con otros virus es frecuente, lo que podría explicar en parte nuestra baja tasa, ya que solo se investigó la presencia de estos virus en las muestras negativas para otros enteropatógenos (34,332). Lo mismo podría decirse para el caso del Rotavirus del grupo C.

En 214 de los casos (26%) no se llegó a ningún diagnóstico etiológico, lo que contrasta con trabajos recientes en nuestro país en los que no se detecta ningún patógeno entre un 40 y hasta un 70% de los casos (119,146,193,258,270) y lo mismo ocurre en otros países (15,101).

En nuestro estudio, los casos sin diagnóstico incidieron sobre todo en los niños menores de 6 meses (39,6% de ellos) comparado con el resto de los tramos de edad, donde la proporción osciló entre un 19,4% y un 28,8%. Otros autores que encuentran lo mismo (15) atribuyen este hecho a la transferencia de anticuerpos maternos, que reduciría los microorganismos a niveles indetectables en heces.

Todos estos datos nos hacen reconocer la necesidad de ampliar la detección a otros virus, además de Rotavirus grupo A y Adenovirus entéricos, como Astrovirus, Calicivirus humanos, Rotavirus del grupo C y, posiblemente, a otros no investigados aquí como Torovirus, o Calicivirus humanos tipo Sapporo (genogrupo III).

Hay que destacar, sin embargo, que en la práctica diaria es casi imposible cubrir todo el espectro de posibles patógenos productores de GEA y cada laboratorio deberá elegir, según su capacidad y características propias, que técnicas desarrollar. Por otra parte, sería deseable disponer de técnicas rápidas y sencillas de realizar que facilitaran una búsqueda más sistematizada en los laboratorios de Microbiología clínica.

### 5.1.1.3. Análisis de los casos según el virus responsable

#### Características epidemiológicas

La media de edad de los niños con GEA viral resultó ser inferior que la obtenida en los que padecieron una GEA bacteriana, con predominio de los virus hasta los 24 meses y de las bacterias a partir de los 2 años, como ya se ha observado anteriormente (258,270).

La comparación global de la media de edad de los niños con diarrea por los diferentes virus no presentó diferencias significativas. No obstante, la edad de los niños con GEA por Rotavirus del Grupo A fue significativamente menor que la de los niños que padecieron una infección por otros virus, con una diferencia media de 5 meses. Esta observación ya ha sido descrita por otros autores (17, 34).

En el análisis por tramos de edad, se encontró que los Rotavirus del grupo A y los Calicivirus fueron más frecuentes entre los 6 y 24 meses de edad, coincidiendo con lo publicado en la literatura (29,34,61,134,164,165,241,261). Se observó también un aumento de Calicivirus a partir de los tres años, que probablemente sea debido a la disminución de Rotavirus grupo A en este periodo. Las infecciones por Rotavirus del grupo C presentaron también la mayor incidencia en los niños entre 6 y 23 meses, siendo la media de edad de 17,5 meses. En un trabajo realizado en Japón, los autores encuentran este virus con mayor frecuencia en los niños entre los 3 y 8 años de edad (181), mientras que en el Reino Unido la media de edad encontrada fue de 3,5 meses en los niños con infección adquirida en la comunidad (150).

Las infecciones por Astrovirus y Adenovirus entéricos afectaron con mayor frecuencia a los niños menores de 2 años, de modo que el 68% de las infecciones por Adenovirus entéricos y el 60,9% de las producidas por Astrovirus se presentaron en esta edad, coincidiendo con otros autores españoles (267) y de otros países (130,172, 140,152,242,219,133,238). La mayor incidencia de infecciones por Adenovirus entéricos encontrada en nuestro trabajo (por debajo de los 6 meses), se contradice con otras series en las que esta infección es más frecuente a partir de los 6 meses. Lo mismo ocurre con la mayor proporción de Astrovirus en los niños entre 12 y 23 meses encontrada por nosotros, que en otros estudios se encuentra en niños por debajo de 1 año (89,133,219).

La distribución estacional fue diferente según el virus responsable. El Rotavirus del grupo A presentó una mayor frecuencia en los meses de invierno y primavera con un pico de incidencia en abril, coincidiendo con lo referido en los países de clima templado (29,31,147,175) incluyendo en el nuestro (56,146,183,209,274,330).

El mayor número de casos de infección por Calicivirus tuvo lugar, junto con el Rotavirus grupo A, en los meses de invierno y primavera y con la mayor frecuencia en el mes de abril. Esto contrasta con otros países que describen un predominio de Calicivirus en los meses de invierno (217,239).

El patrón estacional de los Adenovirus, con una mayor frecuencia en el mes diciembre, difiere de lo descrito en nuestro país, con predominio en verano (137,250,267) y de otros países, en los que no se encuentra variación estacional (17,61,140,178). Los Astrovirus predominaron en el otoño, a diferencia de lo que ocurre en otras áreas en nuestro medio donde predomina en invierno y primavera (193,314), así como en otros países con la mayor frecuencia en invierno (214, 238,243,260).

No se encontró variación estacional en el caso del Rotavirus del grupo C, a diferencia de otros estudios que encuentran mayores frecuencias en invierno (155) o en marzo y abril (181). El número de casos de infección por Rotavirus del grupo C, así como por Astrovirus y Adenovirus no permite llegar a conclusiones, siendo necesario para ello más periodos de estudio.

### **Gravedad clínica y evolución**

El impacto y la repercusión de la enfermedad diarreica en nuestro medio se traduce sobre todo por la necesidad de ingreso hospitalario, además de ser uno de los motivos más importantes de consulta médica.

Utilizando la escala de gravedad de Ruuska y Vesikari (278,279), se encontró que la gravedad de la GEA por Rotavirus del grupo A fue superior en nuestra serie, tanto frente a los episodios de etiología bacteriana como al del resto de los virus (con diferencias estadísticamente significativas). Este hecho viene a confirmar lo observado previamente por otros autores (37, 279, 312).

Los Calicivirus siguieron en gravedad al Rotavirus del grupo A y, después, siguieron los Astrovirus y Adenovirus entéricos, los cuales presentaron la media de gravedad más baja. En los artículos que utilizan la misma escala de gravedad de *Ruusca* y *Vesikari* vienen a obtener los mismos resultados, excepto que describen una menor gravedad que en nuestro caso para los Calicivirus (239, 241-243).

En nuestro estudio, los pacientes con GEA por Rotavirus del grupo C igualaron en la media de gravedad a las debidas a Calicivirus tipo Norwalk, aunque en este último caso el 14,8% de los niños necesitaron ser hospitalizados mientras que ello no fue necesario en el caso de los Rotavirus grupo C. En este sentido, la literatura transmite una escasa gravedad de las infecciones por este virus (149,155,181). Se necesitarían estudios más amplios para valorar estos datos y conocer mejor la repercusión clínica de este agente en nuestro medio.

Según nuestros resultados, los pacientes con una coinfección viral presentaban una puntuación media de gravedad superior a la encontrada en las infecciones virales monomicrobianas (diferencia estadísticamente significativa). Otros autores no encuentran diferencias de gravedad entre los casos de GEA monomicrobiana y la infección mixta (34,133,325), aunque en estos trabajos no se aclaran bien los datos por los que se llega a dicha conclusión, ni el papel que juega cada uno de los virus que la integran (314,340).

La alta proporción de Rotavirus grupo A en las coinfecciones, presente en el 76% de los casos, hace pensar que la mayor gravedad de las mismas sea por este motivo. Como ya se ha comentado, las infecciones por este virus fueron más graves que las correspondientes a los casos producidos por otros virus. Por otra parte, cuando se comparó la gravedad de los casos de infección por Rotavirus del grupo A frente a los casos en que se acompañaba de otro microorganismo, no se encontraron diferencias significativas. Tampoco se encontraron diferencias de gravedad entre los casos de coinfección con y sin Rotavirus del grupo A (28 casos frente a 10).

El análisis multivariable de regresión lineal mostró que la presencia de Rotavirus A, la edad y la existencia de coinfección fueron las variables con relación independiente con la gravedad. Sin embargo la variabilidad explicada por esta regresión es tan solo de un 5,3% por lo que los resultados no fueron concluyentes. En resumen, con los datos obtenidos no se puede concluir, si la presencia o no de coinfección tienen valor

pronóstico independiente o si la gravedad se debe a que en este grupo hay un mayor porcentaje de Rotavirus grupo A.

Necesitaron ingreso 83 de los 820 pacientes estudiados en total (10,1%) y entre los 358 niños con GEA viral, 61 precisaron ingreso hospitalario (17%). El Rotavirus del grupo A, presente en 45 casos (40 como microorganismo único), constituyó el 54,2% del total de ingresados, siendo la primera causa de hospitalización, como se ha constatado en otros estudios (46,161,278).

El Calicivirus ocupó el segundo lugar entre los virus como causa de ingreso (9,6%) seguido de Adenovirus (7,2%) mientras que no fue necesario el ingreso en ningún caso de GEA por Astrovirus ni por Rotavirus del grupo C.

En cuanto al porcentaje de pacientes con GEA por Rotavirus del grupo A que precisaron ingreso (19%) fue similar al descrito por otros grupos (239). En el caso de Adenovirus el porcentaje de ingreso fue del 24%, superior al descrito (140,228,315), siendo también los días de estancia hospitalaria (media de 5,8 días), superiores también al resto. Estos dos hechos pueden estar relacionados con el mayor número de días de duración de la diarrea como ya se ha descrito anteriormente (61,130,152,178,242,267,279).

### **5.1.2. Segundo periodo**

Se realizó un segundo periodo de estudio, con el fin de analizar la GEA viral en niños hospitalizados, determinando además la infección nosocomial por estos virus en nuestra área.

Durante este tiempo ingresaron en la Unidad de lactantes 135 (16,8%) niños con diagnóstico de GEA adquirida en la comunidad. Esta infección fue la segunda causa de ingreso, después de la patología respiratoria como ya se ha descrito (53).

La edad media de los niños fue de 10,9 meses, presentándose el mayor número de casos en los meses de noviembre a febrero con un pico de frecuencia en diciembre, coincidiendo con otros trabajos realizados en países desarrollados (15,132,158).

El Rotavirus del grupo A fue de nuevo el principal agente productor de GEA en estos niños. Este virus se encontró en 92 casos (68%) como microorganismo único, llegando

a estar presente en el 71,8%, si se tienen en cuenta las infecciones mixtas. Estas cifras contrastan con el primer año de estudio en el que Rotavirus del grupo A supuso el 48,2% de los casos de ingreso y el 54,2%, si consideramos las coinfecciones. En ambos periodos se utilizó la misma metodología. El hecho de que en el primer año se incluyesen niños hasta 4 años podría influir en el resultado, sin embargo el 80% de ellos eran menores de 2 años. Por otra parte, ya está descrita la variabilidad de frecuencia de infección por Rotavirus grupo A durante diferentes periodos de tiempo, incluyendo en nuestro país (146).

Este gran aumento en la frecuencia de infección por este agente en el segundo periodo de estudio, obligan a mantener una vigilancia continuada de la infección por este virus que nos permita conocer mejor su patrón de comportamiento.

Las frecuencias de Calicivirus (4,4% frente a 9,6%) y sobre todo de Adenovirus (0,7% frente a 7,2%) fueron muy inferiores a las obtenidas en el primer periodo de estudio. Las coinfecciones (4,4% frente a 8,4%), las bacterias (7,4 frente a 8,4) y los casos sin diagnóstico (13,3 frente a 18,7) no variaron sustancialmente en números absolutos. Estos datos sugieren que la disminución de estas frecuencias fue relativa, debida al gran aumento de frecuencia de Rotavirus grupo A. El Astrovirus, que no se encontró en los niños que ingresaron con GEA en el primer periodo de estudio, apareció en este periodo en 5 casos (3,7%).

En este periodo no se investigó Rotavirus del grupo C, ya que en el primer año de estudio los pacientes con GEA causada por este virus no precisaron ingreso hospitalario. Sin embargo, sería deseable incluirlo en futuros estudios para establecer mejor su alcance en nuestro medio, ya que otros autores encuentran infección por este virus de adquisición nosocomial (150).

## **5.2. GASTROENTERITIS AGUDA ADQUIRIDA EN EL HOSPITAL**

Con el propósito de estudiar la GEA adquirida en el hospital se evaluaron los niños que ingresaron en Lactantes en el periodo 1998-99 por patologías diferentes a GEA, considerando 2 grupos. Un grupo de 329 niños (de los 606 que no presentaron diarrea a lo largo de toda su estancia en el hospital) y un grupo de 60 pacientes que presentaron una GEA nosocomial.

### **5.2.1. Pacientes ingresados sin gastroenteritis aguda**

En este grupo de niños se estudió la eliminación fecal asintomática de Rotavirus del grupo A y Astrovirus, detectándose algún virus en un total en 27 de los 329 casos estudiados. En 23 casos (7%) se detectó Rotavirus del grupo A, más de la mitad de ellos pasadas 72 horas del ingreso y por lo tanto de adquisición nosocomial. En la literatura se ofrecen cifras entre el 2% y el 38% de eliminación asintomática de Rotavirus del grupo A (34,46,183,262,273). Es muy importante tener en cuenta a estos niños como probables transmisores nosocomiales de la infección.

Se identificó Astrovirus en 4 casos (1,2%), uno de ellos de adquisición hospitalaria. Esta cifra es acorde con otros estudios realizados en los que se analizan grupos control, integrados por niños libres de síntomas de GEA (67,138,177,189,317).

Es probable que la tasa de eliminación asintomática obtenida en este estudio, sea inferior a la real, ya que no se investigaron otros virus como Adenovirus o Calicivirus para los que se describe una frecuente eliminación fecal asintomática (68,140,152,172,174,178).

No existieron diferencias estadísticamente significativas en la media de edad, días de estancia hospitalaria, distribución temporal ni en la patología que motivó el ingreso entre los niños con y sin eliminación fecal de virus.

### **5.2.2. Pacientes con gastroenteritis aguda nosocomial**

En 60 pacientes de los 666 que ingresaron por patología diferente a GEA (9%) apareció un cuadro clínico de gastroenteritis aguda nosocomial. No existieron diferencias significativas entre este grupo y los que se mantuvieron asintomáticos durante el ingreso con respecto a la media de edad, el sexo, distribución temporal ni en la patología que motivó el ingreso.

Los días de estancia media hospitalaria de los niños con GEA nosocomial fue superior a los que no la presentaron (diferencia estadísticamente significativa). Se ha relacionado la prolongación de la estancia hospitalaria con la aparición de diarrea nosocomial (64) y en un trabajo previo realizado en nuestra misma Unidad de

Lactantes, ya encontramos una prolongación significativa de la estancia hospitalaria en estos casos (87).

En cuanto a la etiología, la GEA nosocomial estuvo mayoritariamente asociada a Rotavirus grupo A (65% de los casos), seguido de los Calicivirus tipo Norwalk (11,5%) y Astrovirus (3,8%). No se evidenció en ningún caso la etiología bacteriana ni por Adenovirus entéricos. Estos datos, que coinciden con los de otros autores (101), destacan la importancia de la patología viral, especialmente por Rotavirus del grupo A, en la infección nosocomial.

### **5.3. Marcadores epidemiológicos de la gastroenteritis viral**

#### **5.3.1. Gastroenteritis aguda adquirida en la comunidad**

En España no existe apenas información sobre la incidencia de la gastroenteritis viral ni de la producida por Rotavirus. En nuestro trabajo aportamos datos de incidencia e impacto de la gastroenteritis aguda adquirida en la comunidad, siendo estos los primeros que se conocen y que pueden servir de referencia para otros trabajos y otros periodos de tiempo.

##### **5.3.1.1. Primer periodo**

Nuestro hospital atiende al 100% de la población del Area Sanitaria IX y es el único Centro hospitalario de dicha Area. Por lo tanto, se han podido obtener datos reales de incidencia en el tiempo considerado.

La incidencia de gastroenteritis aguda adquirida en la comunidad, atendida en el hospital fue de 64 casos por 1000 niños menores de 4 años al año. La incidencia de la GEA viral fue de 28,9 casos por 1000 niños menores de 4 años al año, siendo de 18,4 casos para el Rotavirus del grupo A, de 3,5 para Astrovirus, 3,1 para Adenovirus 40-41, 4,2 para Calicivirus tipo Norwalk (genotipos I y II) y 1,7 para Rotavirus grupo C.

De estos datos puede deducirse que 1 de cada 10 niños de nuestra Area, a los 4 años de edad habría experimentado un episodio de GEA viral con necesidad de asistencia hospitalaria y 1 de cada 15 o 16 habría padecido un episodio de GEA por Rotavirus del grupo A.

Hay que considerar que estos podrían estar infravalorados debido a que en la identificación de los virus no se utilizó en todos los casos técnicas de PCR que han demostrado ser las más sensibles (211, 220) y a la falta de investigación de otros virus como Torovirus, Coronavirus o los Calicivirus humanos del tipo Sapporo, los cuales se han descrito en otras series como causa de GEA esporádica en los niños (252,336, 340).

La incidencia de ingreso por GEA viral resultó ser de 5,5 casos anuales por 1000 niños menores de 4 años en el periodo 1996-1997, por GEA viral de 4 casos por 1000 niños y la de GEA por Rotavirus del Grupo A de 2,9 casos anuales por 1000 niños menores de 4 años. Esto nos permite estimar que en nuestro Area al menos 1 de cada 70 niños a los 4 años de edad habrá ingresado debido a una GEA viral y uno de 94 niños por una GEA por Rotavirus del grupo A. Estas cifras entran dentro de lo publicado en USA (14) y Europa (56,161,280,307,330) que estiman cifras de ingreso por una de GEA por Rotavirus en niños menores de 5 años entre 1 de cada 32 y 1 de cada 167 niños (114), según la diferente metodología empleada y del comportamiento biológico variable de este virus.

En España existen dos trabajos sobre la estimación de incidencia de hospitalización de la GEA por Rotavirus del grupo A. En uno de ellos, realizado a escala nacional y basándose en los datos del Sistema de Información Microbiológica y los datos del CMBD (Conjunto Mínimo Básico de Datos), se estima una incidencia de hospitalización por GEA por Rotavirus de 2,5 por 1000 menores de 5 años (330). El segundo trabajo, realizado en Guipúzcoa (56), mediante datos retrospectivos de alta hospitalaria, encuentra una incidencia de hospitalización por diarrea por Rotavirus del grupo A de 3,1 por 1000 niños menores de 5 años por año y una necesidad de ingreso de uno de cada 60-80 niños los primeros 5 años de vida (251).

#### **5.3.1.2. Segundo periodo**

En este periodo, 1998-1999, la incidencia de ingreso por GEA viral fue de 15,5 casos por cada 1000 menores de 2 años por año y la de Rotavirus del grupo A fue de 14 casos anuales por 1000 menores de 2 años. Según estos datos, al menos uno de cada 37 niños, durante los 2 primeros años, habrá ingresado en el hospital por este motivo. Estos datos contrastan de forma llamativa con el primer periodo de estudio en

que la incidencia fue de 2,9. Esto podría explicarse por el comportamiento variable en la biología del virus a lo largo del tiempo.

La GEA viral constituyó, en este periodo de estudio, el 13,3% de todos los ingresos en el mismo periodo y la GEA por Rotavirus el 12,1%. En nuestro medio, los escasos estudios que existen sobre ello, mencionan unas frecuencias de GEA por Rotavirus como motivo de ingreso entre el 4,6% y el 5,5% (56,273).

### **5.3.2. Gastroenteritis aguda adquirida en el hospital**

La incidencia de GEA nosocomial por Rotavirus del grupo A fue de 5,1% de los ingresados por GEA por Rotavirus. Considerando también la adquisición hospitalaria asintomática de la infección, la incidencia de infección nosocomial alcanza un 7%. En las series de nuestro país esta incidencia es de 2,2% (56) y de 3,5% (273), ambas inferiores a la nuestra.

En los trabajos mencionados (56,273), no se realizó seguimiento a los niños después de ser dados de alta, mientras que en el nuestro, el 35% de los casos de GEA nosocomial se descubrieron gracias al seguimiento telefónico realizado pasadas 72 horas del alta hospitalaria. Por tanto, hay que destacar la importancia que tiene este seguimiento a la hora de establecer datos de incidencia o frecuencia de infección nosocomial.

En términos de frecuencia, de los niños ingresados en la Unidad de Lactantes con una GEA por Rotavirus del grupo A (126 casos), 34 de ellos (27%) fueron de adquisición nosocomial. Otros grupos publican cifras de infección de origen nosocomial por este virus, entre el 20 y el 50%, tanto en nuestro país (206,207,267,273,274) como en otros países (53,64).

También podría ser superior la tasa de eliminación fecal asintomática y los casos de infección nosocomial si se hubieran investigado otros virus como Adenovirus y Calicivirus o incluso Torovirus, del que se han publicado cifras de infección hospitalaria del 2% (151).

En total, durante este segundo periodo, si consideramos la GEA por Rotavirus adquirida en la Comunidad, la nosocomial y los casos de eliminación viral asintomática obtenemos que 19 de cada 100 niños ingresados eliminan Rotavirus del grupo A en algún momento de su estancia hospitalaria.

#### **5.4. Distribución de los serotipos/genotipos del Rotavirus del grupo A**

El conocimiento de los serotipos circulantes de los Rotavirus del grupo A es importante. Los estudios de la epidemiología molecular muestran una gran variabilidad de año en año, dentro del mismo país o área geográfica, de los serotipos/genotipos G y P de este virus (21,27,33,71,163).

El estudio de los serotipos G y P de Rotavirus del grupo A en el primer periodo de estudio es el primero realizado en la Comunidad de Madrid (339), siendo el serotipo G1 el predominante, seguido del G4. En otras Comunidades españolas la información de que disponemos es escasa y proviene fundamentalmente de comunicaciones a reuniones científicas, coincidiendo en los serotipos G1 y G4 como predominantes (39,57).

Igualmente, en la mayoría de los estudios en todo el mundo, los serotipos G1 al G4, son los que se encuentran con mayor frecuencia (10,27,33,53,104,108,179,232,342). No se encontró, en nuestro estudio, ningún caso de serotipo G2 y el G3 presentó una incidencia muy baja, al contrario de lo que ocurre en otros países, donde el serotipo G2 constituye entre el 3% y el 28% y el G3 entre el 0,8 y el 19% (27,227,231,232, 263,264,275).

El hallazgo de dos casos (0,8%) con 2 serotipos (G1 + G4), confirma la presencia de infecciones mixtas por 2 cepas diferentes de Rotavirus. Sin embargo, esta cifra de coinfección resulta muy baja comparada con el 3,6% al 16% de casos obtenidos en los países en desarrollo (71,275,285), el 2,3% de EEUU (264) o en Europa, del 2% al 18,8% de los casos (227, 231, 232).

En el 10% de los casos no se pudo determinar el serotipo por la técnica de EIA, aunque utilizando la técnica de RT-PCR se consiguió el serotipado/genotipado de todas las muestras.

La falta de serotipado con anticuerpos monoclonales es variable y está descrita en otros países europeos con tasas entre el 2% y el 12% (175), así como en USA (5%) (264) o en Egipto (38,7%) (263).

En el grupo de muestras en el que se determinaron los serotipos P, todos ellos pertenecían al serotipo P[8] lo que concuerda con otros estudios en los que predominan también los serotipos G1 y G4 (109,145).

No se encontraron diferencias significativas en la gravedad ni en la necesidad o no de ingreso entre los serotipos G1 y G4, coincidiendo con otros autores (104,108,325). Sin embargo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la proporción del serotipo G1 en los casos de coinfección, que fue mayor de la esperada con respecto al grupo total, de modo que constituyó el 91,7% de los casos frente al 70,3% del grupo de infección por Rotavirus A que no presentaban coinfección.

En cuanto a la distribución de los serotipos G1 y G4 a lo largo del año, ambos se distribuyeron en paralelo sin cambios en el predominio a lo largo del año o en los picos de primavera e invierno.

En el segundo periodo destaca el cambio en el serotipo predominante con respecto al primer año de estudio, que fue el G4 seguido de G1, lo que se ha observado también en otros países (33,109,134,342). En nuestro país se ha observado una alternancia en los serotipos en Valencia, predominando G4 en la temporada 1996-97 y el serotipo G1 en 1998-99 (39).

No existieron diferencias entre los serotipos detectados entre las cepas de los niños ingresados por GEA adquirida en la comunidad y los presentados por los niños con infección nosocomial. En la literatura consultada tampoco se encuentran diferencias entre ellos (130,175,176) lo que significa que la infección nosocomial se produce por cepas que se introducen de la comunidad.

Es llamativo en este segundo periodo de estudio, que el 45,6% de las muestras no pudieran ser tipadas por el método de EIA con anticuerpos monoclonales (el mismo método empleado en el primer periodo). Como ya se ha comentado, están descritas tasas variables de serotipado con el EIA con anticuerpos monoclonales (175, 263,264). Esto puede ser debido a la desnaturalización de los antígenos de la cápside que impida su reconocimiento (175). Por otra parte, no puede descartarse que se trate de otros serotipos diferentes a G1, G2, G3 o G4, para lo que se necesitaría continuar el estudio de las muestras no serotipables.

Estos resultados nos llevan a la importancia de establecer una vigilancia epidemiológica de los serotipos de Rotavirus circulantes en nuestro país, sobre todo con vistas a las futuras vacunas que se desarrollen, frente a determinados serotipos G.

Los resultados expuestos nos han permitido alcanzar las siguientes

CONCLUSIONES:

1. En nuestro estudio los Rotavirus del grupo A han sido la causa más frecuente de gastroenteritis aguda adquirida en la comunidad en niños menores de 4 años, tanto en términos de incidencia como de gravedad.
2. Los Calicivirus humanos tipo Norwalk (genogrupos I y II), estudiados por primera vez en nuestro país en la gastroenteritis aguda esporádica infantil, constituyeron la segunda causa en nuestra serie, lo que obliga a tener en cuenta a este agente como causa frecuente de estos procesos en nuestro medio.
3. Los Astrovirus han constituido la tercera causa de gastroenteritis viral en nuestra serie. Sin embargo, sabemos que esta incidencia está infravalorada ya que, utilizando técnicas más sensibles como la RT-PCR, podría llegar a constituir la segunda causa de la gastroenteritis viral. Los Adenovirus entéricos, serotipos 40-41, constituyeron la cuarta causa de gastroenteritis viral adquirida en la comunidad.
4. Nuestros resultados indican que los Rotavirus del grupo C, estudiados también por primera vez en nuestro país, podrían ser una causa importante de gastroenteritis aguda en nuestro medio. No obstante, no se puede llegar todavía a conclusiones definitivas.
5. Se confirma en nuestro trabajo que Rotavirus del grupo A es una causa importante de infección nosocomial en los niños. Debido a que la eliminación fecal asintomática es uno de los mecanismos principales de transmisión, se plantea la identificación de estos portadores asintomáticos, con el fin de disminuir las tasas de infección hospitalaria.
6. Se aportan datos, por primera vez en la Comunidad de Madrid, sobre los serotipos/genotipos G y P de Rotavirus del grupo A, observándose un predominio del serotipo G1 en el primer año y del G4 en el segundo periodo de estudio.

7. La variabilidad observada en la incidencia y distribución de los serotipos del Rotavirus grupo A en los dos periodos de estudio, haría necesario establecer una vigilancia continuada de los serotipos circulantes de este virus.
  
8. Se deduce de nuestro estudio que la búsqueda cuidadosa de agentes virales que no se investigan de forma sistemática, lleva a una disminución considerable de los casos de gastroenteritis sin diagnóstico etiológico. Sería necesario disponer de técnicas sensibles y sencillas de realizar que nos permitieran estudiar un mayor número de agentes, y así poder determinar la importancia real de la gastroenteritis viral en nuestro medio.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Centers for Disease Control and Prevention.** Withdrawal of Rotavirus vaccine recommendation. *MMWR* 1999; 48:1007.
2. **Agus S, Falchuk ZM, Sessoms CS et al.** Increased jejunal IgA synthesis in vitro during acute infectious non bacterial gastroenteritis. *Am J Dig Dis* 1974; 19: 127-131.
3. **Allard A, Albinsson B, Wadell G.** Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 37: 149-157.
4. **American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases.** Possible association of intussusception with rotavirus vaccination. *Pediatrics* 1999; 104: 575.
5. **American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases.** Prevention of rotavirus disease: Guidelines for use of rotavirus vaccine. *Pediatrics* 1998; 102: 1483-1491.
6. **Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI.** Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and Southern hybridization. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 64-71.
7. **Ansari SA, Springthorpe VS, Satar SA.** Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis* 1991; 13:448-461.
8. **Aponte C, Poncet D, Cohen J.** Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *J Virol* 1996; 70: 985-91.
9. **Appleton H, Buckley M, Thom BT, Cotton JL, Henderson S.** Virus I-like particles in winter vomiting disease. *Lancet* 1977; i: 409-411.
10. **Arista S, Vizzi E, Ferraro D, Cascio A, Di Stefano R.** Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among strains recovered from Italian children with diarrhea. *Arch Virol* 1997; 142: 2065-2071.
11. **Arístegui J.** Vacunas pediátricas no incluidas en el calendario vacunal. *Rev Esp Pediatr* 1998; 54: 163-177.
12. **Arnedo A, Gonzalez F, Bellido J, Marti JV, Safont L, Calvo C.** Food poisoning outbreak probably of viral etiology caused by Norwalk virus. *Gac Sanit* 1991; 5: 169-173.
13. **Atmar RL, Estes MK.** Diagnosis of noncultivable Gastroenteritis viruses, the Human Calicivirus. *Clin Microbiol Rev* 2001, 14: 15-37.
14. **Ball JM, Tian P, Zeng CQY, Morris AP, Estes MK.** Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 1996; 272: 101-104.

15. **Barnes GL, Uren U, Stevens KB, Bishop RF.** Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from April 1980 to march 1993. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 133-138.
16. **Bass DM, Upadhyayula U.** Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J Virol* 1997; 71: 8666-8671.
17. **Bates PR, Bailey AS, Wood DJ, Morris DJ, Couriel JM.** Comparative epidemiology of rotavirus, subgenus F (types 40 and 41) adenovirus an astrovirus gastroenteritis in children. *J Med Virol* 1993; 39: 224-228.
18. **Baum SG.** Adenovirus. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000; p. 1624-1630.
19. **Beards G, Xu L, Ballard A, Desselberger U, McCrae MA.** A serotype 10 human Rotavirus. *J Clin Microbiol* 1992, 30: 1432-1435.
20. **Beards GM, Brown WG, Green J, Flewett TH.** An enveloped virus in stools of children and adults with gastroenteritis that resembles de Breda virus of calves. *J Med Virol* 1986; 20:67-78.
21. **Begue RE, Dennehy PH, Huang J, Martin P.** Serotype variation of group A Rotaviruses over nine winter epidemics in southern New England. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1592-1594.
22. **Bennet R, Hedlund KO, Ehrnst A, Eriksson M.** Nosocomial gastroenteritis in two infant wards over 26 monts. *Acta Paediatr* 1995; 84: 667-671.
23. **Berke T, Golding B, Jiang X et al.** Phylogenetic analysis Of Caliciviruses. *J Med Virol* 1997; 52:419-424.
24. **Bern C, Glass RI.** Impact of diarrhoeal disease worldwide. pág 1-26. En Kapikian (ed). *Viral infection of gastrointestinal trac*. Marcel y Dekker, In New York.
25. **Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI.** The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten year update. *Bull WHO* 1992; 70: 705-14.
26. **Berner R, Schumacher RF, Hameister S, Forster J.** Occurrence and impact of community-acquired and nosocomial rotavirus infections- a hospital-based study over 10 y. *Acta Paediatr* 1999 (Suppl 426); 88: 48-52.
27. **Bishop RF, , Masendycz PJ, Bugg HC, Carlin JB, Barnes GL.** Epidemiological patterns of Rotaviruses causing severe gastroenteritis in young children throughout Australia from 1993 to 1996. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1085-1091.
28. **Bishop RF, Bugg HC, Masendycz PJ, Lund JS, Gorrell RJ, Barnes GL.** Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs. *J Infect Dis* 1996; 174 suppl 1: S22-S29.
29. **Bishop RF:** Natural history of human rotavirus infection. *Arch Virol Suppl* 1996; 12:119-128.
30. **Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ.** Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; 2: 1281-1283.

31. **Black RE.** Epidemiology of diarrheal disease: implications for control by vaccines. *Vaccine* 1993; 11: 100-106.
32. **Blacklow NR, Greenberg HB.** Viral gastroenteritis. *N Engl J Med* 1991; 325: 252-264.
33. **Bon F, Fromatin C, Aho S, Pothier P, Kohli E.** G and P genotyping of Rotavirus Strains Circulating in France over a three year period: Detection of G9 and P6 strains at low frequencies. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1681-1683.
34. **Bon F, Fascia P, Dauvergne M et al.** Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3055-3058.
35. **Bonsdorf CHV, Svensson L.** Human serogroup C rotavirus in Finland. *Scand J Infect Dis* 1988; 20: 475-478.
36. **Boyle JF, Holmes KV.** RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J Virol* 1986; 58: 561-68.
37. **Bresee JS, Glass RI, Ivanoff B, Gentsch JR.** Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. *Vaccine* 1999; 17: 2207-2222.
38. **Brown M, Grydsuk JD, Fortsas E, Petric M.** Structural features unique to enteric adenoviruses. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 301-307.
39. **Buesa J, de Souza CO, Gil MT et al.** Prevalencia y evolución de genotipos G y P de rotavirus durante tres años en Valencia. VI Congreso Nacional de Virología, Madrid, Octubre 1999.
40. **Buesa J, Colomina J, Raga J, Villanueva A, Prat J.** Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. *Res Virol* 1996; 157: 353-361.
41. **Buesa J, Duato M, Gimeno C, García de Lomas J.** Sequential variation in genomic RNA patterns on human rotaviruses isolated from infantile gastroenteritis. *Ann Inst Pasteur* 1987; 138: 307-314.
42. **Burns WB, Siadat-Pajouh M, Krishnamey AA, Greenberg HB.** Protective effect of rotavirus VP6 specific IgA monoclonal antibodies that lack conventional neutralizing activity. *Science* 1996; 272: 104-7.
43. **Caceres VM, Kim DK, Bresee JS et al.** A viral gastroenteritis outbreak associated with person-to-person spread among hospital staff. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19: 162-167.
44. **Cahuana A, Iribarren I, Camps F et al.** Gastroenteritis aguda en la infancia. Estudio prospectivo de 408 casos de una Unidad de Estancia Corta. *Pediatrica* 1983; 3: 227-231.
45. **Cama RI, Parashar UD, Taylor DN et al.** Enteropathogens and other factors associated with severe disease in children with acute watery diarrhea in Lima, Peru. *J Infect Dis* 1999; 179: 1139-1144.



62. **Colomina J, Raga J, Gil MT, Buesa J.** Respuesta de anticuerpos séricos y coproanticuerpos específicos en niños con gastroenteritis aguda por rotavirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998; 16: 55-60.
63. **Colomina Rodriguez J, Gil Borja MT, Buesa Gomez J.** Rotavirus: Estrategias de vacunación. *An Esp Ped* 1997; 47:341-345.
64. **Cone R, Mohan k, Thouless M, Corey L.** Nosocomial transmission of rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 103-109.
65. **Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS.** Global seasonality of rotavirus infections. *Bull WHO* 1990; 68: 171-177.
66. **Coulson BS.** VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 113-18.
67. **Cruz JR, Bartlett AV, Herrmann JE, Cáceres P, Blacklow NR, Cano F.** Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1140-1144.
68. **Cruz JR, Cáceres P, Cano F, Flores J, Bartlett A, Torún B.** Adenovirus types 40 and 41 and rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1780-1784.
69. **Cubitt WD, Mitchell DK, Carter MJ, Willcocks MM, Holzel H.** Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a pediatric bone marrow transplant unit. *J Med Virol* 1999; 57: 313-321.
70. **Cubitt WD.** Historical background and classification of caliciviruses and astroviruses. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 225-235.
71. **Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, et al.** Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 836-843.
72. **Cunliffe NA, Kilgore PE, Bresee JS et al.** Epidemiology of rotavirus diarrhea in Africa: a review to assess the need for rotavirus immunization. *Bull WHO* 1998; 76:525-537.
73. **Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG et al.** Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1820-1822.
74. **Davidson GP.** Passive protection against diarrheal disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 23: 207-212.
75. **Davidson GP, Bishop RF, Townley RRW, Holmes IH.** Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet* 1975; 1: 242-6.
76. **De Jong JC, Bijlsma K, Wermenbol AG et al.** Detection, typing, and subtyping of enteric adenoviruses 40 and 41 from fecal samples and observation of changing incidences of infections with these types and subtypes. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1562-1569.
77. **De Leon R, Matsui SM, Baric RS et al.** Detection of Norwalk virus in stools specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and non-radioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3151-3157.

78. **Del Castillo F.** Estudio de los principales enteropatógenos en las diarreas infantiles en España. *Med Clin (Barc)* 1992; 99: 69-74.
79. **Dennehy PH, Hartin M, Nelson SM, Reising SF.** Evaluation of the InmunoCards TAT. Rotavirus assay for detection of group A Rotavirus in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1977-1979.
80. **Dennehy PH, Gauntlett DR, Spangenberg SE.** Choice of reference assay for the detection of rotaviruses in fecal specimens: electron microscopy versus enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1280-1283.
81. **Dennehy PH, Tente WE, Fisher DJ, Veloudis BA, Peter G.** Lack of impact of rapid identification of rotavirus-infected patients on nosocomial rotavirus infections. *Ped Infect Dis J* 1989; 8: 290-296.
82. **Dennehy PH, Gaultlett DR, Tente WE.** Comparasion of nine commercial immunoassay for detection of rotaviruses in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1630-1634.
83. **Desselberger U.** Prospects for vaccines against rotaviruses. *Rev Med Virol* 1998; 8:43-52
84. **Desselberger U.** Genome rearrangements of rotaviruses. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 37-51.
85. **Dolin R, Reichhman KD, Roessner T, Tralka RT, Schooley W, Gary, Mores D..** Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain Agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1982; 146: 184-189.
86. **Dolin R, Blacklow NR, DuPont H et al.** Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* 1971; 123:307-312.
87. **Echávarri F, Román E, Cilleruelo ML et al.** Infección nosocomial por rotavirus en una Unidad de Lactantes. XXVI Reunión Anual de la Asociación Española de Pediatría, Santiago de Compostela 1996. *An Esp Ped* 1996; supp 84: 108.
88. **Eirós Bouza JM, Bachiller Luque ML, Ortiz de Lejarazu R.** Ribovirus emergentes implicados en las gastroenteritis. *An Esp Ped* 2001; 54: 136-144.
89. **Esahli H, Brebäck K, Bennet R, Ehrnst A, Eriksson M, Hedlund K-O.** Astroviruses as a cause of nosocomial outbreaks of infant diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: 511-515.
90. **ESPGAN Working Group on Acute Diarrhoea.** Recommendations for Feeding in Childhood Gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24:619-620.
91. **ESPGAN Working Group on Acute Diarrhoea.** Recommendations for composition of oral rehydration solutions for children of Europe. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14:113-115.
92. **Espinoza F, Paniagua M, Hallander H, Svensson L, Strannegard O.** Rotavirus infections in young Nicaraguan Children. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 564-571.
93. **Estes MK, Ball JM, Guerrero RA et al.** Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 2): S367-373.

94. **Estes MK.** Advances in molecular biology: impact on rotavirus vaccine development. *J Infect Dis* 1996; 174 (Suppl 1): S37-46.
95. **Estes MK.** Rotaviruses and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al (eds). *Fields Virology*. Third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1996; p. 1625-1655.
96. **Estes MK, Cohen J.** Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989; 53: 410-49.
97. **Fang ZY, Ye Q, Ho MS et al.** Investigation of an outbreak of adult diarrhea rotavirus in China. *J Infect Dis* 1989; 160: 948-53.
98. **Farthing MJG.** Acute Diarrhea: Pathophysiology. En: Gracey M, Walker-Smith JA, (eds) *Diarrheal disease*. Nestlé Nutrition Workshop Series. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997; p. 55-73.
99. **Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Morris CA.** Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet* 1975; 1: 4-5.
100. **Flewett TH, Davies H, Bryden AS, Robertson MJ.** Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J Clin Pathol* 1974; 27: 608-14.
101. **Ford-Jones EL, Mindorff CM, Gold R, Petric M.** The incidence of viral-associated diarrhea after admission to a pediatric hospital. *Am J Epidemiol* 1990; 131: 711-718.
102. **Franco MA, Feng N, Greenberg HB.** Molecular determinants of immunity and pathogenicity of rotavirus infection in the mouse model. *J Infect Dis* 1996; 174 (Suppl 1): S47-50.
103. **Frankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando TA, Glass RI.** Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 1998; 178: 1571-1578.
104. **Frühwirth M, Brösl S, Ellemunter H, Moll-Schüler I, Rohwedder A, Mutz I.** Distribution of rotavirus VP4 genotypes and VP7 serotypes among nonhospitalized and hospitalized patients with gastroenteritis and patients with nosocomially acquired gastroenteritis in Austria. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1804-1806.
105. **Fujii R, Kuzuya , Hamano M, Yamada M, Yamazaki S.** Detection of human group C rotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1307-1311.
106. **Gaggero A, O'Ryan M, Noel JS et al.** Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3691-3693.
107. **Gaggero A, Avendaño LF, Fernández J et al.** Nosocomial transmission of rotavirus from patients admitted with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3294-3297.

108. **Gault E, Chikhi-Brachet R, Delon S et al.** Distribution of human rotavirus G types circulating in Paris, France, during the 1997-1998 epidemic: high prevalence of type G4. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2373-2375.
109. **Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M et al.** Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996; 174 (Suppl 1): S30-6.
110. **Gentsch JR, Glass RI, Woods P et al.** Identification of group A rotavirus genes 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1365-1373.
111. **Giaquinto C, Errico G, Ruga E, Naso I, D Elia R.** Evaluation of ELISA test for Rotavirus diagnosis in neonates. *J Pediatr* 1986; 109: 565-566.
112. **Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparc-Goffart I, Hardy ME, Estes MK.** Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000; 74: 6581-6591.
113. **Glass RI, Noel J, Ando T et al.** The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 2): S254-261.
114. **Glass RI, Bresee JS, Parashar UD, Holman RC, Gentsch JR.** First rotavirus vaccines licensed: is there really a need?. *Acta Paediatr* 1999; (Supp 426) 88: 2-8.
115. **Glass RI, Kilgore PE.** Etiology of acute viral gastroenteritis. En: Gracey M, Walker- JA, (eds). *Diarrheal disease. Nestlé Nutrition Workshop Series.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997; p. 39-54. Smith
116. **Glass RI, Kilgore PE, Holman RC et al.** The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden. *J Infect Dis* 1996; 174 (Suppl 1): S5-11.
117. **Glass RI, Noel J, Mitchell D et al.** The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch. Virol Suppl* 1996; 12: 287-300
118. **Glass RI, Gentsch J, Smith JC.** Rotavirus vaccines: success by reassortment. *Science* 1994; 265: 1389-1399.
119. **Gómez López A, Díez R, Coperias JL, Ladrón de Guevara C.** Infección por Astrovirus en niños con gastroenteritis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19: 199-201.
120. **Gorrell RJ, Bishop RF.** Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children. *J Med Virol* 1999; 57: 204-211.
121. **Gouvea V, Santos N.** Rotavirus serotype G5: an emerging cause of epidemic childhood diarrhea. *Vaccine* 1999; 17: 1291-2.
122. **Gouvea V, Ho MS, Glass R et al.** Serotypes and electropherotypes of human rotavirus in the USA: 1987-1989. *J Infect Dis* 1990; 162: 363-367.
123. **Gracey M.** En: Gracey M, Walker- JA, (eds). *Diarrheal disease. Nestlé Nutrition Workshop Series.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997; p. 39-54. Smith.

124. **Grandien M, Pettersson CA, Svensson L, Uhnoo I.** Latex agglutination test for adenovirus diagnosis in diarrheal disease. *J Med Virol* 1987; 23: 311-316.
125. **Gray JJ, X Jiang. P. Morgan Capner, U Desselberger, and M. K. Estes.** 1993. Prevalence of antibodies to Norwalk virus in Englan: detection by enzyme-linked immunosobent assay using baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen. *J Clin Microbiol.*
126. **Green KY, Ando T, Balayan MS et al.** Taxonomy of Caliciviruses. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 2): S322-330.
127. **Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, Brown DWG.** Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 1995; 47: 392-398.
128. **Green KY, J F Lew, X Jiang, A Z Kapikian, and M K Estes.** 1993. Comparasion of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen inserologic assay and some epidemiologic observations. *J Clin Microbiolol* 1993; 31:2185-2191.
129. **Griffin DD, Kirkwood CD, Parashar UD, et al.** Surveillance of Rotavirus strains in the United States: Identification of unusual strains. *J Clin Microbiol* 2000; 2784-2787.
130. **Grinwood K, Carzino R, Narnes GL, Bishop RF.** Patients with enteric adenovirus gastroenteritis admitted to an australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 131-136.
131. **Grohman GS, Glass RI, Pereira HG, Monroe SS, Hightower AW, Bryan RT.** Enteroviruses and diarrhea in HIV infected patients. *N Eng J Med* 1993;329:14-20.
132. **Guerrant RI, Hughes JM, Lima NL, Crane J.** Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev. Inf. Dis.* 1990; 12 (suppl1): s41-s50
133. **Guerrero ML, Noel JS, Mitchell DK et al.** A prospective study of astrovirus diarhea of infancy in Mexico city. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 723-727.
134. **Haffejee IE.** The epidemiology of rotavirus infection: a global perspective. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20: 275-286.
135. **Hart CA, Cunliffe NA.** Diagnoses and causes of viral gastroenteritis. *Current Opin Inf Dis* 1996; 9: 333-339
136. **Hedlund KO, Rubilar-Abreu E, Svensson L.** Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 2): S275-280.
137. **Hernandez JM, Carrillo F, Jimenez R, Martinez A.** Detección de adenovirus entéricos. *Enf Infec Microbiol Clin* 1991; 9: 313-314.
138. **Herrmann JE, Taylor PD, Echeverría P, Blacklow NR.** Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med* 1991; 324: 1757-1760.
139. **Herrmann JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD, Blacklow NR.** Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1990; 161: 226-229.

140. **Herrmann JE, Blacklow NR, Perron-Henry DM, Clements E, Taylor DN, Echeverria P.** Incidence of enteric adenoviruses among children in Thailand and the significance of these viruses in gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1783-1786.
141. **Herrmann JE, Hudson RW, Perron-Henry DM, Kurtz JB, Blacklow NR.** Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1988; 158: 182-185.
142. **Herrmann JE, Perron-Henry DM, Blacklow NR.** Antigen detection with monoclonal antibodies for the diagnosis of adenovirus gastroenteritis. *J Infect Dis* 1987; 155: 1167-1171.
143. **Ho MS, Glass RI, Pinsky PF, Anderson LJ.** Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. *J Infect Dis* 1998; 158: 112-116.
144. **Horwitz MS.** Adenoviruses. . En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al (eds). *Fields Virology*. Third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1996; p. 2149-2171.
145. **Hoshino Y, Kapikian AZ.** Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 99-111.
146. **Hostalot A, Corretger J, Falcó M, Rios M, Lambruschini N.** Gastroenteritis aguda. Estudio prospectivo en niños de 1 a 24 meses. *Arch Ped* 1995; 46: 268-273.
147. **Ijaz MK, Sattar SA, Johnson-Lussenberg CM, Springthorpe VS.** Effect of relative humidity, atmospheric temperature, and suspending medium on the airborne survival of human rotavirus. *Can J Microbiol* 1985; 31: 681-685.
148. **Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo.** ¿Se puede utilizar el sistema de vigilancia existente para conocer la situación de los rotavirus en España?. *Bol Epidemiol Sem* 1996; 4: 89-92.
149. **James VLA, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN.** Enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant human group C rotavirus inner capsid protein (VP6) to detect human group C rotaviruses in fecal samples. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3178-3181.
150. **James VLA, Lambden PR, Caul EO, Cooke SJ, Clarke IN.** Seroepidemiology of human group C rotavirus in the UK. *J Med Virol* 1997; 52: 86-91.
151. **Jamieson F, Wang EI, Bain C et al.** Human Rotavirus: a new nosocomial gastrointestinal pathogen. *J Infect Dis* 1998; 178: 1263-9.
152. **Jarecki-Khan K, Tzipori SR, Unicomb LE.** Enteric adenovirus infection among infants with diarrhea in rural Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 484-489.
153. **Jiang X, Wilton N, Zhong WM et al.** Diagnosis of human caliciviruses by use of Enzyme Immunoassays. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 2): S349-359.
154. **Jiang X, Matson DO, Cubitt WD, Estes MK.** Genetic and antigenic diversity of human caliciviruses (HuCVs) using RT-PVR and new EIAs. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 251-262.

155. **Jiang B, Dennehy PH, Spangenberg S, Gentsch JR, Glass RI.** First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J Infect Dis* 1995; 172: 45-50.
156. **Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK.** Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2529-2534.
157. **Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK.** Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990; 250: 1580-1583.
158. **Jin S, Kilgore PE, Holman RC, Clarke MJ, Gangarosa EJ, Glass R.** Trends in hospitalizations for diarrhea in United States children from 1979 through 1992: estimates of the morbidity associated with rotavirus. *Ped Inf Dis J* 1996; 15:397-404.
159. **Joensuu J, Koskenniemi E, Pang XL, Vesikari T.** Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet* 1997; 350: 1205-1209.
160. **Joensuu J, Koskenniemi E, Vesikari T.** Prolonged efficacy of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine. *Pediatr Infect Dis* 1998; 17: 427-429.
161. **Johansen K, Bennet R, Bondesson K et al.** Incidence and estimates of the disease burden of rotavirus in Sweden. *Acta Paediatr* 1999 (Suppl 426); 88: 20-23.
162. **Johansen K, Hinkula J, Espinoza F et al.** Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. *J Med Virol* 1999; 59: 369-377,
163. **José MV, Bobadilla JR, Bishop RF.** Oscillatory fluctuations in the incidence of Rotavirus infections by serotypes 1, 2, 3, and 4. *J Diarrhoeal Dis Res* 1996; 14: 194-200.
164. **Kapikian AZ, Chanock RM.** Rotaviruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al (eds). *Fields Virology*. Third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1996; p. 1657-1708.
165. **Kapikian AZ.** Overview of viral gastroenteritis. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 7-19.
166. **Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM.** Norwalk group of viruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al (eds). *Fields Virology*. Third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1996; p. 783-810.
167. **Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM.** Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10: 1075-1081.
168. **Kapikian AZ.** Viral gastroenteritis, 1997; p 285-343. En A. S. Evans y R. A. Kaslow (ed.). *Viral infections of humans: epidemiology and control*. Plenum medical Book Company, New York, N.Y)
169. **Kapikian AZ.** Viral gastroenteritis. *JAMA* 1993; 269:627-630.
170. **Kidd AH, Jönsson M, Garwicz D et al.** Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 622-627.

171. **Kilgore PE, Glass RI**, 1997. Gastrointestinal syndromes, p 55-67,. En Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (ed). Clinical virology. Churchill Livingstone Inc.ew York, N. Y.
172. **Kim K-H, Yang J-M, Joo S-I, Cho Y-G, Glass RI, Cho Y-J**. Importance of rotavirus and adenovirus types 40 and 41 in acute gastroenteritis in korean children. J Clin Microbiol 1990; 28: 2279-2284.
173. **Kirkwood CD, Palombo EA**. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. Virology 1997; 236: 258-65.
174. **Koopmans M, Vinjé J, de Wit M, Leenen I, Poel W, Duynhoven Y**. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. J Infect Dis 2000; 181 (Suppl 2): S262-269.
175. **Koopmans M, Brown D**. Seasonality and diversity of Group A rotaviruses in Europe. Acta Paediatr 1999 (Suppl 426); 88: 14-19.
176. **Koopmans M, Van Asperen I**. Epidemiology of rotavirus infections in the Netherlands. Acta Paediatr 1999 (Suppl 426); 88: 31-37.
177. **Kotloff KL, Herrmann JE, Blacklow NR et al**. The frequency of astrovirus as a cause of diarrhea in Baltimore children. Pediatr Infect Dis J 1992; 11: 587-589.
178. **Kotloff KL, Losonsky GA, Morris JG, Wasserman SS, Singh-Naz N, Levine MM**. Enteric adenovirus infection and childhood diarrhea: an epidemiologic study in three clinical settings. Pediatrics 1989; 84: 219-225.
179. **Krajden M, Brown M, Petrasek A, Middleton PJ**. Clinical features of adenovirus enteritis: a review of 127 cases. Pediatr Infect Dis 1990; 9: 636-641.
180. **Kurtz JB, Lee TW, Craig JW, Reed SE**. Astrovirus infection in volunteers. J Med Virol 1979; 3: 221-230.
181. **Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Yamada M et al**. Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993. J Clin Microbiol 1998; 36: 6-10.
182. **Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN**. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. Science 1993; 259: 516-519.
183. **Latorre C, Juncosa T, Collell T**. Gastroenteritis por rotavirus en pediatria. An Esp Ped 1983. 18: 353-357.
184. **Le Guyader F, Estes MK, Hardy ME et al**. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. Arch Virol 1996; 141: 2225-2235.
185. **Lee TW, Kurtz JB**. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. Epidemiol Infect 1994; 112: 187-193.
186. **Levett PN, Gu M, Luan B et al**. Longitudinal study of molecular epidemiology of small round-structured viruses in a pediatric population. J Clin Microbiol 1996; 34: 1497-1501.

187. **Lew JF, Petric M, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY.** Identification of minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J Virol* 1994; 68: 3391-3396.
188. **Lew JF, Valdesuso J, Vesikari T et al.** Detection of Norwalk virus or Norwalk-like virus infections in Finnish infants and young children. *J Infect Dis* 1994; 169: 1364-1367.
189. **Lew JF, Moe CL, Monroe SS et al.** Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings. *J Infect Dis* 1991; 164: 673-678.
190. **Lew JF, Glass RI, Petric M et al.** Six year retrospective surveillance of gastroenteritis viruses identified at ten electron microscopy centers in the United States and Canada. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9: 709-714.
191. **Liu BL, Clarke NI, Caul EO, Lambden PR.** Human enteric Caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Arch Virol* 1995; 140:1345-1356.
192. **Liu BL, Clarke NI, Caul EO, Lambden PR.** The genomic 5' terminus of Manchester Calicivirus. *Virus Genes* 1995; 15:25-28.
193. **López L, Castillo FJ, Fernández MA et al.** Astrovirus infection among children with gastroenteritis in the city of Zaragoza, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 545-547.
194. **Ludert JE, Liprandi F.** Identification of viruses with bi- and trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with gastroenteritis. *Res Virol* 1993;144: 219-224.
195. **Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L.** Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science* 2000; 287: 491-495.
196. **Madeley CR, Cosgrove BP.** 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975; 2: 451-452.
197. **Maldonado Y, Cantwell M, Old M et al.** Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural mayan infants. *J Infect Dis* 1998; 178: 334-339.
198. **Marquez S, García JL, Alvarez-Dardet C, Perea EJ.** Incidencia de diarreas en una cohorte de niños en la ciudad de Sevilla. *An Esp Pediatr* 1990; 32: 114-118.
199. **Matson D, Estes MK, Tananka T, Bartlett AV, Pickering LK.** Asymptomatic human calicivirus infection in a day care center. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9: 190-196.
200. **Matson DO, Estes MK.** Impact of rotavirus infection at a large pediatric hospital. *J Infect Dis* 1990; 162: 598-604.
201. **Matsui SM, Greenberg HB.** Astroviruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al (eds). *Fields Virology*. Third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1996; p. 811-824.

202. **Matthews REF.** The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague. *Intervirology* 1979; 11:133-135.
203. **McIver CJ, Palombo EA, Doultree JC, Mustafa H, Marshall JA, Rawlinson WD.** Detection of astrovirus gastroenteritis in children. *J Virol Method* 2000; 84: 99-105.
204. **Mead, PS, Slutzker L, Dietz V et al.** Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis* 1999; 5: 607-625.
205. **Meeroff JC, Schreiber DS, Trier JS, Blacklow NR.** Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1980; 92: 370-373.
206. **Mendoza J, Navarro JM.** Gastroenteritis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11: 441-449.
207. **Mesa F, Lajo A, Alonso F, Borque C, Segurado E, Ladrón de Guevara C.** Infección por rotavirus: características clínicas y tiempo de eliminación del antígeno de rotavirus en heces. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14: 106-110.
208. **Midthun K, Greenberg HB, Kurtz JB, Gary GW, Lin FC, Kapikian AZ.** Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 955-962.
209. **Mirelis B, Portús M, Rabella N et al.** Estudio etiológico de las gastroenteritis en un hospital universitario de Barcelona durante 1983. *Enfer Infecc Microbiol Clin* 1986; 4: 106-112.
210. **Mitchell DK, Monroe SS, Jiang X, Matson DO, Glass RI, Pickering LK.** Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1995; 172: 1437-1444.
211. **Mitchell DK, Van R, Morrow AL, Monroe SS, Glass RI, Pickering LK.** Outbreaks of astrovirus gastroenteritis in day care centers. *J Pediatr* 1993; 123: 725-732.
212. **Moe CI, Gentsch J, Grohmann G et al.** Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1994; 32:642-648.
213. **Moe CL, Allen JR, Monroe SS et al.** Detection of astrovirus in pediatric stool samples by immunoassay and RNA probe. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2390-2395.
214. **Monroe SS, Glass RI, Noah N et al.** Electronmicroscopic reporting of gastrointestinal viruses in the United Kingdom. *J Med Virol* 1991; 33: 193-198.
215. **Monroe SS, Jiang B, Stine SE, Koopmans M, Glass RI.** Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J Virol* 1993; 67: 3611-3614.
216. **Moore PL, Steele AD, Alexander JJ.** Relevance of commercial diagnostic tests to detection of enteric adenovirus infections in South Africa. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1661-1663.

217. **Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI.** Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 2): S284-287.
218. **Mrukowicz JZ, Krobicka B, Duplaga M et al.** Epidemiology and impact of rotavirus diarrhoea in Poland. *Acta Paediatr* 1999 (Suppl 426); 88: 53-60.
219. **Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF.** Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1058-1062.
220. **Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF.** Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCO-2 cells. *J Clin Virol* 1998; 11: 103-107.
221. **Nakagomi O, Nakagomi T.** Molecular epidemiology of human rotaviruses: genogrouping by RNA-RNA hybridization. *Arch Virol Suppl* 1996; 12:93-98.
222. **Nakata S, Honma S, Numata K-K et al.** Members of the family Caliciviridae (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. *J Infect Dis* 2000; 181: 2029-2032.
223. **Nakata S, Adachi N, Ukae S et al.** Outbreaks of nosocomial rotavirus gastroenteritis in a paediatric ward. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 954-958.
224. **Nilsson M, Sigstam G, Svensson L.** Antibody prevalence and specificity to group C rotavirus in Swedish sera. *J Med Virol* 2000; 60: 210-215.
225. **Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS.** Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 797-801.
226. **Noel J, Cubitt D.** Identification of astrovirus serotypes from children treated at the Hospitals for Sick Children, London 1981-93. *Epidemiol Infect* 1994; 13: 153-159.
227. **Noel J, Beards GM, Cubitt D.** Epidemiological survey of human Rotaviruses serotypes and electropherotypes in young children admitted to two children's hospitals in northeast London from 1989 to 1990. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2213-2219.
228. **Noel J, Mansoor A, Thaker U, Herrmann J, Perron-Henry D, Cubitt WD.** Identification of adenoviruses in faeces from patients with diarrhoea at the hospitals for sick children, London, 1989-1992. *J Med Virol* 1994; 43: 84-90.
229. **Noel JS, Parker SP, Choules K, Phillips AD, Walker-Smith J, Cubitt WD.** Impact of rotavirus infection on a paediatric hospital in the East End of London. *J Clin Pathol* 1994; 47: 67-70.
230. **O'Ryan M, Salinas AM, Mamami N, Matson DO, Jiang X, Vial P.** Detección de virus Norwalk y México, dos calicivirus humanos en deposiciones de niños chilenos. *Rev Med Chile* 1999; 127: 522-531.
231. **O'Halloran F, Lynch M, Cryan B, O'Shea H, Fanning S.** Molecular characterization of Rotavirus in Ireland: Detection of novel strains circulating in the population. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3370-3374.

232. **O'Mahony J, Foley B, Morgan S, Morgan JG, Hill c.** VP4 and VP7 genotyping of Rotavirus samples in Ireland over a 1-year period. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1699-1703.
233. **Offit PA, Clark HF.** Rotavirus. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). New York, Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995; p. 1448-55.
234. **Ojeh CK, Cusak TM, Yolken RH.** Evaluation of the effects of disinfectants on rotavirus RNA and infectivity by the polymerase chain reaction and cell-culture methods. *Mol Cell Prob* 1995; 9: 341-346.
235. **Orden B, Franco A.** Gastroenteritis por adenovirus en la Comunidad de Madrid. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1993; 11: 57-58
236. **Ortiz de Lejarazu R, Reguera JI, Coca MC et al.** Utilidad de una técnica rápida para detección de adenovirus en heces de niños. *An Esp Ped* 1990; 32: 233-236.
237. **Otsu R.** A mass outbreak of gastroenteritis associated with group C rotaviral infection in schoolchildren. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1998; 21: 75-80.
238. **Palombo EA, Bishop RF.** Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1750-1753.
239. **Pang X-L, Honma S, Nakata S, Vesikari T.** Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 2): S288-294.
240. **Pang XL, Joensuu J, Hoshino Y, Kapikian AZ, Vesikari T.** Rotaviruses detected by reverse transcription polymerase chain reaction in acute gastroenteritis during a trial of rhesus-human reassortant rotavirus tetravalent vaccine: implications for vaccine efficacy analysis. *J Clin Virol* 1999; 13: 9-6.
241. **Pang X-L, Joensuu J, Vesikari T.** Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 420-426.
242. **Pang X-L, Koskenniemi E, Joensuu J, Vesikari T.** Effect of rhesus rotavirus vaccine on enteric adenovirus-associated diarrhea in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 29: 366-369.
243. **Pang XL, Vesikari T.** Human-astrovirus associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Acta Paediatr* 1999; 88: 532-536.
244. **Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI.** Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 561-570.
245. **Parashar UD, Holman RC, Clarke MJ, Bresee JS, Glass RI.** Hospitalizations associated with rotavirus diarrhea in the United States, 1993 through 1995: surveillance based on the new ICD-9-CM rotavirus specific diagnostic code. *J infect Dis* 1998; 177: 13-17.
246. **Parker SP, Cubitt WD, Jiang X.** Enzyme Immunoassay using baculovirus-expressed human Calicivirus (Mexico) for the measurement of IgG responses



262. **Rabella N, Margall N, Condom MJ, Carbó LL.** Estudio de la incidencia de rotavirus por microcopía electrónica. Comparación de los resultados con las pruebas de enzimoimmunoanálisis y látex. *Enf Infec Microbiol Clin* 1987; 5: 37-39.
263. **Radwan SF, Gabr MK, El-Maraghi S, El-Saifi AF.** Serotyping of group A Rotaviruses in Egyptian Neonates and infants less than 1 year old with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2996-2998.
264. **Ramachandran M, Gentsch JR, Parashar UD et al.** Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3223-3229.
265. **Ramachandran M, Das BK, Vij A et al.** Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 436-439.
266. **Reguera JI, Ortiz de Lejarazu R, Eirós JM et al.** Estudio de 3 años de los patrones de electroforesis de ARN de rotavirus en Valladolid. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11: 309-313.
267. **Reina J, Hervás J, Ros MJ.** Estudio de las características clínicas diferenciales entre los pacientes pediátricos con gastroenteritis causadas por rotavirus y adenovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 12: 378-384.
268. **Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH et al.** Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines. Report of the National Multicenter Trial. *Pediatrics* 1996; 97: 7-13.
269. **Richardson S, Grimwood K, Gorrell R, Palombo E, Barnes G, Bishop R.** Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *Lancet* 1998; 351: 1844-1848.
270. **Ricós G, Gibert A, Amat A et al.** Gastroenteritis aguda en un servicio de urgencias pediátricas. *Epidemiología y clínica. Rev Esp Pediatr* 1995; 51: 149-153.
271. **Riepenhoff-Talty M, Morse K, Wang CH et al.** Epidemiology of group C rotavirus infection in Western New York women of childbearing age. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 486-488.
272. **Risco C, Carrascosa JL, Pedregosa A.M, CD Humphrey, Sánchez-Fauquier A.** Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J Gen Virol* 1995; 76:2075-2080.
273. **Rodríguez Cervilla J, Peñalver MD, Curros MC, Pavón P, Alonso C, Fraga JM.** Rotavirus: Estudio clínico y epidemiológico en niños hospitalizados menores de 2 años. *An Esp Pediatr* 1996; 45:499-504.
274. **Rodríguez J, Empanaza J, Garmendia A et al.** Gastroenteritis aguda a rotavirus. Estudio de 142 casos. *Acta Pediatr Esp* 1989; 47: 561-564.
275. **Rodríguez-Castillo A, Velasco-Villa A, Ramirez-Gonzalez JE et al.** VP4 and VP/ genotyping by reverse transcription-PCR of human Rotavirus in Mexican Children with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3876-3878.
276. **Román E.** Rotavirus: epidemiología y vacunación. En: Campins M, Moraga F, editores. *Vacunas* 1998. Barcelona: Prous Science S.A., 1998; 135-144.

277. **Rothman Kj.** Medidas de frecuencia de una enfermedad. En: Rothman Kj, (ed). Epidemiología moderna. Madrid: Díaz de Santos 1987; p. 29-41.
278. **Ruuska T, Vesikari T.** A prospective study of acute diarrhoea in finnish children from birth to 2 ½ years of age. *Acta Paediatr Scand* 1991; 80: 500-507.
279. **Ruuska T, Vesikari T.** Rotavirus disease in finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* 1990; 22: 259-267.
280. **Ryan MJ, Ramsay M, Brown D, Gay NJ, Farrington CP, Wall PG.** Hospital admissions attributable to rotavirus infection in England and Wales. *J Infect Dis* 1996; 174 (suppl 1): S12-18.
281. **Sack RB.** Epidemiology of acute infectious diarrhea. En: Gracey M, Walker-Smith JA, (eds). Diarrheal disease. Nestlé Nutrition Workshop Series. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997; p. 75-87
282. **Salim AF, Phillips AD, Walker-Smith JA, Farthing MJG.** Sequential changes in small intestinal structure and function during rotavirus infection in neonatal rats. *Gut* 1995; 36: 231-238.
283. **Sanchez-Fauquier A, Carrascosa AL, Carrascosa JL et al.** Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* 1994; 201:312-320.
284. **Santos N, Voltao EM, Soares CC, et al.** Rotavirus strains bearin genotype G9 or P[9] recovered from brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1157-1160.
285. **Santos N, Lima RCC, Pereira CFA, Gouvea V.** Detection of rotavirus types G8 and G10 among brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2727-2729.
286. **Santosham M.** Status of oral rehidration therapy after 25 years of experience. En: Gracey M, Walker-Smith JA, (eds). Diarrheal disease. Nestlé Nutrition Workshop Series. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997; 38: 91-108.
287. **Sattar SA, Jacobsen H, Rahman H, Cusack M, Rubino JR.** Interruption of rotavirus spread through chemical disinfection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994; 15: 751-756.
288. **Schaub SA, Oshiro RK.** Public health concern about caliciviruses as waterborne contaminants. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 2): S374-380.
289. **Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS.** The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis* 1974; 129: 705-708
290. **Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS.** The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med* 1973; 288: 1318-1323.
291. **Scott-Taylor, Ahluwalia G, Klisko B, Hamond G.** Prevalent enteric adenovirus variant not detected by commercial monoclonal antibody enzyme linked immunoassay. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2797-2801.

292. **Shastri S, Doane AM, Gonzales J, Upadhyayula U, Bass DM.** Prevalence of astroviruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2571-2574.
293. **Shenk T. Adenoviridae: the viruses and their replication.** En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al (eds). *Fields Virology*. Third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1996; p. 2111-2148.
294. **Sherlock CH, Brandt CJ, Middleton PJ, Smith JA.** Laboratory diagnosis of viral infections producing enteritis. *Cumitech* 26, 1989. J.A. Smith (ed.). American Society for Microbiology. Washington D.C.
295. **Shieh Y-S C, Monroe SS, Frankhauser RL, Langlois GW, Burkhardt III W, Baric RS.** Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl 2): S360-366.
296. **Shinozaki T, Araki K, Fujita Y, Kobayashi M, Tajima T, Abe T.** Epidemiology of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children in the Tokyo area. *Scand J Infect Dis* 1991; 23: 543-547.
297. **Sierra E, Pedrón C, Carrasco S, Ferro O, De la Loma A, Vázquez C.** Gastroenteritis aguda por rotavirus. *An Esp Pediatr* 1982; 16: 219-228.
298. **Singh-Naz N, Rodriguez WJ, Kidd AH, Brandt CD.** Monoclonal antibody enzyme linked immunosorbent assay for specific identification and typing of subgroup F adenoviruses. *J Clin Microbiol* 1988; 26:297-300
299. **Singh-Naz N, Naz RK.** Development and application of monoclonal antibodies for specific detection of human enteric adenoviruses. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 840-842.
300. **Snyder JD, Merson MH.** The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull Who* 1982; 60: 605-631
301. **Souza DF, Kisielius JJ, Ueda M et al.** An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, Sao Paulo state, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 1998; 16: 59-65.
302. **Steele AD, James VLA.** Seroepidemiology of human group C rotavirus in South Africa. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4142-4144.
303. **Steele AD, Parker SP, Peenze I, Pager CT, Taylor MB, Cubitt WD.** Comparative studies of human rotaviruses serotype G8 strains recovered in South Africa and The United Kingdom. *J Gen Virol* 1999; 80:3029-3034.
304. **Steward PL, Burnett RM, Cyrklaff M, Fuller SD.** Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell* 1991; 67: 145-154.
305. **Stewien KE, Mos EN, Yanaguita RM et al.** Viral, bacterial and parasitic pathogens associated with severe diarrhoea in the city of Sao Paulo, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 1993; 11: 148-152.
306. **Struve J, Bennet R, Ehrnst A et al.** Nosocomial calicivirus gastroenteritis in a pediatric hospital. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 882-885.

307. **Szücs G, Uj M, Mihály I, Deák j.** Burden of human rotavirus-associated hospitalizations in three geographic regions of Hungary. *Acta Paediatr* 1999 (Suppl 426); 88: 61-65.
308. **Thomas EE, Puterman ML, Kawano E, Curran M.** Evaluation of seven immunoassay for detection of rotavirus in pediatric stool samples. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1189-1193.
309. **Thornhill T.** Detection by Immune electron microscopy of 26-27 nm virus-like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Inf Dis* 1977; 135: 20-27.
310. **Török TJ, Kilgore PE, Clarke MJ, Holman RC, Bresee JS, Glass RI.** Visualizing geographic and temporal trends in rotavirus activity in the United States, 1991 to 1996. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 941-946.
311. **Trabelsi A, Peenze I, Pager C, Jeddi M, Steel D.** Distribution of rotavirus VP7 serotypes and VP4 genotypes circulating in Sousse, Tunisia, from 1995 to 1999: emergence of natural human reassortants. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3415-3419.
312. **Treanor JJ, Dolin R.** Astroviruses, toroviruses, and picobirnaviruses. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000; p. 1956-1958.
313. **Treanor JJ, Dolin R.** Norwalk virus and other caliciviruses. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000; p. 1949-1956.
314. **Treviño M, Prieto E, Peñalver MD et al.** Diarrea aguda infantil de origen vírico. *Acta Pediátrica Española* 1999; 57 (1): 18-20.
315. **Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME.** Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 365-372.
316. **Unicomb LE, Podder G, Gentsch JR et al.** Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995: *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1885-1891.
317. **Unicomb LE, Banu NN, Azim T et al.** Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 611-614.
318. **Unicomb LE, Kilgore PE, Faruque ASG et al.** Anticipating rotavirus vaccines: hospital-based surveillance for rotavirus diarrhea and estimates of disease burden in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 947-51.
319. **Van der Poel WHM, Vinjé J, Heide R, Koopmans M.** Norwalk like Calicivirus genes in farm animals. *Emerg Inf Dis* 2000; 6: 36-41.
320. **Van R, Wun C-C, O’Ryan ML, Matson DO, Jackson L, Pickering L.** Outbreaks of human enteric adenovirus types 40 and 41 in Houston day care centers. *J Pediatr* 1992; 120: 516-521.
321. **Vanderhoof JA, Young RJ.** Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 27: 323-332.



338. **Wilhelmi I, Colomina J, Martín-Rodrigo D, Román E, Sánchez-Fauquier A.** New Immunochromatographic method for rapid detection of Rotaviruses in stool samples compared with standard Enzyme Immunoassay and Latex agglutination Techniques. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000 (en prensa).
339. **Wilhelmi I, Mier C, Román E, Colomina J, Prat J, Sánchez-Fauquier A.** Epidemiología molecular de rotavirus en niños españoles. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 509-514.
340. **Wolfaardt M, Taylor M, Booyesen H, Engelbrecht, Grabow W, Jiang X.** Incidence of human calicivirus and rotavirus infection in patients with gastroenteritis in South Africa. *J Med Virol* 1997; 51: 290-296.
341. **Wood DJ, Longhurst D, Killough RI, David TJ.** One-year prospective cross-sectional study to assess the importance of group F adenovirus infections in children under 2 years admitted to hospital. *J Med Virol* 1988; 26: 429-435.
342. **Woods PA, Gentsch J, Gouvea V et al.** Distribution of human rotavirus in different populations. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 781-785.
343. **Yamazaki K, Oseto M, Seto Y et al.** Reverse transcription-polymerase chain reaction detection and sequence analysis of small round-structured viruses in Japan. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 271-276.
344. **Yeager M, Dryden KA, Olson NH, Greenberg HB, Baker TS.** Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol* 1990; 110:2133-2144.
345. **Yolken RH, Dubovi E, Leister F, Reid R, Almeida-Hill J, Santosham M.** Infantile gastroenteritis associated with excretion of pestiviruses antigens. *Lancet* 1989; i: 517-520.
346. **Zeng CQ, Estes MK, Charpilienne A, Cohen J.** The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *J Virol* 1998; 72:201-8.
347. **Rao, CD., Gowda K, Reddy BS.** Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology* 2000; 276: 104-113.