



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

Programa de Segunda Especialización en Medicina Humana

**"Comparación de ELISA y aglutinación de látex para
la detección de rotavirus en heces de niños con diarrea
aguda"**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Título de Especialista en Patología Clínica

AUTOR

María del Carmen Geovana YARASCA ROJAS

ASESOR

Billey Kurt SAMAMÉ TALLEDO

Lima, Perú

2008



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Yarasca M. Comparación de ELISA y aglutinación de látex para la detección de rotavirus en heces de niños con diarrea aguda [Trabajo de Investigación]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2008.

CAPITULO I:

DATOS GENERALES

1.1. TÍTULO:

Comparación de ELISA y aglutinación de látex para la detección de rotavirus en heces de niños con diarrea aguda.

1.2. ÁREA DE INVESTIGACIÓN:

Patología Clínica

1.3. AUTOR:

María del Carmen Geovana Yarasca Rojas

1.4. ASESOR:

Pediatra : Billey Samamè Talledo

1.5. INSTITUCIÓN:

Hospital II MINSA Sullana

1.6. DURACIÓN:

9 meses

CAPITULO II

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1.1. DESCRIPCIÓN Y ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

En 1973 la Dra Bishop y col. visualizaron partículas virales en biopsias duodenales en niños con diarrea no bacteriana ni parasitaria y en el mismo año el Dr Flawett encontró las mismas partículas virales en heces de niños con diarrea, mediante microscopía electrónica (1).

El rotavirus ha sido reconocido como el mayor agente causal de gastroenteritis en niños menores de 5 años, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. (2).

De los diversos rotavirus, sólo tres de ellos han sido asociados con diarreas en humanos. El grupo A es endémico en todo el mundo y ocasiona diarreas severas en niños y los grupos B y C en los adultos. (3).

Cada año en Asia, África y América Latina se estima que hay entre 3 a 5 millones de casos de diarreas y la infección por rotavirus es una de las causas principales de enfermedad diarreica tanto en

los países desarrollados como subdesarrollados, en los cuales el rotavirus guarda relación con aproximadamente el 33% de los casos en los lactantes y niños menores de 5 años (4).

Se han reportado diversos porcentajes en relación a la detección de rotavirus en niños con diarreas agudas, así tenemos, que en Australia se determinó rotavirus en más del 50% de los pacientes (5), en Guatemala y El Salvador se ha demostrado que el 7 a 14% de todos los episodios de diarrea antes de los tres años de edad se debían a rotavirus (6), en Costa Rica, los rotavirus fueron los agentes más comunes, con una tasa del 45.3% en niños no hospitalizados (7), en Jamaica encontraron una incidencia de rotavirus del 19% en niños menores de cinco años con gastroenteritis (8) y en los Estados Unidos los rotavirus son responsables del 30 al 50% de las hospitalizaciones (9).

En el Perú, también se han llevado a cabo diversos trabajos sobre rotavirus. En un estudio realizado en Lima se reportó rotavirus en un porcentaje de 31% (10) y en Trujillo, los porcentajes encontrados en estudios realizados en pacientes con diarrea aguda causada por rotavirus oscilan entre 12.5% y 46% (11,12).

De otro lado, el diagnóstico de una infección por rotavirus debe ser lo más rápida para la identificación de los pacientes infectados, ya que éstos son fuentes potenciales de infección nosocomial (12). De allí, que se han desarrollado diversas pruebas para la detección de rotavirus en heces, tales como la microscopía electrónica, la fijación de complemento, la inmunofluorescencia, el radioinmunoensayo, el análisis inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y la prueba de aglutinación con látex (5, 13,14).

Se han realizado diversos estudios comparativos entre las diferentes pruebas para detectar rotavirus. En un estudio comparativo para conocer la sensibilidad para detectar rotavirus humano y bovino en heces, se encontró para microscopía electrónica un 68% y 76%; con inmunoelectroosmoféresis un 80% y 76%; con anticuerpos fluorescentes: no determinado y 85%; para ELISA un 86% y 98% respectivamente. (15).

En trabajos realizados para detectar rotavirus en heces de 112 niños con diarrea usando seis métodos diferentes, se encontró que la sensibilidad para la microscopía electrónica fue de 84%, inmunofluorescencia 86%, Rótales 88% y Enzygnost 98% (16).

En un estudio sobre detección de rotavirus en heces realizado en la universidad de Liverpool, se reportó que el test de aglutinación de látex fue el más sensible (92%) pero el de más baja especificidad (96%), en tanto que la microscopía electrónica como la electroforesis en gel de poliacrilamida fueron altamente específicos (100%), pero de más baja sensibilidad de 73% y 84% respectivamente (17).

En una evaluación de un nuevo test de aglutinación de látex para detectar rotavirus humanos en heces se determinó que la sensibilidad para microscopía electrónica, ELISA y test de látex fue del 96% y para la inmunofluorescencia de 84%, sin embargo la microscopía electrónica fue el más específico (96.4%) seguido por inmunofluorescencia (92.9%), ELISA (89.4%) y aglutinación por látex (85.9%) (18).

La microscopía electrónica es un método confiable pero no es usado para examinar gran cantidad de muestras a la vez y de otro lado el alto costo del equipo, limita su aplicación en la práctica diaria. En cambio la inmunofluorescencia es más subjetiva y laboriosa (19).

Además, tanto el RIA como el ELISA son objetivas y pueden ser automatizadas. Cabe indicar que el RIA está sujeto a restricciones legislativas

por el riesgo de salud y el ELISA es un método semejante al radioinmunoensayo en sensibilidad, es económico y sencillo, pero presenta ciertos problemas, como la generación de resultados falsos positivos no específicos. (19).

Aún cuando últimamente los inmunoensayos han sido descritos para la detección directa de rotavirus en muestras clínicas, la prueba de aglutinación de látex ha demostrado ser sensible en la detección de rotavirus (20).

La prueba considerada como gold estándar para el diagnóstico de rotavirus es el cultivo viral, la cual no se realiza en el país, por lo que se quiso comparar el grado de concordancia entre los resultados por la técnica de látex para la detección de rotavirus en heces con una prueba de referencia validada como el ELISA.(con una sensibilidad de 95.7% y especificidad de 100%)

2.1.2. FUNDAMENTOS

MARCO TEÓRICO

Rotavirus constituye la causa más frecuente de diarrea, siendo su frecuencia entre el 70 a 80% de los casos de GEA en niños de países desarrollados. Rotavirus es también la causa más frecuente de hospitalización y deshidratación por GEA de niños

en países en vías de desarrollo, afectando aproximadamente al 50% de los ingresos. (21)

En España , en la revisión efectuada por Del Castillo sobre la mayoría de los trabajos publicados en revistas médicas o comunicaciones a congresos médicos durante el periodo 1980-1990, el predominio de los enteropatógenos causantes de infecciones gastrointestinales en niños menores de 14 años corresponde en primer lugar a los virus : rotavirus que representan el 18 a 21%.(22).

Características Del Rotavirus

El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*, es un virus ARN de doble cadena, con una simetría icosaédrica, compuesto por tres capas concéntricas. El virus carece de envoltura y por microscopía electrónica da la imagen de una rueda dentada. Con base en las diferencias antigénicas de la proteína mayor de la cápside interna VP6 se han logrado clasificar los rotavirus en siete grupos (de A a G), de los cuales sólo tres (A, B, C) han sido encontrado en humanos.

De éstos, el grupo A causa la mayor parte de la enfermedad endémica en los seres humanos. Considerando las diferencias en los epítopes localizados en la proteína mayor de la cápside externa VP7, se han caracterizado catorce serotipos (G) del grupo A.

Diez afectan al humano (G1 a G6, G8 a G10 y G12), pero de ellos G1 a G4 son los responsables de la mayoría de las infecciones en el humano. (23)

Las partículas maduras, presentan una cápside 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 M.E. mediante tinción negativa presentan apariencia de rueda con espículas, rodeada de un fino borde que le proporciona apariencia lisa.

La capa externa está 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 motilidad electrofóretica. Cada uno de los segmentos genómicos codifica una proteína vírica. Estas son las proteínas estructurales que se denominan con las iniciales VP, seguido de un número (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y las proteínas no estructurales., que se designan como NSP seguida de un número (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 y NSP5)

La VP7 corresponde a la parte lisa de la cubierta y la PV4 a la parte especulada, dando lugar a 60 espículas cortas. Ambas proteínas son los únicos antígenos virales conocidos hasta ahora que inducen, independientemente, la formación de anticuerpos neutralizantes.

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.

La VP7 es la proteína más importante de la cubierta externa, constituye el 30% del peso del virión y es una glicoproteína. La VP6 forma mayoritariamente la cubierta interna, constituyendo el 50% del peso de la partícula vírica. Recientemente se ha descrito el papel de esta proteína en la infectividad viral y en el desarrollo de la inmunidad.

La proteína VP2 constituye la envoltura del core, donde se sitúan también la VP1 y VP3. La VP1 parece constituir la polimerasa viral, necesitándose de VP2 para su actividad.

Se conoce menos la actividad de las proteínas no estructurales aunque se sabe que interviene en

los procesos de replicación y ensamblaje del virus.
(21).

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.

Los niños que sufren una infección primaria quedan protegidos frente a episodios graves de diarrea. Se ha demostrado en diversos estudios que la inmunidad local intestinal protege de sucesivos episodios graves de diarrea.

En la fase aguda de la enfermedad predominan las Ig M, con una respuesta sérica Ig G e Ig A en la fase convaleciente. En el intestino predominan los anticuerpos secretores Ig A, 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.

Parece ser que sólo 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 glicoproteínas VP7 similar), apareciendo respuestas heterotípicas con infecciones sucesivas. 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. Aquí entraría el papel de la inmunidad celular, demostrándose que la proteína NSP4, produce una respuesta mediada por la inmunidad celular. (24).

Diagnostico Microbiológico

Las pruebas de diagnóstico viral se han desarrollado de manera importante en los últimos años, nuevas técnicas más rápidas, simples, poco costosas, sensibles y específicas se ofrecen hoy en día, sin embargo, la evaluación de éstas siempre se debe hacer con base en los «estándares de oro» (como los cultivos y la fijación de complemento, etc.) y de acuerdo con una adecuada correlación clínica.

La disponibilidad de estas pruebas se debe acompañar de una óptima realización a nivel técnico, y una adecuada recolección y almacenamiento de la muestra, además de una interpretación acertada.

La demostración directa de antígenos tiene valor en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la infección así como en el tratamiento médico y es indicador importante de infección activa. Sin embargo, en algunos casos la concentración del antígeno puede no ser suficiente para su descubrimiento.

Por otro lado, la determinación de anticuerpos es útil cuando no se tiene la posibilidad de realizar una demostración directa de antígeno o en caso de ser negativa a pesar de la sospecha clínica o porque haya pasado la fase aguda de la infección.

Las pruebas indirectas o de anticuerpos son importantes para establecer los antecedentes de infección viral en la historia clínica de un paciente y en una comunidad y son claves en definir el modelo de diseminación de un serotipo determinado. (25)

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. . (24)

El cultivo de los rotavirus humanos es sumamente laborioso ya que resulta imprescindible la adaptación previa de la cepa salvaje a ciertas condiciones de crecimiento in vitro, por lo que requiere además, mucho tiempo de trabajo. Dada la gran cantidad de partículas virales que se eliminan en heces, este virus puede ser detectado con facilidad sin necesidad de recurrir al cultivo de tejidos, que en definitiva es un método de amplificación.

Técnicas de Microscopia Electrónica

El diagnóstico de las gastroenterocolitis producidas 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 sólo en determinados laboratorios de referencia. (24).

Permite visualizar la partícula viral debido a la gran resolución del microscopio electrónico. Para este fin se utilizan dos tinciones especiales con sales de metales pesados como el uranio o el tungsteno. La primera es la tinción negativa donde el acetato

de uranilo forma una especie de molde viral que permite detallar la estructura del virus. La segunda tinción es la del sombreado, donde las partículas virales se ponen en un ángulo donde el metal que se utiliza en ella se deposita sobre el virus pero no sobre su sombra y sólo se visualiza lo que no se ha cubierto con el metal. Esta técnica no revela las estructuras internas del virus sino su forma y dimensiones. El uso de equipo especializado y costoso, el elevado nivel técnico que requiere, la baja sensibilidad cuando hay un bajo número de partículas virales y el hecho de que en algunos casos la morfología per se no es suficiente para un diagnóstico viral definitivo, hacen que este sistema sea poco usado y sólo se emplee a nivel investigativo o académico (25).

Estos agentes son fácilmente detectados por microscopía electrónica, sin embargo se requiere más de un millón de partículas virales por gramo de heces para ser observados.

Técnicas de Detección de Antígeno

Estos métodos incluyen técnicas de ELISA y látex que han sustituido a la microscopía electrónica. Estas técnicas son específicas y sensibles, sin embargo en general sólo detectan rotavirus del grupo A y no sirve para los grupos minoritarios.

Mediante esta técnica se pueden descubrir antígenos virales circulantes o los que se encuentran en los tejidos del huésped. La sensibilidad de estas pruebas depende de la cantidad de antígeno presente y su especificidad depende de la calidad de los antisueros disponibles para este efecto. Estas pruebas permiten una demostración rápida y son muy prácticas para el diagnóstico, pues los cultivos virales requieren de una infraestructura adecuada y personal entrenado y sólo se pueden realizar en centros de docencia o de investigación. Además, los resultados del cultivo viral requieren por lo menos hasta 8 días. (25).

La EIA y la aglutinación de látex son sensibles para detectar antígenos durante la infección sintomática. Los métodos de EIA son más sensibles para detectar antígenos en las fases tardías de la enfermedad y sólo detectan el rotavirus del tipo A; el costo es más elevado que la aglutinación de látex, siendo este método ligeramente menos sensible pero de fácil aplicación. (22)

Mediante ELISA se han detectado dos serotipos antigénicamente distintos de Rotavirus, denominados 1 y 2, que no confieren inmunidad cruzada; el serotipo 2 es más virulento y con mayor expresividad clínica.

ELISA detecta antígeno de rotavirus en heces , aunque da falsos positivos en niños menores de 3 meses .(21)

Aglutinación de látex. Las partículas de látex son esferas de poliestireno que se unen fácilmente al fragmento cristalizable (Fc) de moléculas de inmunoglobulina G (IgG) o inmunoglobulina M (IgM), esta última es mucho más eficiente en aglutinar partículas naturales. Los fragmentos de unión del anticuerpo (FAb) quedan expuestos y son capaces de unirse al antígeno que se encuentra en la muestra.

Cuando los antígenos tienen varios epítopes (o estructuras antigénicas repetitivas), los anticuerpos multivalentes acoplados a múltiples partículas de látex se unen al antígeno y se produce un entramado de las partículas de látex que dan como resultado una aglutinación visible.

La técnica de LA demostró ser sumamente útil, y está basada en la sensibilización de partícula de látex con anticuerpos anti-rotavirus.

Este reactivo en contacto con una muestra positiva produce una aglutinación característica en sólo un par de minutos. También existen equipos comerciales de LA, como Rótales (Orion Diagnóstica), y Slidex Rota-Kit (Biomerieux), los que

han sido ampliamente comparados en la literatura con distintos equipos de ELISA y con la M.E. entre otros.

En general, la sensibilidad y especificidad de estos equipos es algo menor que la de ELISA, aunque su utilización resulta ampliamente satisfactoria si tenemos en cuenta la enorme rapidez y practicidad de su implementación, y que no necesita un equipamiento especial ni personal entrenado. Estas características hacen de la LA un método ideal para realizar tamizaje en laboratorios hospitalarios donde se procesa un gran volumen de muestras.

ELISA y la aglutinación de látex, son pruebas que detectan la abundante proteína VP6 en la capa media de la cápside de triple capa, y tiene sensibilidades del 70 al 98% y especificidad

El Rotaclon Mr es un ensayo de látex, cualitativo rápido para el diagnóstico de Rotavirus en muestras de deposiciones. Está basado en la tecnología de aglutinación directa de partículas de látex recubiertas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína VP6 del Rotavirus.

La proteína VP6 es altamente inmunogénica y está presente en altas concentraciones en los dos subgrupos de Rotavirus conocidos, lo que le otorga al ensayo su alta sensibilidad y especificidad.

Inmunoensayos:

Ensayos de captura del antígeno (sandwich), inmunocromatografía. Son inmunoensayos en fase sólida donde se fijan los anticuerpos específicos para el virus en la superficie de una matriz, tubo o microplaca y luego se pone en presencia del suero o muestra que contiene el antígeno que se quiere demostrar; una vez ocurre la reacción antígeno-anticuerpo, se hace un lavado y se agrega un anticuerpo marcado, que depende de la marcación del anticuerpo. La prueba se denomina radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA o EIA) dependiendo del trazador que se utilice para evidenciar la reacción.

Se denomina RIA cuando el anticuerpo se marca con un isótopo radioactivo, el más utilizado es el yodo-¹²⁵, el anticuerpo que reacciona a manera de sandwich, se pega a los epítomes del antígeno que han quedado expuestos; después de varios lavados, se mide o cuantifica la radioactividad mediante un contador de centelleo. El número de destellos por minuto es directamente proporcional a la concentración del antígeno que reacciona y de

acuerdo con una serie de estándares de concentración conocida, se realiza una curva y se extrapolan los valores de la muestra.

En la técnica ELISA el anticuerpo se marca con una enzima que puede ser la fosfatasa alcalina (FA) o la peroxidasa de rábano (PR) y para revelar la reacción se coloca el sustrato específico para la enzima que es modificado por ésta y produce un compuesto coloreado. En el caso de la FA el sustrato es el paranitrofenilfosfato y para la PR es el peróxido de hidrógeno en una solución de ortofenilendiamina (OPD) que hace visible la reacción. Para la cuantificación se mide la absorbancia en una longitud de onda determinada en un espectrofotómetro. La absorbancia será directamente proporcional a la cantidad de antígeno descubierto. (25).

Actualmente existe un número importante de equipos comerciales para la detección de rotavirus por ELISA, los que incluyen al Rotazime I y II EIA Tests (Abbot Laboratorios), Enzignost EIA test (Behring Institute), Pathfinder EIA test (kallestad Laboratorios), y Bio-Enzabead EIA test (Litton Bionetics). Diversos trabajos comparan la sensibilidad y especificidad de estos equipos , las que varían entre 80 a 100%.

Técnicas de Detección de Anticuerpos

Aglutinación de látex. Es similar a la técnica de látex ya descrita sólo que en este caso el antígeno se encuentra fijo a la partícula de látex y, por tanto, se espera descubrir los anticuerpos que se encuentran en la muestra. Estos ensayos generalmente son pruebas de filtro (tamizaje) pues sólo determinan la presencia o no de anticuerpos. Los resultados se pueden interpretar como «inmune» (si es positivo) o «susceptible» (si es negativo), como en el caso de determinar el estado inmune para el virus de la rubéola. La información que suministra corresponde a exposición al agente o infección pasada y aunque, como se ha afirmado, la IgM es una aglutinina muy buena, generalmente las pruebas de látex no son específicas para ésta. En virología se utiliza con más frecuencia la técnica de aglutinación de látex directa.

ELISA indirecta tiene un principio semejante al de la ELISA directa, sólo que en este caso, un antígeno específico está unido a una fase sólida que puede ser un tubo, microplaca o perlas de vidrio; luego se añade el suero del paciente que posee los anticuerpos y después se adiciona el conjugado constituido por un anti-anticuerpo IgG o IgM unido a una enzima; posteriormente se adiciona el sustrato específico para la enzima, que lo va a modificar y produce un compuesto coloreado, cuya intensidad es

proporcional a la concentración de anticuerpo en el suero del paciente. Esta prueba se utiliza ampliamente; más aún, con el advenimiento y la disponibilidad de los sistemas automatizados se puede efectuar en un periodo de 1 a 2 horas. Mediante esta técnica se pueden señalar niveles de IgM e IgG con ensayos por separado para evitar los falsos positivos y negativos. Su utilidad en virología es básicamente para determinar anticuerpos contra antígenos específicos del dengue, HSV, VIH, RSV, CMV, rubéola, hepatitis A, B y C principalmente, y en infecciones por EBV se usa para demostrar marcadores serológicos tempranos de la infección, que se pueden utilizar en el manejo de huéspedes inmunocomprometidos. Su especificidad depende del antígeno que se utilice en la fase sólida; de acuerdo con esto la prueba puede ser:

- a. **De primera generación** que son pruebas incipientes donde se utilizan antígenos crudos sin mayores procesos de purificación, como p.e., el virus completo inactivado, es el caso de las primeras técnicas de ELISA para VIH. Sin embargo, estos ensayos presentaban como resultado muchas reacciones inespecíficas.
- b. **De segunda generación**, en este caso los antígenos son proteínas recombinantes, que se producen mediante ingeniería genética en

bacterias y son sometidas a procesos de purificación lo que da más especificidad a la prueba pues se descubren anticuerpos particulares contra las proteínas consideradas más inmunogénicas.

- c. **De tercera generación**, que son las más utilizadas actualmente y las más específicas, donde se emplean péptidos sintéticos (fabricados en un sintetizador en el laboratorio) con secuencias más específicas del virus.

En otra modalidad de ELISA se usa el sistema biotina/avidina-estreptavidina, método que se fundamenta en sistemas con distintos marcadores unidos a la biotina y demostrados por reacciones enzimáticas, de color o quimioluminiscentes que portan la avidina, la estreptavidina o la biotina. La biotina ligada a un anticuerpo, nucleótidos, proteína o lecitina, se une a una molécula blanco que puede ser anticuerpo (indirecta) o antígeno (directa), la avidina o estreptavidina se marcan con una molécula demostrable como una enzima, una sustancia fluorescente o un metal. La avidina o la estreptavidina marcada se unen a la biotina y de esta forma se descubre la molécula blanco.

Hay otras modalidades de ELISA, que son pruebas rápidas que se pueden observar visualmente y se utilizan en laboratorios rurales o de primer nivel; son las ELISA de cartucho donde los antígenos se encuentran inmovilizados sobre una membrana de nitrocelulosa en un cartucho, se adiciona el suero y se filtra a través de una membrana, se hace un lavado y se usa un anticuerpo marcado específico para la inmunoglobulina que se quiere demostrar; después de un lavado se aplica el sustrato. Un resultado positivo se observa porque se produce un compuesto coloreado a manera de mancha (dot blot) donde se encuentra el antígeno inmovilizado. Esta prueba se puede hacer en 10 minutos y se utiliza sobre todo para determinar anticuerpos contra VIH. Sin embargo, ante resultados de difícil interpretación se recurre a la ELISA de tercera generación y a las pruebas confirmatorias. (2)

2.1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Qué concordancia de resultados existe entre aglutinación de látex y la prueba de ELISA para detectar rotavirus en heces de niños con cuadros diarreicos?

2.2. HIPÓTESIS

Existe un alto grado de concordancia de resultados entre aglutinación de látex y la prueba de ELISA para detectar rotavirus en heces de niños con cuadros diarreicos.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. OBJETIVOS GENERAL

Comparar los resultados de la aglutinación de látex y la prueba de ELISA para detectar rotavirus, en heces de niños con cuadros diarreicos, en el Hospital de Sullana, desde Junio a Noviembre del 2008.

2.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICO

- Comparar el porcentaje de concordancia entre la técnica de aglutinación de látex con la técnica ELISA.
- Comparar el porcentaje de discordancia de la técnica de aglutinación de látex con la técnica ELISA

2.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA

1. JUSTIFICACIÓN CIENTÍFICA:

- Siendo el rotavirus el agente causal más frecuente de diarreas en el mundo y no contando en nuestro hospital con datos etiológicos de las diarreas, el presente

trabajo pretende investigar al rotavirus como agente causal de las mismas y demostrar que es un agente común en nuestro medio.

- Este trabajo permitirá formular recomendaciones a los laboratorios clínicos para utilizar técnicas rápidas y prácticas en el diagnóstico de rotavirus, como es la técnica de aglutinación de látex .
- Además servirá de fuente de información para el desarrollo de posteriores investigaciones considerando que el rotavirus, es de interés para la salud pública, y contribuirá a motivar los programas de prevención y control de la rotaviriosis

2. JUSTIFICACIÓN TÉCNICA O SOCIOECONÓMICA.

- Considerando que el rotavirus es el agente etiológico más frecuente de cuadros diarreicos en niños y teniendo en cuenta las diferencias de sensibilidad y especificidad que presentan los diversos métodos que se utilizan para detectar rotavirus en muestras clínicas, se plantea el presente estudio con la finalidad de comparar los resultados de la aglutinación de látex con una prueba de ELISA como método de referencia para la detección de rotavirus en heces de niños con cuadros diarreicos agudos.

3. JUSTIFICACIÓN INSTITUCIONAL.

- El presente trabajo permitirá comparar las técnicas de aglutinación de látex y ELISA , como métodos de diagnóstico para el rotavirus y así recomendar , la aglutinación de látex como un análisis de rutina en diarreas.

- El conocer el grado de concordancia de los resultados de ambos métodos diagnósticos para rotavirus, nos permitirá decidir por el método efectivo, rápido y barato, para ser utilizado en el diagnóstico precoz de diarreas en nuestra institución.
- Así mismo permitirá formular recomendaciones al programa de enfermedades diarreicas en cuanto a diagnóstico de rotavirus.

4. JUSTIFICACIÓN PERSONAL.

- Ejerciendo la especialidad de médico patólogo clínico y siendo frecuente la diarreas en niños menores de 5 años, del que ya se conoce a rotavirus como agente causal más frecuente de diarreas en el mundo nace el interés en comparar un método sencillo y económico con una prueba de ELISA validada ,como método de referencia ,para el diagnóstico etiológico precoz de esta entidad.

III. CAPITULO METODOLOGÍA

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

| | |
|--|---------------|
| Por la participación del investigador: | Observacional |
| Por su alcance temporal: | Prospectivo |
| Por la evaluación del fenómeno estudiado: | Transversal |
| Por el análisis y alcance de los resultados: | Comparativo |

3.2. UNIVERSO MUESTRAL

Estuvo constituida por todos los niños menores de 5 años de edad con cuadros diarreicos agudos, que fueron atendidos en el Hospital MINSA de Sullana, entre Junio y Noviembre del 2008.

3.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

De acuerdo al universo muestral y aplicando la fórmula de proporción para un solo grupo (27) (Anexo 1) la muestra estuvo constituida por 150 niños menores de cinco años de edad con diagnóstico clínico de enfermedad diarreica. Para seleccionar la muestra se realizará un muestreo aleatorio simple (28)

Criterios de Inclusión:

- Niños menores de 5 años con diarrea hasta 7 días de duración.
- Niños con diarrea atendidos en consultorio externo de pediatría, servicio de Emergencia y/o hospitalización.

- Niños sin antibióticos y antiparasitarios en el curso de su enfermedad actual.

Criterios de Exclusión:

- Niños con diarrea más de 7 días.
- Niños con diarrea recurrente.
- Niños que estén recibiendo antibióticos o antiparasitarios en el curso de su enfermedad actual
- Niños con heces formadas.
- Pacientes que no desean participar del estudio.

3.4. MATERIAL DE ESTUDIO

El material biológico que se empleó fueron las heces de los niños con cuadros diarreicos agudos, que fueron atendidos en el Hospital de Apoyo-MINSA de Sullana, entre Junio y Noviembre del 2008.

3.5. TIPO DE VARIABLES:

Variable independiente : Resultados del ELISA.

Variable dependiente: Resultados del test de látex.

3.6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

| VARIABLE | DEFINICIÓN OPERACIONAL | INDICADORES | TIPO Y ESCALA DE MEDICION |
|----------------------------------|--|---|---------------------------|
| Resultados del test látex | Dependen de la presencia o no de aglutinación directa de las partículas de látex, recubiertas con inmunoglobulinas y el antígeno de la muestra | Positivo Negativo Dudoso | CATEGORICA/NOMINAL |
| Resultados del ELISA | Dependen si hubo reacción antígeno-anticuerpo (marcado con enzima) cuyos valores son leídos por el equipo automatizado | Positivo : ≥ 300 Negativo: >95 a < 300 Dudoso : < 95 | CATEGORICA/NOMINAL |
| Edad | Tiempo trascurrido desde el nacimiento hasta la fecha del estudio en años. | < 1 mes 1m- 11m 1a- 2a. R 3a.-4 a. | NUMERICA/ CONTINUA |
| Sexo | Características fenotípicas del individuo de acuerdo a sus caracteres orgánicos, que clasifican a una persona como mujer o varón. | Masculino Femenino | CATEGORICA/ NOMINAL |
| Procedencia | Lugar de habitación por área geográfica del niño | Urbano centro Urbano marginal Rural | CATEGORICA/ NOMINAL |

| | | | |
|--|---|--|---------------------|
| Servicio de procedencia | Lugar de atención en que está siendo atendido el niño | Emergencia Hospitalización Consultorio | CATEGORICA/ NOMINAL |
| Tiempo de evolución de la diarrea | Tiempo comprendido entre el inicio de la diarrea y la toma de muestra, expresado en días y horas. | < 24 hr 1- 2 días 3-4 días 5-6 días | NUMERICA/CONTINUA |
| Consistencia de la diarrea | Característica de la deposición que depende de la cantidad de humedad presente | Líquida Grumosa Blanda Pastosa | CATEGORICA/ NOMINAL |
| Característica de diarrea | Presencia o ausencia de moco o sangre en las deposiciones | Con moco Sin moco Con sangre Sin sangre | CATEGORICA/NOMINAL |
| Frecuencia de la diarrea/día | Número de deposiciones promedio por día | 3-5 veces 6-10 veces > 10 veces | NUMERICA/CONTINUA |
| Tipo de recolección | Procedimiento que se uso para obtener la muestra de las heces | Pañal Recolector Hisopado | CATEGORICA/ NOMINAL |

3.6. MÉTODOS Y TÉCNICAS

3.6.1. COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Las muestras de heces fueron colectadas de niños menores de cinco años, con cuadros diarreicos agudos.

Para coleccionar las muestras de heces se utilizaron frascos colectores estériles. No se agregaron preservantes ni detergentes.

En caso de heces líquidas se coleccionó 5 a 10ml aproximadamente y en caso de heces blandas 4 a 6gr.

Una vez recolectada la muestra se almacenó a 4°C a 6°C si el ensayo se realizó durante el día de la recolección. De lo contrario la muestra se conservó a menos 20°C, en crioviales.

3.6.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Las heces líquidas fueron centrifugadas a 3500 r.p.m. por 10 minutos y el sobrenadante se colocó en viales estériles con tapa rosca y para las heces blandas se adicionó diluyente de muestra (solución tampón) en una proporción 1:10, se homogenizó, luego se centrifugó a 3500 r.p.m. por 10 minutos, colocándose el sobrenadante en viales estériles con tapa rosca (29).

3.6.3. DETECCIÓN DE ROTAVIRUS MEDIANTE ELISA Y AGLUTINACIÓN DE LÁTEX

Para determinar la diferencia entre la prueba de ELISA y la aglutinación de látex se precedió a detectar rotavirus humano en las muestras de heces mediante ambas pruebas.

Los productos comerciales utilizados fueron el método inmunoensayo enzimático fluorescente (EIA-VIDAS Rotavirus) y el de aglutinación de látex directo Rotaclon- Bios Chile respectivamente.

3.7. INSTRUMENTOS Y TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Instrumentos: Se diseñó una ficha de datos, donde se incluyó nombre y apellidos, edad, sexo, procedencia, domicilio, servicio, etc. (Anexo 2)

Procedimientos:

- Se recolectaron los números de historias clínicas de las pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, se llevó a cabo la recolección de datos a través de un cuestionario a los padres de familia, previo consentimiento informado.
- Posteriormente se le indicó a los padres como recolectar la muestra de las heces, las mismas que fueron entregadas en el servicio de microbiología del Hospital II de Sullana, siendo procesadas el ELISA en un equipo automatizado MINIVIDAS.
- Con los datos obtenidos se creó una base de datos en el software estadístico SPSS versión 10 en español y en el programa Microsoft Office Excel 2003 para Windows XP.

4. RESULTADOS

Cuadro 1.-Distribución según el sexo

| Sexo | ELISA y látex positivos | ELISA y látex negativos | ELISA positivo y látex negativo | |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|--|-----|
| Masculino | 07 | 91 | 02 | 100 |
| Femenino | 05 | 44 | 01 | 50 |
| Total | 12 | 135 | 03 | 150 |

Cuadro 2.- Distribución según el grupo etàreo

| Edad | ELISA y látex positivos | ELISA y látex negativos | ELISA positivo y látex negativo | |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|--|-----|
| < 1mes | 01 | 02 | 00 | 03 |
| 2m-11m | 11 | 47 | 03 | 61 |
| 1 a -2 a | 00 | 64 | 00 | 64 |
| 3 a -4 a | 00 | 22 | 00 | 22 |
| Total | 12 | 135 | 03 | 150 |

Cuadro 3.- Distribución según la procedencia

| Procedencia | ELISA y látex positivos | ELISA y látex negativos | ELISA positivo y látex negativo | |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|------------|
| Urbano centro | 08 | 28 | 02 | 38 |
| Urbano marginal | 00 | 83 | 00 | 83 |
| Rural | 04 | 24 | 01 | 29 |
| Total | 12 | 135 | 03 | 150 |

Cuadro 4.- Distribución según el Servicio de Procedencia:

| Servicio | ELISA y látex positivos | ELISA y látex negativos | ELISA positivo y látex negativo | |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--|------------|
| Consultorio | 11 | 116 | 03 | 130 |
| Emergencia | 01 | 16 | 00 | 17 |
| Hospitalización | 00 | 03 | 00 | 03 |
| Total | 12 | 135 | 03 | 150 |

Cuadro 5.-Distribución según el tiempo de evolución de la diarrea

| Tiempo | ELISA y látex positivos | ELISA y látex negativos | ELISA positivo y látex negativo | |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|--|-----|
| <24hr | 00 | 09 | 00 | 09 |
| 1-2 días | 09 | 43 | 02 | 54 |
| 3-4 días | 02 | 61 | 00 | 63 |
| 5-6 días | 01 | 22 | 01 | 24 |
| Total | 12 | 135 | 03 | 150 |

Cuadro 6.-Distribución según la consistencia de la diarrea

| Consistencia | ELISA y látex positivos | ELISA y látex negativos | ELISA positivo y látex negativo | |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|-----|
| Líquida | 02 | 72 | 01 | 75 |
| Grumosa | 08 | 14 | 02 | 24 |
| Blanda | 01 | 20 | 00 | 21 |
| Pastosa | 01 | 29 | 00 | 30 |
| | 12 | 135 | 03 | 150 |

Cuadro 7.-Distribución según las características de la diarreas

| Característica | ELISA y látex positivos | ELISA y látex negativos | ELISA positivo y látex negativo | |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|-----|
| Sin moco | 08 | 73 | 03 | 84 |
| Con moco | 04 | 62 | 00 | 66 |
| Sin sangre | 12 | 135 | 03 | 135 |
| Con sangre | 00 | 00 | 00 | 00 |
| Total | 12 | 135 | 03 | 135 |

Cuadro 8.-Distribución según la frecuencia de la diarrea

| Frecuencia | ELISA y látex positivos | ELISA y látex negativos | ELISA positivo y látex negativo | |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|-----|
| 3-5veces/día | 05 | 77 | 01 | 83 |
| 6-10veces/día | 02 | 45 | 00 | 47 |
| >10veces/día | 05 | 13 | 02 | 20 |
| Total | 12 | 135 | 03 | 150 |

Cuadro 9.- Distribución según el tipo de recolección

| Tipo de recolección | ELISA y látex positivos | ELISA y látex negativos | ELISA positivo y látex negativo | |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|-----|
| Pañal | 10 | 73 | 01 | 84 |
| Recolector | 02 | 62 | 02 | 66 |
| Hisopado | 00 | 00 | 00 | 00 |
| Total | 12 | 135 | 03 | 150 |

Cuadro 10.- Comparación de la técnica aglutinación de látex y Elisa para la detección de rotavirus, en heces de niños con diarrea aguda, en el hospital de Sullana.

Jun.-nov. 2008

| ELISA | LÁTEX | | Total |
|--------------|-----------------|-----------------|--------------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | 12 | 3 | 15 |
| Negativo | 0 | 135 | 135 |
| Total | 12 | 138 | 150 |

KAPPA de Cohen=0.878, Sig= 0.000 (Prueba altamente significativa)

Los resultados evidencian un coeficiente cercano a la unidad, el cuál según la prueba estadística es altamente significativo ($\text{Sig} < 0.01$). Dicha prueba evidencia alta concordancia entre ambas pruebas para la detección de rotavirus. Sólo en tres casos, las pruebas discrepan en sus resultados.

Cuadro 11.- Grado de concordancia entre la técnica aglutinación de látex y Elisa para la detección de rotavirus, en heces de niños con diarrea aguda, en el hospital de Sullana. Jun.-nov. 2008

| ELISA | LÁTEX positivo | LÁTEX negativo | Porcentaje |
|--------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| Positivo | 12 | 03 | |
| Negativo | 00 | 135 | |
| Concordancia | 12(8%) | 135(90%) | 98% |

Los resultados concordantes entre ambas pruebas fueron:

a. Muestras positivas por ambos métodos: 12(8%)

b .Muestras negativas por ambos métodos: 135 (90%)

Cuadro 12.- Grado de discordancia entre la técnica aglutinación de látex y Elisa para la detección de rotavirus, en heces de niños con diarrea aguda, en el hospital de Sullana. Jun.-nov. 2008

| ELISA | LÁTEX positivo | LÁTEX negativo | Porcentaje |
|--------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| Positivo | 12 | 03 | |
| Negativo | 00 | 135 | |
| Discordancia | 00 | 03 | 2% |

Los resultados discordantes entre ambas pruebas fueron:

- a. Muestras negativas por el método de referencia y positivas por la prueba de aglutinación de látex:00
- b. Muestras positivas por el método de referencia y negativas por la prueba de aglutinación de látex: 03

4.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el análisis de los resultados se utilizaron parámetros estadísticos de concordancia y discordancia,

Resultados de comparación de las pruebas de Látex y ELISA para el diagnóstico de rotavirus.

| | Número | Porcentaje |
|-----------------|--------|------------|
| Concordancia | 147 | 98% |
| Discordancia | 03 | |
| Látex +/ELISA- | 00 | |
| Látex -/ELISA + | 03 | 02% |
| Subtotal | | |
| Total | 150 | 100% |

Se obtuvo al comparar las 2 técnicas una coincidencia del 98 %.**y una discordancia de sólo 2%.**

Correlations

| | | | |
|-------|---------------------|-------|-------|
| | | LATEX | 2 |
| LATEX | Pearson Correlation | 1.000 | .885 |
| | Sig. (2-tailed) | . | .000 |
| | N | 150 | 150 |
| 2 | Pearson Correlation | .885 | 1.000 |
| | Sig. (2-tailed) | .000 | . |
| | N | 150 | 150 |

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

La tabla demuestra que ambos métodos tiene una alta correlación en sus resultados.

5. DISCUSIÓN

Las gastroenteritis agudas producidas por Rotavirus son de gran importancia por su alta morbilidad y mortalidad, ya sean solas o asociadas a otro agente productor de diarreas, por ello los métodos de diagnóstico rápido en la atención primaria de salud, son muy importantes.

El diagnóstico exacto y rápido es esencial en cuadros diarreicos por rotavirus para prevenir tempranamente complicaciones severas.

En los últimos años se han desarrollado una amplia variedad de ensayos comerciales de detección directa de antígeno en muestras fecales, basados en enzimoimmunoanálisis (EIA), aglutinación con partículas de látex (LA) disponibles para rotavirus del grupo A.

La técnica de LA presenta muy buena especificidad pero con una sensibilidad inferior a las técnicas de EIA (24) Esta técnica se aplica ampliamente en el laboratorio de microbiología, porque es fácil de realizar, requiere sólo unos minutos y no necesita equipo, pues se lee a simple vista. Sin embargo, ofrece como desventaja la presencia de reacciones

cruzadas sobre todo con otros antígenos en la muestra y también ocurren interferencias por el fenómeno de prozona, en el que un exceso de anticuerpos no permite la formación del entramado. Esta técnica se usa comúnmente para la demostración de antígenos de rotavirus en materias fecales, (25)

La mayoría de trabajos comparativos sobre diagnóstico de rotavirus en diarreas, mediante inmunoensayos enzimáticos y test de látex, han sido comparando sensibilidad, especificidad.(16,17,30,31).

Este trabajo es uno de los pocos que busca demostrar que los resultados por ambos métodos son altamente coincidentes, como es 98%.

Sólo 12 (8%)de las muestras fueron positivas al látex y 15 (10%) fueron positivas con ELISA; esto probablemente porque las muestras han sido tomadas mayoritariamente en los meses de Setiembre, Octubre y Noviembre, donde no es tan frecuente las diarreas por rotavirus.

La presencia de los 3 resultados no coincidentes se puede explicar por presentar las muestras un contenido viral escaso no detectado por el LATEX pero sí por el ELISA

CONCLUSIONES

En nuestro país son pocos los laboratorios que cuentan con métodos y medios para realizar un ELISA , de ahí nuestro interés en comparar métodos sencillos, a bajo costo que hagan posible determinar esta patología en forma temprana.

Se concluye que la técnica de Látex puede ser utilizada como prueba de rutina para detectar rotavirus en heces de niños con diarreas, en virtud de presentar un 98% de concordancia con el Elisa, la cual es una de las técnicas más sensibles y específicas.

El test de látex, es una buena alternativa para el diagnóstico de Rotavirus, ya que permite obtener resultados de forma rápida y fácil, tiene poca complejidad técnica, es de fácil manipulación y proporciona información diagnóstica rápida, ya que los resultados se obtienen en un período de 30 minutos, lo cual resulta muy conveniente para el tratamiento de esta enfermedad.

Las ventajas del test de látex son su rapidez, simplicidad y bajo costo y puede ser realizado por personal no tan capacitado, que es la realidad de muchos laboratorios del país que están en provincias alejadas.

Los resultados obtenidos en esta etapa de trabajo son alentadores, pues logramos demostrar que los resultados con LATEX son tan iguales que con ELISA, lo cual nos permite disminuir grandemente el costo en el diagnóstico de rotavirus.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Salazar I. Diarrea aguda causada por virus. Diagnóstico.1982; 9 (4): 195.
- 2.- Martínez, M.; N.Fariria; M. Rodríguez; G. Russomando y G. Parra. Presencia de rotavirus en adultos con diarrea en Asunción, Paraguay. Rev. Argent. Microbiol. 2005; 37(2): 1-4
- 3.- Wilson W. Diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas.Manual Moderno; 2002
- 4.- Chin J. El control de las enfermedades transmisibles. 17º Edición. OPS. 2001
- 5.- Davindson,G.; R. Bishop.; P. Townley; I. Holmes and B.Ruck. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. Lancet 1975;1: 242-245
- 6.- Organización Panamericana de Salud. Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y los animales. 3ra Edic. Vol II; 2003
- 7.- Mata L.; A. Simhon; J. Urrutia; R. Kronmal; R. Fernández y B.García. Epidemiology of rotaviruses in a cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. J.Infect.Dis.1983;148 ;452-461

- 8.- Dowe G.; S. King; P. Maitland y S. Ellis. Laboratory investigations on rotavirus in infantile gastroenteritis in Jamaica. Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg. 1988;82 (1):155-159
- 9.- Pérez S.; R. Gonzáles;B. Salinas; M. Villarroel;M. Tomat y P. Yarzabal. Rotavirus: control y vacunas. 09 Junio 2006 caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/vitae/VitaeQuince/Articulos/Virologia/ArchivosHTML/virologia.pdf –
- 10.- Franco A.; B.Kay; E. Chaparro y P. Mercado. Estudios de rotavirus en la ciudad de lima. Libro de resúmenes de la III Jornada de investigación y Docencia Universitaria .Trujillo; 1984
- 11.- Rodríguez J. y E. Figueroa. Enfermedad diarreica aguda por rotavirus en lactantes y manifestaciones de infección respiratoria aguda concomitante. Tesis de Bachiller en Medicina .Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo;1990
- 12.- Castañeda C.;K.Morey y A.Villoslado. Frecuencia de infección por rotavirus en niños menores de dos años con enfermedad diarreica aguda atendidos en el Hospital “Belén” de Trujillo, Perú. REBIOL 1996;16 (1 y 2); 17-24.
- 13.- Kapikian A. and R. Chanock. Viral gastroenteritis. En: Evans A. (ed), Viral infections of Humans. Epidemiology and Control, 3rd ed. New York and London. Plenum Medical Book Company;1990. p. 300- 311

- 14.- Yolken R.; R. Wyatt and A. Kapikian. ELISA for rotavirus.Lancet.1997; 2: 819
- 15.- Grauballe P.; B. Vestergaard; A. Meylingy y J. Genner. ELISA optimizado para detección de rotavirus humano y bovino en heces: comparación con microscopía electrónica, inmunoelectroosmoféresis y técnica de anticuerpos fluorescentes. J. Med. Virol.1981;7(1): 29-40.
- 16.- Morinet F.; F. Ferchal;R.Colimon; y Y.Perol, Comparación de seis métodos para comparar rotavirus humano en heces. Eur.J.Clin.Microbiol.1984;Apr.;3(2):136-40
- 17.- Ibrahim O.; Sunderland y C. Hart, Comparación de cuatro métodos para detección de rotavirus en heces.Trop.Doct.1990;Jan; 20(1):30-2
- 18.- Cevenini R.; F. Rumpianesi; R. Mazzaracchio; M. Donati y R. Falcieri Evaluación de un nuevo test de aglutinación de látex para detectar rotavirus humano en heces. J. Infect.1983;Sep, 7(2):130-3
- 19.- Simhon A. ; S. Amato; F. Hernández ; R. Yolken y L. Matta Diagnóstico de rotavirus por microscopía electrónica y el ensayo inmunoabsorbente enzima conjugada (ELISA). Bol. Of. Sanit. Panam.1979; 86 (5) 391-397.
- 20.- Thomas E.;O. Roscoe;L. Book ; B.Bone and V. Mah. The utility of latex agglutination assays in the diagnosis of

pediatric viral gastroenteritis .J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.1994; 101(6): 742-746

- 21.- Gòmez J.; M. Gonzàlez y R. Rodríguez. Gastroenteritis por rotavirus.09 Junio 2006. www.aeped.es/protocolos/infectologia/16-Gastroerotavirus.pdf
- 22.- Grande A.; P. Gayol; J.Redondo y P. Gonzàlez . Infecciones gastrointestinales prevalentes en pediatria. Bol. Pediatr 1998; 38:220-241
- 23.- Solórzano F. y G. Miranda . Diarrea por rotavirus. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 2004;Abril-Jun ;24(2)
- 24.- Sánchez A.; I.Wilhelmi; J. Colomina; E.Cubero y E. Romàn. Diversity of group A Human Rotavirus Types circulating over a 4 year period in Madrid, Spain. J. Clin Microbiol 2004 April;42(4):1609-1613
- 25.- Crespo María. El diagnóstico viral por el laboratorio. Colombia Médica 2000; 31:135-150
- 26.- Bass E.; D.Pappano y S. Humiston. Rotavirus. Pediatrics in Review, en español.2007.Nov ;28 (9)
27. Mormontoy W. Elaboración del protocolo de investigación en ciencias de Salud, de la conducta y áreas afines. Laboratorios Boehringer Ingelheim. Lima. 1993

- 28.- Steel R. y J. Torrie. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2ª Edic. Bogotá. Mc. Graw-Hill.1985
- 29.- Christensen M. Rotavirus. En: Murray P.; E. Jo; M. Pfaller ; F. Tenover y R. Yolken. Manual of Clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1994; p. 1012-1016
- 30.- Julkunen I ; Savolainen J ; Hautanen A y Hovi T. Detection of rotavirus in faecal specimens by enzyme immunoassay, latex agglutination and electron microscopy Scand J Infect Dis. 1985;17(3):245-9.
- 31.- Jensen A. Evaluation of two commercial kits for rapid detection of human rotavirus in feces; Rotalex, a latex agglutination test and Rotavirus ELISA kit Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]. 1985 Apr;93(2):159-60

ANEXOS

ANEXO 1

Para el cálculo del tamaño de la muestra, se utilizó la fórmula de proporciones para un solo grupo (Mormontoy, 1993)

$$n_0 = \frac{z^2 p \cdot q}{d^2}$$

Donde:

n_0 = tamaño de la muestra

$z = 1.96$ para una seguridad del 95%

p = proporción o tasa de prevalencia que se asumirá (0.435)

$q = 1-p$

T ó d = tolerancia de error permitido (0.05)

$$n_0 = \frac{(1.96)^2 (0.435) (0.565)}{(0.05)^2}$$

$$n_0 = 377.66$$

Si se conoce n_0

n_0 = tamaño de muestra infinita

n = tamaño de la muestra

N = casos de cuatro meses antes del muestreo

Reajustando:

$$n = \frac{n_0}{1 + \frac{n_0}{N}}$$

$$n = \frac{377.66}{1 + \frac{377.66}{248}}$$

$$n = 150$$

La muestra reajustada será de 150

ANEXO 2

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre:.....

Fecha de nacimiento:

Edad: Sexo :M () F ()

Domicilio:

Procedencia:

Servicio: Emergencia () Hospitalización () Consultorio ()

Fecha y hora de recepción de la muestra:

Hora de emisión de la muestra:

Fecha de inicio de la diarrea:

Tiempo de evolución de la diarrea:

Consistencia de diarrea: líquida () grumosa ()

pastosa () blanda ()

Característica de diarrea: Moco () Sangre ()

Sin moco () Sin sangre ()

Frecuencia de la diarrea por día:

Tipo de recolección: pañal () recolector () hisopado ()

Resultados de laboratorio:

ELISA: Positivo () Negativo () Indeterminado ()

Test aglutinación de látex: Positivo () Negativo ()

Inespecífico ()