



Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

**INFECCIÓN POR ENTEROVIRUS NO-POLIO EN
NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS CON
GASTROENTERITIS AGUDA ATENDIDOS EN UN
HOSPITAL, LIMA-PERÚ**

Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología

AUTORA

Ochoa Porras, Mayra Rosana

ASESOR

Mg. Salas Asencios, Ramsés

JURADO

Mg. Robles Román, Margarita

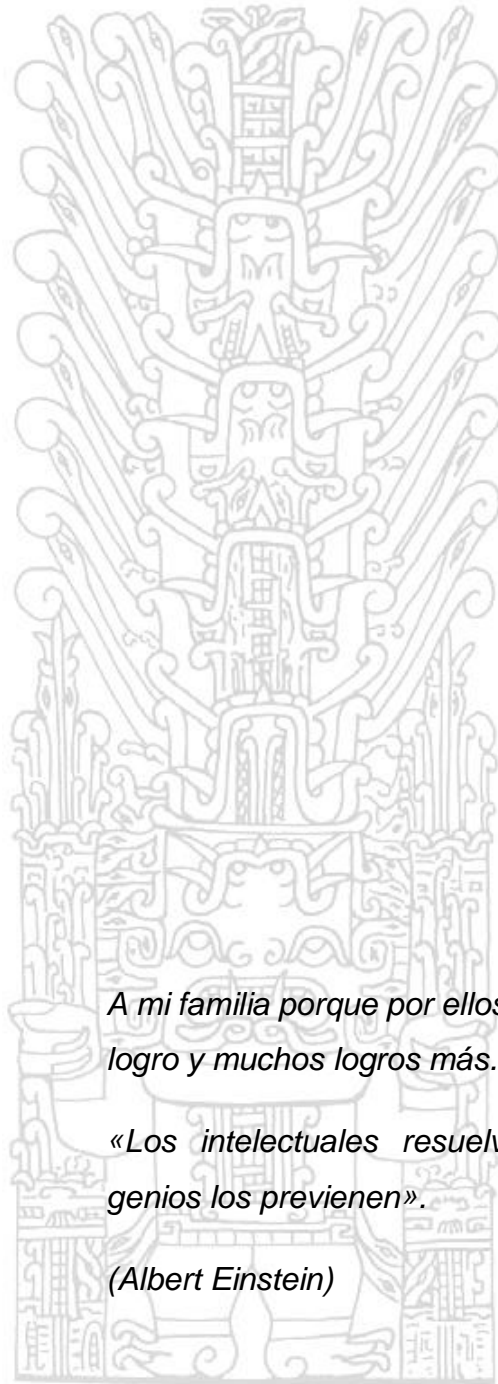
Blga. Bravo Cruz, Nora

Mg. Santa Cruz Carpio, Carlos

Mg. Lezama Vigo Helmer

Lima – Perú

2018



A mi familia porque por ellos y para ellos es este logro y muchos logros más.

«Los intelectuales resuelven problemas, los genios los previenen».

(Albert Einstein)

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar conmigo y ser mi guía en cada momento. Por darme la fuerza y la voluntad para alcanzar esta meta y todas las que vengan.

A mi familia por todo el apoyo y el amor brindado. Javier, Rosana, Dana, y Javier: son mi fortaleza mi motor, siempre me esforzaré por darles lo mejor. Asimismo a mis tíos Angel, Soledad y Jorge, a mis primos: Angeleydi y Marjhory parte importante de mi vida y mi familia.

A mi mamita Zoraida que siempre estado conmigo y me educado desde muy pequeña eres mi segunda mama para ti también es este logro por tu apoyo y amor incondicional.

A mi tia Ana que desde el cielo me cuida y guía mis pasos.

Al Dr. Holger Mayta por haberme permitido realizar esta investigación y acogerme en su laboratorio, por haber sido un mentor y amigo todo este tiempo.

Al Mg. Ramses Salas, quien ha sido un excelente maestro y gran profesional que me asesoro en todo momento.

A la Dra. Roxana Zamudio que a pesar del corto tiempo que nos conocimos me brindó su apoyo, amistad y asesoría a la distancia.

Al Dr. Jaeson Calla por ser un excelente amigo y profesional que me brindó su apoyo y conocimientos cuando se lo solicite.

A Helena, Gerardo, Giuliana, Karen, Carmen, Alejandra, Macarena y Jorge, por todo su apoyo, por sus consejos, por la amistad cultivada, por las sonrisas y buenos momentos.

Al MD Robert Gilman por su apoyo para con esta investigación y con mi carrera profesional un excelente mentor y profesional.

A la Dr. Sarah-Blythe Ballard y Fabiola C. por la ayuda brindada en la realización de esta investigación.

A todo el equipo científico y administrativo del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la UPCH, encabezado por el Dr. Robert Gilman.



RESUMEN

La diarrea aguda es la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años, con 0,8 millones de muertes anuales a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo. Aunque rotavirus y norovirus son la principal causa de gastroenteritis aguda en niños; aún existe un porcentaje considerable de casos diarreicos en los que el agente causal no se conoce. Se sugiere que dentro de estos agentes causales se encuentran algunas especies del género Enterovirus no-polio. A fin de determinar la prevalencia de Enterovirus no-polio en niños con gastroenteritis aguda que requieren atención médica, se realizó un estudio de casos y controles en niños que acudieron al Instituto Nacional de Salud del Niño, en la ciudad de Lima. La detección de enterovirus no-polio se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando sondas taqman para la región no traducida 5' (UTR 5'). Las muestras positivas para PCR en tiempo real se genotipificaron mediante PCR convencional y fueron secuenciadas. Se analizaron un total de 767 muestras, 303 niños con gastroenteritis (casos) y 464 niños sin gastroenteritis (controles), de los cuales 26 (9%) fueron positivos entre los casos y 18 (4%) entre los controles. Todas las muestras positivas se tipificaron mediante secuenciación siendo el más prevalente Enterovirus humano B (n=6 en controles y n=5 en casos) mientras que Enterovirus humano D (n=1) y Rinovirus humano C (n=4) estuvo presente solo en casos. Se observó diferencias en la prevalencia del género Enterovirus en casos y controles ($P=0.0068$). Si se observó que Rinovirus humano C está asociado a gastroenteritis aguda ($P=0.0235$).

Palabras clave: Gastroenteritis aguda, Enterovirus no-polio, Rinovirus humano C.

ABSTRACT

Acute diarrhea is the second leading cause of death in children under 5 years of age, causing 0.8 million deaths annually, especially in developing countries. Although rotavirus and norovirus are the leading cause of acute gastroenteritis in children; there are still a considerable percentage of diarrheal cases in which the causative agent is unknown. It has been suggested that within these causal agents are some species of the genus Enterovirus. To determine the prevalence of non-polio Enterovirus among children with acute gastroenteritis seeking for medical attention; a case-control study was carried out among children attending the National Institute of Child Health in Lima. Non-polio Enterovirus detection was carried out using real-time PCR with Taqman probes for untranslated region 5' (UTR 5'). Positive samples were genotyped by standard PCR and sequencing. A total of 767 samples were processed 303 children with gastroenteritis (cases) and 464 children without gastroenteritis (controls), 26 (9%) were positive among cases and 18 (4%) among controls. All positive samples were genotyped being the most common human Enterovirus B (n=6 among controls and n=4 among cases), while human enterovirus D (n=1), human rhinovirus C (n=4) was present only among cases. No association was observed between Enterovirus genus and acute gastroenteritis (P=0.0068). However Human rhinovirus C was associated to acute diarrhea (P=0.0235).

Key words: Acute Gastroenteritis, Human enterovirus, Human rhinovirus C.

ÍNDICE

Contenido	Página
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO II: MARCO TEORICO.....	3
2.1 ANTECEDENTES.....	3
2.2 GENERALIDADES SOBRE ENTEROVIRUS.....	5
2.2.1 Estructura viral.....	5
2.2.2 Ciclo de replicación.....	8
2.2.3 Epidemiología.....	9
2.2.4 Diagnóstico y Tipificación.....	10
CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS.....	11
3.1 Diseño de Investigación.....	11
3.2 Población y muestra en estudio.....	11
3.3 Variables independientes.....	12
3.4 Variables dependientes.....	12
3.5 Técnica de recolección de datos.....	12

3.5.1 Clonamiento para determinar la curva estándar del qPCR.....	12
3.5.2 Preparación de Muestras biológicas.....	13
3.5.3 Detección de Enterovirus por qPCR.....	14
3.5.4 Genotipificación y Secuenciamiento.....	15
3.6 Técnicas de análisis y procesamiento de datos.....	16
3.6.1 Índices de prevalencia.....	16
3.6.2 Prueba de Fisher.....	17
3.6.3 Flujograma.....	18
CAPITULO IV: RESULTADOS.....	19
CAPITULO V: DISCUSIONES.....	27
CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....	30
RECOMENDACIONES.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	32
ANEXOS.....	36

CAPITULO I INTRODUCCIÓN

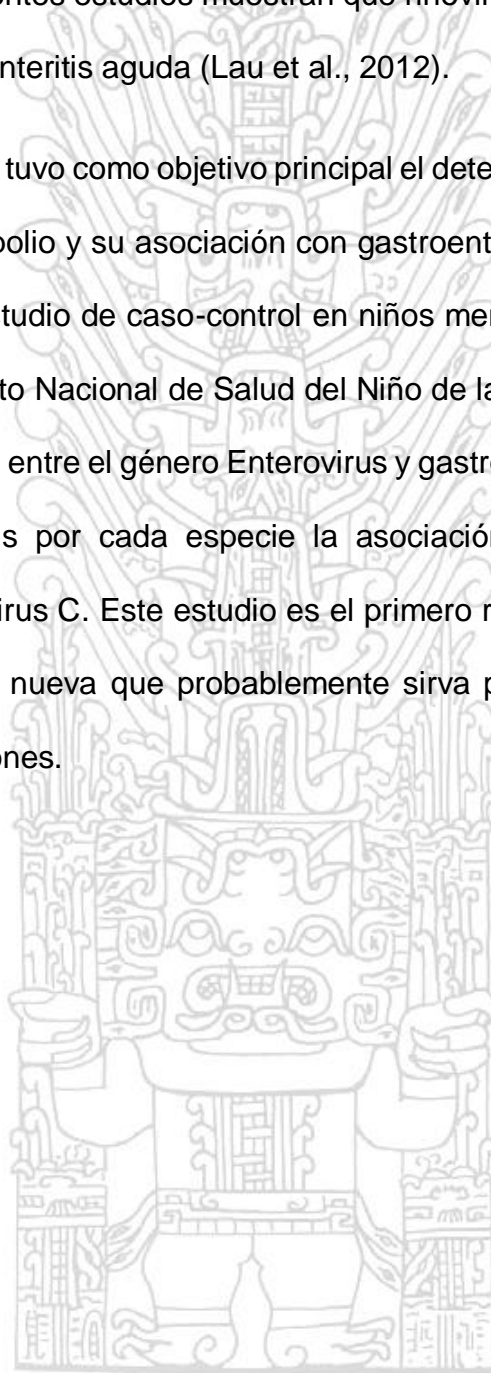
La gastroenteritis es la inflamación de la mucosa del estómago y el intestino delgado, que se debe en gran parte a infecciones virales. Sin embargo, algunas infecciones bacterianas y parasitarias también son causa de gastroenteritis (Fleurat et al., 2010). La OMS reportó que los cuadros de diarrea aguda son la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años a nivel mundial, ocasionando la muerte de 0.8 millones de niños por año, principalmente en países en vías de desarrollo como el nuestro.

Norovirus con el 18% de prevalencia (Ahmed et al., 2014) y rotavirus con el 12% de prevalencia reportado por la OMS en el 2015, son los principales agentes virales causantes de gastroenteritis aguda en niños; no obstante, no son los únicos virus reportados como causantes de cuadros diarreicos agudos, también se ha reportado como agente causal de diarrea aguda a sapovirus, astrovirus y adenovirus, pero a pesar de ello aún existe un porcentaje considerable de casos en los que aún se desconoce el agente causal (Bellido J. et al. 2007). Se sugiere que dentro de estos agentes causales se encuentran algunas especies del género Enterovirus no polio (Patil et al., 2015).

Enterovirus es un género de la familia Picornaviridae que está comprendido por 12 especies: Enterovirus humano A, B, C, D, E, F, G, H y J, Rinovirus

humano A, B y C (ICTV et al., 2015). Se ha reportado que enterovirus humano, A, B y C están asociados a casos de gastroenteritis aguda (Patil et al., 2015). Recientes estudios muestran que rinovirus C también estaría asociado a gastroenteritis aguda (Lau et al., 2012).

El presente estudio tuvo como objetivo principal el determinar la prevalencia de enterovirus no-polio y su asociación con gastroenteritis aguda. Para tal fin se realizó un estudio de caso-control en niños menores de 5 años que acudieron al Instituto Nacional de Salud del Niño de la ciudad de Lima. Se observó asociación entre el género Enterovirus y gastroenteritis aguda pero al hacer el análisis por cada especie la asociación no se mantuvo a excepción de rinovirus C. Este estudio es el primero realizado en el país y aporta información nueva que probablemente sirva para el desarrollo de futuras investigaciones.



CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

La gastroenteritis aguda se caracteriza principalmente por cuadros diarreicos agudos y vómitos con dolores abdominales que generan un gran malestar en la población de riesgo como son los niños, adultos mayores y personas inmunodeprimidas. Esta enfermedad es la segunda causa de mortalidad en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo como el nuestro (Alvarado et al., 2012).

La mayoría de casos de gastroenteritis aguda se debe a organismos virales predominantes como Norovirus, Rotavirus, Astrovirus, Adenovirus y Sapovirus (Bellido et al., 2007); así mismo las infecciones bacterianas y parasitarias son también agentes causales importantes de gastroenteritis (Fleurat et al., 2010). Sin embargo en aproximadamente 40 % de casos de gastroenteritis el agente causal es desconocido.

Investigaciones recientes han determinado la relación del género enterovirus como agente causal de gastroenteritis aguda en niños. Patil et al., (2015) en un estudio caso – control en el oeste de la India realizado entre el 2004 y el 2009, encontró una asociación significativa entre enterovirus y los casos de gastroenteritis. El porcentaje de niños infectados con enterovirus no-polio fue mayor en pacientes con

gastroenteritis que en aquellos sin gastroenteritis (13,7% y 4,9% respectivamente). Enterovirus no-polio fue más frecuente entre los pacientes con gastroenteritis de etiología desconocida que en los pacientes positivos a otros virus (17,9% frente a 7%) ($P < 0,01$).

Otra especie del género Enterovirus no-polio que también ha sido relacionado con gastroenteritis aguda, rinovirus que por lo general está relacionado con enfermedades respiratorias; reportándose una prevalencia de rinovirus con 14.5% en pacientes adultos y pediátricos con gastroenteritis aguda internados en la Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo de Pavia-Italia (Rovida et al., 2013). De igual forma en un estudio con muestras de niños con gastroenteritis aguda del hospital regional de Hong Kong, se encontró 3 casos de rinovirus C que no presentaban sintomatología de una infección respiratoria sugiriendo que esta especie era la causa de la gastroenteritis (Lau et al., 2012).

Por otro lado, Skern et al. Mostró que un único cambio de aminoácido (Asp101 por Glu101) en la proteína VP1 de la cápside de Rinovirus humano-B14 es suficiente para conferir resistencia a la inactivación del virus cuando se incuba a pH bajo, lo que sugiere que este cambio de aminoácidos regula el aumento de la estabilidad a pH bajo.

En el Perú hasta el momento no se ha reportado estudios sobre enterovirus no-polio mucho menos estudios relacionados a rinovirus que estén asociados a casos de gastroenteritis aguda.

Por lo que este trabajo es un aporte a la investigación en busca de nuevos agentes causales asociados a gastroenteritis aguda.

2.2 Generalidades sobre enterovirus

Enterovirus es un género de virus que pertenece a la familia Picornaviridae, la que comprende 12 especies de acuerdo a la última clasificación del Comité Internacional de Taxonomía de virus (ICTV): Enterovirus humano A, B, C, D, E, F, G, H y J, Rinovirus humano A, B y C (ICTV, 2015). En la presente investigación no se incluyó la especie Poliovirus que fue agrupada junto con otras dentro de la especie Enterovirus humano C en la nueva clasificación taxonómica, por lo que usamos el nombre de “Enterovirus no-polio” para aclarar que no incluimos a Poliovirus en el presente estudio.

Algunas de las especies de Enterovirus no-polio están asociadas a casos de diarrea, sin embargo las especies de rinovirus están usualmente asociadas cuadros de infecciones del tracto respiratorio (Linsuwanon et al., 2009).

2.2.1 Estructura Viral

El virión de enterovirus presenta un tamaño de 30 nm y una cápside icosaédrica compuesto de 60 protómeros, cada protómero está compuesto de 4 proteínas que son: VP1, VP2, VP3 y VP4 (Fig 1). Esta estructura es la que protege el genoma del virus que es una cadena simple de RNA de sentido positivo que presenta un tamaño que varía entre 7.2 kb y 8.5 kb. Este RNA es poliadenilado y presenta un solo marco de lectura abierto que codifica una sola poliproteína. El RNA genómico viral tiene un gen que codifica una proteína viral "VPg" en su extremo 5' en lugar de una proteína cap. El extremo 5' no transcrito, contiene un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) que permite que los ribosomas traduzcan de forma directa de la poliproteína. El mRNA que codifica el polipéptido presenta tres regiones P1, P2 y P3 (Figura 2). La región P1 codifica los polipéptidos estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4. Las regiones P2 y P3 codifican las proteínas no estructurales asociadas con la replicación. La región P2 codifica las proteínas 2A (proteasa), 2B y 2C mientras que la región P3 codifica las proteínas 3A, VPg, 3C (proteasa), y una RNA polimerasa dependiente de RNA (Knipe D. et al., 2013).

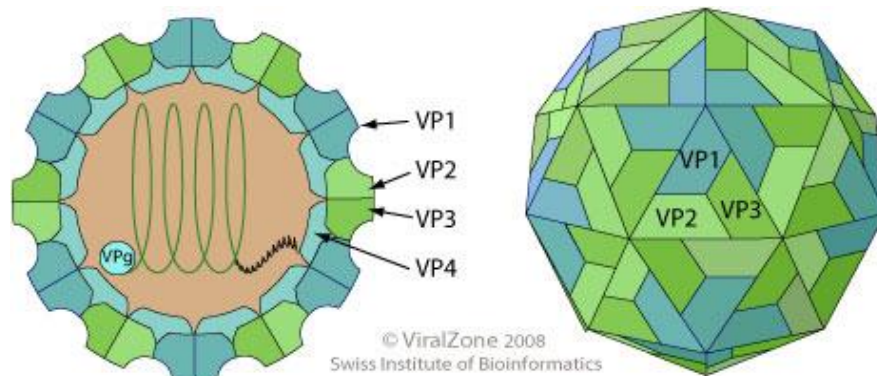


Figura 1. Estructura icosaédrica del virio de Enterovirus que está compuesto de 60 protómeros, cada protómero comprende 4 proteínas VP1, VP2 y VP3 que se encuentra en la superficie del virión y la proteína VP4 que se encuentra en el interior del virión (ViralZone, http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html, 2017).

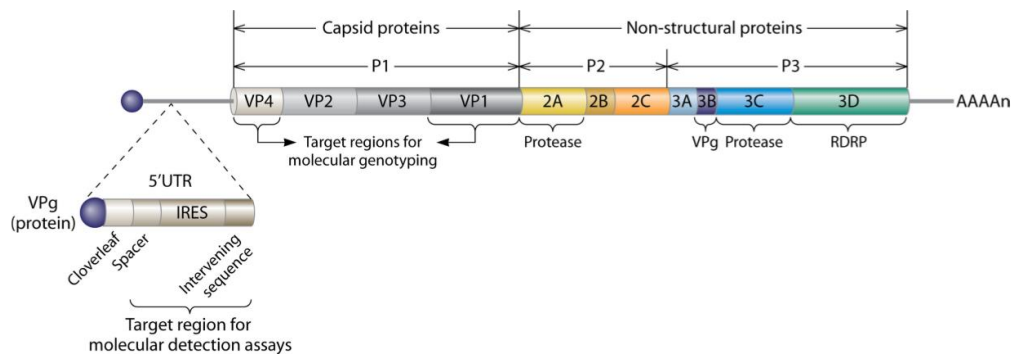


Figura 2. Genoma de enterovirus: RNA de 7.2 kb, de sentido positivo, con un solo marco de lectura abierto formado por 3 unidades P1 codifica proteínas estructurales del virion, P2 y P3 codifican proteínas no estructurales, proteasa y ARN polimerasa dependiente de ARN (RDRP). IRES, unidad de entrada ribosoma interno (Jacobs et al., 2013).

2.2.2. Ciclo de replicación

La replicación de los picornavirus se produce en el citoplasma de la célula hospedera. El primer paso es la unión del virión a un receptor celular, el cual depende de la especie; así para Enterovirus humano A, B y C el receptor es CD55 y para Rinovirus humano A, B y C es ICAM1. El genoma del virus ingresa al citoplasma a través de un proceso que implica cambios estructurales en la cápside. Una vez que el RNA viral de sentido positivo se introduce en el citoplasma, es traducido para proporcionar proteínas virales esenciales para la replicación del genoma y la producción de nuevas partículas virales (Knipe et al., 2013). Las proteínas víricas se sintetizan a partir de un precursor de poliproteína, que se escinde posteriormente. Las escisiones se llevan a cabo principalmente por dos proteasas virales, 2A y 3C o 2A y 3CD. Entre las proteínas sintetizadas están la ARN polimerasa dependiente de RNA y las proteínas accesorias necesarias para la replicación del genoma y la síntesis de mRNA (Knipe et al., 2013). El primer paso en la replicación del genoma es copiar el RNA de sentido positivo y generar un RNA intermediario de sentido negativo; este paso es seguido por la producción de varias hebras de RNA de sentido positivo. Estos eventos ocurren en pequeñas vesículas membranosas que son inducidas por varias proteínas del virus. Una vez que el grupo de

proteínas de la cápside es suficientemente grande, comienza la encapsidación (Knipe et al., 2013).

El tiempo total requerido para un único ciclo de replicación oscila entre 5 y 10 horas, dependiendo de muchas variables como: la temperatura, el pH, la célula huésped y la multiplicidad de infección. Muchas especies de la familia picornavirus se liberan cuando la célula pierde su integridad y se lisa (Knipe et al., 2013).

2.2.3. Epidemiología

El género Enterovirus no-polio presenta una distribución mundial como agente causal de distintas enfermedades como meningitis, miocarditis (Knipe et al. 2013), enfermedades respiratorias agudas (Jacobs et al., 2013) y ahora lo asociamos como agente causal de gastroenteritis aguda en niños menores de 9 años (Patil et al., 2015).

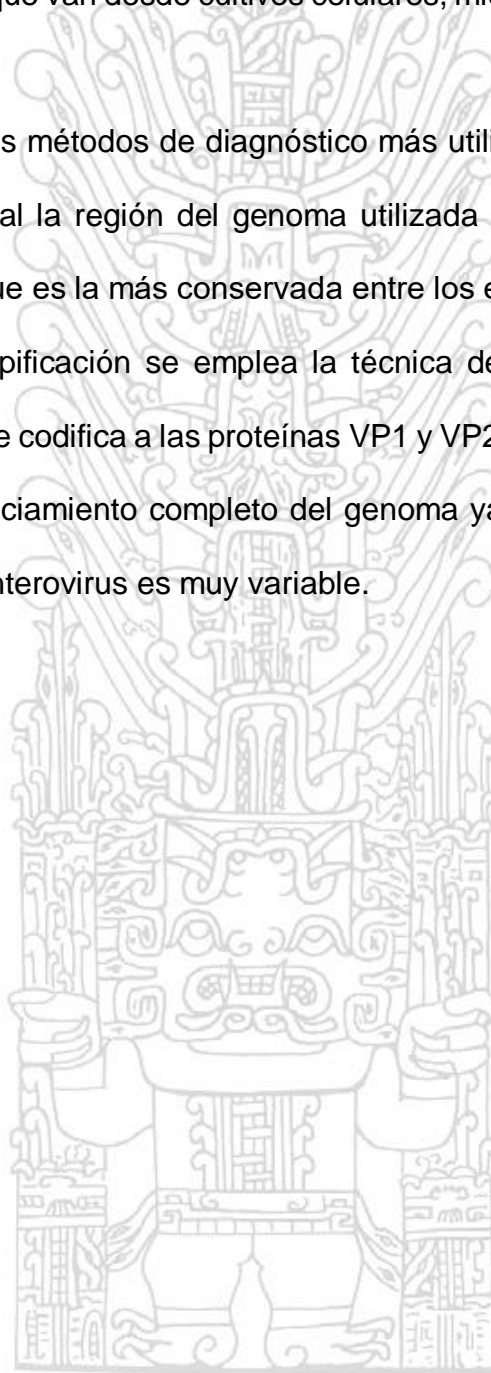
La prevalencia de Enterovirus no-polio en muestras de heces de niños con gastroenteritis aguda va desde 9 hasta el 15% (Lau et al., 2012; Patil et al., 2015).

2.2.4. Diagnóstico y tipificación

Para el diagnóstico de enterovirus se emplean distintas técnicas que van desde cultivos celulares, microscopia electrónica y PCR.

Uno de los métodos de diagnóstico más utilizado es el qPCR en tiempo real la región del genoma utilizada para este método el UTR 5' que es la más conservada entre los enterovirus.

Para la tipificación se emplea la técnica de PCR que utiliza la región que codifica a las proteínas VP1 y VP2 pero se recomienda el secuenciamiento completo del genoma ya que el genoma del genero enterovirus es muy variable.



CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño de Investigación

El presente estudio es un estudio transversal tipo Caso – Control en el que se pretendió identificar la posible asociación entre gastroenteritis aguda y la presencia de Enterovirus humano. Las muestras consideradas como casos fueron aquellas provenientes de niños con cuadros diarreicos agudos que llegaron a la unidad de rehidratación oral (URO) del Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima – Perú.

Las muestras consideradas como controles fueron aquellas muestras tomadas de niños sin gastroenteritis aguda del Instituto Nacional de Salud del Niño, Lima - Perú.

3.2 Población y muestra de estudio

Las muestras consideradas como casos en el presente estudio, fueron obtenidas de niños menores de 5 años con cuadros diarreicos (mínimo 3 deposiciones líquidas en un periodo de 24 horas) que llegaron, en busca de atención médica, a la unidad de rehidratación oral del Instituto Nacional de Salud del Niño. Y las muestras consideradas como controles en el presente estudio, fueron obtenidas de niños sin cuadros diarreicos que llegaron a la unidad de rehidratación oral del Instituto Nacional de Salud del niño.

El material biológico fué almacenado a -80 °C y se procesaron en el área de Virología Molecular del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.3 Variables independientes

Especies de Enterovirus no-polio presentes en las muestras.

Concentración de carga viral.

3.4 Variables dependientes

Gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años.

3.5 Técnicas de recolección de datos

3.5.1 Clonamiento para determinar la curva estándar del qPCR

Para el clonamiento se utilizó la especie Rinovirus humano A. Los cebadores que se emplearon para el clonamiento de la región UTR 5' de Enterovirus no-polio la cual se utiliza para la detección con qPCR fueron los diseñados por Lu et al., (2008). El kit que se utilizó para el clonamiento fue el TOPO TA cloning (Invitrogen, California, EEUU catalog #450641) el cual utiliza para la inserción del producto de amplificación al plásmido utilizando los extremos poliadenilados del producto en vez de las enzimas de restricción y la enzima ligasa. El producto de inserción fue de 207 pb. El plásmido insertado se empleó para

realizar la curva de detección con lo que se determinó de la línea umbral.

3.5.2 Preparación de Muestras biológicas

Todas las muestras se diluyeron 1/10 en PBS pH 7.2. Para las muestras formadas (sólidas) se empleó 100mg de heces, mientras que para las muestras no formadas (líquidas) 100µl de heces más 900µl de PBS. Las diluciones se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 minutos. Una alícuota de 140 µl del sobrenadante de esta suspensión fue empleado para la extracción de RNA empleando el kit comercial QIAmp RNA viral (QIAGEN, Catalogo #52904/6) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

La síntesis del cDNA se realizó a partir de RNA purificado de las muestras empleando el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Applied Biosystems catalog #18030), este proceso se realizó en 2 pasos, el primero consistió en agregar 7 µl de RNA de la muestra más 3 µl del mix1 compuesto por: 1 µl de agua DEPC, 1 µl de dNTP mix a 10 mM y 1 µl de random hexámeros a 50 ng/µl (cebadores), obteniendo un volumen final de 10 µl. Se incubó a 65 °C por 5 minutos.

El segundo pazo consistió en agregar 10 µl de mix2 a la mezcla anterior. El mix2 está compuesto por: 2 µl RT Buffer 10X, 4 µl de MgCl₂ a 25 mM, 2 µl de DTT (ditiotreitól) a 0.1 M, 1 µl de RNase OUT a 40 U/µl y finalmente 1 µl de SuperScript III RT a 200 U/µl. El ciclaje para este último paso es 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 50 °C y finalmente 5 minutos a 85 °C.

3.5.3 Detección de Enterovirus por qPCR

Para la detección de enterovirus se empleó la prueba de qPCR para ello se empleó los siguientes cebadores (Lu et al., 2008) sentido: 5' CYAGCCTGCGTGGC 3', antisentido: 5' GAAACACGGACACCCAAAGTA 3' y la sonda: 5' FAM-TCCTCCGGCCCCTGAATGYGGC-BHQ 3' que amplifican la región no transcrita (5' UTR) que es la región más conservada de los enterovirus. (ANEXO A)

La reacción consistió de 1X de mix Fast advance (Applied Biosystem catalogo #4444557), 0.6 µM de cada primer y 0.1µM de sonda TaqMan, 2 µL de agua de grado molecular y 1 µL de cDNA en un volumen total de 10 µL. El ciclamiento fue de 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 20 segundos, 40 ciclos de cada ciclo de 95 °C por 1 segundo y 60 °C por 20 segundos

y un paso final de 60 °C por 1 minuto. Este procedimiento se le realizó a todas las muestras.

3.5.4 Genotipificación y Secuenciamiento

La genotipificación y clasificación se realizó únicamente a las muestras que resultaron positivas a la prueba de detección para enterovirus no-polio. Se amplificó la región VP2/VP4 que pertenecen la parte estructural (cápside) del virus para ello se empleó los siguientes cebadores (Wisdom et al., 2009). Sentido externo 5'–CCGGCCCCTGAATGYGGCTAA–3' y antisentido interno 5'–TCWGGHARYTTCCAMCACCANCC–3' (ANEXO A); en una mezcla de reacción que consistió de buffer de PCR 1X, 1.5 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTPs, 0.5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen, Carlsban, CA) y 2 μl de cDNA en un volumen final de 25 μl

El ciclaje consistió de un paso a 94 °C por 3 minutos; 35 ciclos cada uno de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 40 segundos, 72 °C por 30 segundos; y un paso final a 72 °C por 7 minutos.

En aquellas muestras positivas al qPCR que no amplificaron en el primer PCR convencional para la región VP2/VP4 se realizó un PCR convencional adicional para que puedan ser secuenciados, para ello empleamos los cebadores dirigidos

contra la región 5' UTR del genoma de los enterovirus humano (Sapkal et al., 2009). Sentido interno 5'–CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG–3' y antisentido interno 5'–GAAACACGGACACCCAAAGTA–3' (ANEXO A); en una mezcla de reacción que consistió de buffer de PCR 1X, 0.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen, Carlsban, CA) y 2 µl de Cdna.

El ciclaje consistió de un paso a 94 °C por 3 minutos; 40 ciclos de 92 °C por 40 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos; finalmente 72 °C por 7 minutos.

Los productos obtenidos fueron enviados a Macrogen USA para su secuenciamiento.

3.6 Técnicas de análisis y procesamiento de datos

3.6.1 Índices de prevalencia

La prevalencia de Enterovirus en la población, expresada en porcentaje, se determinó empleando a siguiente formula:

$$P = \frac{\text{Número de casos positivos de Enterovirus}}{\text{Número total de infantes en casos y/o controles}} \times 100$$

3.6.2 Prueba exacta de Fisher

Se utilizó para determinar una posible asociación entre la enfermedad (gastroenteritis aguda) y el agente causal (genaro enterovirus) empleando el software Graphpad Pims 6.

$$F = \frac{\left(\frac{RSS_0 - RSS_1}{m} \right)}{\left(\frac{1 - RSS_0}{n - k} \right)}$$

RSS_0 se refiere al coeficiente de determinación del modelo sin restringir (R^2).

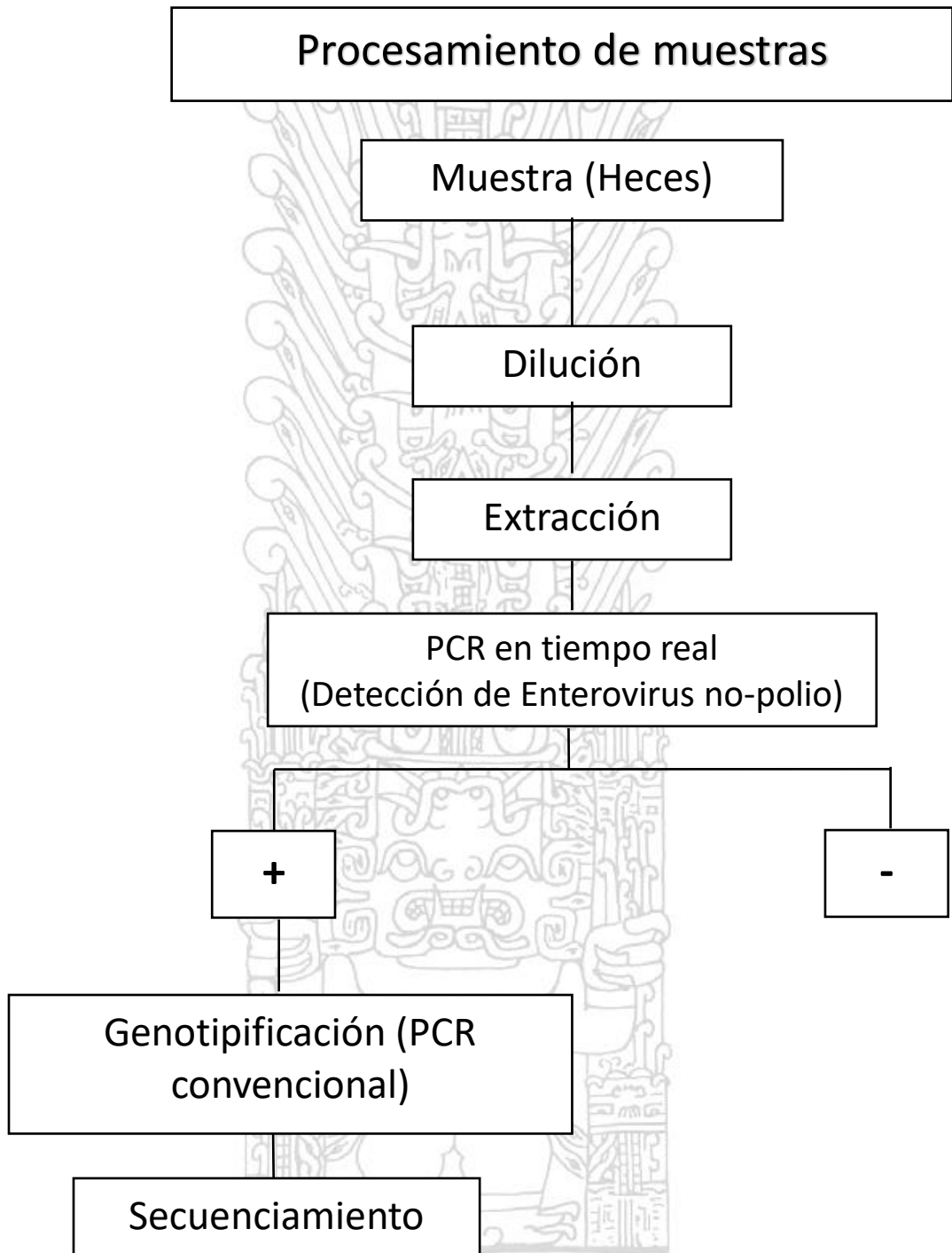
RSS_1 se refiere al coeficiente de determinación del modelo restringido (R^2)

m se refiere al número de restricciones impuestas a los coeficientes estimados (coeficientes restringidos).

k se refiere al número de coeficientes estimados en el modelo sin restricciones.

n se refiere al número de observaciones del modelo.

3.6.3 Flujo grama



CAPITULO IV

RESULTADOS

La curva estándar tuvo una pendiente de -3.3994 y un correlación (R^2) de 0.9995 y una eficiencia del 96% que nos permite establecer el límite de 2 copias del virus con un Cq de 38, luego de haber adaptado la técnica de PCR en tiempo real de usar RNA a usar cDNA para la detección que podemos apreciar en la figura 3.

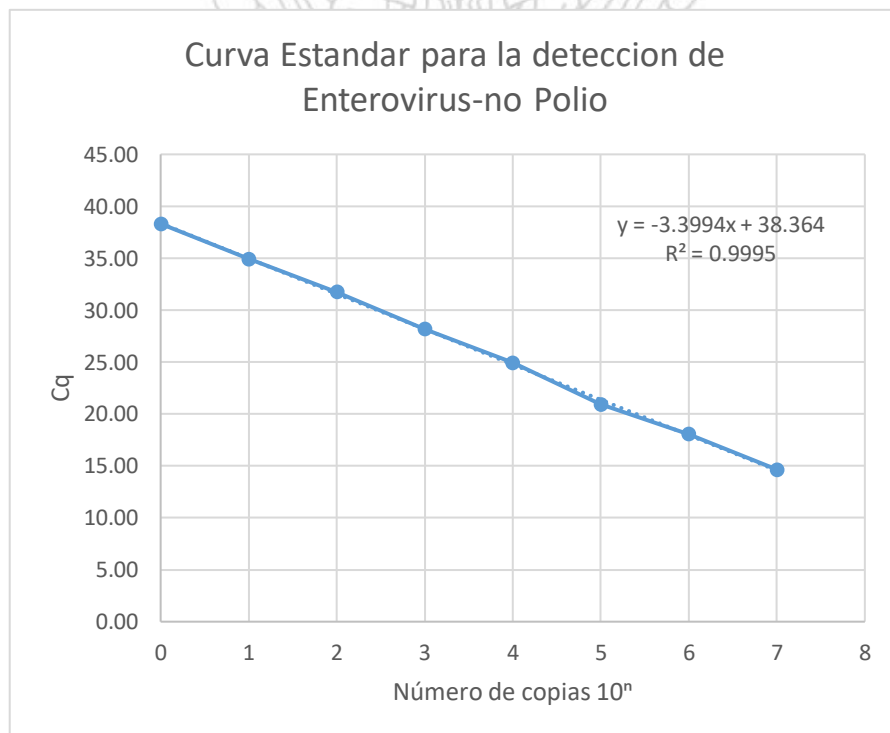


Figura 3.- Curva estándar para determinar el límite de detección.

Se procesaron un total de 767 muestras (303 casos y 464 controles). Mediante qPCR la prevalencia de enterovirus no polio entre las muestras provenientes de los casos fue de 9% (26/303). Mientras que la prevalencia entre las muestras provenientes de los controles fue de 4%(18/464). La prevalencia de enterovirus no polio fue mayor entre los casos que en los controles (prueba exacta de Fisher $P=0.0068$).

En el grupo de casos un total de 167 (55.12%) fueron niños y 136 (44.88%) fueron niñas, mientras que en el grupo de controles un total de 246 (53.02%) fueron niños y 218 (46.98%) fueron niñas.

La mayoría de los niños ($n=687$) incluidos en el estudio recibieron la dosis completa de la vacuna contra Rotavirus (Rotarix), en el grupo de casos la distribución de niños vacunados es 88.12% ($n=267$) recibieron dosis completa, 4.29% ($n=13$) recibieron dosis incompleta, 4.29% ($n=13$) no recibieron la vacuna y 3.30% ($n=10$) no proporcionó información sobre la vacuna.

La presencia de enterovirus no-polio positivo en función a los grupos de edad no fue estadísticamente significativa (Prueba de Chi-cuadrado, $P=0.197$).

Respecto a la vacunación en el grupo control fue similar el 90.52% ($n=420$) recibieron dosis completa, 4.96% ($n=23$) recibieron dosis incompleta, 2.37% ($n=11$) no recibieron la vacuna y el 2.16% ($n=10$) no proporcionó

información con respecto a la vacuna; la diferencia entre los grupos no fue estadísticamente significativa (Prueba de Chi-cuadrado, $P=0.073$).

En el grupo casos el mayor número de participantes tenía entre 6 meses y 2 años (73.93%, $n=224$), mientras que en el grupo control el mayor número de participantes tenían entre 2 y 4 años (43.10%, $n=200$) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los niños menores de 5 años del Área de Rehidratación oral del Hospital del Niño. Lima 2016.

Características	Casos N (%)	Controles N (%)
Sexo		
Femenino	136(44.88)	218(46.98)
Masculino	167(55.12)	246(53.02)
Grupo de edad		
≤ 6 meses	9(2.97)	19(4.09)
> 6 meses a ≤ 2 años	224(73.93)	139(29.96)
> 2 años a ≤4 años	57(18.81)	200(4.10)
> 4 años	13(4.29)	106(22.84)
Vacuna Rotavirus		
Dosis completa	267 (88.12)	420 (90.52)
Dosis incompleta	13 (4.29)	23 (4.96)
No vacunados	13 (4.29)	11 (2.37)
No recuerdan	10 (3.30)	10 (2.16)
Enterovirus No polio		
Positivo	26 (9.00)	18 (4.00)
Negativo	277 (91.00)	446(96.00)

En el grupo de casos un total de 26 muestras (9%) resultaron positivas para Enterovirus humano no polio mediante la prueba de qRT-PCR. El 73.08% de los casos positivos a Enterovirus humano no polio se presentó en niños, mientras que el 26.92% de niñas obtuvo resultados positivos; sin embargo

esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (Prueba de Chi-cuadrado, $P=0.054$), ver Figura 4.

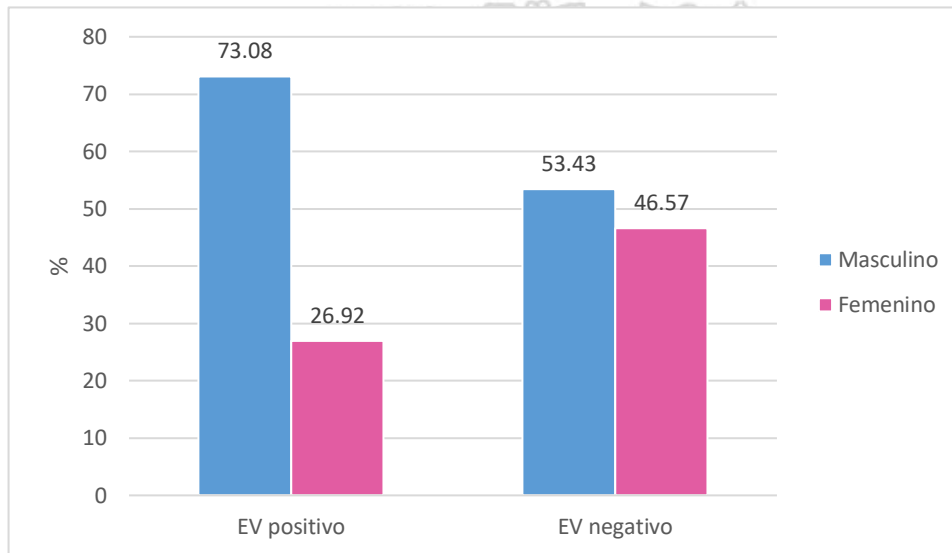


Figura 4. Porcentaje de Enterovirus humano no-polio en el grupo de casos de la población estudiada.

En el grupo de controles un total de 18 muestras (3.88%) tuvieron resultados positivos mediante la prueba de qRT-PCR. El 55.56% de los casos positivos a Enterovirus humano no polio se presentó en niños, mientras que el 44.44% de niñas obtuvo resultados positivos; sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. (Prueba de Chi-cuadrado, $P=0.826$), ver Figura 5

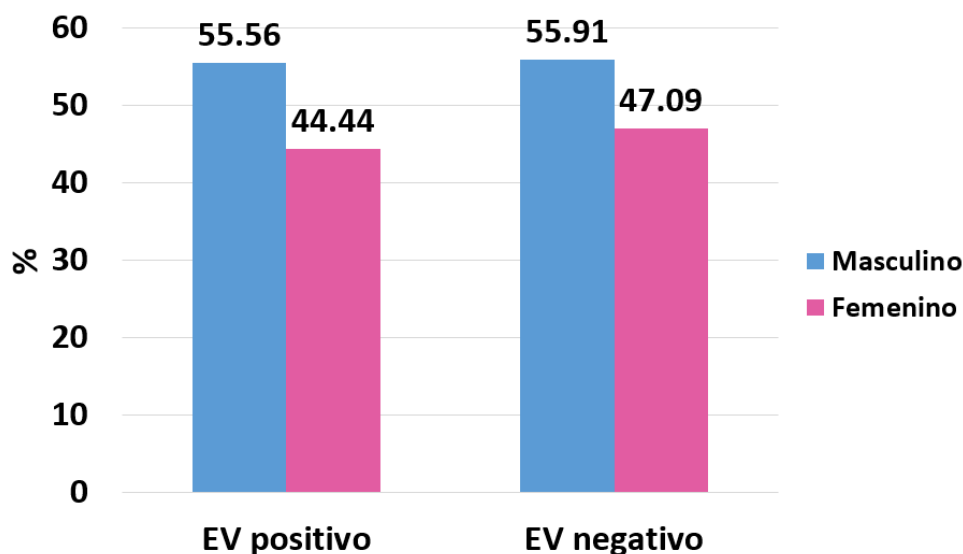


Figura 5. Porcentaje de Enterovirus humano no-polio separado por sexo en el grupo de controles de la población estudiada.

En el grupo de casos el rango de edad con mayor número de resultados positivos a Enterovirus humano no-polio fue en niños mayores de 6 meses y menor/igual de 2 años (9.82%, n=22). Mientras que no se presentó ningún positivo en el grupo mayores a 4 años.

En el grupo de controles el rango de edad con el mayor número positivos a Enterovirus humano no-polio fue en niños mayores de 6 meses y menor/igual de 2 años (5.76%, n=8).

Las muestras positivas para casos y controles fueron identificadas al 100% mediante la prueba de PCR convencional solo para la región UTR 5' ya que para la región VP2/VP4 solo amplificaron 5 muestras en el grupo de controles y 1 muestra en el grupo de casos. Los productos obtenidos se mandaron a secuenciar a Macrogen (Figura 6).

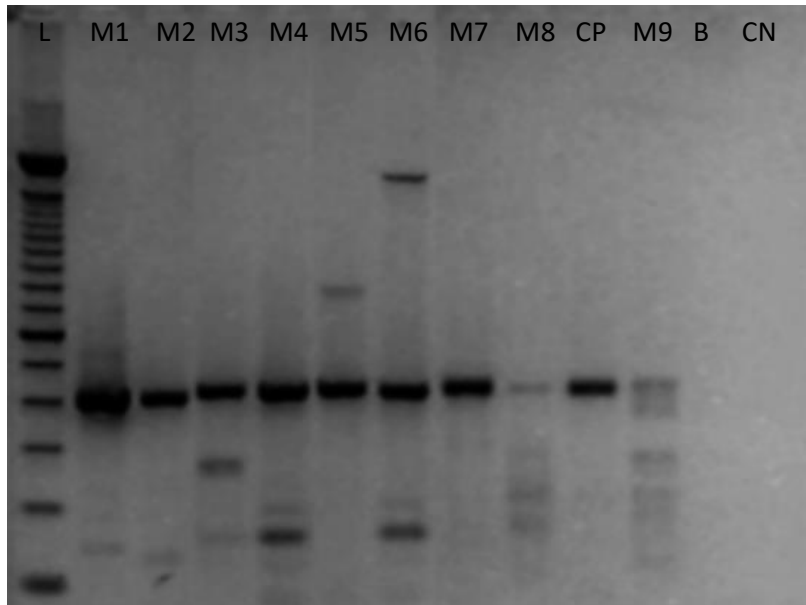


Figura 6. Productos de amplificación para secuenciamiento de la región UTR 5'. L: ladder 100 pb (pares de bases), M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 y M9: muestras. CP: control positivo. B: blanco. CN: control negativo.

Luego de obtener las secuencias estas fueron comparadas empleando el programa informático de alineamiento de secuencias (BLAST) de la página del NCBI. Mostrando la siguiente distribución Casos: Enterovirus humano A (n=3), Enterovirus humano C (n=6), Enterovirus humano B (n=6), Enterovirus humano D (n=1), Rinovirus humano A (n=6), Rinovirus humano C (n=4) y Controles: Enterovirus humano A (n=2), Enterovirus humano B (n=5), Enterovirus humano C (n=5), Rinovirus humano A (n=6), como podemos apreciar en la figura 7.

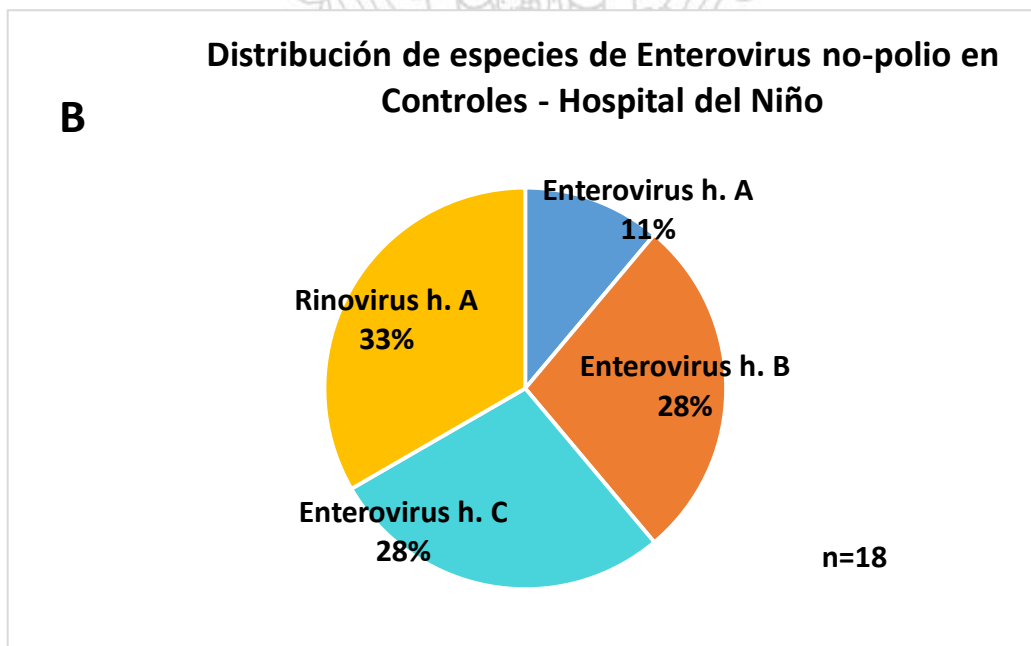
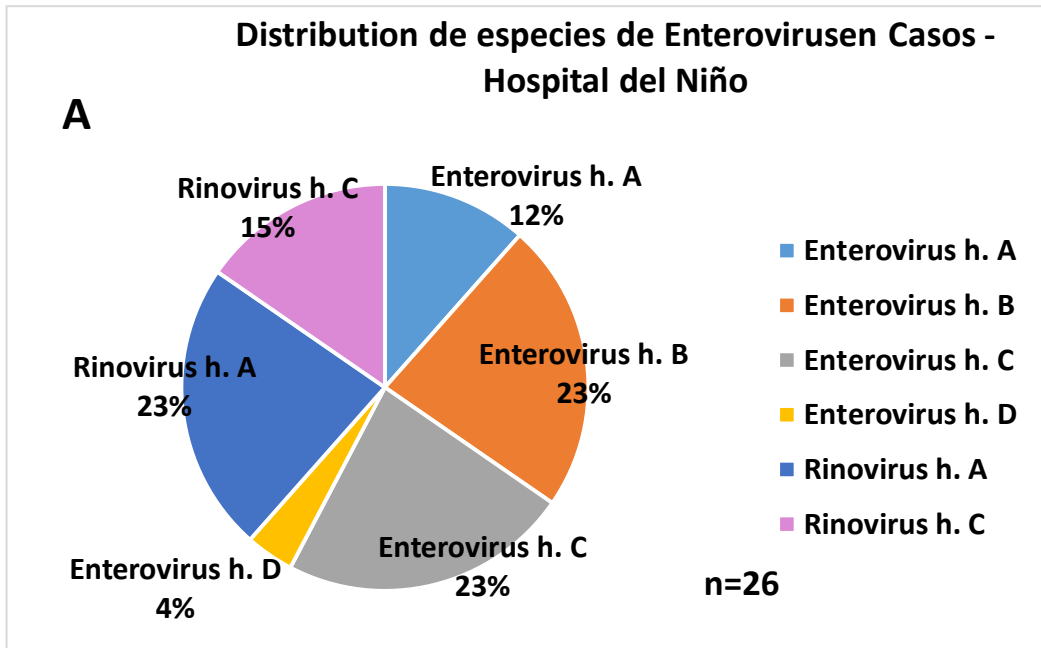
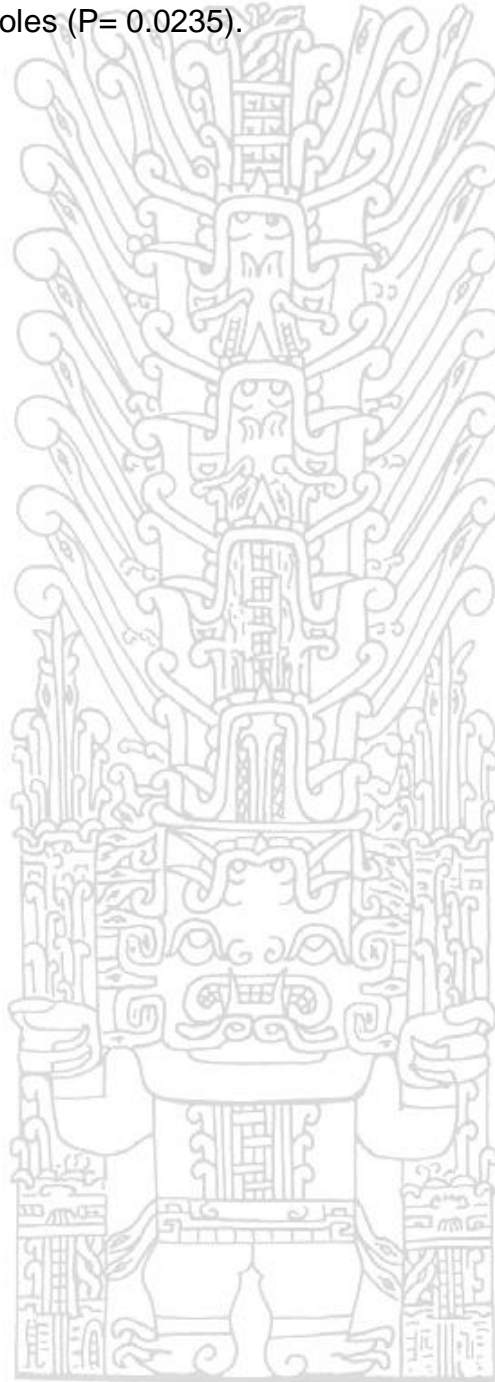


Figura 7. Distribución de especies de Enterovirus Humanos en casos y controles. A) La distribución de la especie encontrada en los casos fue: 23% H. Enterovirus B (n=6), 23% H. Rinovirus A (n=6), 23% H. Enterovirus C (n=6), 15% H. Rinovirus C (n=4), 12% H. Enterovirus A (n=3), 4% H. Enterovirus D (n=1). B) La distribución de las especies encontradas en los controles fue: 11% H. Enterovirus A (n=2), 28% H. Enterovirus B (n=5), 28% H. Enterovirus C (n=5), 33% H. Rhinovirus A (n = 6).

No se observó diferencias entre la prevalencia de Enterovirus humano A, B, C y D ni Rinovirus humano A entre casos y controles ($P > 0.05$). Sin embargo, en el caso de Rinovirus humano C la prevalencia fue mayor en casos que en controles ($P = 0.0235$).



CAPITULO V

DISCUSIONES

El presente estudio se realizó a partir de muestras de heces e hisopados rectales de niños menores de 5 años que llegaban a la unidad de rehidratación oral del Instituto Nacional del Niño, para conocer la asociación entre la gastroenteritis y algunas especies del genero enterovirus no polio, como posible agente causal.

La eficiencia obtenida de la curva estandar con cDNA fue de 96% a comparacion de la eficiencia reportada por Lu. que fue de 86%.

La asociación no significativa entre sexo y la presencia de enterovirus en el grupo de casos se puede deber a que hay un mayor número de niños y a un tamaño de muestra pequeño.

La edad en la cual hubo mayor numero de casos positivos y de controles positivos fue de 6 meses a 2 años por otro lado Patil et al., (2015) encontró un mayor número de casos positivos en el grupo de edad de 1 mes a 1 año, y en el grupo de controles encontro más positivos en el grupo de edad >1 año, esta deferencia sepuede deber a la diferencias en las categorizaciones de las edades y a que la mayoría de los niños del estudio eran mayores de 1 año.

La prevalencia de Enterovirus no-polio en casos y controles del Hospital del niño, Lima – Perú, fue diferente siendo un 9% en casos y 4% en controles, muy similar a lo descrito por Patil et al., (2015)

que reporto una prevalencia de 13.7% en casos y 4.9% en controles en niños hospitalizados por problemas de gastroenteritis en la India.

Enterovirus humano B fue el más prevalente con 23% del total de positivos en casos y el 28% del total de positivos en controles similar a lo reportado por Patil con la diferencia que se encontró más positivos en controles que en casos; sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

El género enterovirus no-polio presentó una asociación significativa con la gastroenteritis aguda similar a lo descrito por Patil et al., (2015).

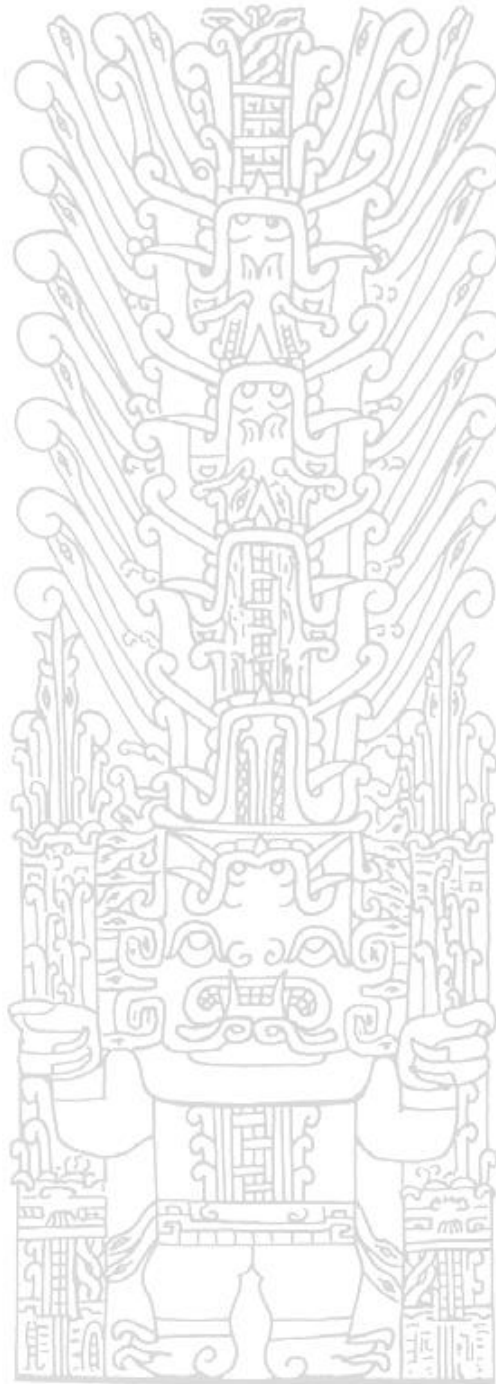
Enterovirus humano A, B y C no presentaron una asociación significativa con la gastroenteritis lo que difiere de lo publicado por Patil (2015) que determinó una asociación significativa.

Rinovirus C presentó una prevalencia de 1.3% en casos que difiere de lo publicado por Lau et al., 2012 que reportó una prevalencia de 15.4% en niños con gastroenteritis.

Se identificó Rinovirus humano C en muestras fecales en niños con gastroenteritis aguda sin sintomatología de infecciones respiratorias, estos resultados son similares a los reportados previamente en Hong Kong por Lau et al. 2012.

La región utilizada para la identificación de las especies de Enterovirus humano no polio fue la del 5' UTR a diferencia de la

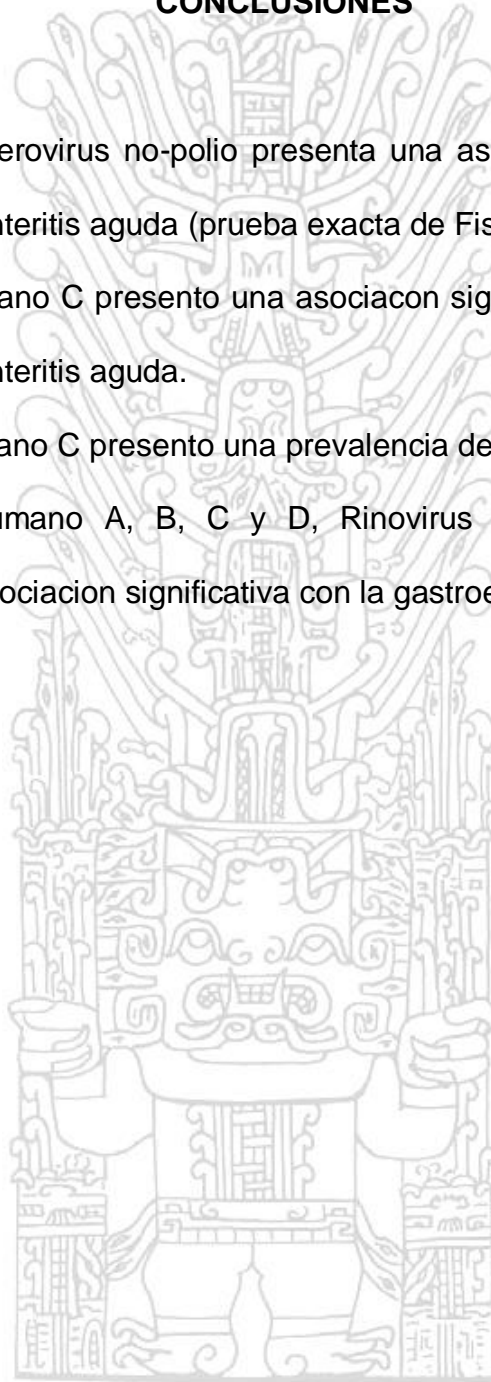
region utilizada por Patil (2015) que fue la del VP2 y VP1, ya que muy pocas muestras amplificaron para esta región VP2 y VP4.



CAPITULO VI

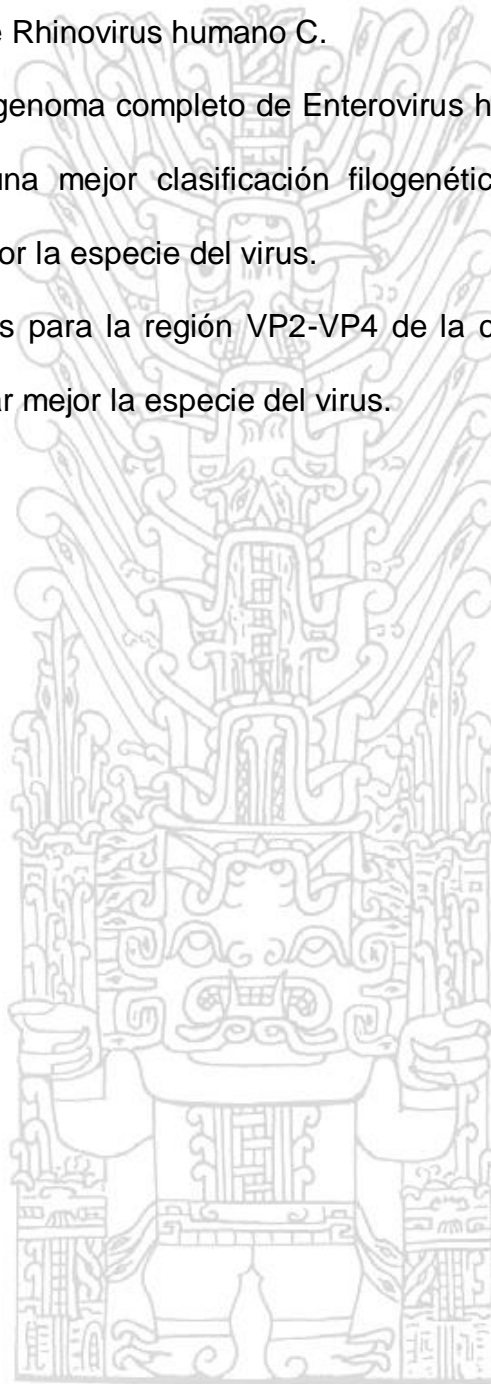
CONCLUSIONES

- El Genero Enterovirus no-polio presenta una asociacion significativa con la gastroenteritis aguda (prueba exacta de Fisher $P=0.0068$).
- Rinovirus Humano C presento una asociacion significativa ($P=0.0244$) con la gastroenteritis aguda.
- Rinovirus Humano C presento una prevalencia de 1.3%.
- Enterovirus humano A, B, C y D, Rinovirus humano A y B no presentaron asociacion significativa con la gastroenteritis aguda.



RECOMENDACIONES

- Evaluar si hay una asociación entre la severidad de la gastroenteritis y la presencia de Rhinovirus humano C.
- Secuenciar el genoma completo de Enterovirus humano no polio para poder hacer una mejor clasificación filogenética y con ello poder determinar mejor la especie del virus.
- Diseñar primers para la región VP2-VP4 de la cápside con el fin de poder identificar mejor la especie del virus.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2014;14(8):725–30.

Alvarado L. Gastroenteritis por norovirus en Lima. *Rev Med Hered*. 2012; 23(2): 137-138.

Bellido J. (2007). *Gastroenteritis agudas víricas* (6a ed., Vol. 6). España: EMISA.

Fleurat M., MD Singh A., MD. (2010, julio). *Pediatric Emergency Medicine Practice Acute Gastroenteritis — An Update*, 7(7), 1–21.

ICTV Virus Taxonomy. (n.d.). Retrieved January 9, 2017, desde <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>

Jacobs, S. E., Lamson, D. M., St. George, K., & Walsh, T. J. (2013). Human Rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 135–162. <https://doi.org/10.1128/CMR.00077-12>

Kosek, M., Yori, P. P., Pan, W. K., Olortegui, M. P., Gilman, R. H., Perez, J., ... Hall, E. (2008). Epidemiology of Highly Endemic Multiply Antibiotic-Resistant Shigellosis in Children in the Peruvian Amazon. *Pediatrics*, 122(3), e541–e549. <http://doi.org/10.1542/peds.2008-0458>.

Knipe, D. M., & Howley, P. M. (Eds.). (2013). *Fields virology* (6th

ed). Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.

Lau, S. K. P., Yip, C. C. Y., Lung, D. C., Lee, P., Que, T.-L., Lau, Y.-L., Yuen, K.-Y. (2012). Detection of human rhinovirus C in fecal samples of children with gastroenteritis. *Journal of Clinical Virology*, 53(4), 290–296. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.01.008>.

Linsuwanon, P., Payungporn, S., Samransamruajkit, R., Posuwan, N., Makkoch, J., Theanboonlers, A., & Poovorawan, Y. (2009). High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease. *Journal of Infection*, 59(2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.05.009>

Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., others. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet*, 379(9832), 2151–2161.

Lu, X., Holloway, B., Dare, R. K., Kuypers, J., Yagi, S., Williams, J. V., Erdman, D. D. (2008). Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Comprehensive Detection of Human Rhinoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 533–539. <http://doi.org/10.1128/JCM.01739-07>

OMS | Enfermedades diarreicas. (s/f). Recuperado el 8 de

noviembre de 2015, a partir de

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>

Patil Pooja R., Chitambar Shobha D., & Gopalkrishna V. (2015). Molecular Surveillance of Non-Polio Enterovirus Infections in Patients with Acute Gastroenteritis in Western India: 2004–2009, 83, 154–161. <http://doi.org/10.1002/jmv.23992>.

Rovida, F., Campanini, G., Piralla, A., Adzasehoun, K. M. G., Sarasini, A., & Baldanti, F. (2013). Molecular detection of gastrointestinal viral infections in hospitalized patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(3), 231–235. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.020>.

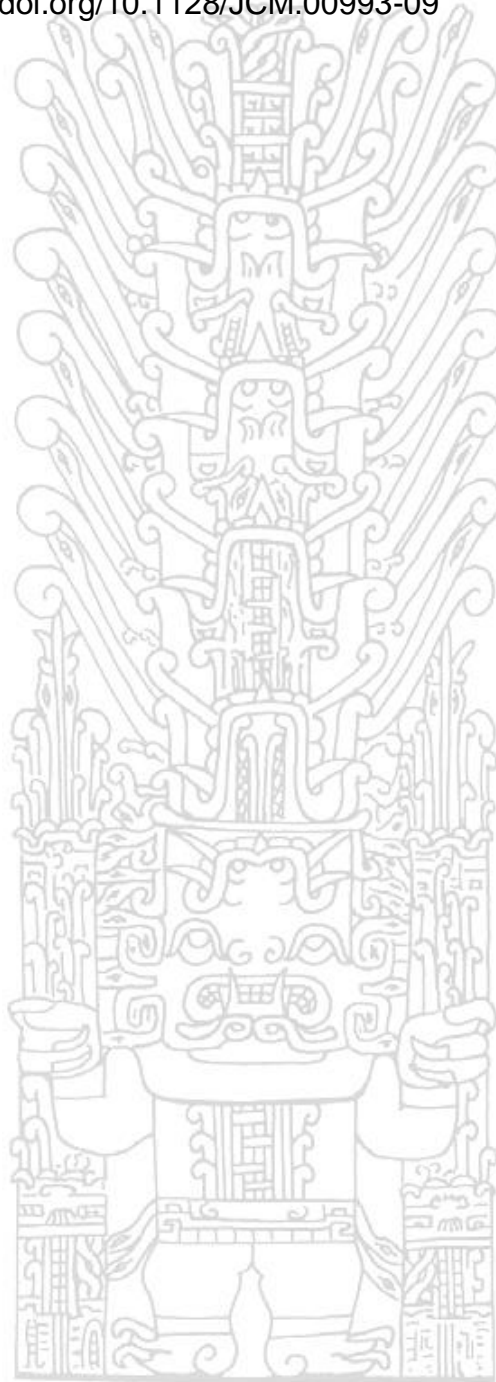
Sharia M Ahmed, Aron J Hall, Anne E Robinson, Linda Verhoef, Prasanna Premkumar, Umesh D Parashar, Marion Koopmans, Benjamin A Lopman. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis, 14, 725–30. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4)

ViralZone: Enterovirus. (n.d.). Retrieved January 9, 2017, from http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html

Wisdom, A., Leitch, E. C. M., Gaunt, E., Harvala, H., & Simmonds, P. (2009). Screening Respiratory Samples for Detection of Human Rhinoviruses (HRVs) and Enteroviruses: Comprehensive VP4-VP2 Typing Reveals High Incidence and

Genetic Diversity of HRV Species C. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 3958–3967.

<http://doi.org/10.1128/JCM.00993-09>



ANEXOS

ANEXO A. Condiciones de qPCR para la detección de Enterovirus

TABLA 1 Secuencia y localización de cebadores y sonda para la detección y genotipificación de Enterovirus humano.

Nombre del cebador	Secuencia 5' --> 3'	Región que amplifica	Ubicación	Tamaño del producto
Primer, forward	CYAGCCTGCGTGGC	5'-UTR	356-369	207 pb
Primer, reverse	GAAACACGGACACCCAAAGTA		444-465	
Sonda	5'-FAM-TCCTCCGGCCCCCTGAATGYGGC-BHQ-3'		563-543	
Sentido externo	CCGGCCCCTGAATGYGGCTAA		458-478	651 pb
Antisentido interno	TCWGGHARYTTCCAMCACCANCC	VP2-VP4	1087-1109	
Sentido interno	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	UTR 5'	166-186	400 pb
Antisentido interno	GAAACACGGACACCCAAAGTA		566-546	