

Prevalencia de *Norovirus* en muestras de heces procedentes del laboratorio del Hospital José Gregorio Hernández. Catia, Caracas

Llumey Martínez Chang ¹, Noel Silva ², Nirsén García ², Ana Monzón de Orozco ³

RESUMEN

La gastroenteritis en Venezuela es la principal causa de muerte y morbilidad en la población infantil. La falta de adecuadas metodologías diagnósticas en el laboratorio de rutina impide identificar todos los posibles microorganismos causantes de gastroenteritis enfocando el diagnóstico al estudio de parásitos protozoarios o helmintos, bacterias aeróbicas y en menor grado virus y hongos. Basado en esto, decidimos determinar si el *norovirus* es el agente causal de gastroenteritis en nuestro país, determinar las condiciones ambientales y sanitarias en la comunidad en estudio y analizar los esquemas y técnicas diagnósticas actualmente utilizadas en los centros de salud. Se evaluaron 173 muestras de heces de pacientes que asistieron al laboratorio del Hospital Magallanes de Catia. Se utilizó un kit de inmunoensayo enzimático, ELISA RIDASCREEN *norovirus* de r-biopharm AG, Alemania, el cual permite el diagnóstico *in vitro* e identificación cualitativa de los *norovirus* genogrupo I y II en muestras de heces. De las 173 muestras de heces analizadas 29 (16,76%) resultaron positivas, 144 (83,32%) fueron negativas. Cuando se evaluaron por grupo etario, el grupo de niños de 6 - 13 años se obtuvo el mayor número de muestras positivas (8) seguido del grupo de niños 0 - 5 años con 7 muestras positivas. Se encontró mayor frecuencia de *norovirus* en muestras con aspecto heterogéneo, color marrón y verde de consistencia blanda y alcalina, así mismo 19,08% de las muestras fueron positivas para algún parásito (Protozoario o Helmintos) visibles en el examen microscópico directo. Se demostró que 16,76% de las diarreas en el grupo evaluado fueron por *norovirus*, siendo importante su determinación para el diagnóstico de gastroenteritis.

Palabras clave: *Norovirus*, gastroenteritis, análisis de heces.

The prevalence of the *Norovirus* in fecal samples which originated at the laboratory of the Hospital José Gregorio Hernández. Catia, Caracas

SUMMARY

Gastroenteritis is the main cause of death and morbidity among children in Venezuela. The lack of adequate diagnostic methodologies in the laboratory reduce the identification of all possible microorganisms that cause gastroenteritis, since they focus the diagnosis on the study of parasites, protozoa or helminthes, aerobic bacteria and, to a lesser degree, on viruses and fungi. Based on this, we decided to determine if the *norovirus* is the causal agent of gastroenteritis in our country; to determine the environmental and sanitary conditions in the community under study; and, to analyze the diagnostic framework and techniques currently used in healthcare centers. 173 fecal samples of patients that visited the laboratory of the Hospital Magallanes in Catia were evaluated. An enzymatic immunoassay kit, ELISA RIDASCREEN *norovirus* of r-biopharm AG, Germany, was used since it permits the *in vitro* diagnosis and the qualitative identification of the *norovirus* genogroups I and II in fecal samples. Of the 173 stool samples analyzed, 29 (16.76%) tested positive, 144 (83.32%) tested negative. When evaluated by age group, the group of children between 6-13 years old presented the greatest number of positive samples (8), followed by the group of children between 0-5 with 7 positive samples. The highest frequency of *norovirus* was found in samples of heterogeneous appearance, brown-green color, soft and alkaline consistency; also, 19.08% of the samples tested positive for some type of parasite (Protozoa or Helminthes), visible with direct microscopic examination. So, we can conclude that it was shown that 16.76% of the diarrheas in the evaluation group were due to *norovirus*, its determination being important for the diagnosis of gastroenteritis.

Key words: *Norovirus*, gastroenteritis, fecal analysis, stool analysis.

1. Laboratorio del Hospital José Gregorio Hernández.

2. Laboratorio de Producción y Control de Calidad Corpodiagnostica C.A.

3. Instituto de Oncología y Hematología. Universidad Central de Venezuela.

Introducción

Las Gastroenteritis en Venezuela constituyen hoy en día, el principal problema al cual se enfrenta todo el sector de salud, debido a que es la principal causa de muerte y morbilidad en la población infantil nacional, y siendo esta la más sensible y de mayor importancia para el presente y futuro de un país, se establece la necesidad de investigar y actuar de forma expedita para lograr el control de la situación en el más corto de los plazos posibles.

Es un hecho notable que la mayoría de los diagnósticos de gastroenteritis que se realizan en nuestro país, son adjudicados a agentes etiológicos y/o causas desconocidas; esto se debe principalmente a la carencia de técnicas científicas y enfoques diagnósticos competentes, en los laboratorios clínicos de los principales centros de salud públicos y privados de nuestro país, los cuales difieren enormemente de lo observado en países desarrollados como Alemania, Estados Unidos de Norte América y Japón, entre otros.

La falta de adecuadas metodologías y tecnologías diagnósticas en el laboratorio de rutina, capaces de incluir a todos los posibles microorganismos causantes de gastroenteritis, es lo que no permite una identificación específica de el o los principal (es) agente (s) causal (es) de gastroenteritis, aumentando aún más la prevalencia de gastroenteritis en nuestro país, al imposibilitar la implantación de campañas epidemiológicas de mayor efectividad, como las que se observan en aquellas patologías en donde se diagnóstica de forma correcta el agente causal por ejemplo: Dengue, Malaria, Tuberculosis, Fiebre Amarilla, entre otras, en la cual se evidencia un mayor y coordinado esfuerzo sanitario en la prevención, diagnóstico y control de su prevalencia e incidencia.

Considerando estos hallazgos, y conociendo que hasta el momento la documentación existente en nuestro país en el área es limitada y no muy promocionada, nos abocamos al estudio y evaluación de la prevalencia del *norovirus* en la población asistente a la consulta externa del Laboratorio Clínico del Hospital José Gregorio Hernández en Caracas, Venezuela durante el período correspondiente a los meses Julio y Agosto de 2005.

Seleccionamos al *norovirus*, como el agente etiológico de estudio en nuestra investigación, por ser actualmente el principal virus causante de brotes de gastroenteritis a nivel mundial reportado.

Este trabajo busca contribuir a la base de datos que se está desarrollando en nuestro país, no sólo con el estudio de *norovirus*, sino también con investigaciones orientadas al estudio de *rotavirus*, *adenovirus* y *astrovirus* como agentes etiológicos virales causantes de gastroenteritis.

Las gastroenteritis se definen como una inflamación aguda del estómago y de los intestinos grueso y delgado; están mayormente asociadas a malas condiciones higiénicas, hacinamiento y desnutrición. Las gastroenteritis son particularmente importantes entre la población infantil, debido a que los niños son más susceptibles a la deshidratación y tienen escasas reservas calóricas, al igual que un sistema inmune no desarrollado en su totalidad. Dentro de los síntomas de la gastroenteritis se encuentra la diarrea (1). La diarrea se define como la presencia de tres o más deposiciones anormalmente líquidas con o sin sangre en un día, según la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2005). En Venezuela se estima que anualmente ocurren aproximadamente 1,32 millones de casos de diarreas (1). Entre los años 1997 al 2002, las diarreas han representado el 39.9% de las causas de muerte en niños menores de 5 años en Venezuela (2). Las gastroenteritis pueden ser causadas por diversos agentes etiológicos tales como virus, bacterias o parásitos. La OMS establece a los patógenos virales como la causa más común de gastroenteritis; entre los principales agentes virales tenemos a: los *rotavirus*, *adenovirus*, *astrovirus*, y *norovirus* (3).

Los *norovirus* (NVs), anteriormente llamados Norwalk-like Virus (NLV) forman parte de la familia *Caliciviridae*, y actualmente son considerados como los principales agentes virales asociados a brotes de diarreas no bacterianas (4,5).

Según un informe de la OMS sobre el estado actual de las infecciones alimentarias en países de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) y presentado el año 2.004, indica que entre los años 1.995 y 2.000 más del 85% de todos los brotes de gastroenteritis registrados en Europa fueron debidos a la presencia de *norovirus* (6-8).

El nombre *norovirus* se asigna a un grupo de virus patógenos al humano, que morfológicamente se presentan como partículas pequeñas de estructura redonda (SRSVs: Small Round Structured Viruses). Estos últimos obtuvieron su nombre debido a la típica estructura de su superficie similar a cálices alineados (latín: calix = cáliz). Hoy en día los *norovirus* están clasificados dentro de la familia *Caliciviridae* (10).

Como sabemos el único reservorio natural de los *norovirus* son los seres humanos, y las sustancias eliminadas por el organismo continuamente retornan el virus al ambiente, contaminando por esta vía los alimentos que constituyen la cadena alimenticia (11).

Recientes estudios, utilizando biología molecular, han confirmado que el 50% de los voluntarios expuestos al *norovirus* son susceptibles a contraer la infección y aproximadamente el 80% de estos son asintomáticos (16).

El tiempo de incubación para la presentación de los síntomas luego de la infección, oscila entre 6 y 48 horas con una dosis de infección de sólo 100 partículas virales, y por ser ésta extremadamente baja, brinda las condiciones idóneas para una propagación muy efectiva de persona a persona (9).

Las personas infectadas con el *norovirus* pueden transmitir el virus desde el momento en que aparecen los primeros síntomas de la infección hasta aproximadamente 3 días posteriores a su recuperación. Algunas personas pueden llegar a ser transmisoras del virus por un período más largo de hasta 2 semanas después de su recuperación clínica (12).

Es importante destacar, que las infecciones con *norovirus* no son tratadas con antibióticos; ya que, no existen medicamentos que actúen en contra de los virus entéricos, y el único tratamiento recomendado durante la infección consiste en la rehidratación oral con fluidos (agua o jugos) (15).

Recientemente se desarrolló una prueba de ELISA (Enzyme Ligand Immuno Sorbent Assay), actualmente disponible en el mercado; el test RIDASCREEN® *norovirus* ELISA fabricado por r-biopharm AG, Alemania. Ridascreeen *norovirus* ELISA, el cual utiliza una metodología diagnóstica más rápida y sencilla de tamizaje, que nos posibilita una detección altamente específica de *norovirus* de ambos genogrupos (GI y GII) (17).

Este inmunoensayo ha sido validado internacionalmente al ser comparado con técnicas de PCR en Alemania, Reino Unido y más recientemente en Venezuela (17,18).

La sensibilidad y especificidad obtenida del ensayo RIDASCREEN®, usando PCR como prueba de gold estándar, fue de un 95.6% respectivamente (19).

Los métodos actuales de ELISA que determinan la presencia del antígeno, representan una buena solución. Su límite de detección es, de 105 partículas por ml de muestra de heces, mejor que el de la microscopía electrónica y, sin embargo, inferior al de la PCR. Funciona para el análisis de muestras de heces de personas clínicamente enfermas (vómitos y/o diarrea), en las que, por regla general suele haber una carga viral suficiente (105 partículas/ml), no supone ningún problema (20-22).

Otra ventaja de la prueba de ELISA reside en la posibilidad de realizar análisis de un gran número de muestras en poco tiempo y a unos costos razonables. Además, el ELISA se muestra menos susceptible ante modificaciones en los antígenos a analizar (proteínas cápsides) que las estructuras objetivo en la PCR (secuencia básica de los genes). En este último caso, mutaciones puntuales individuales conducen a una no conjugación repentina de los *primers* con su secuencia objetiva definida. Mutaciones puntuales de ese tipo no se producen; sin

embargo, modificaciones perjudiciales inmediatas en los epítomos de la cápside del virus, no son importantes para el método ELISA, de forma que los anticuerpos utilizados en ELISA pueden, sin pérdida de eficacia, absorber el antígeno aunque a nivel de genomas hayan transcurrido previamente mutaciones perjudiciales para el análisis por PCR (16,23,24).

El *norovirus* se presenta como uno de los principales agentes etiológicos responsables de gastroenteritis en muchos países tales como EEUU, Alemania, Japón, Suecia y otros; sin embargo, sólo hasta hace un par de años se encuentra disponible una metodología diagnóstica inmunoenzimática (EIA) para *norovirus* (Prueba de ELISA) aplicable a la mayoría de los Laboratorios Clínicos y Centros de Investigación del país; la cual, a diferencia de la microscopía electrónica y el PCR, no requiere de costosa instrumentación, capacitación especial del personal ni de condiciones de trabajo específicas para su realización.

Entonces, al estar disponible una prueba comercial tipo ELISA de rápida elaboración, se posibilita la detección de los *norovirus* en los Laboratorios Clínicos de rutina del país, reportando el resultado obtenido en pocas horas, y por otro lado, dependiendo de la importancia que se le determine a los *norovirus* dentro del cuadro de agentes causales de diarrea en Venezuela, se puede contribuir a aumentar la sensibilidad diagnóstica de la investigación de gastroenteritis en el país, incluyendo la investigación de *norovirus* en el proceso, y finalmente contribuir a la disminución del elevado número de resultados negativos reportados diariamente en las muestras de heces en nuestros laboratorios de los distintos Centros de Salud.

La prevalencia de una enfermedad es el número de casos que presentan la enfermedad, dividido por el número de individuos que componen la población en un determinado momento. Es un parámetro útil porque mide la frecuencia de la enfermedad, y es de gran ayuda para los médicos al calcular la probabilidad de alcanzar ciertos diagnósticos (9).

Basados en estos hallazgos decidimos:

1. Determinar la importancia de *norovirus* como agente etiológico causante de gastroenteritis, en pacientes que asisten a la consulta externa del Laboratorio Clínico del Hospital José Gregorio Hernández durante el período correspondiente a los meses Julio y Agosto de 2005.
2. Determinar si las condiciones ambientales y sanitarias presentes en la comunidad en estudio, proporcionan condiciones que permitan al *norovirus* pasar de un agente productor de brotes de diarreas a un residente permanente.
3. Analizar los esquemas y técnicas diagnósticas actualmente utilizados en nuestros centros de salud, verificando la posibilidad de inclusión de nuevas y modernas técnicas de enfoque adaptables a los distintos laboratorios que conforman la red nacional.

Materiales y métodos

Población a estudiar

Se estudiaron 173 muestras de heces de pacientes que asistieron a la consulta externa de laboratorio clínico del Hospital José Gregorio Hernández.

1. Recolección e identificación de las muestras de heces:

Las muestras de Heces fueron llevadas por los pacientes asistentes a la consulta externa del Laboratorio Clínico del Hospital José Gregorio Hernández en recolectores de heces plásticos. Una vez recibidas, se identificaron y se llenó una boleta con el nombre completo del paciente, la edad, sexo y la fecha de recepción de la muestra.

2. Registro de los datos demográficos:

Los datos demográficos de los pacientes, edad, sexo y procedencia, se registraron a partir de las boletas llenadas al momento de la recepción de las muestras de heces en el Laboratorio Clínico.

3. Registro de las características macroscópicas y microscópicas de las muestras de heces:

En el momento de la recepción de la muestra se tomó nota del color, el aspecto Homógeno o Heterógeno de las heces, se indicó la reacción ácida o alcalina utilizando una tira de papel tornasol indicadora de pH y por último se realizó una observación microscópica directa en porta objetos de vidrio utilizando solución salina y lugol como diluyente (18).

4. Transporte y preservación de las muestras de heces:

El transporte de las muestras de Heces desde el Hospital al laboratorio fue llevado a cabo en envases plásticos herméticos dentro de una cava refrigerada (2-8°C) y fueron preservadas en un congelador a (-20°C) hasta el momento de su procesamiento (19).

5. Tratamiento de las muestras de heces:

Las muestras de heces se diluyeron 1/6 (V/V) con el buffer diluyente suministrado por el kit. Este diluyente está constituido por 75 mM de buffer fosfato ajustado a un pH 7.4, el cual viene listo para usar.

Se Tomó 0.1 mL de muestra de heces líquidas en una pipeta Pasteur o en el caso de que las muestras que eran sólidas se tomó una alícuota equivalente a 100 mg y se mezcló con 0.5 mL del buffer diluyente. Las muestras fueron centrifugadas a 2000-2300 G y se utilizó 100 µl del sobrenadante de la muestra para la realización de la prueba.

6. Preparación del buffer de lavado:

Se diluyó 1/10 (con agua destilada) la solución concentrada de Buffer de lavado incluida en el kit, la cual contiene 0.1% Thimerosal a un pH 7.2.

El buffer de lavado ya diluido tiene un período de duración de 4 semanas a una temperatura entre 2-8°C.

7. Procesamiento de las muestras de heces:

La metodología utilizada para la detección de *norovirus* es un ensayo inmunoenzimático denominado ELISA RIDASCREEN® *norovirus*, de la casa comercial r-biopharm AG (Germany),

el cual permite el diagnóstico *in vitro* mediante la identificación cualitativa de los *norovirus* genogrupo I y II en muestras de heces.

En la superficie de los micropozos se encuentran fijados anticuerpos monoclonales provenientes de ratón en contra la cápside del antígeno NLV específico para ambos genogrupos. Las muestras, el control positivo (antígeno recombinante de *norovirus*) y el control negativo (solución Buffer de NaCl) se pipetea al interior de los pozos y posteriormente son incubados (para la fijación de las partículas virales) a temperatura ambiente por 60 minutos y de esta manera se favorece la interacción entre el anticuerpo específico NLV y los antígenos presentes en las muestras de heces.

Seguidamente se realiza el paso de lavado (punto decisivo en la prueba) que se inicia con una aspiración o decantación de todo el contenido de los micropozos de la placa, seguido por la colocación del buffer de lavado, proceso que se repite 5 veces. Posteriormente se añaden a los pozos anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) y se incuban a temperatura ambiente durante un período de 60 minutos. Se cubre la placa de Elisa con papel parafina para evitar pérdida de muestras y/o controles por evaporación durante el período de incubación. Una vez cumplido el período de incubación realizamos nuevamente el proceso de lavado.

Si el *norovirus* esta presente, éste se encuentra capturado entre los anticuerpos fijados en la fase sólida del pozo.

Posteriormente, se agrega 100 µl del conjugado enzimático a los pozos de la placa que contienen muestras y/o controles y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se repite el paso de lavado nuevamente. El conjugado-HRP que no fue unido es removido por el lavado.

Seguidamente, se agregan 100 µl de sustrato en cada pozo para la formación del componente coloreado. Se recubre la placa y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura.

La enzima unida a los pozos convierte el color del sustrato/cromógeno a un color azul. Seguida la última incubación, la reacción se detiene al agregar 1 gota de solución de parada (ácido clorhídrico 1N) en cada micropozo. Al agregar la solución stop se convierte el color azul en amarillo por el cambio del pH efectuado.

Finalmente, la D.O. (Densidad Óptica) se mide a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración del antígeno en la muestra de heces.

En cada corrida realizada se procesaron 10 muestras controles, cuya negatividad fue previamente confirmada por PCR, las cuales se consideraron como controles negativos verdaderos; así mismo, se corrió un pool de muestras positivas también confirmadas por PCR³ para garantizar la capacidad de detección de los kits utilizados.

8. Análisis del procesamiento de las muestras de heces y controles: Tanto el control positivo como el control negativo se procesaron cada vez que se realizó el inmunoensayo, para verificar la estabilidad de los reactivos y el correcto desarrollo del procedimiento.

La corrida se consideró correcta si la D.O.^{405 nm} del control negativo era menor a 0.20 y la D.O.^{405 nm} y para el control positivo que fuese mayor de 0.5 D.O.^{405 nm} 19.

9. Cálculos del cut-off o punto de corte: El cut-off lo determinamos al adicionar 0.15 unidades de absorbancia al valor obtenido del control negativo, tal como lo indica el inserto del fabricante.

Cut-off = valor de absorbancia del control negativo + 0.15

10. Interpretación de los resultados obtenidos: Las muestras se consideraron positivas si los valores de absorbancia eran mayores al cut-off calculado; las muestras negativas fueron aquellas que tenían valores de absorbancia menores al valor del cut-off calculado.

Aquellas muestras que tuvieron valores de absorbancia dentro del rango correspondiente a un 10% mayor o menor al valor del cut-off calculado, no se consideraron claramente como positivas o como negativas sino más bien como indeterminadas. Estas muestras fueron procesadas nuevamente.

Resultados

Resultados de los controles de calidad de las corridas de ELISA

Como control de calidad para la metodología aplicada, se procesaron conjunto a cada corrida, 10 micropozos con un pool de muestras positivas y negativas para *norovirus*, confirmadas previamente por PCR; de estos se obtuvieron 80 resultados positivos y 80 resultados negativos, obteniendo así un 100% de reproductibilidad en ambos casos. (Se realizó 8 tandas de corridas de muestra).

Además, se procesaron los controles positivos y negativos incluidos en el kit de ELISA para cada corrida, calculándose el cut-off y obteniéndose resultados dentro del rango establecido.

Tabla 1. Resultados obtenidos de los pool de muestras controles (Pool de muestras positivas y Pool de muestras negativas, suministradas gentilmente por el Laboratorio de Biología de Virus del IVIC) (18).

Pool de muestras control.	Resultados obtenidos positivos (+)	Resultados obtenidos negativos (-)	Porcentaje de acierto (%)
1. Positivas	80	0	100
2. Negativas	0	80	100

Resultados previamente confirmados por PCR.

Todo esto nos indica que los resultados obtenidos están dentro de las especificaciones técnicas del fabricante y que además los kits que se utilizaron para la realización del trabajo muestran un correcto funcionamiento y capacidad de detección.

La sensibilidad y especificidad del kit RIDASCREEN® *norovirus* de r-biopharm AG, Alemania es de 95,0% respectivamente según lo reporta el inserto del mismo al compararlo con estudios de PCR; así mismo, se determinó un valor predictivo positivo de 93,8% y negativo de 96,1%

Asumimos que nuestros resultados son válidos hasta los límites que presenta la técnica utilizada, en este caso del kit RIDASCREEN® *norovirus* de r-biopharm AG, Alemania (14).

Prevalencia de la infección de *norovirus* en la población en estudio

Durante la realización de este trabajo de investigación se analizaron un total de 173 muestras de heces, de las cuales se obtuvieron 29 resultados positivos para *norovirus* y 144 negativos, correspondientes a un 16.76% y un 83.32% respectivamente del total de las muestras Tabla 2.

Se determinó un 16,76% de prevalencia para *norovirus* en la población en estudio para el período de tiempo seleccionado.

Tabla 2. Resultados positivos y negativos para *norovirus* del total de muestras de heces analizadas.

Muestras	Casos (n)	Porcentaje (%)
Positivas	29	16.763
Negativas	144	83.236
Total	173	100

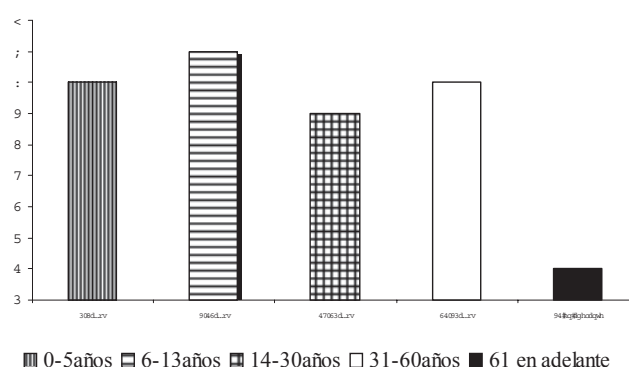


Figura 1. Distribución de muestras positivas para *norovirus* de acuerdo a la edad.

Observamos que el grupo etario con mayor número de casos positivos para *norovirus* es el comprendido por niños entre los 6-13 años, del cual obtuvimos 8 muestras positivas.

Seguidamente el grupo correspondiente por niños entre 0-5 años, en donde encontramos 7 muestras de heces positivas para *norovirus* en igual proporción que el grupo de adultos de 31-60 años. Posteriormente 6 muestras de heces positivas a *norovirus* correspondientes al grupo de adultos entre 14-30 años; y finalmente se presentó 1 sola muestra de heces positiva para *norovirus* en pacientes mayores de 61 años.

Como se puede visualizar en la Figura 1, el virus no presenta una especial predilección por grupo etario, aunque se destaca, que en los adultos mayores de 61 años sólo encontramos un caso, esto pudiese ser circunstancial y obedecer a las características del periodo de tiempo y a la población escogida para el estudio; sin embargo, la realización de trabajos complementarios con mayor número de pacientes, contribuiría a dilucidar aún más en el grupo etario de mayor riesgo para la infección.

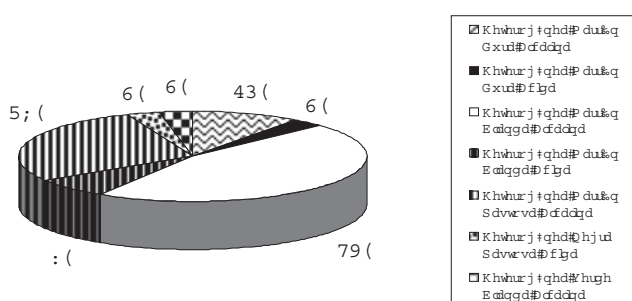


Figura 2. Distribución porcentual de las características macroscópicas provenientes de resultados positivos para *norovirus*.

Al realizar el examen Macroscópico de las muestras de heces en estudio, se encontró una mayor frecuencia de *norovirus* en muestras con aspecto heterogéneo, color marrón y verde, de consistencia blanda y de reacción alcalina. Todas estas características sumadas ocupan el 74% de los casos estudiados.

Co-infección de *norovirus* con otros parásitos (Protozoarios y/o Helmintos)

De las 173 muestras de heces analizadas, se encontró que un 19,08% fueron positivas para algún tipo de parásito (Protozoarios y/o Helmintos) visibles en el examen microscópico directo.

Por otra parte observamos, que del 16,76% de las muestra positivas, un 14,59% fueron positivas únicamente para *norovirus*, un 4,16% de las muestras fueron positivas para *norovirus* y *Blastocystis hominis*; un 0,69% de las muestras fueron positivas a *norovirus* concomitantes con *chylomastix mensili* y por último un 0,69% de las muestras fueron positivas a *norovirus* y a Blastosporas.

Tabla 3. Resultados positivos y negativos para algún tipo de parásito (Protozoarios y/o Helmintos identificables en el examen microscópico directo).

Presencia de parásitos	Casos (n)	%
Positivos	33	19,08
Negativos	144	80,92
Total	173	100

Discusión

I. La prevalencia de *norovirus* encontrada en las muestras de heces de pacientes que asisten a la consulta externa del Laboratorio Clínico del Hospital José Gregorio Hernández, fue de 29 muestras positivas para el virus, correspondientes a un 16,76%, de un total de 173 muestras analizadas durante el periodo de estudio seleccionado.

Queda claro que a través de la realización de este trabajo de investigación, determinamos que el *norovirus* constituye un importante agente etiológico causante de gastroenteritis en la población seleccionada para el estudio durante el tiempo que duro el mismo.

Dado que esta población la podemos considerar como representativa de un importante sector de la población Venezolana que vive en condiciones similares en todo el país, conjuntamente con el hecho de que los cambios climáticos en la región (temperatura, humedad, lluvias, etc.) no varían de forma significativa a lo largo del año, planteamos la posibilidad de que el *norovirus* pudiese estar presente en otras comunidades de condiciones parecidas, de la similar forma en la cual lo hemos hallado en nuestra investigación.

Es bien conocido que actualmente en Venezuela, las características demográficas de una población como la residente en los Magallanes de Catia, representan las condiciones en las que habitan por lo menos el 80% de la población; también podemos percibir que en muchas otras comunidades, se empeoran las condiciones higiénicas y facilidades sanitarias, como es el caso de muchas barriadas populares de los estados más pobres del interior del país.

Entonces, un agente viral altamente contagioso como el *norovirus*, podría encontrar en nuestras barriadas populares el medio de cultivo y supervivencia ideal, para generar brotes que trasciendan la barrera de lo esporádico, y convertirse así en un residente permanente generador de gastroenteritis en nuestra población.

Si añadimos el hecho de que los virus en general son mas resistentes a los cambios del entorno ambiental que las bacte-

rias, los parásitos protozoarios y los helmintos, y que en particular, el *norovirus* presenta una muy marcada variabilidad genética que le hace mucho mas efectivo para la infección y producción de gastroenteritis de forma reincidente, encontramos allí otras razones que fortalecen nuestra posición de que el *norovirus* está jugando actualmente un papel muy importante en la salud pública de nuestro país, adquiriendo mucho mas relevancia que otros agentes etiológicos de gastroenteritis no virales.

Otro factor que no debemos dejar a un lado, es el hecho comprobado de que los *norovirus* infectan animales con mucha frecuencia. Tal es el caso del cerdo.

Este factor de infección exitosa en otras especies, trae la posibilidad de adquirir el *norovirus* a partir de fuentes no humanas.

Es muy probable, dada la alta variabilidad genética de los *norovirus*, que estas partículas virales provenientes de animales puedan infectar humanos; sin embargo, se requieren otras investigaciones para aclarar este punto en particular, y para fines de control epidemiológico es importante actuar atacando todos los focos de infección posibles, por lo que este es, un punto que no se debería descuidar en ninguna campaña de prevención y control de Gastroenteritis causadas por *norovirus* y otros virus de los cuales se posee información de infección en otras especies (por ejemplo: *rotavirus* y *adenovirus*).

II. Las muestras de heces positivas para *norovirus*, presentaron predominantemente las siguientes características macroscópicas: aspecto Heterogéneo, color marrón, consistencia blanda, pastosa y reacción alcalina (todas estas características reunidas suman un total de 72%).

Podemos considerar que la alcalinidad y la pérdida de consistencia de las heces, son alteraciones que se explican debido al desequilibrio hidroelectrolítico que generan los mecanismos de patogenicidad del *norovirus* en el aparato gastrointestinal.

Estos mecanismos de patogenicidad consisten en replicar grandes cantidades del ARN viral al invadir el interior de las células intestinales, en el cual se multiplican sucesivamente hasta un punto en el que la pared celular de la célula intestinal no tiene la capacidad de distenderse más y se rompe liberando abundantes cantidades del virus.

Estas partículas virales liberadas, son capaces de colonizar nuevas células del epitelio intestinal y así sucesivamente invadir a todas las células aledañas del tracto gastrointestinal.

Este mecanismo de patogenicidad ocasiona la destrucción del epitelio intestinal del individuo infectado con *norovirus*, impidiendo así que las células que conforman este epitelio puedan realizar varias de sus principales funciones, como lo son:

el control del equilibrio hidroelectrolítico y la absorción y degradación de los alimentos ingeridos en la dieta diaria, trayendo como consecuencia la aparición de las manifestaciones comúnmente observadas al contraer la infección, a saber, las diarreas y vómitos a repetición por periodos prolongados, deshidratación y malestar general.

Es muy poco frecuente encontrar sangre en las heces provenientes de pacientes infectados con *norovirus*. Este hecho conjuntamente con las características reportadas en nuestra investigación, podrían ser de utilidad para el Bioanalista que analiza las muestras de heces de pacientes con diarreas, de tal manera de orientar sus estudios hacia la investigación de microorganismos virales.

Es importante aclarar que de ninguna manera se debe tomar las características físico químicas de las heces como patognomónicas de ningún agente etiológico en particular; sin embargo, su valor orientador acerca de que metodologías y enfoques diagnósticos se deben seguir por parte del Bioanalista, deben ser tomadas en cuenta al momento de seleccionar y priorizar cual o cuales grupo(s) de microorganismos infecciosos investigar en una muestra determinada.

Actualmente y sin ninguna razón específica que lo valide, el enfoque del laboratorio en el diagnóstico de las diarreas, se dirige inicialmente hacia el descarte de protozoarios y helmintos, seguidamente por el estudio de la presencia de bacterias aeróbicas y sólo si el médico así lo requiere en algunos centros de diagnóstico privados se evalúa la presencia de *adenovirus* y *rotavirus*.

Este esquema hoy en día se muestra obsoleto y muy alejado de la realidad mundial para el diagnóstico de gastroenteritis; por lo cual, es imperativo cambiar los esquemas diagnósticos de nuestro sistema de salud hacia un enfoque que sitúe a los virus entéricos como punto de inicio de cualquier estudio etiológico de las diarreas.

Aunque para los actuales momentos el diagnóstico de laboratorio para la identificación de los virus es mucho más costoso que el examen microscópico simple, ante un problema de la magnitud de las gastroenteritis en Venezuela, el factor costo no debe ser lo que determine la estrategia diagnóstica a seguir en el control del principal problema de salud pública en el país.

Una alternativa pudiese ser la elaboración de marchas analíticas para el diagnóstico de gastroenteritis, dependiendo de las características físico químicas de las muestras y de la historia clínica del paciente.

Por ejemplo, si recibimos una muestra que presente dentro de sus características físico químicas la presencia de sangre, nos

enfocaríamos entonces al diagnósticos de microorganismos cuyos mecanismos de patogenicidad sean invasivos, tales como parásitos: *Entamoeba histolytica*, y bacterias.

En el caso de analizar muestras que presenten características físico químicas tales como, aspecto heterogéneo, color marrón o verde, de consistencia blanda y de reacción alcalina, en un paciente con vómitos habitante de una zona popular con condiciones de hacinamiento, deberíamos enfocar el esquema diagnóstico para este individuo, hacia la identificación de microorganismos cuyos mecanismos de patogenicidad sean menos invasivos del epitelio intestinal; como es el caso de los virus.

De esta manera se pueden crear distintos enfoques o marchas analíticas, que incluyan esquemas y técnicas apropiadas a las características físico químicas de las muestras de heces a analizar y de la historia clínica del paciente, lo cual facilitaría la identificación del o los agente(s) etiológico(s) causante(s) de gastroenteritis en menor tiempo y un mas eficiente manejo de los recursos disponibles.

Es importante destacar que las metodologías y técnicas actualmente utilizadas para el diagnóstico de gastroenteritis en nuestros centros de salud públicos y privados, deben ser sometidas a diversos y constantes cambios, que se adapten a las nuevas realidades epidemiológicas de nuestro país.

III. Es posible que el hecho de no haber encontrado preferencia significativa del *norovirus* hacia un grupo etario en especial, puede obedecer a la alta variabilidad genética del microorganismo que impide la consecución de una inmunidad permanente en los individuos de la comunidad, presentándose entonces una alta posibilidad de reinfecciones.

Durante la realización de este trabajo de investigación no se nos permitió el estudio de las historias clínicas de los pacientes, esto nos imposibilitó a determinar el porcentaje de prevalencia en pacientes inmunocomprometidos; sin embargo, cabe suponer que todas aquellas personas cuyo sistema inmunológico se encuentre débil o deficiente serán más susceptibles a contraer la infección con *norovirus*.

Por otra parte, es importante destacar que se han reportado casos en los cuales las personas infectadas con el virus no presentan ningún tipo de sintomatología, por lo que existen personas estarían actuando como portadoras silentes del virus, subestimando así la prevalencia del *norovirus* como agente causal de gastroenteritis.

Ante tal situación es recomendable realizar estudios de investigación en personas aparentemente “sanas”, que no presenten ningún tipo de sintomatología, de manera de completar los estudios estadísticos que demuestren el porcentaje real de

personas infectadas con *norovirus* en una población determinada.

Es importante determinar este tipo de casos en particular, puesto que estas personas portadoras del virus, constituyen una de las principales causas de diseminación del *norovirus*, en las cuales se deben tomar medidas preventivas rigurosas, ya que constituyen fuentes de infección capaces de originar brotes, esto es particularmente importante en aquel grupo de personas encargadas de manipular y procesar alimentos para el consumo humano.

En nuestro país los estudios sanitarios que se realizan para la obtención del certificado de salud para manipular alimentos, no incluyen estudios de virus entericos, además este certificado tiene una validez de un año, dentro del cual pueden acontecer muchos episodios de infección por agentes productores de gastroenteritis.

Esto es diferente en países desarrollados como Alemania y Estados Unidos de Norte América, en donde actualmente se analizan virus entericos en los tests para manipuladores de alimentos, e inclusive se incluye el *norovirus* dentro del panel de análisis realizados.

Esto, aunado a las condiciones ambientales de la comunidad de los Magallanes de Catia, caracterizada por hacinamiento, acumulación de aguas residuales, ventas inadecuadas de alimentos en las calles, entre otros, constituye un ambiente idóneo para la permanencia del virus en la comunidad.

Por esta razón, se hace imprescindible la implementación de campañas culturales que permitan a la comunidad participar en la prevención del contagio y diseminación del virus, y no solamente atribuir responsabilidades a las autoridades sanitarias competentes.

Al lograr que la comunidad tome conciencia de la situación actual en la que vive diariamente y la magnitud del problema de salud que esto acarrea en el país, se magnificarían los esfuerzos preventivos aplicados entre la comunidad y las autoridades obteniendo entonces una disminución de la prevalencia de *virus*, específicamente del *norovirus*, así como también de otros agentes etiológicos causantes de gastroenteritis como lo son las bacterias y los parásitos.

IV. En base a los resultados de coinfecciones con parásitos (Protozoarios y/o Helminthos) no se puede determinar de forma concluyente, cual de los microorganismos involucrados (*norovirus* o parásitos) estaría produciendo el cuadro de diarrea por el cual los pacientes estarían acudiendo al servicio de coprología de nuestros centros de salud. Esto requeriría de estudios minuciosos de la historia clínica de los pacientes, diag-

nósticos diferenciales entre ambos microorganismos que pudiesen estar ocasionando la gastroenteritis, así como también del estudio de otros factores, los cuales se escapan de los límites de este trabajo debido a la dificultad logística que plantea realizar el levantamiento de la información a todos los pacientes que acudieron al servicio del Laboratorio del Hospital, durante el período de tiempo del estudio.

Por otra parte, observamos que el *norovirus* es un microorganismo que no requiere suplementos nutricionales exigentes para su desarrollo ni en grandes cantidades, por lo cual es capaz de convivir en simbiosis con cualquier tipo de parásito sin impedir su establecimiento.

Tampoco se detectó una correlación significativa entre la infección con *norovirus* y la presencia de algún parásito en específico; lo que pareciera indicar que cualquier parásito e incluso la presencia de hongos podrían convivir concomitantemente con el *norovirus* sin impedir su establecimiento como potencial agente causal de gastroenteritis en cualquier ser vivo.

A nivel del diagnóstico es importante en los laboratorios, realizar diagnósticos diferenciales que incluyan técnicas adecuadas y efectivas, aunado a un análisis exhaustivo de la historia clínica del paciente, que permitan identificar el agente etiológico que realmente está causando la patología en curso. De esta manera se podrá suministrar al paciente una mejor terapéutica que le garantice al mismo una recuperación efectiva en el menor tiempo posible.

Así mismo se podrán recomendar medidas preventivas óptimas, que eviten la diseminación de la infección disminuyendo los riesgos de contagio del virus y evitar originar futuros brotes que compliquen el control y la proliferación del *norovirus*.

Por último, con la finalidad de ampliar los estudios existentes actualmente y determinar estadísticamente la prevalencia del *norovirus* en todos los ámbitos que a este le conciernen, es recomendable en estudios posteriores, incluir diagnósticos diferenciales en aquellas muestras de heces que posean dos o más agentes etiológicos causantes de gastroenteritis, con la finalidad de determinar la prevalencia de cada uno de ellos y dilucidar cual de ellos es el agente causal de la gastroenteritis originada.

Conclusiones

Usualmente es posible determinar porcentualmente la capacidad de una técnica analítica diagnóstica para confirmar o descartar la existencia de alguna patología determinada.

En lo que concierne a las Gastroenteritis y sus diversos agen-

tes causales, se infiere que un servicio de coprología de un laboratorio de Bioanálisis será más capaz de detectar el o los agentes causales de las diarreas, mientras más se investiguen todos los microorganismos que pudiesen estar produciendo el cuadro mencionado.

Como es casi imposible, en un laboratorio de rutina bajo las condiciones escasas de recurso y tiempo que existen en la actualidad, poder investigar el gran número de agentes etiológicos posibles, el enfoque del servicio debe ser hacia la investigación de los microorganismos patógenos más frecuentes en el área que atiende el centro hospitalario.

Sumado a esta situación, hay pocas estadísticas disponibles en la mayoría de las áreas específicas de la salud pública en Venezuela; por lo cual, los estudios de prevalencia de distintos agentes etiológicos productores de Gastroenteritis, son requerimientos inexorablemente necesarios en el país.

Mediante una información estadística adecuada, el enfoque diagnóstico del laboratorio, debería cambiar de un enfoque netamente parasitológico y bacteriológico a uno dirigido hacia el descarte de virus, implementado nuevos esquemas y técnicas diagnósticos en nuestros centros de salud.

A nivel mundial, los virus constituyen la primera causa de Gastroenteritis, en un porcentaje 10 veces superior al de los parásitos (protozoarios y helmintos).

Si tomamos en cuenta que en el examen microscópico, sólo podemos ver algunos de los posibles parásitos productores de diarreas, podemos concluir que la capacidad de detección del servicio de coprología del laboratorio es muy limitada.

En la mayoría de los laboratorios del país, no se investigan virus y esto en parte explica el alto número de resultados negativos que se reportan a diario en dichos servicios.

En este trabajo se demuestra, que para el período de tiempo escogido, el 16,76% de las diarreas pudieron tener como agente causal al *norovirus*; lo cual, es una información significativa que no se suministró al paciente o al médico tratante; por consiguiente, las personas infectadas con el virus no tomaron las medidas preventivas adecuadas para evitar la diseminación del virus, pudiendo originar posteriores complicaciones y brotes.

Por otra parte, estudios posteriores podrían demostrar la importancia del *norovirus* como agente etiológico de gastroenteritis en Venezuela y, siendo este el principal problema de salud pública infantil de nuestro país, se recomendaría incluir el estudio del *norovirus* para el diagnóstico de Gastroenteritis en los distintos laboratorios y centros diagnósticos del país.



Del mismo modo cabe esperar que otros virus tales como: *rotavirus*, *astrovirus* y *adenovirus*, pudiesen estar presentes, así como bacterias pero eso es materia que requerirá ser dilucidada en investigaciones ulteriores.

El hecho de que el *norovirus* se ha asociado históricamente con la producción de brotes aislados, a nivel mundial, en un ambiente con las condiciones particulares de los Magallanes de Catia, existe la posibilidad, que el virus no haya podido ser eliminado completamente de la comunidad y encontrarse en constante reciclaje; lo cual, lo convierte en un residente permanente del sector.

Es importante recordar que la presencia de *norovirus* se encuentra asociada a brotes, que por lo corto del tiempo estipulado para el desarrollo de este trabajo de investigación, no pudimos extendernos en el tiempo; por lo cual, recomendamos continuar dicha investigación durante un período más prolongado que permita identificar brotes, si los hubiere, y así poder determinar la frecuencia del mismo en las distintas épocas del año.

Referencias

- Urrestarazu MI y col. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Rev Panamericana de Salud Pública* 1999;6:149-156.
- Instituto Nacional de Estadísticas (INE). Principales causas de muerte en Venezuela, 1997-2002. Sitio web: www.ine.gob.ve.
- Centro de Microbiología y Biología Celular Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Venezuela, 2005.
- Green KY, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ & Estes MK. A comparison of the reactivities of the baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with the native Norwalk virus in serologic assays and some epidemiologic observations. *Jour Clin Microbio*. 1993;2185-2191.
- http://www.uc.edu.ve/biologia/pdf/taxo_virus2.pdf.
- Tompkins DS, Hudson MJ, Smith HR, Eglin RP, Wheeler JG, Brett MM, et al. A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Commun Dis Public Health*, 1999;2:108.
- Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001;154:666-674.
- Lopman BA, Reacher MH, van Duynhoven Y, Hanon FX, Brown D and Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9:90-96.
- CDC (center for disease control and prevention), *MMWR* (morbidity and mortality weekly report) 2005; vol. 50/ N. RR-9.
- Jonathan A. Burton-MacLeod, Erin M. Kane, Rachel S. Beard, Leslie A. Hadley, Roger I. Glass, and Tamie Ando, Evaluation and Comparison of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Detection of Antigenically Diverse Human Noroviruses in Stool Samples, *Journ Clin. Microbio*. 2004;42: 2587-2595.
- Green KY, Ando T, Balayan MS, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ and Theil HJ. *Family Caliciviridae*. In: Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Seventh ICTV report. Academic Press, San Diego, 2000;725-739.
- Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM. Norwalk group of viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996;783-810.
- Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, et al. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:261-4.
- McAnulty JM, Rubin GL, Carvan CT, Huntley EJ, Grohmann G, Hunter R. Outbreak of Norwalk-like gastroenteritis associated with contaminated drinking water at a caravan park. *Aust J Public Health* 1993;17:36-41.
- Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1982;96:756-61.
- Ando T, Mulders MN, Lewis DC, Estes MK, Monroe SS, Glass RI. Comparison of the polymerase region of small round structured virus strains previously classified in three antigenic types by solid-phase immune electron microscopy. *Arch Virol* 1994;135:217-26.
- National Reference Center of the Robert-Koch-Institute in Berlin. Validation released in Germany, 2002-2003.
- Luis Ernesto Ludert, Germán González Centro de Microbiología y Biología Celular Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas-Venezuela. Trabajo por Publicar, 2005.
- ELISA RIDASCREEN® *norovirus*, R-biopharm, Germany.
- Rodríguez M. Parásitos intestinales. *Métodos de diagnóstico*. MSDS. 1995;390-405.
- Jiang X, Matson DO, Cubitt WD, Estes MK. Genetic and antigenic diversity of human caliciviruses (HuCVs) using RT-PCR and new EIAs. *Arch Virol Suppl* 1996;12:251-62.
- Jiang X, Cubitt D, Hu J, et al. Development of an ELISA to detect MX virus, a human calicivirus in the Snow Mountain agent genogroup. *J Gen Virol* 1995;76:2739-47.
- Jiang X, Matson DO, Cubitt WD, Estes MK. Genetic and antigenic diversity of human caliciviruses (HuCVs) using RT-PCR and new EIAs. *Arch Virol Suppl* 1996;12:251-62.
- Jiang X, Wang J, Estes MK. Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. *Arch Virol* 1995;140:363-74.