

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIROTAVIRUS EN NIÑOS SANOS MENORES DE UN AÑO

**Armando Soto Escalona, Hugo Hernández Henríquez y
Linda Blitz de Dorfman**

*Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
Apartado Postal 1151. Maracaibo 4001-A, Venezuela.*

RESUMEN

Se determinaron anticuerpos antirotavirus en un estudio de 81 sueros de niños menores de 1 año obtenidos en la consulta externa de Control de Niños Sanos del Centro de Salud del Amparo, en Maracaibo, Venezuela.

El 33.3% resultó positivo y presentó un aumento la positividad a medida que avanzaba la edad. Por otra parte, se relacionaron los casos seropositivos con la lactancia materna, observándose un 92% de casos positivos que comprenden niños que no lactaron o lactaron muy poco y solo el 8% para aquellos que habían lactado toda su vida o más de la mitad de ella. Además se estableció relación en los niños estudiados, entre la historia de diarrea y la presencia de anticuerpos antirotavirus, resaltándose que de los 27 casos seropositivos, el 78% señalaron haber tenido historia de diarrea en alguna época de su vida y 22% sin historia de diarrea. Por el contrario los seronegativos indicaban 31% y 69% respectivamente.

INTRODUCCION

Siendo la diarrea un problema de Salud Pública en todo el mundo, constituye una enfermedad infantil de gran importancia por su alta mortalidad y morbilidad, además de provocar desnutrición y retardo en el crecimiento, con la consecuente alteración en el medio familiar (16). En Venezuela, continúa siendo un factor principal de atención con 1.310 muertes para 1984, en 196.919 casos reportados, representando aproximadamente 4 muertes diarias por gastroenteritis en niños menores de dos años (17). En este tipo de enfermedad, los virus juegan un papel primordial y entre ellos los Rotavirus (12, 14).

Un agente llamado antes reovirus y ahora Rotavirus aparece como causa mayor de enfermedades entéricas en niños menores de 2 años. El agente ha sido visualizado al microscopio electrónico tanto en células epiteliales de la mucosa duodenal, como material de heces de niños con gastroenteritis desde 1973 (13).

La infección por Rotavirus es muy común tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo o tropicales, siendo frecuente en los meses de invierno, sin embargo en los países tropicales parece ser endémica esta enfermedad (20). Los niños sufren desde muy temprana edad (6) y se presentan cuadros entéricos durante todo el año, siendo más frecuente entre los meses de noviembre a febrero (9). Además se debe tener en cuenta que esta enfermedad prevalencen factores físicos-ambientales, sociales, económicos y culturales, y su control depende de programas a largo plazo, como mejoras en la calidad y abastecimiento de aguas, servicios sanitarios y educación de la colectividad (15).

En Venezuela, en 1975 Esparza y col. (8), demostraron la existencia de Rotavirus en heces provenientes de niños hospitalizados en Caracas con gastroenteritis confirmada luego por Esparza J. y Viera T. (10). En 1980, Pellacani y Soto (19), realizaron un estudio con microscopía electrónica en Maracaibo, obteniendo un 47% de casos positivos a Rotavirus en niños con diarreas. Luego en 1983, Hernández y col. (13), llevaron a cabo un estudio serológico en la población infantil del Estado Zulia demostrando un 80% de positividad para Rotavirus.

Ha sido demostrado que la infección por Rotavirus es acompañada por una respuesta serológica al agente causal, la cual puede medirse por diferentes pruebas inmunológicas (3). Los estudios seroepidemiológicos demuestran que la infección por Rotavirus afecta a niños desde temprana edad (6).

Se cree que la ingestión de leche materna que contenga anticuerpos neutralizantes contra Rotavirus puede disminuir la manifestación de síntomas diarreicos en la mayoría de los neonatos que excretan Rotavirus (5). Debido a que las investigaciones hechas hasta el momento, no dan una clara idea sobre la posible protección conferida por la leche materna, el presente estudio está dirigido a realizar un programa en niños menores de un año, para conocer:

- 1.— Prevalencia de anticuerpos contra Rotavirus humano, en relación a la edad.
- 2.— Relación existente entre la duración de la lactancia materna y la aparición de diarreas en la misma población.

MATERIAL Y METODOS

Procedimiento de muestreo:

Se analizaron 81 muestras de sueros de niños menores de 1 año de edad, tomadas entre el 12-11-85 y 27-10-86 de la consulta de Control de niños sanos del Centro de Salud El Amparo, Maracaibo. Estas muestras fueron obtenidas por punción digital, tomando tres tubos capilares sin heparina por cada niño. Se centrifugó a 1.500 rpm, por 5 minutos para separar el suero del paquete globular. Los sueros fueron colocados en recipientes debidamente rotulados y se recogió una historia interrogando a la madre del niño con los siguientes datos: edad, nombre y sexo del niño, tiempo de lactancia materna e historia de diarrea la cual se definió como períodos de evacuaciones intestinales frecuentes líquidas y abundantes que habían presentado los niños hasta el momento de la encuesta. Los sueros, fueron guardados en -20°C hasta el momento de su utilización, y fueron luego analizados por el método de Inmunofluorescencia Indirecta, en un microscopio fluorescente ZEISS TIPO D 7082 Oberkocher.

Preparación del Antígeno Rotavirus:

Se utilizaron células MA-104 y una vez obtenida la monocapa completa se inoculó el cultivo de células con la cepa de Rotavirus SA 11, (obtenidas del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas), tratada previamente con una solución 100 ug/ml de Tripsina, Ácido clorhídrico 1N en partes iguales, por una hora a temperatura ambiente. Se inocularon 0.2 ml de la suspensión viral, se permitió absorción por una

hora a 37°C y luego se le añadió el medio de cultivo MEM (Eagle), el cual contenía 2% de suero bovino fetal.

Se observó el efecto citopatogénico de tres cruces aproximadamente a las 48 horas. El resto de células se desprendieron mecánicamente.

Las células fueron centrifugadas a 1.500 rpm, durante 15 minutos y el paquete celular se resuspendió en 4 ml. de PBS. Fué lavado 3 veces con PBS. Un control, constituido por células no infectadas, fué tratado de la misma manera.

En cada lámina portaobjeto, se colocaron 8 gotas de la suspensión de células infectadas (0.02 ml. por gota). Las láminas fueron colocadas en una campana extractora para deshidratar dichas gotas, luego se fijaron con acetona fría por 15 minutos y se guardaron en congelación a -70°C, hasta su uso.

Procedimiento de la Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta:

Las láminas que contenían el antígeno se lavaron tres veces con buffer de PBS a pH 7.2 al igual que las láminas control.

A las láminas infectadas y controles, se le añadió una gota de suero (sin diluir), proveniente del paciente. Se incluyó un suero control positivo para Rotavirus con título de 1:2.560, y un suero control negativo cuyo título era menor de 1:20.

Las láminas fueron incubadas en cámara húmeda a 37°C por una hora, luego se lavaron tres veces con buffer de PBS. Se les añadió una gota del conjugado Inmunoglobulina de carnero anti-IgG Humana, (Cappel Lab, California) y fueron incubadas de nuevo, en las mismas condiciones.

Después de lavadas tres veces con buffer PBS y secadas, se les colocó una laminilla con una mezcla de glicerol y PBS, para su observación al microscopio fluorescente.

La infección de las células MA 104 por el virus fué verificada por su fluorescencia brillante citoplasmática, con un antisuero conjugado con fluorescencia preparada en carnero contra el virus; mientras que las células MA 104 no infectadas, no reaccionaron con este reactivo. Los sueros humanos que fueron reportados como fluorescencia positivo, produjeron fluorescencia clara. Todos los demás sueros fueron reportados como fluorescencia negativa.

RESULTADOS

En la Tabla I se puede observar que los 81 niños estudiados se distribuyeron en 6 grupos etarios, demostrándose la presencia de anticuerpos antirotavirus en un total de 33.3%. También se resalta que a medida que avanza la edad, aumenta la presencia de anticuerpos y ese aumento creciente comienza en 0% en edades comprendidas de 1-2 meses, hasta 69% en edades comprendidas entre 11-12 meses. Observándose además, que de los 27 casos, solo 4 de 39 fueron seropositivos en niños hasta los 6 meses, mientras que en niños con 7 a 12 meses, la relación fué 23 de 42 casos. En

TABLA I
PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTIROTAVIRUS
POR GRUPOS ETARIOS

Edad en Meses	Positivos/Totales	Porcentaje de Positividad
1-2	0/11	0%
3-4	1/14	7.1%
5-6	3/14	21.4%
7-8	6/13	46.1%
9-10	8/16	50.0%
11-12	9/13	69.2%
Total	27/81	33.3%

la Tabla II se observa que de los 27 casos seropositivos, 25 niños lactaron durante menos de la mitad de la edad, o no lactaron, correspondiendo a un 92%. Por el contrario, en aquellos que lactaron durante toda su edad o más de la mitad de ella hasta el momento de la encuesta, solo 2 fueron seropositivos, lo que representa un 8%.

Cuando se estudiaron los casos seronegativos, un 76% correspondió a los niños que lactaron mucho o regular, en cambio los niños que no lactaron o que lactaron poco, dieron el 24%.

No se obtuvo ningún valor significativo, cuando se quiso relacionar la lactancia materna con la presencia ó ausencia de diarrea. Sin embargo, al relacionar esta última con la seroconversión, encontramos que, el mayor porcentaje de seropositividad está en los niños que presentaron cuadros diarreicos (78%), en contraste con un 22% de seropositivos sin diarrea. Tabla III.

TABLA II

**SEROCONVERSION DE CASOS POSITIVOS Y NEGATIVOS,
RELACIONADO CON LACTANCIA MATERNA
EN NIÑOS MENORES DE 1 AÑO**

Grupo	Seropositivos	Seronegativos
Lactaron mucho*	1 (4%)	26 (48%)
Lactaron regular**	1 (4%)	15 (28%)
Lactaron poco***	13 (48%)	8 (15%)
No lactaron	12 (44%)	5 (9%)
TOTAL	27 (100%)	54 (100%)

* Lactaron todos los meses hasta el momento de la encuesta.

** Lactaron durante, más de la mitad de su vida hasta el momento de la encuesta.

*** Lactaron durante, menos de la mitad de su vida hasta el momento de la encuesta.

TABLA III

**SEROCONVERSION DE CASOS POSITIVOS Y NEGATIVOS,
EN NIÑOS MENORES DE 1 AÑO CON O SIN HISTORIA
DE DIARREA**

	Con historia de diarrea	Sin historia de diarrea	Total de casos
Seropositivos	21 (78%)	6 (22%)	27
Seronegativos	17 (31%)	37 (69%)	54
	38 (100%)	43 (100%)	81

DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran que los niños sanos menores de un año, tienen un alto porcentaje de seropositividad a Rotavirus (33.3%) y que ésta aumenta con la edad, observándose que 85% de los casos positivos corresponden a niños de 6-12 meses y solo un 15% de los casos a niños menores de 6 meses.

Estos hallazgos podrían explicarse por el hecho de que en los primeros meses de la vida los niños están protegidos contra las infecciones a Rotavirus por los anticuerpos específicos que han recibido de la madre por transferencia trasplacentaria y a través de la lactancia (4, 8, 13, 18). Por otro lado, durante esta etapa de la vida, los niños reciben una atención higiénica esmerada, la cual va disminuyendo poco a poco quedando más expuestos a contraer la infección viral. Además, los niños estudiados pertenecían a un barrio de bajas condiciones socioeconómicas donde una serie de factores favorecen las infecciones tales como: desnutrición, promiscuidad familiar, servicios públicos deficientes, poco saneamiento ambiental y bajo nivel educativo de la colectividad.

El papel que juegan los anticuerpos maternos en prevenir las infecciones a rotavirus en los recién nacidos, no ha sido suficientemente evaluado. En el estudio realizado por Batnavala y col. (2) se observó una baja incidencia de infección a rotavirus, en los recién nacidos que fueron alimentados con leche materna.

En nuestro estudio se observó una baja seropositividad en el grupo de niños que lactaron durante un período mayor. Esto podría explicarse por la protección que les confiere la lactancia materna, ya que las investigaciones realizadas por Ellens y col. demostraron la presencia de anticuerpos antirotavirus en calostro y leche materna (7).

Existen diferentes reportes sobre la susceptibilidad de los recién nacidos a la infección por Rotavirus. En un estudio realizado en 1.056 recién nacidos, se encontró que 32.5% de ellos excretaban rotavirus a los 5 días de nacidos (2). 40% de seropositividad se encontró en niños menores de 6 meses en el trabajo realizado por Sack y col. (20).

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Bernardo Rodríguez Iturbe por facilitarnos el conjugado fluorescente para la realización de la prueba. Al Sr. Florencio Añez por su colaboración en el desarrollo de la técnica y a los Bachilleres Deisy Bracho, Mercedes Borjas y María Guarecuco por su ayuda en la recolección de las muestras. Igualmente a la Sra. Yudis de Flores por su labor secretarial.

ABSTRACT

Determination of antibodies antirotavirus in healthy infants less than one year. Soto Escalona A. (Sección de Virología, Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Apartado Postal

1151. Maracaibo, Venezuela), Hernández Henríquez H., Blitz de Dorfman L. *Invest Clín* 28(2): 65-73, 1987.— Human Rotavirus have been demonstrated to be an important agent in the etiology of diarrhea in children. In order to investigate the presence of antibodies antihuman rotavirus in apparently healthy infants, serum was obtained from 81 children between the ages of 1 to 12 months who attended the outpatients clinic at the Amparo Health Center in Maracaibo. The presence of antihuman rotavirus antibodies was demonstrated in 33.3% of the samples, being more frequent in the older children. Ninety-two percent of the positive samples were from infants who were not breast-fed or were breast fed for less than one month. The remaining positive sera was from infants who breast-fed all their lives or for more than half of their lives. A direct relation was established between a history of diarrhea and the presence of anti rotavirus-antibodies in the cases studied.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— BISHOP R.F., DAVIDSON G.P., HOMES I.H., RUCH B.J.: Virus Particles in Epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2: 1273-1283, 1973.
- 2— BANATVALA J.E., PATH F.R.C., CHYRSTIE I.L., TOTTERDELL B.M.: Rotavirus infections in human neonates. *JAVMA* 173 5(2): 527-530, 1978.
- 3— BLACKLOW NEIL R., ECHEVERRIA P., SMITH P.H.: Serological Studies with Reovirus Like Enteritis agent. *Infection and Immunity* 13: 1563-1566, 1976.
- 4— CUKOR G., BLACKLOW N.R., CAPOZZA F.E., PANJVANI Z.F.K., BADNARCK F.: Persistence of antibodies to Rotavirus in human milk. *J Clin Microbiol* 9: 93-96, 1979.
- 5— CUKOR G., BLACKLOW N.: Human viral gastroenteritis. *Microbiological Reviews* 48(2): 157-179, 1984.
- 6— ELIAS M.M.: Distribution and titres of rotavirus antibodies in different age groups. *J Hyg (Camb.)* 79: 365-372, 1977.
- 7— ELLENS D.J., DE LEEUW P.W., STRAVER P.J.: Detection of Rotavirus-specific antibodies in colostrum and milk by ELISA. *Am Rech Vet* 9: 337-342, 1978.
- 8— ESPARZA J., VIERA DE TORRES B., PIÑERO A., CARMONA O., MAZZALI DE ILJA R.: Rotavirus in Venezuelan children with gastroenteritis. *Amer J Trop Med Hyg* 26: 148-151, 1977.

- 9- ESPARZA J.: Rotavirus asociados a la gastroenteritis: Epidemiología y Caracterización Molecular. Tesis Doctoral en Ciencias Médicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. 1984.
 - 10- ESPARZA J., VIERA DE TORRES B.: Avances recientes sobre la etiología viral de la gastroenteritis. *Acta Médica. Venezuela* 26, 110-121, 1979.
 - 11- WALTHER F.J., BRUGGEMAN C., DANIELS-BOSMAN M.S., POURIER S., GRAULS G., STALS F., BOFAARD A.V.D.: Symptomatic and Asymptomatic Rotavirus infections in Hospitalized Children. *Acta pediátrica Scand* 72: 659-663, 1983.
 - 12- FLEWETT T.H., WOODE G.N.: The Rotavirus. Brief Review. *Arch Virol* 57: 1-23, 1978.
 - 13- HERNANDEZ H., PEREZ SCHAEEL I., SOTO ESCALONA A.: Estudio seroepidemiológico de rotavirus en una población infantil venezolana. Relación entre lactancia materna y seropositividad. *Bol Med Hosp Inf de México* 41: 580-584, 1984.
 - 14- KAPIKIAN A.Z., YOLKEN R.H., GREENBER H.B., WYATT R.G., KALICA A.R., CHANECK R.M., KIN H.W.: Gastroenteritis viruses. In: Lennette EH, Schmidt NH, eds: *Diagnostic Procedures for viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 5th ed. Washington D.C. 927. American Public Health Association, 1979.
 - 15- LOPEZ N., DAVOLI M., GRAFFE H.: El futuro de la Diarrea Infantil. *Revista de la Fundación José María Vargas*. Vol. 1 N° 4 19-20, 1977.
 - 16- MATA L.: Acute Diarrhea: Its Nutritional Consequences in children. *Epidemiology of acute diarrhea in childhood. An overview* Ed. JA. Bellanti 3-22. Raven Press. New York, 1983.
 - 17- MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. *Anuario de Epidemiología y Estadística Vital*. Caracas, 1984.
 - 18- PARRA DE SOTO H., SOTO H.: Rotavirus y Diarrea aguda. Trabajo de Ascenso, Universidad del Zulia, 1985.
 - 19- PELLACANI D., SOTO A.: Los rotavirus como agentes etiológicos de la gastroenteritis en el Estado Zulia. *Invest Clín* 21(4): 259-275, 1980.
 - 20- SACK D.A., ROBERRH G., KAPIKIAN A.Z., AZIZ K.M.S.: Seroepidemiology of rotavirus infection in rural Bangladesh. *Journal Clinical Microbiology* Vol. II, N° 5, 530-532, 1983.
-