

Artículo original

Estudio de la infección por rotavirus y calicivirus en neonatos de la Maternidad “Concepción Palacios” de Caracas

María Rosángel Morales^{a,b}, Manuel Marrugo^c, Gilberto Angulo^c, Rosabel González^d, Ana C. Alcalá^a, Germán G. González^{a,e}, Esmeralda Vizzi^a, Ferdinando Liprandi^a, Juan E. Ludert^{a,*}

^aCentro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)

^bServicio de Bioanálisis

^cDepartamento de Pediatría, Maternidad Concepción Palacios

^dInstituto de Biomedicina, MSDS-UCV; Caracas

^eEscuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo, Valencia; Venezuela

Recibido 14 de octubre de 2006; aceptado 8 de febrero de 2007

Resumen: En un estudio realizado en 1984 en la Maternidad “Concepción Palacios”, Pérez-Schael y col. detectaron excreción asintomática de rotavirus en el 56% de los recién nacidos evaluados. El objetivo de este trabajo fue estudiar la infección por rotavirus en neonatos de la Maternidad y comparar datos con aquellos obtenidos anteriormente. Además, se investigó la presencia de calicivirus en dicha población. Entre agosto y diciembre de 2004, se recolectaron 307 muestras de heces provenientes de 215 neonatos sanos. Para la detección de los agentes virales se utilizaron ensayos tipo ELISA comerciales y no comerciales. Estos ensayos identificaron como positivas a rotavirus y calicivirus a un total de 14 y 58 muestras, respectivamente. Sin embargo, al realizar pruebas para corroborar la presencia de rotavirus por microscopía electrónica, EGPA y RT-PCR y para calicivirus por RT-PCR, ninguna de las muestras señaladas como positivas pudo ser confirmada. Estos resultados sugieren la no-circulación tanto de rotavirus como de calicivirus dentro de la Maternidad. Es posible que la interrupción de la transmisión de rotavirus dentro de la Institución pueda deberse a cambios en el manejo del par madre-neonato introducidos en la Maternidad desde 1995, promovidos por la OMS y UNICEF.

Palabras clave: neonatos, rotavirus, calicivirus

Study of rotavirus and calicivirus infections in neonates from the Maternity Hospital “Concepción Palacios”, Caracas

Abstract: In a study carried out in 1984 at the “Concepción Palacios” Maternity Hospital, Perez-Schael et al (J Med Virol 1984, 14:127) detected asymptomatic excretion of rotavirus in 56% of the neonates evaluated. The purpose of this work was to study rotavirus infection in neonates at the Maternity Hospital and compare the new data with those previously obtained. We also studied calicivirus presence in said population. Between August and December 2004, 307 feces samples were collected from 215 healthy neonates. Commercial and non commercial ELISA type assays were used for detection of viral agents. These assays identified a total of 14 and 58 samples as rotavirus and calicivirus positive respectively. Nevertheless, when carrying out tests to corroborate rotavirus presence with electron microscopy, EGPA and RT-PCR, and for calicivirus with RT-PCR, none of the samples previously shown as positive could be confirmed. These results suggest the non-circulation of both rotavirus and calicivirus within the Maternity Hospital. It is possible that the interruption of rotavirus transmission within this Institution could be due to changes in the management of the mother-child unit promoted by WHO and UNICEF, and introduced at the Maternity Hospital since 1995.

Keywords: neonates, rotavirus, calicivirus

* Correspondencia:
E-mail: jeludert@ivic.ve

Introducción

Las infecciones por rotavirus son la causa más frecuente de diarreas severas en niños menores de 2 años. Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*. Presentan un virión con simetría icosaédrica, carente de envoltura lipídica y compuesto por tres capas concéntricas de proteínas que contienen al genoma, constituido por 11 segmentos de ARN de cadena doble [1]. La capa externa del virión esta compuesta por la glicoproteína VP7 y por la proteína sensible a tripsina VP4 y es necesario que la proteína VP4 sea escindida por tripsina para que el virus sea infeccioso [2]. El virión de rotavirus es sumamente estable en el ambiente y la transmisión del virus ocurre por la vía fecal-oral [1,3]. En infantes, la infección por rotavirus se caracteriza por vómito y diarrea acuosa, que en ocasiones puede incluir fiebre y dolores abdominales [1]. El virus tiene un periodo de incubación de 2 días, la duración del cuadro clínico es de 3 a 8 días y si no es tratado apropiadamente puede resultar en deshidratación severa y muerte [1,4]. Se estima que anualmente las infecciones por rotavirus ocasionan cerca de medio millón de muertes, dos millones de hospitalizaciones y 25 millones de visitas médicas, por lo que se considera un problema de salud pública a escala mundial [4]. En Venezuela, los rotavirus constituyen la principal causa de diarrea severa en niños menores de 5 años ya que están asociados aproximadamente a una cuarta parte (23%) de todos los episodios de diarrea que requieren tratamiento médico y a un tercio (33%) de aquellos que necesitan hospitalización [5]. Además, se estima que la infección por rotavirus causa cada año cerca de 300 muertes, el 80% de ellas en niños menores de un año [Pérez-Schael y col., resultados no publicados]. La infección por rotavirus en neonatos fue descrita por primera vez en una unidad de maternidad en Inglaterra [6] y a partir de entonces han sido numerosos los estudios que han descrito la infección de recién nacidos por rotavirus [7]. La excreción de rotavirus en neonatos puede comenzar desde el primer día de nacimiento y la mayor frecuencia de excreción se ha observado durante los primeros 5 días [8]. Una de las características más resaltante de la infección neonatal por rotavirus es que cursa de manera asintomática. Para explicar la ausencia de síntomas en los recién nacidos infectados, se han señalado diversos factores relacionados al huésped tales como inmunidad pasiva derivada de la madre o la ausencia de proteasas (tripsina) en el intestino del neonato, necesarias para activar la infectividad del virión [6,9,10]. También se han señalado como causa de atenuación características únicas de las cepas neonatales de rotavirus [6,9,10]. La caracterización antigénica y molecular de las cepas neonatales muestra que estas cepas poseen una alta estabilidad genética y que la mayoría de los rotavirus aislados de recién nacidos presentan un genotipo de la proteína VP4 único: P2, ausente en las cepas de rotavirus que usualmente circulan en infantes [6]. La proteína VP4 ha sido señalada como uno de los factores de virulencia de los rotavirus [2]. Sin embargo, aun no están claras las razones por las cuales la infección por un virus con tanto potencial patogénico en infantes cursa sin síntomas en neonatos. Adicio-

nalmente, dos estudios prospectivos, uno hecho en Australia y otro en la India [8,11], han demostrado que las infecciones sufridas por los recién nacidos, a pesar de su carácter asintomático, son capaces de conferir protección más tarde contra la diarrea severa causada por rotavirus. Esta observación, aunada a la estabilidad genética que presentan las cepas neonatales, ha llevado a que algunas cepas aisladas de neonatos hayan sido evaluadas como candidatas a vacuna [7,8].

En Venezuela, los primeros estudios sobre la infección por rotavirus en recién nacidos fueron realizados por Pérez-Schael y col. [12,13] en la Maternidad "Concepción Palacios" (MCP) de Caracas. Estos autores encontraron prevalencias de infección por rotavirus en más del 55% de los neonatos estudiados en ese hospital y confirmaron el carácter asintomático de la infección. Posteriormente, Pacheco [14] en un estudio realizado en el Servicio de Neonatología del Hospital General del Oeste "José Gregorio Hernández" encuentra una prevalencia para rotavirus del 34% y además logra re-aislar la misma cepa encontrada por Pérez-Schael y col. [13] en la MCP. Mas recientemente, Flores y col. [15] encontraron prevalencias para rotavirus del 20% entre recién nacidos del Hospital Materno Infantil de Caricua e identifican nuevamente, la misma cepa encontrada originalmente en la MCP. Los resultados en conjunto de los estudios venezolanos indican que la infección por rotavirus en neonatos puede ser común en nuestro país y resaltan la estabilidad genética de las cepas neonatales.

Los calicivirus son virus pequeños, sin envoltura, de 27 a 35 nm de diámetro cuyo genoma consiste en una molécula de ARN de cadena simple, de polaridad positiva, poliadenilado con un tamaño comprendido entre 7,4 y 8,3 kb [16]. El genoma codifica por la proteína única de la cápside y varias proteínas no estructurales entre las que se encuentran una polimerasa de ARN dependiente de ARN, una proteasa viral y una helicasa [16,17]. La familia *Caliciviridae* esta conformada por cuatro géneros, dos de los cuales, *Norovirus* (antiguamente, Norwalk-like virus) y *Sapovirus* (antiguamente, Sapporo-like virus) infectan humanos y han sido asociados exclusivamente a enfermedades entéricas. A su vez, y debido a la alta variabilidad genética que presentan, los géneros *Norovirus* y *Sapovirus* han sido divididos filogenéticamente en varios genogrupos cada uno [17]. Hoy en día se considera a los norovirus como los principales agentes virales asociados a brotes de diarrea no-bacteriana, brotes estos que usualmente ocurren en comunidades cerradas [17]. Adicionalmente, los norovirus son causa importante de diarreas endémicas en todos los grupos etarios, mientras que los sapovirus han sido principalmente asociados a diarreas endémicas en niños [17]. Los calicivirus son virus altamente resistentes al ambiente y son transmitidos por vía la oral fecal a través del contacto directo entre personas, así como también a través del agua y alimentos contaminados [17]. En Venezuela, existen reportes de circulación de calicivirus entre adultos y niños que señalan a este grupo de virus como una causa importante de diarreas, tal vez la segunda en importancia después de rotavirus [18,19]. A pesar de que es posible que

los calicivirus sean el agente viral más comúnmente asociado a diarreas en humanos de cualquier edad, hasta la fecha no existen reportes sobre infección neonatal por calicivirus y se desconoce si este grupo etario puede o no ser infectado por este agente.

Debido al tiempo transcurrido desde el último reporte sobre rotavirus realizado en la MCP [12,13], el objetivo de este trabajo fue realizar un nuevo estudio sobre la infección por rotavirus en neonatos de la MCP, con el propósito de obtener datos sobre la infección que pudieran ser comparados en términos de prevalencia y estabilidad de las cepas circulantes con los resultados obtenidos anteriormente. Además, se realizaron estudios para determinar la presencia o no de infecciones por calicivirus dentro de esta población de neonatos.

Materiales y Métodos

Población de estudio

La recolección de muestras se llevó a cabo en los Servicios Neonatales 4 y 6 de la MCP entre el 19 de agosto y el 31 de diciembre del año 2004. Se recolectaron un total de 307 muestras fecales provenientes de 215 neonatos sanos; 48 de los neonatos estudiados aportaron más de una muestra. Se definió como neonato sano a todo recién nacido exento de patología alguna y sin antecedentes maternos que comprometieran su vida, según criterio del neonatólogo responsable durante su permanencia en la Institución. Las muestras fueron recogidas en pañales desechables los cuales fueron mantenidos en refrigeración y trasladados al laboratorio diariamente. Una vez en el laboratorio, cada muestra fue separada en 2 alícuotas y mantenida a -20 °C hasta su procesamiento. Paralelamente y mediante una encuesta, se obtuvieron datos del recién nacido correspondientes a fecha de nacimiento, sexo, peso al nacer, tipo de parto y alimentación, ubicación durante su permanencia en la institución y fecha de recolección de la muestra. A cada madre se le ofreció una breve charla informativa sobre los objetivos del estudio y se les pidió la firma del consentimiento informado sustitutivo para la toma de muestra de su representado. Este trabajo fue aprobado por los Comités de Ética del IVIC y de la MCP.

Detección de agentes virales

Preparación de clarificados fecales. A partir del material fecal recuperado de los pañales, se prepararon clarificados fecales al 10% p/v en solución fosfato-salina, pH 7.4, por agitación mecánica y posterior centrifugación a baja velocidad (1500xg por 10 min.). Los sobrenadantes obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso directamente en los ensayos inmunoenzimáticos, análisis al microscopio electrónico y para la extracción de ácidos nucleicos previa a los ensayos de RT-PCR y las electroforesis en geles de poliacrilamida.

Ensayos inmunoenzimáticos. Para la detección de rotavirus en los clarificados fecales se utilizó un ensayo tipo ELISA no-comercial realizado según Salinas y col. [5].

Brevemente, se sensibilizaron pozos de placas de cloruro de polivinilo (Inmunolon®, Dynatech) alternativamente con suero no-inmune o suero hiperinmune anti-rotavirus, producidos en conejos como fase de captura. Las placas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 5% en tampón fosfato-salino, pH 7.4 y los clarificados fecales al 10% p/v se añadieron por duplicado. Como anticuerpo de detección se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el antígeno común de grupo de los rotavirus localizado en la proteína VP6 [20]. El conjugado usado fue un anticuerpo comercial (Sigma®, St. Louis, MO, USA) anti Ig-G de ratón conjugado a peroxidasa y como sustrato se utilizó tetrametil-benzidina (TMB Microwell Peroxidase Substrate System, KPL). Como controles positivos se incluyeron muestras fecales de infantes previamente probadas positivas para rotavirus. Se consideraron positivas a rotavirus aquellas muestras donde la densidad óptica (D.O.) en los pozos sensibilizados con el suero hiper-inmune era al menos el doble de la D.O. obtenida en los pozos sensibilizados con el suero no-inmune. Adicionalmente, un grupo de 93 muestras fue evaluado para la presencia de rotavirus utilizando el ensayo comercial Test Ridascreen® Rotavirus (R-Biopharm; AG Landwehrstr, Darmstadt, Alemania) llevado a cabo según las instrucciones del fabricante.

La presencia o no de calicivirus pertenecientes al género *Norovirus* fue evaluada en un lote de 64 muestras utilizando el ensayo comercial Test Ridascreen® Norovirus (R-Biopharm; AG Landwehrstr, Darmstadt, Alemania) siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Las placas de todos los ensayos se leyeron en un lector automático de ELISA (Sunrise, Tecan, Austria) utilizando una longitud de onda de 450nm.

Microscopía electrónica. Los clarificados de las muestras fecales que resultaron positivas por ELISA fueron analizados al microscopio electrónico (Philips M10, Eindhoven, Holanda) luego de ser teñidos negativamente con ácido fosfotúngstico al 2%, pH 6.5.

Extracción de ácidos nucleicos. La extracción de ácidos nucleicos se hizo a partir de alícuotas de clarificado fecal de 0,3 ml utilizando TRIZOL-LS (Gibco-BRL, WI, USA), reactivo a base de fenol e isotiocianato de guanidinio, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ácidos nucleicos extraídos fueron precipitados con isopropanol y resuspendidos, luego de un lavado con etanol al 75% en 20 µl de agua libre de nucleasas, para finalmente ser almacenados a -70°C hasta su uso.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. Dada la naturaleza del genoma de los rotavirus, compuesto por 11 segmentos de ARN de doble cadena, el mismo genera un patrón característico al ser analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida. El ácido nucleico extraído de aquellas muestras que resultaron positivas a rotavirus por ELISA fue analizado directamente en geles de poliacrilamida al 7% [21]. Como controles positivos se incluyeron ácidos nucleicos extraídos de muestras fecales de infantes previamente probadas positivas para rotavirus. Para la visualización de los ácidos nucleicos los geles fueron teñidos con nitrato de plata [22].

Ensayos de RT-PCR. Las muestras que resultaron positivas a rotavirus por ELISA fueron analizadas por RT-PCR siguiendo el protocolo descrito por Abbaszadegan y col. [23] sin modificaciones. Este ensayo de PCR se basa en la amplificación de un fragmento altamente conservado del gen 4 de rotavirus para generar un amplicón de 211 pares de bases. Las muestras que resultaron positivas para calicivirus fueron analizadas en dos oportunidades por RT-PCR, en un caso siguiendo el protocolo descrito por Jiang y col. [24] y en otro siguiendo el protocolo de Green y col. [25], sin modificaciones. Ambos protocolos están basados en cebadores dirigidos a amplificar una región del gen que codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN de los calicivirus, sin embargo, presentan especificidades distintas. Los cebadores descritos por Jiang y col. [24] están diseñados para amplificar calicivirus de los géneros norovirus y sapovirus, mientras que los cebadores descritos por Green y col. [25] están diseñados para detectar norovirus pertenecientes a los genogrupos I y II. La razón para utilizar juegos de cebadores que difieren en especificidad responde a que dada la alta variabilidad genética de los calicivirus, no existen cebadores "universales", capaces de detectar todas las variantes genéticas descritas [26].

Resultados

Características de la población estudiada

El promedio de peso al nacer de los neonatos incluidos en este estudio fue de 3.085gr (rango 1.400-4.600gr) y la edad promedio fue de 2 días (rango 0-28 días). La relación entre recién nacidos del sexo femenino a masculino fue de 1,2:1. De los 215 neonatos estudiados, 61% de ellos nacieron por parto normal, 29% por cesárea y el 10% restante por parto instrumental. El 71% de los recién nacidos en estudio permaneció en el retén o sala de neonatos entre 2 y

4 horas antes de ser trasladado a la habitación con la madre, donde permaneció hasta su salida de la Maternidad, mientras que el 29% restante permaneció en el retén hasta por 28 días. El 60% de los neonatos estudiados fue alimentado exclusivamente con lactancia materna, el 32% recibió alimentación mixta (lactancia materna y fórmulas lácteas) y el 8% recibió fórmulas lácteas solamente. Ninguno de los recién nacidos estudiados presentó signos o síntomas de afección gastrointestinal.

Detección de agentes virales

De un total de 236 muestras analizadas por el ensayo de ELISA no comercial, 9 (4%) fueron señaladas como positivas para rotavirus. Asimismo, de las 93 muestras que fueron analizadas con el estuche Ridascreen® Rotavirus, fueron señaladas como positivas 5 (5%), para un total de 14 muestras positivas para rotavirus por ELISA. Sin embargo, ninguna de estas 14 muestras mostró el patrón electroforético típico de rotavirus cuando el ácido nucleico extraído de ellas fue analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida. Adicionalmente, en ninguna de ellas se observaron viriones de rotavirus al ser analizadas al microscopio electrónico. Debido a que tanto la electroforesis como la microscopía electrónica son técnicas de menor sensibilidad para la detección de rotavirus que los ensayos inmunoenzimáticos [1], se consideró la posibilidad de que los resultados negativos en estos ensayos fuesen debido a una baja carga viral en las muestras. Para descartar esta posibilidad, las 14 muestras sospechosas fueron también analizadas por ensayos de RT-PCR, con resultados igualmente negativos. Es decir, ninguna de las muestras señaladas como positivas para rotavirus por ELISA pudo ser confirmada y por lo tanto fueron consideradas como falsos positivos.

Tabla 1. Detección de rotavirus y calicivirus en heces de neonatos recolectadas en la Maternidad Concepción Palacios entre agosto y diciembre del año 2004.

	Rotavirus		Total
	Positivo	Negativo	
ELISA no-comercial	9 (4%)	227	236
ELISA comercial	5 (5%)	88	93
EGPA	0	14	14
ME	0	14	14
RT-PCR	0	14	14
	Calicivirus		Total
	Positivo	Negativo	
ELISA	58 (91%)	6	64
RT-PCR	0	37	37

ELISA: ensayo inmunoenzimático. EGPA: electroforesis en gel de poliacrilamida. ME: microscopía electrónica. RT-PCR: transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa.

De un total de 64 muestras analizadas por la presencia de calicivirus con el estuche Ridascreen® Norovirus, 58 (91%) fueron señaladas como positivas. Seguidamente, se procedió a confirmar estos resultados por ensayos de RT-PCR, prueba

considerada hoy en día como el estándar de oro para la detección de calicivirus [26]. Treinta y siete de las 58 muestras sospechosas fueron analizadas por RT-PCR utilizando dos juegos de cebadores con especificidades distintas, sin embargo, ninguna de ellas pudo ser confirmada

como positiva. En consecuencia, se consideró como falsas positivas a todas las muestras señaladas como positivas para calicivirus en el ensayo comercial. En la Tabla 1 se muestra un resumen de los resultados de la detección de rotavirus y calicivirus por las metodologías usadas en este estudio.

Discusión

En este trabajo se realizó una evaluación sobre la situación epidemiológica actual de la infección por rotavirus en neonatos de la MCP, centro materno donde previamente se había detectado la excreción del virus en heces de recién nacidos asintomáticos [12,13]. Adicionalmente, se realizaron estudios para determinar la presencia de calicivirus del género *Norovirus* en la población neonatal de la MCP. Utilizando dos tipos de ensayos inmunoenzimáticos, se identificaron inicialmente 14 (6%) muestras positivas para rotavirus; sin embargo, ninguna de estas muestras pudo ser corroborada en los ensayos confirmatorios realizados posteriormente, por lo que se consideraron falsos positivos. Los ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA, seguidos de electroforesis en geles de poliacrilamida como prueba confirmatoria, han sido las metodologías utilizadas para la detección de rotavirus en heces de neonatos en estudios previos [8,13-15,27,28]. Más aún, la detección de rotavirus en heces por ensayos de RT-PCR muestra alta sensibilidad y especificidad [23]. Por lo tanto, los métodos de detección utilizados en este trabajo deberían haber resultado en la detección de rotavirus en el caso de que el virus estuviera presente. Adicionalmente, las muestras fueron mantenidas siempre en refrigeración y manejadas apropiadamente y debido a la alta estabilidad que presentan los rotavirus [3], es poco probable que las muestras se hayan "negativizado". Dadas estas consideraciones, los resultados de este trabajo sugieren la no-circulación y ausencia de rotavirus dentro de la MCP.

Existen varios trabajos realizados en Venezuela y en otras partes del mundo que reportan la ausencia de rotavirus en centros de maternidad [13,29,30]. Sin embargo, este estudio, a diferencia de los mencionados anteriormente, reporta la no detección de rotavirus en un centro donde previamente se habían observado prevalencias superiores al 55%. Es decir, que aparentemente en la MCP hubo interrupción de la transmisión de rotavirus. ¿Que factores pudieran haber llevado a interrumpir la circulación de rotavirus entre los neonatos de la MCP? Es probable que la interrupción de la transmisión de rotavirus se deba a cambios importantes en el manejo del dúo madre-neonato introducidos en la MCP a partir del año 1995. Siguiendo recomendaciones emanadas de la declaración conjunta hecha en 1989 por la OMS y la UNICEF titulada *Protección, Promoción y Apoyo de la Lactancia Natural. Función Especial de los Servicios de Maternidad* [31], dentro de la MCP se implementaron los programas denominados *Apego Precoz*, *Alojamiento Conjunto* y *Consejería en Lactancia Materna*. El primero de estos programas tiene como objetivo comenzar con la lactancia materna dentro de la primera media hora después del parto o a la brevedad po-

sible en caso de cesárea y dentro del programa *Consejería en Lactancia Materna*, personal especializado ofrece instrucción a las madres en técnicas de correcto amamantamiento. Ambos programas en conjunto han permitido aumentar la frecuencia y la calidad de la lactancia materna a los neonatos de la MCP en relación con la década de los 80. El amamantamiento sin restricciones ofrece protección contra las infecciones gastrointestinales, entre ellas por rotavirus, ya que la mucosa intestinal se ve bañada constantemente por anticuerpos, oligosacáridos y otros elementos protectores presentes en la leche materna [32-34]. Finalmente, el programa de *Alojamiento Conjunto*, que consiste en garantizar el alojamiento del recién nacido con su madre las 24 horas del día, salvo indicación médica, además de contribuir con un aumento en la frecuencia de la lactancia materna, redujo el tiempo en que los neonatos permanecían todos juntos en la sala de neonatos de 3 a 4 días, a menos de 2 horas. La transmisión de los rotavirus ocurre por la vía fecal-oral [1], por lo tanto es de suponer que la ruptura de los grupos hiciera menos factible la transmisión del agente entre los neonatos.

En la Tabla 2 se presenta un resumen de algunas de las condiciones relacionadas con el manejo del par madre-neonato antes y después del año 1995. Antes de 1995, no existía el programa de apego precoz, los recién nacidos podían llegar a pasar horas o incluso días, antes de ser amamantados por su madre por primera vez. Hoy en día, a todas las madres se les entrega el recién nacido en los primeros 30 minutos después del parto, para hacer contacto piel a piel y estimular el amamantamiento. Por otra parte, antiguamente el neonato era ubicado en el retén separado de su madre; al presente, se garantiza el alojamiento conjunto del recién nacido y la madre dentro de las primeras horas después del parto. En cuanto a la alimentación del neonato, anteriormente solo existía el Servicio de Fórmulas Lácteas y sólo ha sido descrita la lactancia mixta o artificial; luego de 1995, se creó el Banco de Leche Humana cuyo desempeño favoreció un aumento en la lactancia materna exclusiva, conjuntamente con la aplicación del programa de *Consejería en Lactancia Materna*. Es de suponer que todos estos cambios en conjunto crearon condiciones suficientes para interrumpir la transmisión de rotavirus dentro de la MCP. Lamentablemente, este estudio se ve limitado por el hecho de no contar con otro centro en donde aún persista la infección neonatal por rotavirus, lo que hubiera permitido hacer comparaciones importantes referidas a las condiciones de la dupla madre-neonato que pudieran validar las conclusiones presentadas.

El alto porcentaje (91%) de muestras falsas positivas para norovirus obtenidas con el estuche comercial Ridascreen® Norovirus indica que dicho estuche comercial, estandarizado y recomendado por los fabricantes para uso con muestras fecales de infantes, no es apropiado para el uso con muestras de recién nacidos. Estudios previos han advertido sobre problemas de especificidad en la detección de virus entéricos en muestras de neonatos al utilizar estuches comerciales destinados a ser usados con muestras fecales de infantes [35,36]. Las muestras fecales de recién nacidos presentan una pastosidad y consistencia, así como

un alto contenido de proteínas y anticuerpos maternos que las hace distintas a las muestras fecales de infantes. Cukor y col. [37] señalan que la presencia de anti-inmunoglobulinas, capaces de unirse a la fase sólida, en las muestras de heces es causa frecuente de falsos positivos en ensayos de ELISA.

bulinas, capaces de unirse a la fase sólida, en las muestras de heces es causa frecuente de falsos positivos en ensayos de ELISA.

Tabla 2. Variables relacionadas con el manejo del par madre-neonato en la MCP, antes y después de la aplicación de los programas de protección, promoción y apoyo de la lactancia natural, OMS-UNICEF 1989.

Antes de 1995	Después de 1995	Programa
Madre-neonato sin contacto al nacer Primer amamantamiento en horas o días	Contacto madre-neonato al nacer Primer amamantamiento dentro de 30 minutos	Apego precoz
Tiempo de permanencia en el retén: 3-4 días Madre en habitación, neonato en retén	Tiempo de permanencia en el retén: 2 horas Madre y neonato juntos en habitación	Alojamiento conjunto
N° de biberones diarios repartidos en la MCP: 1.200 Servicio de fórmulas lácteas Lactancia mixta/artificial	N° de biberones diarios repartidos en la MCP: 600 Servicio de fórmulas lácteas/banco de leche humana Lactancia materna exclusiva, lactancia mixta/artificial	Consejería en lactancia materna
Prevalencia de RV: 56% ^a	Prevalencia de RV: 0% ^b	

RV: rotavirus. ^aPerez-Schael y col 1984. ^bEste estudio, 2004.

Los resultados de este estudio sugieren que no hay circulación de calicivirus del género *Norovirus* dentro de la MCP. Es posible que los neonatos, a diferencia de todos los otros grupos etarios [17], sean naturalmente resistentes a la infección por norovirus. Sin embargo, también es probable que dentro de la MCP no estén dadas las condiciones para que se establezcan infecciones nosocomiales por norovirus. La transmisión de los norovirus ocurre por la vía fecal-oral y hay estudios que señalan que la leche materna posee oligosacáridos protectores contra la infección causada por calicivirus [32,33]. Por lo tanto, aquellas mismas condiciones en el manejo del par madre-neonato que pudieron llevar a la interrupción de la transmisión de rotavirus, también pudieran estar protegiendo a los recién nacidos de las infecciones por otros agentes entéricos como los norovirus.

En resumen, este estudio sugiere que la transmisión de rotavirus entre recién nacidos de la MCP observada por Pérez-Schael y col. [12] pudiera haberse interrumpido y que actualmente no ocurren infecciones por rotavirus en los neonatos de ese Centro. Los cambios en el manejo del par madre-neonato introducidos hace más de una década, y que han redundado en un aumento en la frecuencia, calidad y cantidad de la lactancia materna y en la reducción del tiempo que los recién nacidos permanecen juntos en la sala de neonatos, son presumiblemente la causa para que haya ocurrido dicha interrupción. Asimismo, este estudio sugiere que no ocurren infecciones por calicivirus del género *Norovirus* dentro de la Maternidad, aunque no es posible decir si ello se debe a que los neonatos son naturalmente resistentes o a la existencia de condiciones que impiden el establecimiento de la infección.

Agradecimientos

Al personal del Departamento de Neonatología de la MCP por su valiosa colaboración en la recolección de las muestras utilizadas en este trabajo. Al Banco de Leche

Humana de la MCP por la cooperación prestada. A las madres de la MCP quienes gentilmente permitieron la realización de este estudio.

Referencias

- Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology-Vol 1*, 4ta ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001. pp. 1787-834.
- Estes MK. Rotaviruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology-Vol 1*, 4ta ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001. pp. 1747-86.
- Fischer TK, Steinsland H, Valentiner-Branth P. Rotavirus particles can survive storage in ambient tropical temperatures for more than 2 months. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4763-4.
- Parashar UD, Hummelman EG, Breesee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:565-72.
- Salinas B, González GG, González R, Escalona M, Materán M, Pérez-Schael IP. Epidemiologic and clinical characteristics of rotavirus disease during five years of surveillance in Venezuela. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(10 Suppl):S161-7.
- Chrystie L, Totterdell BL, Baker MJ, Scopes JW, Banatvala JE. Rotavirus infection in a maternity unit. *Lancet* 1975; 2: 79.
- Haffejee IE. Neonatal rotavirus infection. *Rev Infect Dis* 1991; 13(5):957-62.
- Vethanayagam RR, Ananda Babu M, Nagalaxmi KS, Maiya PP, Venkatesh HA, Purohit S, y col. Possible role of neonatal infection with the asymptomatic reassortant rotavirus (RV) strain I321 in the decrease in hospital admissions for RV diarrhea, Bangalore, India, 1988-1999. *J Infect Dis* 2004; 89:2282-9.
- McLean B, Holmes I.H. Transfer of antirotaviral antibodies from mothers to their infants. *J Clin Microbiol* 1981; 12: 320-5.
- Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 2004; 78: 10213-20.

11. Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. *N Engl J Med* 1983; 309: 72-6.
12. Pérez Schael I, Daoud SG, White L, Urbina G, Daoud de DaSilva N, Pérez M y col. Rotavirus en neonatos de la maternidad "Concepción Palacios" de Caracas. *Arch Venez Puericult Pediatr* 1983; 66: 3-9.
13. Pérez Schael I, Daoud G, White L, Urbina G, Daoud N, Pérez M, y col. Rotavirus shedding by new-born children. *J Med Virol* 1984; 14: 127-36.
14. Pacheco FA. La infección por rotavirus en neonatos. Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Magíster Scientiarum en Biología mención Microbiología. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas-IVIC, Centro de Estudios Avanzados-CEA. Caracas, 1990.
15. Flores J, White L, Blanco M, Perez-Schael I. Serological response to rotavirus infection in newborn infants. *J Med Virol* 1994; 42:97-102.
16. Clarke IN, Lambden PR. The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol* 1997; 78:291-301.
17. Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human caliciviruses. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology-Vol 1*, 4ta ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001. pp. 841-74.
18. Pujol FH, Vasquez G, Rojas AM, Fuenmayor ME, Loureiro CL, Perez-Schael I, y col. Norwalk virus infection in Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92:205-11.
19. Rodríguez-Guillen L, Vizzi E, Alcalá AC, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J Clin Virol* 2005; 33:104-9.
20. Liprandi F, Brito B, Palencia L, Esparza J. Derivation of a monoclonal antibody against the group specific antigen of rotaviruses and its use in a diagnostic enzymatic immunoassay. *Acta Cient Venez* 1986; 37(4):432-6.
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
22. Maldonado AJ, Bastardo JW. Epidemiología molecular de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela. *Acta Cient Venez* 1992; 43:368-72.
23. Abbaszadegan M, Steward P, LeChevalier M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 444-9.
24. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 1999; 83:145-54.
25. Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, Brown DW. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 1995; 47:392-8.
26. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:15-37.
27. Rodger S.M, Bishop R.F, Birch C, Mc Lean B, Holmes I.H. Molecular epidemiology of human rotavirus in Melbourne, Australia. From 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 272-8.
28. Steele D, Reynecke E, de Beer M, Bos P, Smuts I. Characterization of rotavirus infection in a hospital neonatal unit in Pretoria, South Africa. *J Trop Pediatr* 2002; 48:167-71.
29. Appleton H, Buckley M, Robertson MH, Thom BT. A search for faecal viruses in new-born and other infants. *J Hyg (Lond)* 1978; 81:279-83.
30. Yap KL, Boo NY, Surayah O. Absence of rotavirus in the neonatal special care nursery of a Malaysian maternity hospital. *Malays J Pathol* 1994; 16:89-91.
31. Declaración conjunta OMS-UNICEF. Protección, Promoción y Apoyo de la Lactancia Natural. Función Especial de los Servicios de Maternidad. OMS Ginebra 1989. En: http://www.unicef.org/spanish/nutrition/index_24807.html. Acceso 24 de agosto de 2006.
32. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinen-Derr JK, y col. Human milk oligosaccharide blood group epitopes and innate immune protection against *Campylobacter* and calicivirus diarrhea in breastfed infants. *Adv Exp Med Biol*; 2004; 554:443-6.
33. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinen-Derr JK, y col. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr* 2004; 145:297-303.
34. Asensi MT, Martínez-Costa C, Buesa J. Anti-rotavirus Antibodies in Human Milk: Quantification and Neutralizing Activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42:560-7.
35. Krause PJ, Hyams JS, Middleton PJ, Herson VC, Flores J. Unreliability of Rotazyme ELISA test in neonates. *J Pediatr* 1983; 103:259-62.
36. Chrystie IL, Totterdell BM, Banatvala JE. False positive rotazyme tests on faecal samples from babies. *Lancet* 1983; 2(8357):1028.
37. Cukor G, Berry MK, Blacklow NR. Simplified radioimmunoassay for detection of human rotavirus in stools. *J Infect Dis* 1978; 138:906-10.