

Ribovirus emergentes implicados en las gastroenteritis

J.M.^a Eiros Bouza^a, M.^aR. Bachiller Luque^b y R. Ortiz de Lejarazu^a

Departamentos de ^aMicrobiología y ^bPediatría. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

(*An Esp Pediatr* 2001; 54: 136-144)

Los virus se sitúan en un lugar preferente entre los agentes causales de diarrea aguda, en particular en la infancia. En este contexto el papel de los astrovirus, coronavirus, torovirus y picobirnavirus es emergente. Los astrovirus se han detectado en las heces entre el 1,2 y el 20% de niños con diarrea que requieren atención médica en una gran variedad de localizaciones geográficas. Se han descrito brotes epidémicos en escuelas, guarderías y salas pediátricas, y son más frecuentes entre niños de menos de 3 años. En climas templados se ha demostrado una mayor incidencia invernal, y en climas tropicales ésta es similar en todo el año, siendo su transmisión preferente por vía orofecal. Se han reconocido siete serotipos de astrovirus humanos, de los cuales el más común es el uno. Los viriones pueden eliminarse durante amplios períodos y detectarse mediante microscopía electrónica. En estudios epidemiológicos se emplean técnicas de enzimoanálisis para detectar el antígeno común de grupo y se han desarrollado también técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos mediante hibridación y amplificación (reacción en cadena de la polimerasa).

Los coronavirus entéricos se han asociado con frecuencia con enfermedad gastrointestinal en recién nacidos y niños menores de 12 años. El papel de los torovirus y picobirnavirus como causa de gastroenteritis es también emergente. Se necesitan estudios epidemiológicos para determinar su verdadera frecuencia en la comunidad, identificar sus mecanismos de transmisión y explicar la fisiopatología de los cuadros provocados por estos agentes.

Palabras clave

Gastroenteritis. Astrovirus. Coronavirus. Torovirus. Picobirnavirus.

EMERGENT RIBOVIRUSES IMPLICATED IN GASTROENTERITIS

Viral agents are one of the main causes of acute diarrhea, particularly in infants and young children. Astrovirus, coronavirus, torovirus, and picobirnavirus are increasingly being identified as causative agents of gastroenteritis.

Astroviruses have been detected in the stools of between 1.2% and 20% of children with diarrhea requiring medical care in a variety of geographical areas. Outbreaks have been described in schools, day care settings and pediatric wards. Children younger than 3 years old are the most frequently affected. In temperate climates incidence is greater in winter whereas in tropical areas infection occurs throughout the year. Transmission is mainly through the fecal-oral route. At least seven serotypes of human astroviruses have been recognized and serotype 1 is more common than the other serotypes. Astroviruses are often shed in stools during long periods and can be detected by electron microscopy. An enzyme-immunoassay technique that detects the astrovirus group antigen has been widely used in epidemiological studies. Nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction-based techniques have also been used. Enteric coronaviruses have most frequently been associated with gastrointestinal disease in neonates and children younger than 12 years old. The role of toroviruses and picobirnaviruses as causative agents of gastroenteritis is still emerging.

Further epidemiological studies to determine the frequency of these viruses in the community and to identify their mechanisms of transmission are needed, as are further studies to elucidate the pathophysiology of diseases due to these agents.

Key words:

Gastroenteritis. Astrovirus. Coronavirus. Torovirus. Picobirnavirus.

INTRODUCCIÓN

El papel que desempeñan los nuevos ribovirus como agentes causales de gastroenteritis en la infancia está fuera de toda duda¹⁻³. De la magnitud de las consecuencias de esta focalidad infecciosa puede dar una idea el hecho de que de manera reiterada se señala en diversos fo-

Correspondencia: Dr. J.M.^a Eiros Bouza.

Departamento de Microbiología. 6.^a pl. Facultad de Medicina.
Avda. Ramón y Cajal, 7. 47005 Valladolid.
Correo electrónico: eiros@med.uva.es

Recibido en septiembre de 2000.

Aceptado para su publicación en octubre de 2000.

ros la gran morbilidad y la elevada mortalidad que la diarrea aguda ocasiona en niños menores de 5 años⁴. El protagonismo que ejercen en su etiología nuevos virus de ácido ribonucleico (ARN) se ha visto impulsado por los esfuerzos técnicos en el diagnóstico virológico de muchos cuadros que permanecían sin clasificar. A la vez que se ha potenciado el conocimiento de su estructura y su genoma, se ha progresado en una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos. Todo ello conducirá además al desarrollo de nuevos antivíricos capaces de inhibir su replicación y, de manera primordial, llevará a configurar los componentes que integren las potenciales vacunas frente a éstos.

En el presente trabajo se excluyen deliberadamente los calicivirus, cuya novedosa actualidad se ha revisado recientemente en un foro monográfico⁵, y los ya clásicos rotavirus y adenovirus, objeto de atención por nuestro grupo con anterioridad⁶⁻⁸. Nuestra reflexión abarca, con un esquema convencional, aspectos relativos a la estructura, acción patógena, posibilidades diagnósticas y epidemiología de astrovirus, coronavirus, torovirus y picobirnavirus. De manera preliminar en la tabla 1 se exponen aquellos virus primariamente asociados a cuadros de gastroenteritis en la infancia, indicando sus propiedades estructurales básicas.

ASTROVIRUS

Los astrovirus constituyen un género incluido en la nueva familia de virus *Astroviridae*⁹. Se han relacionado como una importante causa de gastroenteritis, siendo según Bass¹⁰ la segunda causa, después de los rotavirus, de gastroenteritis víricas en niños pequeños, con una elevada incidencia tanto en los países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo. Junto con los calicivirus son probablemente responsables de la mayor parte de las gastroenteritis que hasta hace poco se clasificaban como de etiología desconocida¹¹.

Desde el punto de vista estructural son virus pequeños de 28-30 nm de diámetro, desprovistos de membrana de envoltura, con cápside de simetría icosaédrica y un genoma compuesto por ARN monocatenario de polaridad positiva. La morfología de los viriones, observados mediante microscopía electrónica les otorga una apariencia similar a una estrella de 5 o 6 puntas, lo cual da origen a su nombre^{9,12}, con un centro electrodenso y múltiples áreas triangulares electrolúcidas en su superficie, delimitadas por bordes lisos. La adaptación de las partículas víricas a cultivos celulares permite además la visualización de unas proyecciones puntiagudas en los vértices a modo de espículas¹³.

El análisis de su secuencia genómica ha permitido identificar en el ARN monocatenario tres fragmentos de lectura abierta (*open reading frames*, ORF), que codifican tanto para proteínas con actividad funcional, tales como la proteasa (codificada por el ORF-1) y la polimerasa (co-

TABLA 1. Virus primariamente implicados en cuadros de gastroenteritis en la infancia

Familia	Género	Ácido nucleico	Envoltura	Cápside
<i>Caliciviridae</i>	V Norwalk like	ARNmc	No	Icosaédrico
	V Sapporo like	ARNmc	No	Icosaédrico
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus	ARNmc	No	Icosaédrico
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	ARNmc	Sí	Helicoidal
	Torovirus	ARNmc	Sí	Helicoidal
<i>Reoviridae</i>	Rotavirus	ARNbc	No	Icosaédrico
<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus	ARNbc	No	Icosaédrico
<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus	ADNbc	No	Icosaédrico

Se pueden documentar en circunstancias específicas otros virus, fundamentalmente de la familia *Herpesviridae*, que no ocasionan primordialmente cuadros de gastroenteritis.
mc, monocatenario; bc, bicatenario.

dificada por el ORF-1b) como para proteínas con actividad estructural¹⁴. Entre estas últimas se incluyen las proteínas de la cápside¹⁵, codificadas por una región del genoma altamente conservada, el fragmento ORF-2.

Entre los diferentes aislados humanos se observa una diferencia en cuanto al número de proteínas estructurales¹⁶⁻¹⁸, que varían en función de los distintos serotipos (a los que nos referiremos más adelante). Este hecho refleja las diferencias existentes en el procesamiento del precursor del cápside. En este terreno el dinamismo de los grupos de investigación básica realiza contribuciones relevantes desde perspectivas muy variadas. Los estudios relativos a la dinámica de replicación intracelular de estos virus se han visto impulsados por la consecución llevada a cabo por Geigenmuller et al¹⁹ de un clon infectivo de ADN complementario y de sus correspondientes transcritos de ARN. A éstas se añaden las recientes aportaciones realizadas por el Departamento de Pediatría de la Universidad de Stanford²⁰, en el que se ha podido caracterizar el proceso proteolítico de la formación del cápside. Estas líneas de trabajo además de aportar luz al conocimiento de la patogenia de la enfermedad diarreica originada por los astrovirus, contribuyen a identificar aquellas proteínas que por su función relevante y su mantenida repetitividad entre cepas sean óptimos candidatos a incorporar a las vacunas.

Acción patógena

En la actualidad la patogenia de la gastroenteritis producida por los astrovirus no se ha establecido definitivamente. Buena parte de los conocimientos relativos a la misma derivan de estudios desarrollados en modelos animales, en los que son hallazgos constantes la atrofia de las papilas intestinales y la existencia de infiltrados inflamatorios en la lámina propia, lo cual desencadena una modificación de la actividad de las disacaridasas y de manera concomitante una diarrea osmótica^{21,22}.

Desde el punto de vista clínico los datos aportados por distintas series²³⁻³⁰, establecen el período de incubación

de la enfermedad en unos 3-4 días, y en ausencia de la coexistencia de otros patógenos, las manifestaciones suelen durar alrededor de 3-5 días, si bien el intervalo puede oscilar según Guerrero et al³¹, sobre todo en lactantes entre 1-21 días. La eliminación de virus en heces puede prolongarse hasta 5 semanas, cuando se investiga su presencia con técnicas de amplificación genómica³².

Diagnóstico virológico

La idea primordial que debe presidir el comentario al diagnóstico virológico de las gastroenteritis por astrovirus es que si bien didácticamente las técnicas pueden abordarse desde el marco conceptual clásico de visualización, aislamiento, detección de antígenos estructurales y detección genómica, en la práctica asistencial sólo la detección de antígenos en heces, por diversos métodos, suele estar disponible en la oferta diagnóstica a la que accede el pediatra en nuestro entorno. En la tabla 2 se exponen las características operacionales más relevantes de las cuatro estrategias diagnósticas de acuerdo con el esquema conceptual anteriormente referido.

Los astrovirus, a diferencia de otros agentes implicados en las gastroenteritis víricas, son a menudo eliminados en grandes cantidades en las heces, por lo que pueden detectarse mediante microscopía electrónica^{33,34}. Si bien en un principio no se postulaba la necesidad de emplear técnicas de inmunoagregación, su posterior incorporación mejoró el rendimiento de esta metodología diagnóstica³⁵. Resulta obvio que aunque estas técnicas posibilitan desde un principio su reconocimiento como agentes de gastroenteritis, no es menos cierto que las exigencias de infraestructura y personal limitan su disponibilidad en la asistencia clínica convencional.

Las técnicas de cultivo celular se han impulsado siempre más como un método intermedio, necesario para el aislamiento y caracterización de viriones, que como un método de diagnóstico convencional^{36,37}. Diversos grupos de investigación poseen líneas que ofertan un excelente rendimiento en este sentido^{20,38}.

Sin duda, como señalan Glass et al³⁹, el hecho más determinante para establecer el diagnóstico ha sido la progresiva incorporación de métodos más sensibles al análisis de las heces de los niños con gastroenteritis, lo cual ha condicionado un cambio en el protagonismo que alcan-

zan los astrovirus en diferentes series. En los primeros estudios basados en la microscopía electrónica, aparecen como una causa poco frecuente de gastroenteritis, que no supera o supera ligeramente el 1% en pequeños brotes invernales^{12,23,24}. Por una parte, el desarrollo de la producción de anticuerpos monoclonales y, por otra, la progresiva caracterización y purificación de las proteínas y antígenos estructurales de los viriones, posibilitaron el desarrollo de técnicas de diagnóstico rápido, tales como el enzimoanálisis (EIA), la inmunodifusión capilar y la aglutinación con partículas de látex. Todas ellas facilitan la detección de antígenos víricos en heces, elevando la sensibilidad con respecto a la microscopía y condicionando también un aumento de la prevalencia de las infecciones por astrovirus, cuando estas técnicas se emplean en la sistematología diagnóstica de los estudios epidemiológicos^{27,29,31,40}. En un estudio muy reciente, McIver et al⁴¹ han evaluado un EIA comercial, documentado como características intrínsecas para la muestra poblacional objeto de atención una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98,6%. Prácticamente de manera concomitante en el tiempo Putzker et al³⁰ presentaron sus hallazgos relativos al óptimo comportamiento de otro EIA también disponible en la práctica asistencial, otorgándole la máxima puntuación en los referidos parámetros.

En última instancia, las técnicas de detección genómica, ya sea mediante hibridación o mediante amplificación (y entre ellas las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) abren un gran cauce para el estudio de la evolución y la variabilidad entre diferentes aislados^{17,18,28,32}. Además, en íntima conexión, amplían el campo a través de la secuenciación de ácidos nucleicos, para el estudio de los genotipos¹⁴ y su concordancia con lo establecido para los serotipos. La reciente aplicación de las técnicas de PCR al diagnóstico ha supuesto un incremento de la prevalencia de estos virus como causa de diarrea y al mismo tiempo la posibilidad de documentar su excreción en individuos asintomáticos y de ampliar el período de tiempo en el que pueden eliminarse³². En este sentido, Cubitt et al⁴² durante la evaluación de heces de niños trasplantados de médula ósea ingresados en un hospital londinense, corroboraron la extraordinaria sensibilidad de la PCR frente a la microscopía electrónica y el EIA⁴².

TABLA 2. Métodos de diagnóstico virológico directo empleados para documentar la presencia de astrovirus en heces

Método	Disponibilidad	Sensibilidad/especificidad	Tiempo requerido	Referencias bibliográficas
Microscopía electrónica	Laboratorios asistenciales de referencia	++/++	1-2 días	33, 34, 35
Cultivo celular	Laboratorios de investigación	++/+++	2-7 días	20, 36, 37, 38
Detección de antígenos estructurales*	Laboratorios asistenciales convencionales	+++ / +++	< 1 día	27, 29, 30, 31, 40, 41
Detección genómica**	Laboratorios de investigación	++++ / ++++	2-3 días	14, 17, 18, 28, 32, 42

*Látex, enzimoanálisis, inmunodifusión capilar; **hibridación, amplificación (reacción en cadena de la polimerasa).

TABLA 3. Estudios epidemiológicos publicados durante el último cuatrienio que describen la prevalencia de astrovirus en niños con gastroenteritis

Autor (referencia)	País/zona (año publicación)	Nº de episodios	Técnica diagnóstica	Prevalencia (%)
Palombo et al ¹⁷	Australia (1996)	378	Detección genómica	4,2
Taylor et al ⁴³	Sudáfrica (1997)	10	Detección genómica	20
Guerrero et al ³¹	México (1998)	510	EIA	5
Steele et al ⁴⁴	Sudáfrica (1998)	225	EIA	7
Gaggero et al ⁴⁵	Chile (1998)	456	EIA, cultivo, detección genómica	11
Shastri et al ²⁹	EE.UU./California (1998)	267	EIA	10
Maldonado et al ⁴⁶	Centroamérica (1998)	271		17
Unicomb et al ²⁷	India (1998)	153	EIA	4
Pang et al ²⁸	Finlandia (1999)	723	Detección genómica	9
Mitchell et al ¹⁸	EE.UU./Virginia (1999)	179	Detección genómica	20
Bou et al ⁴⁷	Francia (1999)	414	EIA, detección genómica	6
McIver et al ⁴¹	Australia (2000)	414	EIA, cultivo, detección genómica	21
Mustafa et al ³⁸	Australia (2000)	449	Detección genómica	9
Putzker et al ³⁰	Alemania (2000)	4.211	EIA	1,2
Eiros et al ⁴⁸	España (2000)	286	Látex	3,1

Detección genómica: hibridación y amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa. Detección de antígenos: enzimoanálisis (EIA).

A pesar de lo expuesto, la aplicación de esta última estrategia diagnóstica dista de estar disponible para su aplicación en la práctica asistencial, y deben realizarse esfuerzos en la búsqueda de procedimientos eficientes para la extracción de los ácidos nucleicos (sobre todo en muestras fecales), para establecer las condiciones ideales para la amplificación e identificación de los productos de PCR.

Epidemiología

Existen numerosas contribuciones efectuadas en los últimos 4 años, que establecen el protagonismo alcanzado por los astrovirus como agentes etiológicos de las gastroenteritis en la infancia^{17,18,27-31,41,43-48}. A pesar del sesgo inherente a la variabilidad observada en el diseño de éstos, resulta útil conocer una panorámica de diversas series publicadas al respecto. En la tabla 3 se recoge la información aportada por 15 series (incluida la nuestra), aparecidas en el mencionado período. Como puede observarse, las prevalencias oscilan entre el 1 y el 20%, y si bien los métodos diagnósticos empleados son diferentes, no es menos cierto que uno de los factores que condicionan su aplicación es la dotación tecnológica en cuanto a infraestructura del grupo que establece el diagnóstico. De la información aportada tanto por estas series como por estudios similares realizados con anterioridad^{24,26} pueden extraerse algunas consideraciones de interés, tal y como se expone en la tabla 4.

La enfermedad se ha documentado de manera aislada en una gran variedad de contextos, afectando fundamentalmente a niños menores de 3 años^{24,30,31}. Se han descrito brotes epidémicos en guarderías, escuelas y salas pediátricas^{24,39,43,49,50}. Se han detectado también brotes en

TABLA 4. Algunas características epidemiológicas de las gastroenteritis por astrovirus

Características	Referencias
La enfermedad aislada afecta fundamentalmente a menores de 3 años	24, 30, 31
Los brotes epidémicos se han descrito en guarderías, escuelas, salas pediátricas	24, 32, 39, 43, 49, 50
En niños inmunodeprimidos se han descrito brotes	42
En zonas templadas se observa predilección por el invierno	33, 34, 38, 39
En zonas cálidas la distribución anual es uniforme	46, 51
La transmisión ocurre probablemente por vía orofecal	3, 9, 11, 39

niños sometidos a trasplantes⁴² y con infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)⁵¹. La transmisión ocurre predominantemente por la vía orofecal^{3,9,11}. En cuanto a las variables climáticas que acompañan a la enfermedad cabe destacar que en latitudes de clima templado se observa una mayor predilección por el invierno^{33,34,39}. En este sentido, en nuestras antípodas se han descrito picos de incidencia invernal con periodicidad bianual, tal y como reflejan Mustafa et al³⁸ en un estudio realizado en niños menores de 5 años, seguidos entre los años 1995 y 1998 en Melbourne. En zonas cálidas se observa una distribución uniforme a lo largo del año⁴⁶.

Existen dos estrategias de aproximación al conocimiento de los serotipos circulantes. Por una parte, la serotipificación de los aislados víricos a partir de muestras fecales y por otra la realización de estudios de respuesta seroló-

gica en suero de personas que han estado en contacto con astrovirus.

Hasta el momento actual se distinguen al menos la existencia de siete serotipos de astrovirus humanos^{35,36,52,53}, cuya notación se efectúa con el acrónimo HastV seguido de un guión y un número arábigo del 1 al 7. Recientemente se ha comunicado la aparición de un octavo serotipo con una prevalencia pequeña³⁸. Su diferenciación puede establecerse analizando los aislados a través de técnicas de neutralización en placa, inmunofluorescencia o enzimoimmunoanálisis^{16,31,35,54}. Cuando se efectúa un diagnóstico directo consistente en la detección de antígenos estructurales puede observarse la existencia de reactividad cruzada entre serotipos, debido a la presencia de un antígeno común de grupo. La distribución de los serotipos es universal, si bien existe una preponderancia bastante generalizada del serotipo 1^{28,29,35,45,53}.

Los estudios pioneros en seroprevalencia se efectuaron en el Reino Unido a finales de la década de los años setenta, y mostraron que el 75% de los niños a la edad de 3 a 4 años eran ya seropositivos frente a astrovirus⁵⁵. Los hallazgos posteriores han confirmado esta realidad de la aparición de una respuesta serológica precoz en niños de todo el mundo en edades muy tempranas^{35,39,56}. Una de las contribuciones más rigurosas al estudio de la seroepidemiología de los astrovirus ha sido la realizada por Mitchell et al⁵⁷, quienes establecieron un sistema de monitorización secuencial de los anticuerpos antiastrovirus en 393 niños ingresados por problemas no infecciosos en un hospital de Virginia a lo largo de 3 años consecutivos. Emplearon un EIA capaz de detectar anticuerpos frente a los diferentes antígenos de cápside (expresados en baculovirus) y encontraron que en el intervalo edad de 6 a 9 años el 94% de los niños tenían anticuerpos frente a HastV-1. El mismo grupo efectuó la secuenciación del genoma de viriones de niños con diarrea residentes en una zona y concluyeron que el HastV-1 era el principal responsable de los brotes epidémicos de astrovirus, seguido por el HastV-2¹⁸. Los estudios seroepidemiológicos de Koopmans et al³⁵ en Holanda, han aportado luz al conocimiento de la coexistencia de anticuerpos frente a diversos serotipos, lo cual aboga por la múltiple coinfección en un mismo individuo. Finalmente, es interesante conocer que el análisis comparativo de la secuencia de un mismo serotipo revela divergencia a lo largo del tiempo, tal y como establecieron Palombo et al¹⁷ para el HastV-1 en un período de 15 años, al cifrar su variabilidad del 7%. Ello apunta sin duda a la necesidad de implementar técnicas de diagnóstico virológico molecular aplicables a la asistencia clínica.

CORONAVIRUS

De entre el resto de los ribovirus emergentes, aquellos que se implicaron de una manera más precoz en el tiempo como agentes causales de gastroenteritis infanti-

les son los coronavirus¹⁰. Éstos se incluyen en la familia *Coronaviridae* y los viriones poseen un tamaño medio (entre 60 y 220 nm), estando provistos de una membrana de envoltura con proyecciones, lo cual les confiere un aspecto de "corona". Su nucleocápside posee simetría helicoidal y alberga un ARN monocatenario de polaridad positiva⁵⁸.

La información relevante disponible relativa a su papel como agentes causales de diarrea en la infancia es mucho menos escasa y concluyente, en cuanto a su relación etiológica con la misma⁵⁹⁻⁶², que lo comentado para los astrovirus. Si bien los estudios relativos a modelos animales son relevantes y en nuestro país existen grupos de excelencia que han contribuido a esclarecer aspectos básicos merced a la recombinación de genes responsables de codificación de proteínas que determinan tropismo celular⁶³ y desarrollo de vectores para la consecución de vacunas⁶⁴.

Desde el punto de vista patogénico se han descrito diferentes receptores celulares para los viriones, entre los que destacan la aminopeptidasa N⁶⁵ y diversas moléculas de la superficie celular tales como los antígenos de clase I del complejo de histocompatibilidad (HLA)⁶⁶.

Si bien los coronavirus se describieron inicialmente como patógenos respiratorios, enseguida se documentaron viriones en heces mediante microscopía electrónica^{60,67}. Las características clínicas de los cuadros acompañantes se asemejan en gran medida a las establecidas para los rotavirus, si bien en el caso de los coronavirus algunos autores⁶⁸, describen como matices diferenciales que estos últimos originan diarrea menos acuosa, pero con presencia de más moco y sangre en heces. Este último hallazgo había sido avanzado en algunos trabajos que describían epidemias de enterocolitis necrosante en unidades de recién nacidos y lactantes^{59,60}. No faltan, no obstante, aportaciones que comunican su eliminación de manera asintomática en niños que habitan en zonas cálidas⁶⁹.

Los estudios epidemiológicos que han concedido un protagonismo inequívoco a los coronavirus como agentes etiológicos de diarrea establecen su preponderancia en edades precoces de la vida^{59,60}. Hasta donde se conoce una de las contribuciones más amplias en este campo ha sido la efectuada por Payne et al⁶⁷, quienes realizaron un estudio de 8 años en 862 muestras fecales de niños con gastroenteritis y lograron además establecer una preferencia estacional de estos cuadros por los meses fríos del año.

En última instancia, por lo que hace referencia a su diagnóstico virológico, además de su visualización por microscopía electrónica^{60,67}, algunas cepas se han logrado propagar en cultivos de células intestinales y a partir de ellos se han adaptado a líneas celulares de otras especies animales⁷⁰. Este hecho ha facilitado la replicación de viriones y la posterior separación de sus componentes estructurales en geles de poliacrilamida, permitiendo la

identificación y caracterización de antígenos específicos⁷¹. Sería deseable el desarrollo (al igual que se comentó para astrovirus) de métodos de diagnóstico rápido basados en la detección mediante tecnología convencional (EIA, aglutinación con látex) de estos antígenos en heces. Finalmente, cabe apuntar que se han desarrollado métodos de detección genómica, aplicables más al ámbito de la investigación que al de la asistencia clínica^{72,73}.

TOROVIRUS

Al igual que los coronavirus, los torovirus constituyen un género independiente, pero también dentro de la familia *Coronaviridae*⁷⁴. Desde el punto de vista estructural son virus con un tamaño de 100-140 nm de diámetro, provistos de membrana de envoltura, con una nucleocápside de simetría helicoidal que alberga en su genoma ARN monocatenario de polaridad positiva⁷⁵.

Si bien su visualización mediante microscopía electrónica se remonta a 1984⁷⁶, su papel como agentes causales de gastroenteritis es todavía emergente⁷⁷⁻⁷⁹. Una aportación sólida a su conocimiento ha sido la realizada por el grupo del Pediatric Hospital de Toronto⁸⁰, cuya lectura parece obligada para cuantos profesionales están interesados en el tema. Estos autores estudiaron casi 3.000 muestras fecales de niños hospitalizados entre 1993 y 1995, con un doble objetivo. Por una parte, describir la presencia de torovirus en pacientes con síntomas gastrointestinales y, por otra, abordar su diagnóstico virológico, la respuesta serológica frente a los mismos y la evolución clínica de la infección. Entre sus hallazgos cabe destacar que en comparación con otros agentes, la diarrea por torovirus se acompaña de menos vómitos y origina con mayor frecuencia heces sanguinolentas. Se asocia también a una adquisición nosocomial y afecta en mayor proporción a pacientes inmunodeprimidos.

La microscopía electrónica se ha mantenido como un buen método para detectar la presencia de torovirus en heces⁷⁹, y aunque la incorporación de procedimientos de inmunomarcado ha mejorado su sensibilidad⁸¹, su aplicación en la práctica habitual dista de ser una realidad en nuestro contexto asistencial. Por ello, la tecnología diagnóstica deseable para su aplicación eficiente a la práctica clínica sería la basada en técnicas de detección de antígenos. En este sentido, Koopmans et al⁸² han evaluado con buenos resultados la aplicación de un EIA capaz de documentar antígenos de torovirus en niños afectados tanto por diarrea aguda como por cuadros persistentes. En última instancia, y al igual que lo comentado en los casos anteriores las técnicas de amplificación genómica y de secuenciación posibilitan, a nivel básico, el estudio y caracterización de los diferentes aislados humanos⁸¹, lo cual redundará sin duda en un beneficio claro, gracias al impulso que confieren tanto a la optimización de métodos diagnósticos como a la potencial consecución de vacunas⁸³.

PICOBIRNAVIRUS

Aún a pesar de que su posición taxonómica no está definitivamente establecida⁴, desde el punto de vista estructural los picobirnavirus son pequeños virus desnudos, con un tamaño de 30-40 nm y un cápside de simetría icosaédrica. Su genoma está constituido por 2 o 3 segmentos de ARN bicatenario.

La aportación pionera en cuanto a su observación fue realizada por Pereira et al⁸⁴, de una manera "accidental" al interpretar geles de poliácridamida para buscar rotavirus. A partir de entonces se han encontrado en una gran variedad de especies animales⁸⁵ y tanto en niños como en adultos con diarrea, incluyendo pacientes inmunodeprimidos⁸⁶⁻⁸⁹. Entre las contribuciones con un amplio número de individuos analizados está la del grupo de la Universidad de Palermo⁹⁰, quienes describieron tras un estudio de 690 muestras fecales de niños con diarrea el hallazgo en 3 casos de bandas compatibles con infección por picobirnavirus (prevalencia de 0,43%), no documentando su presencia en el grupo control. La prevalencia más elevada descrita en la bibliografía (14,6%) ha sido la publicada por Giordano et al⁸⁷ en Argentina, al estudiar pacientes adultos con infección por VIH y diarrea. No obstante, existen contribuciones muy recientes⁵¹ que aun incorporando su búsqueda activa mediante electroforesis en gel de poliácridamida, también en niños con infección por VIH, no logran demostrar el hallazgo de picobirnavirus y sí de otros agentes.

Los retos que tiene planteados su diagnóstico virológico eficiente consisten en una puesta a punto de las técnicas de detección antigénica y de manera obligada y primordial por una profundización en su papel patogénico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blacklow NR, Greenberg HB. Viral gastroenteritis. *N Engl J Med* 1991; 325: 252-264.
2. Sherman PM, Petric M, Cohen MB. Infectious gastroenterocolitides in children: an update on emerging pathogens. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43: 391-407.
3. Framm SR, Soave R. Agents of diarrhea. *Med Clin North Am* 1997; 81: 427-447.
4. Treanor JJ, Dolin R. Astrovirus, Toroviruses and Picobirnaviruses. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and practice of infectious diseases*, 5ª ed. Filadelfia: Churchill Livingstone, 2000; 2: 1956-1958.
5. Green KY. Summary of the first international workshop on human caliciviruses. *J Infect Dis* 2000; 181: 252-253.
6. Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Reguera Useros JI, Eiros Bouza JM, Rodríguez Torres A. Detección de adenovirus en heces mediante látex y comprobación por microscopía electrónica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990; 8: 468-469.
7. Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Reguera Useros JI, Eiros Bouza JM, Rodríguez Torres A. Evaluación de un enzimoimmunoanálisis rápido de rotavirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10: 240-242.

8. Reguera JI, Ortiz de Lejarazu R, Eiros JM, Bratos MA, Gonzalo MP, Pérez-Pascual P, Rodríguez Torres A. Estudio de 3 años de los patrones de electroforesis de ARN de rotavirus en Valladolid. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11: 309-313.
9. Matsui SM, Greenberg HB. Astroviruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howlwy PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP et al, eds. *Fields Virology*, 3.^a ed. Filadelfia: Lippincott-Raven, 1996; 811-824.
10. Bass DM. Rotavirus and other agents of viral gastroenteritis. En: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. *Nelson textbook of pediatrics*, 16.^a ed. Filadelfia: WB Saunders, 2000; 997-999.
11. Denis F, Barriere E, Venot C, Ranger-Rogez S, Durepaire N, Martin C et al. Virus et infections gastro-intestinales. *Ann Biol Clin (Paris)* 1997; 55: 275-287.
12. Ashley CR, Caul EO, Paver WK. Astrovirus-associated gastroenteritis in children. *J Clin Pathol* 1978; 31: 939-943.
13. Risco C, Carrascosa JL, Pedregosa AM, Humphrey CD, Sanchez-Fauquier A. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J Gen Virol* 1995; 76: 2075-2080.
14. Willcocks MM, Brown TD, Madeley CR, Carter MJ. The complete sequence of a human astrovirus. *J Gen Virol* 1994; 75: 1785-1788.
15. Carter MJ, Willcocks MM. The molecular biology of astroviruses. *Arch Virol* 1996; 12 (Suppl): 277-285.
16. Midthun K, Greenberg HB, Kurtz JB, Gary GW, Lin FY, Kapikian AZ. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 955-962.
17. Palombo EA, Bishop RF. Annual incidence, serotype distribution, and generic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1750-1753.
18. Mitchell DK, Matson DO, Jiang X, Berke T, Monroe SS, Carter MJ et al. Molecular epidemiology of childhood astrovirus in child care centers. *J Infect Dis* 1999; 180: 514-517.
19. Geigenmuller U, Ginton NH, Matsui SM. Construction of a genome-length cDNA clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts. *J Virol* 1997; 7: 1713-1717.
20. Bass DM, Qiu S. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J Virol* 2000; 74: 1810-1814.
21. Snodgrass DR, Angus KW, Gray EW, Menzies JD, Paul G. Pathogenesis of diarrhoea caused by astrovirus infections in lambs. *Arch Virol* 1979; 60: 217-226.
22. Thouvenelle ML, Haynes JS, Sell JL, Reynolds DL. Astrovirus infection in hatchling turkeys: alterations in intestinal maltase activity. *Avian Dis* 1995; 39: 343-348.
23. Herrmann JE, Taylor DN, Echeverria P, Blacklow NR. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med* 1991; 324: 1757-1760.
24. Lew JF, Moe CL, Monroe SS, Allen JR, Harrison BM, Forrester BD et al. Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings. *J Infect Dis* 1991; 164: 673-678.
25. Kotloff KL, Herrmann JE, Blacklow NR, Hudson RW, Wasserman SS, Morris JG Jr. The frequency of astrovirus as a cause of diarrhea in Baltimore children. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 587-589.
26. Oishi I, Yamazaki K, Kimoto T, Minekawa Y, Utagawa E, Yamazaki S et al. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J Infect Dis* 1994; 170: 439-443.
27. Unicomb LE, Banu NN, Azim T, Islam A, Bardhan PK, Faruque AS et al. Astrovirus infection in association with acute, persistent non-bacterial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 611-614.
28. Pang XL, Vesikari T. Human astrovirus-associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Acta Paediatr* 1999; 88: 532-536.
29. Shastri S, Doane AM, Gonzales J, Upadhyayula U, Bass DM. Prevalence of astrovirus in a children's hospital. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2571-2574.
30. Putzker M, Sauer H, Kirchner G, Keksel O, Marlic A. Community acquired diarrhea-the incidence of astrovirus infections in Germany. *Clin Lab* 2000; 46: 269-273.
31. Guerrero ML, Noel JS, Mitchell DK, Calva JJ, Morrow AL, Martinez J et al. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 723-727.
32. Mitchell DK, Monroe SS, Jiang X, Matson DO, Glass RI, Pickering LK. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1995; 172: 1437-1444.
33. Lew JF, Glass RI, Petric M, Lebaron CW, Hammond GW, Miller SE et al. Six-year retrospective surveillance of gastroenteritis viruses identified at ten electron microscopy centres in the United States and Canada. *Pediatr Infect Dis* 1990; 9: 709-714.
34. Monroe SS, Glass RI, Noah N, Flewett TH, Caul EO, Ashton CI et al. Electron microscopic reporting of gastrointestinal viruses in the United Kingdom, 1985-1987. *J Med Virol* 1991; 33: 193-198.
35. Koopmans MP, Bijen MH, Monroe SS, Vinje J. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; 5: 33-37.
36. Herrmann JE, Hudson RW, Perron-Henry DM, Kurtz JB, Blacklow NR. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1988; 158: 182-185.
37. Willcocks MM, Carter MJ, Laidler FR, Madeley CR. Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line. *Arch Virol* 1990; 113: 73-81.
38. Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF. Epidemiology of astrovirus in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1058-1062.
39. Glass RI, Noel J, Mitchell D, Herrmann JE, Blacklow NR, Pickering LK et al. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol* 1996; 12 (Suppl.): 287-300.
40. Herrmann JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD, Blacklow NR. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1990; 161: 226-229.
41. McIver CJ, Palombo EA, Doultree JC, Mustafa H, Marshall JA, Rawlinson WD. Detection of astrovirus gastroenteritis in children. *J Virol Methods* 2000; 84: 99-105.
42. Cubitt WD, Mitchell DK, Carter MJ, Willcocks MM, Holzel H. Application of electron microscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J Med Virol* 1999; 57: 313-321.
43. Taylor MB, Marx FE, Grabow WO. Rotavirus, astrovirus and adenovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in a South African child care centre. *Epidemiol Infect* 1997; 119: 227-230.
44. Steele AD, Basetse HR, Blacklow NR, Herrmann JE. Astrovirus infection in South Africa: a pilot study. *Ann Trop Paediatr* 1998; 18: 315-319.

45. Gaggero A, O'Ryan M, Noel JS, Glass RI, Monroe SS, Mamani N et al. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3691-3693.
46. Maldonado Y, Cantwell M, Old M, Hill D, Sanchez ML, Logan L et al. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural mayan infants. *J Infect Dis* 1998; 178: 334-339.
47. Bon F, Fascia P, Dauvergne M, Tenenbaum D, Planson H, Petion AM et al. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3055-3058.
48. Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R, Bachiller R, Hernández B, Ortega M, Rodríguez Torres A. Diagnosis of Astrovirus associated gastroenteritis in children. Presentado en el Europaediatrics 2000. The UNEPSA and CESP European Congress of Paediatrics, 18-21 de marzo 2000, Roma. Libro de Abstracts, IN-314, pág. 161.
49. Konno T, Suzuki H, Ishida N, Chiba R, Mochizuki K, Tsunoda A. Astrovirus-associated epidemic gastroenteritis in Japan. *J Med Virol* 1982; 9: 11-17.
50. Esahli H, Breback K, Bennet R, Ehrnst A, Eriksson M, Hedlund KO. Astroviruses as a cause of nosocomial outbreaks of infant diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: 511-515.
51. Liste MB, Natera I, Suarez JA, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2873-2877.
52. Lee TW, Kurtz JB. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-1992, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol Infect* 1994; 112: 187-193.
53. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 797-801.
54. Hudson RW, Herrmann JE, Blacklow NR. Plaque quantitation and virus neutralization assays for human astroviruses. *Arch Virol* 1989; 108: 33-38.
55. Kurtz J, Lee T. Astrovirus gastroenteritis age distribution of antibody. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1978; 166: 227-230.
56. Kriston S, Willcocks MM, Carter MJ, Cubitt WD. Seroprevalence of astrovirus types 1 and 6 in London, determined using recombinant virus antigen. *Epidemiol Infect* 1996; 117: 159-164.
57. Mitchell DK, Matson DO, Cubitt WD, Jackson LJ, Willcocks MM, Pickering LK et al. Prevalence of antibodies to astrovirus types 1 and 3 in children and adolescents in Norfolk, Virginia. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 249-254.
58. McIntosh K. Coronaviruses. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and practice of infectious diseases, 5ª ed. Filadelfia: Churchill Livingstone; 2000; 2: 1767-1770.
59. Chany C, Moscovici O, Lebon P, Rousset S. Association of coronavirus infection with neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1982; 69: 209-214.
60. Vaucher YE, Ray CG, Minnich LL, Payne CM, Beck D, Lowe P. Pleomorphic, enveloped, virus-like particles associated with gastrointestinal illness in neonates. *J Infect Dis* 1982; 145: 27-36.
61. Gerna G, Passarani N, Battaglia M, Rondanello EG. Human enteric coronaviruses: antigenic relatedness to human coronavirus OC43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1985; 151: 796-803.
62. González P, Sanches A, Rivera P, Jiménez C, Hernández F. Rotavirus and coronavirus outbreak: etiology of annual diarrhea in Costa Rican children. *Rev Biol Trop* 1997; 45: 898-991.
63. Sánchez CM, Izeta A, Sánchez-Morgado JM, Alonso S, Sola I, Balasch M et al. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J Virol* 1999; 73: 7607-7618.
64. Almazán F, González JM, Penzes Z, Izeta A, Calvo E, Plana-Durán J et al. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5516-5521.
65. Holmes KV, Tresnan DB, Zelus BD. Virus-receptor interactions in the enteric tract. Virus-receptor interactions. *Adv Exp Med Biol* 1997; 412: 125-133.
66. Collins AR. HLA class I antigen serves as a receptor for human coronavirus OC43. *Immunol Invest* 1993; 22: 95-103.
67. Payne CM, Ray CG, Borduin V, Minnich LL, Lebowitz MD. An eight-year study of the viral agents of acute gastroenteritis in humans: ultrastructural observations and seasonal distribution with a major emphasis on coronavirus-like particles. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 5: 39-54.
68. Mortensen ML, Ray CG, Payne CM, Friedman AD, Minnich LL, Rousseau C. Coronaviruslike particles in human gastrointestinal disease. Epidemiologic, clinical, and laboratory observations. *Am J Dis Child* 1985; 139: 928-934.
69. Marshall JA, Birch CJ, Williamson HG, Bowden DK, Boveington CM, Kuberski T et al. Coronavirus-like particles and other agents in the faeces of children in Efate, Vanuatu. *J Trop Med Hyg* 1982; 85: 213-215.
70. Luby JP, Clinton R, Kurtz S. Adaptation of human enteric coronavirus to growth in cell lines. *J Clin Virol* 1999; 12: 43-51.
71. De Haan CA, Vennema H, Rottier PJ. Coronavirus envelope assembly in sensitive to changes in the terminal regions of the viral M protein. *Adv Exp Med Biol* 1998; 440: 367-375.
72. Cristallo A, Biamonti G, Battaglia M, Cereda PM. DNA probe for the human coronavirus OC43 also detects neonatal calf diarrhea coronavirus (NCDCV). *New Microbiol* 1996; 19: 251-256.
73. McGoldrick A, Lowings JP, Paton DJ. Characterisation of a recent virulent transmissible gastroenteritis virus from Britain with a deleted ORF 3a. *Arch Virol* 1999; 144: 763-770.
74. Cavanagh D, Horzinek MC. Genus Torovirus assigned to the Coronaviridae. *Arch Virol* 1993; 128: 395-396.
75. Horzinek MC. Molecular evolution of corona-and toroviruses. *Adv Exp Med Biol* 1999; 473: 61-72.
76. Beards GM, Hall C, Green J, Flewett TH, Lamouliatte F, Du Pasquier P. An enveloped virus in stools of children and adults with gastroenteritis that resembles the Breda virus of calves. *Lancet* 1984; 1: 1050-1052.
77. Koopmans M, Herrewegh A, Horzinek MC. Diagnosis of torovirus infection. *Lancet* 1991; 337: 859.
78. Koopmans M, Petric M, Glass R, Monroe SS. Enzyme-linked immunosorbent assay reactivity of torovirus-like particles in fecal specimens from humans with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2738-2744.
79. Krishnan T, Naik TN. Electronmicroscopic evidence of totovirus like particles in children with diarrhoea. *Indian J Med Res* 1997; 105: 108-110.
80. Jamieson FB, Wang EE, Bain C, Good J, Duckmanton L, Petric M. Human torovirus: a new nosocomial gastrointestinal pathogen. *J Infect Dis* 1998; 178: 1263-1269.
81. Duckmanton L, Luan B, Devenish J, Tellier R, Petric M. Characterization of torovirus from human fecal specimens. *Virology* 1997; 239: 158-168.
82. Koopmans MP, Goosen ES, Lima AA, McAuliffe IT, Nataro JP, Barrett LJ et al. Association of torovirus with acute and persistent diarrhea in children. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 504-507.

83. Snijder EJ, Horzinek MC. Toroviruses: replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. *J Gen Virol* 1993; 74: 2305-2316.
84. Pereira HG, Fialho AM, Flewett TH, Teixeira JM, Andrade ZP. Novel viruses in human faeces. *Lancet* 1988; 2: 103-104.
85. Chandra R. Picobirnavirus, a novel group of undescribed viruses of mammals and birds: a minireview. *Acta Virol* 1997; 41: 59-62.
86. Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG, Monroe SS, Hightower AW, Weber R et al. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric oportunistic Infectoins Working Group. *N Engl J Med* 1993; 329: 14-20.
87. Giordano MO, Martinez LC, Rinaldi D, Espul C, Martinez N, Isa MB et al. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 1427-1432.
88. Gonzalez GG, Pujol FH, Liprandi F, Deibis L, Ludert JE. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J Med Virol* 1998; 55: 288-292.
89. Gallimore CI, Appleton H, Lewis D, Green J, Brown DW. Detection and characterization of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses in human faecal specimens). *J Med Virol* 1995; 45: 135-140.
90. Cascio A, Bosco M, Vizzi E, Giammanco A, Ferraro D, Arista S. Identification of picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. *Eur J Epidemiol* 1996; 12: 545-547.