

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE NOROVIRUS GI/GII
MEDIANTE REAL TIME (TAQMAN®) REVERSE
TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-
PCR), EN MUESTRAS DE HECES DE NIÑOS MENORES DE 5
AÑOS DE EDAD QUE PRESENTARON EPISODIOS
ESPORÁDICOS DE DIARREA AGUDA EN EL CANTÓN
QUININDÉ, PROVINCIA DE ESMERALDAS – ECUADOR.

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGIA

ELABORADO POR:

GUAMBO COELLO JOHANNA ELIZABETH

SANGOLQUÍ, Septiembre de 2012

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. JOHANNA ELIZABETH GUAMBO COELLO como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 12 de septiembre de 2012

Ligia Ayala, PhD.
DIRECTORA

Pedro Romero, Ing.-Mat.
CODIRECTOR

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

JOHANNA ELIZABETH GUAMBO COELLO

Declaro que:

El proyecto de grado denominado: ***“DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE NOROVIRUS GI/GII MEDIANTE REAL TIME (TAQMAN®) REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR), EN MUESTRAS DE HECES DE NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS DE EDAD QUE PRESENTARON EPISODIOS ESPORÁDICOS DE DIARREA AGUDA EN EL CANTÓN QUININDÉ, PROVINCIA DE ESMERALDAS – ECUADOR”***, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 12 de septiembre de 2012

JOHANNA E. GUAMBO C.

CERTIFICACION

Ligia Ayala, PhD.

Pedro Romero, Ing.-Mat.

Certifican:

Que el trabajo titulado: “**DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE NOROVIRUS GI/GII MEDIANTE REAL TIME (TAQMAN®) REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR), EN MUESTRAS DE HECES DE NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS DE EDAD QUE PRESENTARON EPISODIOS ESPORÁDICOS DE DIARREA AGUDA EN EL CANTÓN QUININDÉ, PROVINCIA DE ESMERALDAS – ECUADOR**”, realizado por JOHANNA ELIZABETH GUAMBO COELLO, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

SI se recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a JOHANNA ELIZABETH GUAMBO COELLO que lo entregue a Ing. Tatiana Páez Barrera, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 12 de Septiembre 2012

Ligia Ayala, PhD.
DIRECTORA

Pedro Romero, Ing.-Mat.
CODIRECTOR

AUTORIZACIÓN

Yo, JOHANNA ELIZABETH GUAMBO COELLO

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo: “*DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE NOROVIRUS GI/GII MEDIANTE REAL TIME (TAQMAN®) REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR), EN MUESTRAS DE HECES DE NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS DE EDAD QUE PRESENTARON EPISODIOS ESPORÁDICOS DE DIARREA AGUDA EN EL CANTÓN QUININDÉ, PROVINCIA DE ESMERALDAS – ECUADOR*”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 12 de septiembre de 2012

JOHANNA E. GUAMBO C.

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Guambo Coello Johanna Elizabeth

COORDINADORA DE LA CARRERA

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera

Lugar y fecha: Sangolquí, 12 de Septiembre de 2012

DEDICATORIA

Tras el esfuerzo, sacrificio y constancia, es justo que dedique este trabajo primeramente a Dios porque ha estado conmigo en cada paso protegiéndome, dándome fortaleza y sabiduría para seguir adelante.

A mis queridos padres Milton y Carmita, pilares fundamentales en mi vida, por brindarme todo su amor, comprensión y apoyo, cuyo sacrificio y trabajo han sido un ejemplo en mi vida, para nunca desistir y siempre luchar por mis sueños.

A mi hermana Carito, amiga incondicional, por todo tu cariño.

Al amor de mi vida Vladimir, por tu amor, comprensión y paciencia.

Y por ultimo: deseo dedicar este momento tan importante e inolvidable; a mí misma, por no dejarme vencer.

Elizabeth Guambo C.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme valor, perseverancia, sabiduría y fuerza para afrontar los momentos difíciles, te doy gracias, porque en tu infinita bondad me has permitido alcanzar esta meta, en el camino de la superación profesional.

Agradezco infinitamente a la “*Fundación Ecuatoriana para Investigación en Salud*”, y a sus colaboradores, especialmente a su director el *Dr. Phill Cooper* por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Muy particularmente agradezco a mi directora de Tesis la *Dra. Ligia Ayala* por ser un gran apoyo, ya que nunca escatimó esfuerzo y tiempo para corregir y mejorar este trabajo, por sus valiosos conocimientos. Pero sobre todo porque me demostró en el trayecto de esta tarea ser una gran maestra y un excelente ser humano.

Al *Ing.-Mat Pedro Romero* por su atinada dirección en la parte estadística, por compartir conmigo su tiempo. Por sus acertados consejos y cambios constructivos al proyecto que desembocaron en el pulimento del mismo. Por escucharme y retroalimentar con soluciones todo tipo de aflicciones. Pero sobre todo por concederme la dicha de su valiosa amistad.

A todo el profesorado y a las personas que directa o indirectamente me ayudaron en la elaboración de este trabajo.

Elizabeth Guambo C.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
1.4 Marco teórico	4
1.4.1 Introducción	4
1.4.2 Historia y etimología	4
1.4.3 EDA de origen viral	6
1.4.4 Taxonomía	7
1.4.5 Características biológicas de los norovirus	10
1.4.5.1 Características estructurales y genómicas de norovirus	10
1.4.5.2 Ciclo replicativo	15
1.4.5.3 Hospedadores naturales	18
1.4.5.4 Mecanismos de transmisión	19
1.4.6 Aspectos clínicos de la gastroenteritis por norovirus	20
1.4.6.1 Sintomatología clínica	20
1.4.6.2 Patogénesis	21
1.4.6.3 Virulencia	22
1.4.7 Respuesta inmune frente a norovirus	23
1.4.8 Factores de riesgo involucrados con la infección por norovirus	24
1.4.9 Diagnóstico de norovirus	25
1.4.9.1 Diagnostico de laboratorio	25
1.4.9.2 Diagnóstico clínico	26
1.4.10 Tratamiento	26
1.4.11 Vacunación	27
1.4.12 Epidemiología y distribución geográfica de la infección por norovirus ...	28

1.4.13 Recomendaciones y medidas de control o prevención para controlar un brote por norovirus	32
1.5 Sistema de hipótesis o pregunta de investigación	33
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1 Participantes	34
2.2 Zona de estudio	34
2.2.1 Trabajo de campo	34
2.2.2 Trabajo de laboratorio	35
2.3 Periodo de tiempo de investigación	35
2.4 Población	35
2.5 Fuentes de datos	35
2.6 Procedimientos	36
2.6.1 Recepción, recolección y toma de muestras	36
2.6.2 Análisis coproparasitológico	37
2.6.2.1 Examen microscópico directo o en fresco	37
2.6.2.2 Técnica de Kato – Katz	38
2.6.2.3 Técnica de concentración formol - acetato etílico	39
2.6.2.4 Conservación y transporte de muestras	40
2.6.3 Análisis molecular	40
2.6.3.1 Codificación de los individuos participantes	40
2.6.3.2 Pre-extracción: preparación de muestras	40
2.6.3.3 Extracción y purificación de <i>RNA viral</i>	41
2.6.3.4 <i>Real Time (TaqMan®) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	42
2.7 Diseño estadístico	46
CAPÍTULO III: RESULTADOS	50
3.1 Descripción general de la muestra	50
3.2 Resultados del análisis coproparasitoscópico	50
3.3 Resultados del análisis molecular	51

3.4 Análisis de potenciales factores de riesgo asociados a la expresión del potencial patogénico de norovirus	53
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	55
4.1 Etiología del síndrome diarreico agudo	55
4.1.1 Parasitología de la gastroenteritis aguda	55
4.1.2 Norovirus, como agente causal de EDA	57
4.2 Distribución estacional de la infección por norovirus <i>GI/GII</i>	58
4.3 Posibles factores de riesgo asociados a la expresión del potencial patogénico de norovirus	59
4.3.1 Edad	59
4.3.2 Nivel socio-económico, condiciones sanitarias y presencia de animales domésticos en el entorno	59
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	63
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	64
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	xix

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Descripción de la secuencia de <i>primers</i> y <i>probes</i> empleados para la amplificación de norovirus del <i>Genogrupo I y II</i> (FEPIS, 2011)	42
Tabla 2.2 <i>Primer/probe mix</i> [10 μ M] (FEPIS, 2011)	43
Tabla 2.3 Concentraciones y volúmenes finales de reactivos empleados en la <i>Real Time RT-PCR</i> (FEPIS, 2011)	43
Tabla 2.4 Parámetros de amplificación para <i>Real Time RT-PCR</i> (FEPIS, 2011)	44
Tabla 3.1 Modelo estadístico multivariado, regresión logística, del comportamiento de los potenciales factores determinantes de la expresión patogénica de norovirus ...	54

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Estimación del papel de los norovirus en brotes causados por alimentos (CDC, 2006)	30
Cuadro 2.1 Valores de referencia para del estudio coprológico (OMS, 1992)	38

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Análisis filogenético de la familia <i>caliciviridae</i> , basados en la homología de secuencia y organización del genoma (Zheng, <i>et al.</i> , 2000)	8
Figura 1.2 Árbol filogenético del género norovirus basado en secuencia completa de los aminoácidos de la proteína principal de la cápside (clasificación según Zheng, <i>et al.</i> , 2006)	9
Figura 1.3 Morfología de norovirus. a) Partículas del <i>virus Norwalk</i> en un filtrado de heces visualizado por microscopia electrónica (adaptado de Kapikian, <i>et al.</i> , 1972). b) Criomicroscopía electrónica (Prasad, <i>et al.</i> , 1999)	10
Figura 1.4 Representación esquemática del genoma del <i>virus Norwalk</i> (<i>Nature Reviews Microbiology</i> , 2010)	11
Figura 1.5 Imagen tridimensional de la estructura de la cápside del <i>virus Norwalk</i> . a) Estructura terciaria de la proteína <i>VP1</i> . b) Estructura secundaria de la <i>VP1</i> , dominios <i>S</i> (amarillo), subdominio <i>PI</i> (azul) y subdominio <i>P2</i> (rojo) (<i>Nature Reviews Microbiology</i> , 2010)	14
Figura 1.6 Morfología de la proteína <i>VP1</i> de la cápside del <i>virus Norwalk</i> . Los residuos de aminoácidos correspondientes a estos dominios se encuentran esquematizados en la parte inferior de la imagen (Siebenga, <i>et al.</i> , 2007)	15
Figura 1.7 Representación esquemática del ciclo replicativo del <i>virus Norwalk</i> (adaptado de <i>Nature Reviews Microbiology</i> , 2010)	16
Figura 2.1 Mapa de la zona de estudio. Cartografía <i>IGM</i> (2011)	34

Figura 2.2 Tubo de centrifuga con las cuatro capas formadas después de realizar el método de concentración formol- acetato etílico (tomado de Botero, 2006)	39
Figura 2.3 Parámetros para el análisis de los resultados, mediante real time RT-PCR. a) Baseline, b) Ct y c) Threshold (tomado de Applied Biosystems, 2008)	45
Figura 3.1 Distribución porcentual de los diferentes parásitos intestinales observados mediante análisis coproparasitoscópico	50
Figura 3.2 Amplificación de RNA viral para norovirus <i>GI</i> : curva VTCs (de color verde) y muestras de ensayo, utilizando la técnica de <i>Real Time (TaqMan®) RT-PCR</i>	51
Figura 3.3 Amplificación de RNA viral para norovirus <i>GII</i> : curva VTCs (de color verde) y muestras de ensayo, utilizando la técnica de <i>Real Time (TaqMan®) RT-PCR</i>	52
Figura 3.4 Distribución porcentual de los genotipos de norovirus observados en la población en estudio	52

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A Formulario N: características socio-económicas y medioambientales de la población en estudio (adaptado de FEPIS, 2011)	xix
Anexo B Principales parásitos intestinales del hombre (tomado de Fabián, Tello y Náquira, 2003)	xix
Anexo C Descripción conceptual de las herramientas estadísticas empleadas en la presente investigación (tomado de Varela y Rial, 2003)	xxv

RESUMEN

Las enfermedades diarreicas agudas (EDA) de origen viral son actualmente un problema de salud importante a nivel mundial. Dentro de los agentes virales de interés etiológico, se reconocen a los norovirus como una significativa causa de morbilidad y mortalidad en la población infantil. Lamentablemente los datos disponibles sobre la epidemiología y la carga de la gastroenteritis por norovirus en el país son limitados, escasos o inexistentes. En el presente estudio, se analizaron 244 muestras de materia fecal provenientes de niños menores de cinco años de edad que presentaron episodios esporádicos de diarrea aguda en el cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas – Ecuador. En primera instancia, gracias al estudio coproparasitoscópico, se determinó que el 14,75% de la población presentó algún tipo de parasitosis intestinal. Con el fin de detectar y genotificar norovirus *GI/GII* se empleó el método de la *Real Time (TaqMan®) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. En general, 72 muestras dieron positivas para norovirus, 12 para *GI*, 53 para *GII* y 7 para una infección mixta (*GI/GII*). Además se evaluaron los factores de riesgo involucrados con el potencial patogénico del virus encontrándose que la edad (lactantes), el consumo de agua entubada, el acceso a una mejor calidad de vida y la exposición o contacto con equinos se asocian significativamente con el virus, mientras que la presencia de un can dentro de la vivienda cumple un factor protector.

Palabras clave: norovirus, prevalencia, *Real Time (TaqMan®) RT-PCR*.

ABSTRACT

Acute diarrheal diseases (ADD) of viral origin are currently an important health problem all over the world. Inside viral agents of interest etiologic are recognized to the norovirus as a significant cause of morbidity and mortality in children. Unfortunately the available data on the epidemiology and burden of norovirus's gastroenteritis in the country is limited, scarce or non-existent. In the present study, there were analyzed 244 samples of fecal matter from children under five years who presented sporadic episodes of ADD in the canton Quinindé, Esmeraldas province - Ecuador. In the first instance, by parasitological studies, it was determined that 14,75 per cent of the population had some type of intestinal parasitizes. In order to detect and genotyping norovirus GI/GII was used the method of the Real Time (TaqMan®) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). In general, 72 samples tested positive for norovirus, 12 for GI, 53 for GII and 7 for a mixed infection (GI/GII). Besides the risk involved factors were evaluated with the potential pathogenic of virus, so the age (breast-fed babies), consumption of piped water, access to a better quality of life and exposure or contact with horses are associated significantly with the virus, while the presence of a dog plays a role inside the house, as a protective factor.

Key words: norovirus, prevalence, *Real Time (TaqMan®) RT-PCR*.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

De acuerdo con la *Organización Mundial de la Salud* (2009), las enfermedades diarreicas son la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años a nivel mundial. Se calcula que dentro de este grupo se producen más de 700 millones de casos anuales, de los cuales se estima que mueren 2 millones de niños solo en Asia, África y América latina (Kosek, Bern & Guerrant, 2003). Otros autores más pesimistas sostienen que esta cifra puede elevarse hasta los 5 millones (Guerrant, Hughes, Lima & Crane, 2003), por lo tanto se trata de un problema de salud importante a escala mundial.

Si bien la etiología de muchos de estos procesos, especialmente los que se dan como casos esporádicos no se llega a conocer, los datos disponibles indican que la causa más común de gastroenteritis aguda en niños son las de origen viral (70 al 80%) (Blacklow & Greenberg, 1991), seguida por bacterias (15%) y parásitos (5%) (Thomas & Lynch, 2007). En la actualidad, los *calicivirus humanos* son reconocidos como uno de los principales agentes virales, teniendo especial consideración los norovirus (*Centers for Disease Control and Prevention* [CDC], 2010).

Los norovirus producen una inflamación del estómago y los intestinos denominada gastroenteritis. Los síntomas relacionados con la infección provocada por este virus por lo general consisten en diarrea no sanguinolenta, vómito, náusea y dolor estomacal (Ribes y Buesa, 2010). Por lo general, la infección aparece de manera repentina, y en la mayor parte de los casos no es de gravedad, pero es posible que la infección se agrave, particularmente en niños pequeños, debido a la pérdida excesiva de líquidos en vómitos y diarreas, convirtiéndose en una enfermedad letal (Monroe, Ando & Glass, 2000).

En países con redes de vigilancia epidemiológica eficientes, donde se han implementado métodos moleculares para la detección de norovirus, se ha hecho evidente un incremento de la incidencia del virus (Guerrant, *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestro medio estudios sobre los

diversos agentes virales responsables de las enfermedades diarreicas agudas son limitados, escasos o inexistentes y los datos que existen al respecto están relacionados sobre todo con rotavirus. Por lo tanto, se hace urgente y necesario la implementación de técnicas moleculares especializadas que permitan determinar la prevalencia e incidencia de norovirus en la población infantil (Glass, *et al.*, 2000).

1.2 Justificación del problema

La enfermedad diarreica aguda (EDA), es un problema de salud pública importante a nivel mundial, especialmente en los países en desarrollo, donde representan una importante causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años (*Organización Panamericana de la Salud* [OPS], 2010).

En América Latina y el Caribe ocurren anualmente aproximadamente 1,32 millones de casos relacionados con EDA, es decir 2,2 episodios por niño (OPS, 2010), de los cuales alrededor de 77 600 niños menores de cinco años fallecen, lo que significa más de 200 muertes diarias (Pang, Hanma, Nakato & Vesikari, 2000). En el Ecuador, el síndrome diarreico agudo de carácter infeccioso ocupa el décimo lugar de entre las doce principales causas de mortalidad infantil, según datos ofrecidos por el CIE-10 durante el 2008.

Muchas de estas muertes pudieron ser evitadas mediante acciones sencillas de prevención, diagnóstico temprano y tratamiento oportuno. Actualmente, apenas el 60% de los episodios diarreicos son diagnosticados etiológicamente (Glass, Parashar & Estes, 2009), adjudicando gran número de casos a agentes y/o causas desconocidas debido esencialmente a la carencia de metodologías y tecnologías de diagnóstico. Esto ha imposibilitado la implantación de campañas epidemiológicas de prevención y tratamiento para reducir la tasa de mortalidad en la población infantil.

Dentro del grupo viral de interés etiológico, asociado con EDA se encuentran los norovirus, mismos que están reconocidos en la actualidad como causa de gastroenteritis viral esporádica aguda en personas de todas las edades y la segunda en niños a nivel mundial (CDC,

2006). El peligro relacionado con norovirus es su fácil propagación, la vía de transmisión más frecuente es oral-fecal y/o ingesta de alimentos o agua contaminada. Además la dosis infectante del virus es muy baja (de 10 a 100 partículas), sin mencionar que es muy resistente a condiciones ambientales, así como a desinfectantes usuales (Evans, *et al.*, 2002).

Una limitante en el estudio del norovirus es la incapacidad de aislar y cultivar este virus *in vitro*. No existe un prototipo animal que pueda ser un modelo experimental real de la patogenia en humanos (Ribes y Buesa, 2010). Por lo tanto su verdadero impacto como agente etiológico de EDA ha estado subestimado.

Gracias a los avances en biología molecular, se han desarrollado técnicas y herramientas moleculares que ponen en manifiesto la verdadera importancia del virus. La herramienta más confiable y eficaz para el diagnóstico de norovirus es la *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*, y más recientemente la real time RT-PCR, debido a su alta sensibilidad y especificidad, superando a otros métodos de diagnóstico utilizados en la actualidad (Gunson & Carman, 2005).

Considerando estos hallazgos, y conociendo que hasta el momento la documentación existente en el país, en el área es limitada; este proyecto de investigación busca conocer la prevalencia del síndrome diarreico agudo causado por norovirus *GI/GII*, en niños menores a cinco años del cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas – Ecuador.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Detectar y genotipificar norovirus *GI/GII* mediante *Real Time (TaqMan®) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*, en muestras de heces de niños menores de cinco años de edad que presentaron episodios esporádicos de diarrea aguda en el cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas – Ecuador.

1.3.2 Objetivos específicos

- Estimar la prevalencia del síndrome diarreico agudo causado por norovirus *GI/GII*, en la población de estudio.
- Determinar la distribución estacional de la infección por norovirus *GI/GII*.
- Establecer los factores de riesgo (sociales, económicos y sanitarios) asociados a la expresión del potencial patogénico de norovirus *GI/GII*.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Introducción

Según la *Organización Mundial de la Salud* (2009) la enfermedad diarreica aguda (EDA) se define como: “*el aumento en la frecuencia de deposiciones, líquidas o disminuidas en consistencia, generalmente en número mayor a tres en veinticuatro horas, dentro de un período inferior a tres semanas*”. Ocurre como respuesta a una alteración en la absorción y secreción de agua y electrolitos a través de la mucosa intestinal (Guerrant, *et al.*, 1990).

Las enfermedades diarreicas agudas siguen siendo un problema de salud pública importante a nivel mundial. Ocupa el quinto lugar con mayor carga de enfermedad. Está expresada en años de vida ajustados por discapacidad *DALYs* (*Disability Adjusted Life Years*). Es superada únicamente por afecciones perinatales, enfermedades respiratorias y el virus de inmunodeficiencia humana/SIDA (OMS, 2009).

Entre los factores predisponentes más frecuentes está la manipulación inadecuada y contaminación de alimentos, condiciones higiénico-sanitarias deficientes, cambios estacionales, mal uso de medicamentos, intoxicación alimentaria y agentes infecciosos (Ribes y Buesa, 2010). El control de esta enfermedad a nivel mundial se inició en 1978 como respuesta al llamado de los estados miembros de la *Organización Panamericana de la Salud* (OPS) para concertar acciones alrededor de uno de los mayores problemas de morbi-mortalidad (OPS, 2010).

1.4.2 Historia y etimología

A principios del siglo pasado, en el año 1929 el pediatra John Zahorsky describió la “enfermedad de vómito del invierno” (*Hyperemesis heimis or the winter vomiting disease*), como una infección que se caracterizaba por la presencia de diarrea en gran parte de los casos, y los experimentos con voluntarios así como los brotes que se producían, daban fe de su contagiosidad. Sin embargo, el agente etiológico que lo provocaba era desconocido, y hasta entonces nunca se había pensado en

la etiología viral de la diarrea, como ya se había demostrado en las infecciones respiratorias (Sociedad Española de Epidemiología [SEE], 2007).

Uno de esos brotes tuvo lugar en una escuela de Gran Bretaña en marzo de 1963, durante cinco días se registraron 142 casos, los intentos por develar la causa infecciosa fueron infructuosos. Las muestras fecales fueron congeladas a -70°C , hasta que siete años y medio después, las mismas muestras se analizaron por segunda ocasión.

En el laboratorio de salud pública de Bristol, se llevó a cabo un experimento utilizando exámenes microbiológicos nuevos, que consistía en administrar a los voluntarios, un vaso de bicarbonato sódico diluido en agua y enseguida otro vaso con zumo de naranja al que se le había añadido la emulsión fecal *abacteriana*. Con los resultados de este estudio, solo se reiteró la transmisibilidad de la enfermedad. Respecto a la etiología sólo se pudo afirmar que el “agente W”, como se lo denominó, era una partícula estable al calor, menor a 50 nanómetros (nm), quizás un *picornavirus* (SEE, 2007).

En octubre de 1968 en una pequeña localidad llamada *Norwalk*, en *Ohio* (EEUU), ocurrió un brote de gastroenteritis en una escuela secundaria que afectó tanto a los alumnos como a los trabajadores. En dos días se reportaron 116 casos. Además, hubo un alto número de casos secundarios entre los familiares. El episodio fue diagnosticado como “*brote de la enfermedad emética del invierno*” (Adler & Zickl, 1969). A pesar de los esfuerzos de los investigadores del *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), el agente casual del brote quedó sin identificarse. No obstante, las muestras de origen fecal *abacterianas* obtenidas durante los intentos de clarificar la causa del brote fueron guardadas y entregadas pocos años después a otro grupo de investigadores dirigidos por Albert Kapikian (SEE, 2007).

En esta ocasión las muestras, además de las consabidas experiencias en voluntarios, fueron sometidas a procedimientos de investigación relativamente nuevos en el campo. Se estudiaron las heces de voluntarios a los que se les había administrado el filtrado de heces, libres de bacterias, procedente del brote de 1968. Las heces de los voluntarios se observaron mediante

inmuno-microscopía electrónica, que permite investigar por observación directa la presencia de inmuno-complejos, ya que las moléculas de anticuerpos específicos presentes en el suero de la fase convaleciente de un individuo infectado se agregan y recubren las partículas víricas, dándoles la apariencia de partículas individuales o dobletes y facilitando así su detección. Gracias a esta novedosa técnica, en 1972 Kapikian y sus colaboradores visualizaron por primera, partículas redondeadas de 27 nm, a las que les denominó *Small Round Structured Viruses* (SRSV), y posteriormente, *virus Norwalk* (Kapikian, *et al.*, 1972).

Este original y meticuloso estudio fue publicado el mismo año en el *Journal of Virology* y aunque con anterioridad se habían identificado virus en heces, ha pasado a la historia como el primero en que se logró demostrar el papel causal de un virus en cuadros de gastroenteritis humana (SEE, 2007).

En los siguientes años, se describieron otros virus de características similares que se denominaron virus de *Hawai*, *Montgomery County*, *Tawnton* y *Snow Mountain*, de acuerdo con las regiones geográficas donde se habían producido los brotes de gastroenteritis. Debido a que, en estos se identificaron agentes con estructura similar a la del *virus Norwalk*, a este conjunto de virus se les llamó *Norwalk Like Viruses* (NLV) (Thornhill, *et al.*, 1977). Sin embargo, la imposibilidad de aislar el virus en cultivo no permitió avanzar en su clasificación hasta que se desarrollaron técnicas moleculares más sensibles.

A principios de los 90, gracias a la clonación del genoma del *virus Norwalk*, así como la aplicación de técnicas como RT-PCR, y posterior secuenciación, permitieron clasificar al NLV dentro de la familia *Caliciviridae* y a partir de 2002, al NLV se le dio el nombre de norovirus (*nor-*, de *Norwalk*). Si bien el *virus Norwalk* fue el primer virus relacionado con gastroenteritis en la historia, existen otros virus asociados con EDA, entre los que se encuentran los rotavirus, astrovirus, adenovirus entéricos, entre otros (SEE, 2007).

1.4.3 EDA de origen viral

La enfermedad diarreica aguda (EDA) de origen viral es un conjunto de afecciones que afectan el tracto gastrointestinal y se caracteriza por presentar una patogenia compleja y en ocasiones no bien conocida. (SEE, 2007).

De forma general, tras la entrada del virus en el organismo por vía oral éste se desplaza hasta el intestino delgado donde se afectan básicamente los enterocitos (células epiteliales del intestino) (CDC, 2001). Esta interacción lleva a la destrucción de la célula infectada con el consecuente acortamiento de las vellosidades intestinales y la alteración de la absorción de agua y solutos. Además, provoca la desorganización del epitelio e infiltración de la lámina propia por células mononucleares (Lopman, *et al.*, 2003).

Se han observado algunas diferencias en la patogenia según el agente causal. Así, en la gastroenteritis causada por rotavirus intervienen también la presencia de enterotoxinas víricas, la disminución de la actividad de las disacaridasas; así como la secreción mediada por el sistema nervioso entérico (Dormitzer, 2005). Por su parte, la gastroenteritis por norovirus afecta principalmente a la zona yeyunal sin detectarse producción de enterotoxinas (Treanor & Dolin, 2005).

1.4.4 Taxonomía

Los norovirus, conocidos también como “*virus tipo Norwalk*”, “*Small Round Structured Viruses* (SRSV)” o “*enfermedad de vómitos invernales*” es un género de virus de RNA de cadena simple y polaridad positiva. Integrante de la familia *Caliciviridae*, causante de aproximadamente el 70 al 80% de los brotes de gastroenteritis no bacteriana en todo el mundo (Lindesmith, *et al.*, 2003).

De acuerdo con el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (2011), la familia *Caliciviridae* (del latín *calix*, “cáliz”), comprende un grupo heterogéneo de virus, miembros de la clase IV del Esquema de Baltimore ([+]ssRNA). Conformada por cinco géneros de virus

(norovirus, sapovirus, vesivirus, lagovirus y nebovirus), basados en su homología de secuencia y organización del genoma (figura 1.1).

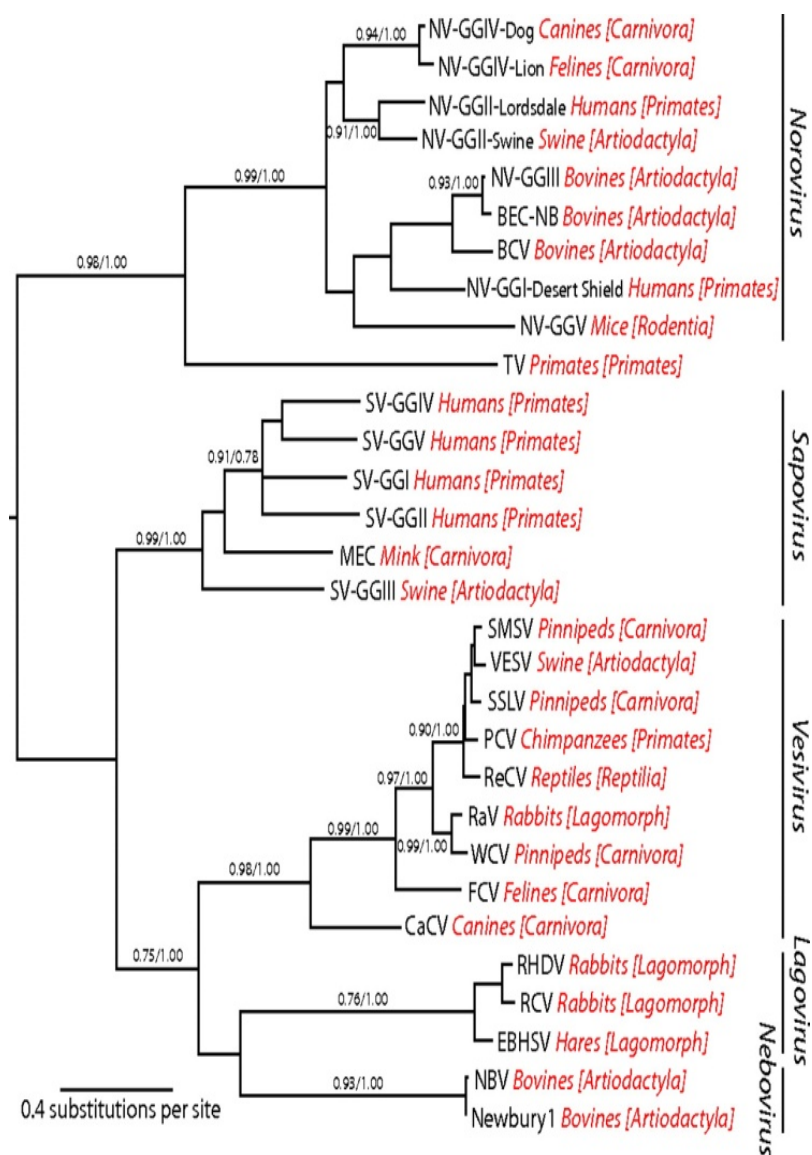


Figura 1.1 Análisis filogenético de la familia *caliciviridae*, basados en la homología de secuencia y organización del genoma (Zheng, *et al.*, 2000).

Los principales agentes patógenos humanos de esta familia son los *calicivirus humanos* (CVH) que incluyen los géneros norovirus y sapovirus, involucrados con gastroenteritis aguda en humanos (ICTV, 2011).

Los primeros intentos para la discriminación entre cepas de norovirus se realizaron mediante técnicas de inmuno-microscopía electrónica (IME) (Koopmans, *et al.*, 2002). En la actualidad, el análisis filogenético de estos virus se efectúa gracias a la aplicación de técnicas moleculares como la clonación del genoma del virus, la reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (PCR-TR), la secuenciación y expresión *in vitro* de las proteínas víricas en sistemas procariotas y eucariota, entre otros (Ribes y Buesa, 2010).

Los norovirus presentan una elevada variabilidad genética que se explica por mutaciones acumuladas que involucran sustituciones puntuales, inserciones o supresiones (Domínguez, 2008). Estudios recientes han demostrado que la gran diversidad genética de norovirus puede estudiarse mejor en relación con la secuencia nucleotídica del genoma que codifica la proteína mayor de la cápside (Zheng, *et al.*, 2006).

Clásicamente, dentro del género norovirus se reconocen cinco agrupaciones filogenéticas o genogrupos (desde *GI* hasta *GV*) (figura 1.2). Los genogrupos *GI*, *GII* y *GIV* afectan a las personas, mientras que los genogrupos *GIII* y *GV* se han descrito en animales (Zheng, *et al.*, 2006). A su vez, cada genogrupo se subdivide en *clusters* genéticos o genotipos, definidos por tener al menos un 80% de identidad de los aminoácidos sobre la secuencia total de la cápside (Ando, Noel & Fankhauser, 2000).

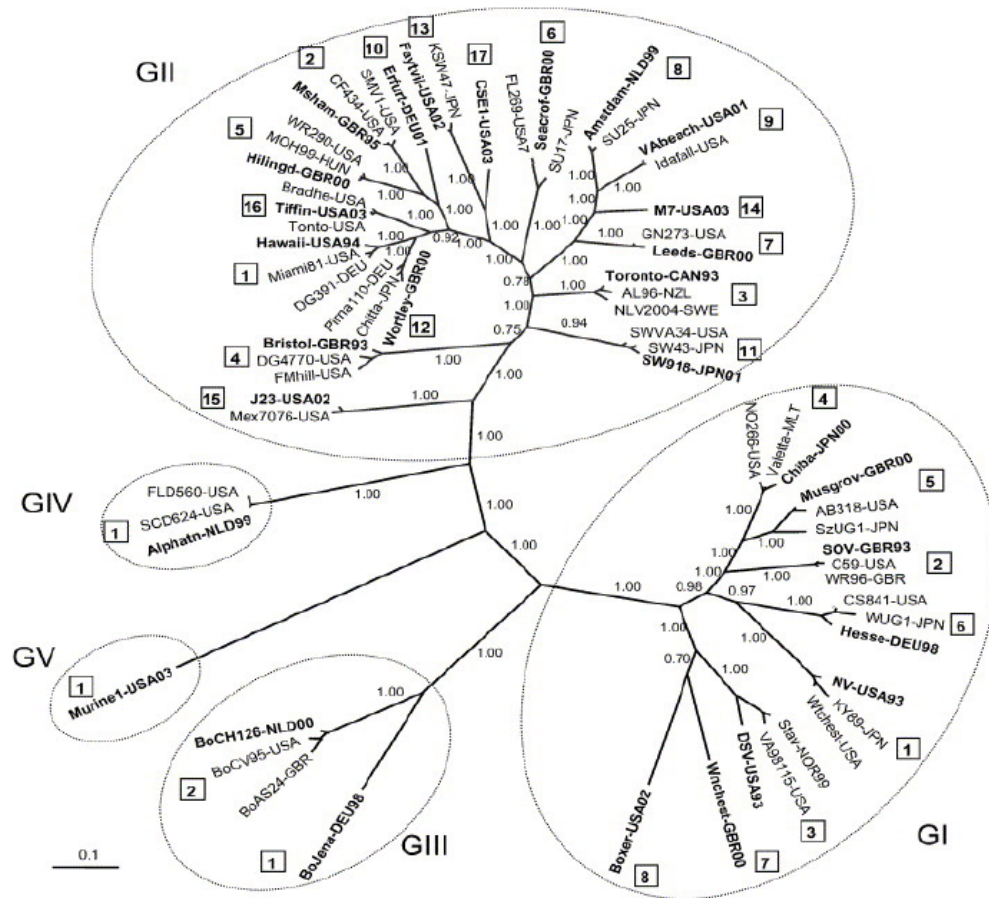


Figura 1.2 Árbol filogenético del género norovirus basado en secuencia completa de los aminoácidos de la proteína principal de la cápsida (clasificación según Zheng, *et al.*, 2006).

A pesar de la gran diversidad que presenta el género norovirus, la mayoría de los casos clínicos reportados en humanos durante los últimos años, pone en manifiesto como responsables a las cepas de los genogrupos *GI* y *GII* (Sánchez-Fauquier, *et al.*, 2007).

1.4.5 Características biológicas de los norovirus

1.4.5.1 Características estructurales y genómicas de norovirus

Los norovirus son virus pequeños, vistos al microscopio electrónico presentan una morfología esférica con un perfil irregular (*figura 1.3*) (Kapikian, *et al.*, 1972).

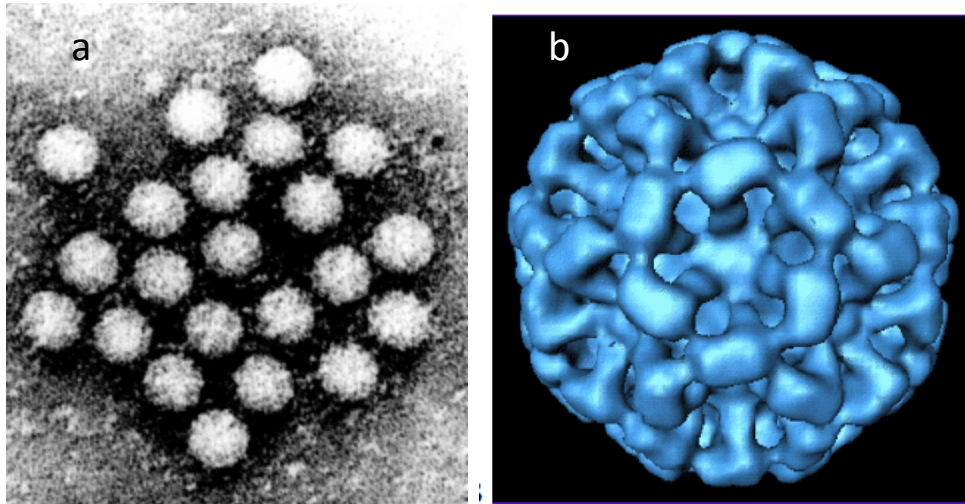


Figura 1.3 Morfología de norovirus. a) Partículas del *virus Norwalk* en un filtrado de heces visualizado por microscopía electrónica (adaptado de Kapikian, *et al.*, 1972). b) Criomicroscopía electrónica (Prasad, *et al.*, 1999).

El genoma del *virus Norwalk*, virus más representativo del género de los norovirus, está constituido por una única molécula de *RNA* de cadena simple y polaridad positiva con un tamaño de 7642 nucleótidos (Gutiérrez, *et al.*, 2003). Localizada en el interior de una cubierta proteica desnuda (sin envoltura) denominada cápside de 27 nm de diámetro aproximado (Okada, *et al.*, 1990).

1.4.5.1.1 Organización genómica

El genoma del virus Norwalk se encuentra organizado desde el extremo 5' hacia el extremo 3' de acuerdo se describe en breve (*figura 1.4*):



Figura 1.4 Representación esquemática del genoma del *virus Norwalk* (*Nature Reviews Microbiology*, 2010).

La primera característica de la molécula simple de *RNA*, es la carencia de la *estructura Cap* en el extremo 5' terminal, que es una guanina metilada propia de los *RNA mensajeros (RNAm)* eucarióticos, cuya función principal es reclutar factores celulares involucrados en el inicio de la síntesis de proteínas. En su lugar se encuentra unida covalentemente una proteína viral denominada *VPg* (del inglés: *viral genomic protein*), la cual participa en el reclutamiento de factores de la traducción (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

A continuación, se observan dos nucleótidos (*guanina - uracilo*), presentes en todos los miembros de la familia *caliciviridae*. Este rasgo conservado sugiere que probablemente estén involucrados en la regulación de la replicación viral (Gutiérrez, *et al.*, 2003). Seguidamente se identifica una región no traducida o *UTR* (del inglés: *untranslated region o untranslated trailer*), constituida por 5 nucleótidos, y en general es muy pequeña comparada con la que se presenta en otros virus. Posteriormente se distingue la primera región codificante o marco abierto de lectura (*ORF*, del inglés: *Open Reading Frame*) de aproximadamente 5 Kilobase (kb) de longitud, constituida por los genes que codifican las proteínas no estructurales del virus (Gutiérrez, *et al.*, 2003). Esta primera organización del genoma se denomina *RNA genómico* debido a su participación en la replicación del virus (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

Subsiguientemente, en el genoma del *virus Norwalk* se visualiza nuevamente los nucleótidos *guanina* y *uracilo*. El segundo y tercer *ORF* que codifican las proteínas mayoritaria y minoritaria de la cápside. Otro *UTR*, de aproximadamente 66 nucleótidos y finalmente una cola de poli A al final del genoma (Bertolotti, *et al.*, 2003). Esta segunda porción del genoma se denomina *RNA subgenómico* por su relación en la formación de la cápside del virus (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

1.4.5.1.2 Proteínas no estructurales

Estudios con *VLPs* (del inglés: *virus-like particles*) del *virus Norwalk*, describen que en el inicio de la replicación se observa la formación de una poliproteína no estructural, codificada por el *ORF-I* del genoma del virus. Que, posteriormente es escindida en varios puntos de restricción,

dando origen a distintos precursores y productos, principalmente proteínas virales no estructurales (Belliot, *et al.*, 2005).

El número absoluto de proteínas no estructurales y su función aun no son del todo conocidos. La función de algunas de ellas o de sus precursores se ha determinado porque poseen secuencias similares a las de otras proteínas virales descritas previamente (Gutiérrez, *et al.*, 2003). Generalmente, se han descrito seis péptidos ordenados desde el extremo amino hacia el carboxilo terminal, asignadas desde *NS1* a *NS7* (Donaldson, *et al.*, 2008).

a) *NS1/2 o p48*

En el *virus Norwalk*, la *NS1/2* es de aproximadamente 48 kDa (Seah, Gunesekere, Marshall, and Wright, 1999). Tiene una secuencia análoga a otras proteínas virales y celulares implicadas en la regulación de la proliferación celular. Es posible que ésta también esté relacionada con el anclaje de los complejos replicativos unidos a membranas (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

b) *NS3 o NTP*

La *NS3* es una proteína de 41 kDa que posee un motivo de unión NTP, que al parecer le permite unirse a moléculas de ATP e hidrolizarlas. Se sugiere que tiene una función NTPasa (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

c) *NS4 o p22*

La *NS4 o p22*, es una proteína de función desconocida. Se localiza en la posición que corresponde a la proteína 3^a de poliovirus. Posiblemente, implicada en la localización membranal de los complejos replicativos (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

d) NS5 o VPg

La NS5 o *proteína viral asociada al genoma (VPg)*; del inglés: *viral genomic protein*), es una proteína de 15 kDa, que se encuentra unida covalente al extremo 5' del RNA (Burroughs, & Brown; 1978). Su presencia es minoritaria con una o dos copias en el virión, y su función está asociada a la infectividad del genoma ya que si es removida, la síntesis de proteínas virales se reduce drásticamente (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

e) NS6 o 3C

Esta es la única proteinasa codificada por el genoma de virus. En su forma de precursor 3CD (proteínasa-polimerasa) presenta un peso molecular aproximado de 79 kDa. La 3CD puede autoprocésarse dando origen a la proteinasa de 19 kDa y a la polimerasa de 57 kDa (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

La forma en la que se acumula frecuentemente tanto en reacciones de síntesis *in vitro* como en células infectadas es como precursor 3CD. Tanto el precursor 3CD como la proteinasa 3C tienen actividad proteolítica (Kuyumcu, *et al.*, 2004).

f) NS7, 3D o RdRp

Esta es la proteína no estructural de mayor tamaño, aproximadamente 57 kDa. Constituye a la *RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp)*; del inglés: *RNA dependent RNA polymerase*). Su principal función es la de sintetizar al *RNA genómico y subgenómico* de la progenie viral (Hardy, 2005).

1.4.5.1.3 Proteínas estructurales

El *ORF-2* tiene una longitud de 1,8 Kb y codifica la principal proteína estructural de la cápside o *VP1* (del inglés: *viral protein 1*). El *ORF-3* de aproximadamente de 0,6 Kb de longitud codifica la proteína estructural básica menor o *VP2* (del inglés: *viral protein 2*) (Donaldson, *et al.*, 2008).

a) VP1

La cápside del virión está constituida principalmente por una proteína estructural denominada *proteína viral 1* o *VP1*, de 530-555 aminoácidos, con pesos moleculares que oscilan entre los 58 y 60 kDa (Hardy, 2005). La predominancia de la *VP1* en la formación de la estructura de la cápside vírica es consistente con su papel como determinante del fenotipo antigénico. Así, como en las interacciones del virus con las células huésped, proporcionando la unión al receptor (Green, 2002).

La estructura atómica de *VP1* (*figura 1.5*) ha sido resuelta por cristalografía con rayos X a partir de *VLPs* (*virus-like particles*) o de partículas virales de algunos miembros de la familia (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

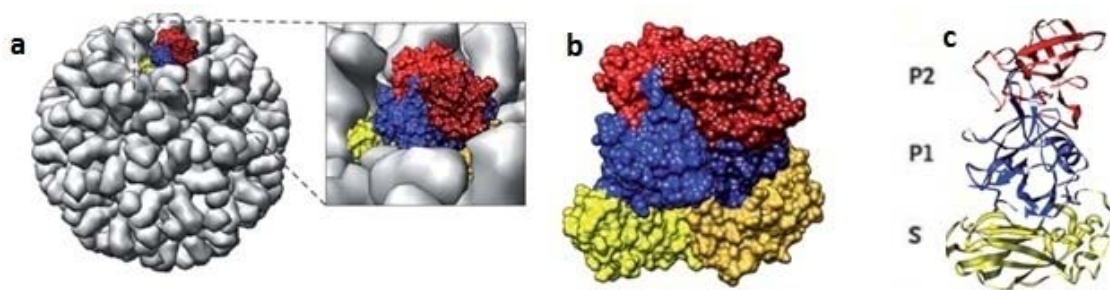


Figura 1.5 Imagen tridimensional de la estructura de la cápside del *virus Norwalk*. a) Estructura terciaria de la proteína *VP1*. b) Estructura secundaria de la *VP1*, dominios *S* (amarillo), subdominio *P1* (azul) y subdominio *P2* (rojo) (*Nature Reviews Microbiology*, 2010).

La molécula de *VP1* (figura 1.6) se pliega en tres dominios principales: el *N-terminal*, localizado hacia el interior de la cápside. El *dominio intermedio* o *S* (del inglés: *Shell domain*) involucrado en la formación de la capa basal icosaédrica y el *dominio P* (del inglés: *Protruding domain*) que corresponde a la fracción *C-terminal* y es de naturaleza más variable (Prasad, *et al.*, 1999).

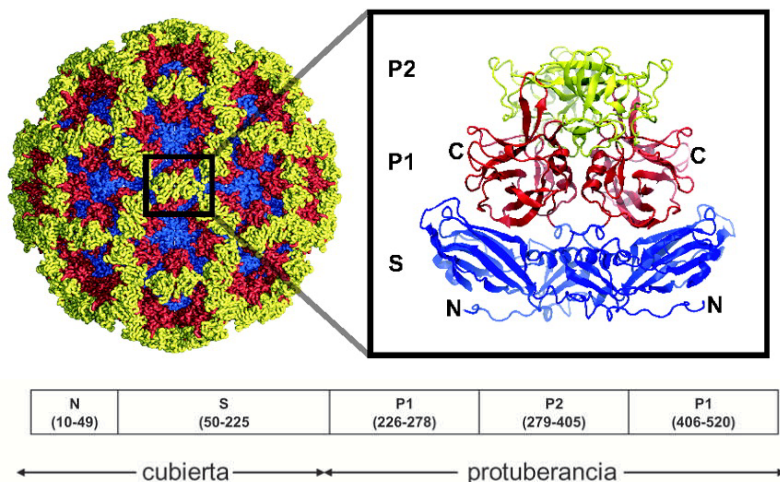


Figura 1.6 Morfología de la proteína *VP1* de la cápside del *virus Norwalk*. Los residuos de aminoácidos correspondientes a estos dominios se encuentran esquematizados en la parte inferior de la imagen (Siebenga, *et al.*, 2007).

El *dominio P*, está formado por dos subdominios: el subdominio *P1*, implicado en la antigenicidad y el subdominio *P2* o región hipervariable, responsable de la especificidad antigénica y de la unión a los receptores de los antígenos del grupo sanguíneo *HBGA* (del inglés: *histo-blood group antigens*) (Tan, *et al.*, 2003).

b) *VP2*

La *proteína viral 2* o *VP2*, con un peso molecular que varía entre los 22 hasta los 29 kDa, está considerada como una proteína estructural minoritaria de la cápside, porque solo está presente en una o dos copias en el virión y su función no se conoce bien. Aunque se cree que su presencia aumenta la eficiencia de la expresión de la *VP1*, mejora la estabilidad y maduración de la

partícula (Bertolotti, Crawford, Hutson & Estes, 2003). Otros autores suponen que la *VP2*, dada su naturaleza básica, podría interactuar con el *RNA genómico* y participar en su encapsidación (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

1.4.5.2 Ciclo replicativo

Tanto el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la replicación viral de norovirus, como el desarrollo de drogas antivirales se han obstaculizado debido a la falta de un sistema de cultivo *in vitro* del virus o de un modelo animal, donde el virus se replique (Harrington, *et al.*, 2004). Sin embargo, la clonación de su genoma, la expresión de proteínas virales recombinantes y el reciente establecimiento de ensayos de replicación *in vitro* han permitido realizar avances importantes en el estudio de su ciclo replicativo (*figura 1.7*) (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

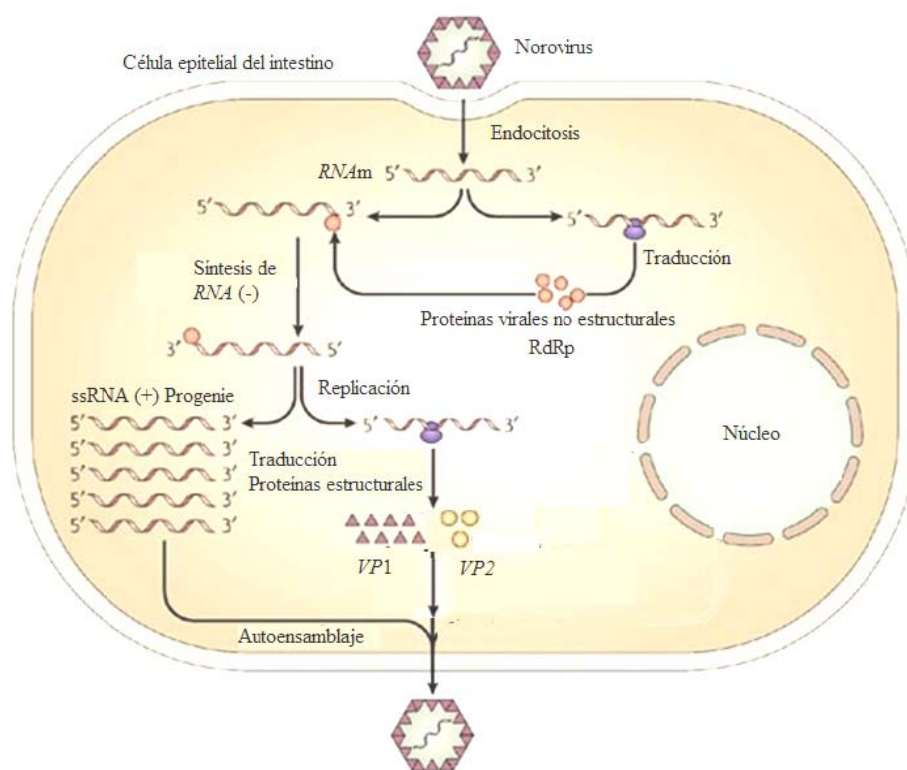


Figura 1.7 Representación esquemática del ciclo replicativo del *virus Norwalk* (adaptado de *Nature Reviews Microbiology*, 2010).

1.4.5.2.1 Fijación o absorción

El primer evento involucrado en la replicación de norovirus está regulado por la interacción entre las moléculas de la superficie celular del huésped y las proteínas virales (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

Estudios con *VLPs* de *virus Norwalk* han mostrado que estos virus reconocer los antígenos del grupo histosanguíneo (*HBGA*), particularmente a los trisacáridos denominados antígenos H tipo 2, presentes en los eritrocitos y enterocitos del humano. Otros antígenos como el H tipo 1, 3 y Lewis, presentes en células epiteliales del intestino, median la interacción con *VLPs* de otros norovirus y permiten su internalización a la célula (Lochridge, *et al.*, 2005).

El dominio de unión del virus ha sido localizado en una región presente en el subdominio *P2* de la proteína de la cápside. Esencial para adherirse a su receptor celular formando dímeros de unión con algunos antígenos (Tan, *et al.*, 2004).

Si bien, el mecanismo de reconocimiento de los antígenos de las células huéspedes no se conoce en detalle, se sabe que el adherirse a los receptores es esencial. Probablemente sean fundamentales no únicamente como receptores, sino también cumplan otras funciones elementales para la infección viral (Tan, *et al.*, 2004).

1.4.5.2.2 Penetración

El siguiente paso después de la unión a la superficie celular es la entrada o penetración del virus hacia el citoplasma celular del huésped. Para *Feline calicivirus (FCV)* ocurre a través de *endocitosis* dependiente de *clatrina* (una proteína, cuya función principal es recubrir las vesículas en el proceso de transporte entre membranas) liberando el *RNA viral* al interior del citoplasma del huésped. La acidificación de las vesículas es necesaria para la liberación del genoma al citoplasma. No se ha identificado ninguna otra molécula involucrada en la entrada a la célula de algún otro miembro de la familia (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

1.4.5.2.3 Traducción del genoma viral

Debido a que el genoma del norovirus es una molécula de *RNA* de cadena sencilla y polaridad positiva. Una vez que se localiza en el citoplasma celular, éste actúa como *RNA_m* sintetizando las proteínas virales, utilizando la maquinaria traduccional celular del huésped (Belliot, *et al.*, 2003).

Si bien el mecanismo involucrado en el inicio de su traducción aun se desconoce, algunos experimentos preliminares proponen que durante este proceso, algunos *RNA virales* compiten con los *RNA_m* celulares para poder ser traducidos (Belliot, *et al.*, 2005). Otros autores proponen que los virus han desarrollado mecanismos más sofisticados que les aseguran su traducción, inhibiendo simultáneamente la traducción de los *RNA_m* celulares (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

1.4.5.2.4 Replicación del *RNA viral*

Inicialmente se transcribe el primer *ORF* del genoma del virus, que codifica una poliproteína, que dará origen a las distintas proteínas no estructurales del virus (Belliot, *et al.*, 2005). Además la cadena simple de *RNA* del virus cumple la función de molde, ya que sirve como plantilla para la síntesis de un *RNA* intermediario de polaridad negativa, que a su vez es necesario para la producción de los *RNAs* de la progenie viral. En este proceso, participan activamente las proteínas virales no estructurales y la *VP2* (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

1.4.5.2.5 Ensamblaje, maduración y liberación

La formación de la cápside viral es un fenómeno que ocurre mediante el autoensamblaje de 180 copias de la *VPI*, ordenadas en 90 dímeros con un arreglo T=3 (El número T define el número de relaciones y la simetría entre las subunidades de la cápside) (Gutiérrez, *et al.*, 2003). Este proceso no requiere de la asociación con el genoma viral, como ocurre en otros virus de *RNA* (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

La cápside no presenta orificios de tamaños apropiados, por lo que es poco probable que el *RNA* se encapsule después de que ésta se ensamble. Es más probable que el empaquetamiento del *RNA* ocurra de manera concomitante con el ensamblaje. Una vez formadas las partículas virales, estas son liberadas al medio, presumiblemente tras la lisis de las células infectadas (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

1.4.5.3 Hospedadores naturales

Si bien el tracto gastrointestinal del ser humano es el principal reservorio confirmado de este virus, en los últimos años también se ha reportado la presencia de norovirus en animales (Van der Poel, *et al.*, 2000).

1.4.5.4 Mecanismos de transmisión

La información epidemiológica de los brotes de gastroenteritis por norovirus recolectados por el CDC, desde enero 1996 hasta noviembre de 2000, sobre la enfermedad indica que la vía de transmisión más frecuente estuvo implicada con la ingesta de comida infectada (39%), el contacto directo de persona a persona (12%), el consumo de agua contaminada (3% - 20%) y a un modo de transmisión no específico (CDC, 2001).

1.4.5.4.1 Transmisión directa

La propagación y transmisión directa de norovirus de persona a persona, pueden ocurrir por dos vías. La ruta fecal-oral, que probablemente sea el modo de transmisión primaria que utiliza el virus. Y, la transmisión aérea debido a la inhalación de partículas y aerosoles contaminados, producidos principalmente por vómitos.

Ambas vías de transmisión juegan un papel importante en la propagación de la enfermedad (CDC, 2006). Sin embargo, el factor responsable para mantener la sucesión de los brotes son los fómites o superficies contaminadas. Debido a la baja dosis infectiva necesaria para

producir infección y a la capacidad del virus de sobrevivir en el medio ambiente por largos períodos de tiempo (Kuusi, *et al.*, 2002)

1.4.5.4.2 Transmisión por alimentos

En teoría, cualquier alimento puede ser potencialmente infectado con norovirus a través de la contaminación fecal, ya sea desde su origen o durante su manipulación (SEE, 2007). No obstante, algunos alimentos están implicados con más frecuencia que otros, particularmente aquéllos que tienen contacto con agua contaminada y que con frecuencia se consumen crudos o escasamente cocinados como frutas, verduras, hortalizas, pero principalmente moluscos bivalvos, como ostras y almejas que tienden a concentrar en sus tejidos activamente al virus, al filtrar grandes volúmenes de agua contaminada (Godoy, *et al.*, 2005).

1.4.5.4.3 Transmisión por agua

Los brotes provocados por el consumo de agua contaminada son mucho menos comunes que los brotes de origen alimentario, la gastroenteritis por norovirus ha sido asociada con diversas fuentes de agua contaminada, incluyendo el consumo de agua potable, de pozo, agua de manantiales y aguas superficiales no controladas. Incluso por el contacto con aguas residuales y el uso del agua en forma recreativa, como piscinas o lagos (SEE, 2007).

Algunas publicaciones señalan que los mecanismos por los que se contamina el agua son a partir de los desbordamientos de las aguas residuales, contaminación por tanques sépticos, lluvias torrenciales que arrastran materia orgánica o averías en la red de suministro (Kukkula, Maunula, Silvennoinen & von Bonsdorff, 1999).

1.4.6 Aspectos clínicos de la gastroenteritis por norovirus

1.4.6.1 Sintomatología clínica

El período de incubación de la infección por norovirus es de 10 a 51 horas, pero generalmente los síntomas comienzan 24 horas después de haber ingerido el virus (Tregan, s/a).

Habitualmente la EDA causada por norovirus se caracterizan clínicamente por la aparición brusca de náuseas (79%), vómitos (69%), diarrea no sanguinolenta (66%), fiebre (37%) y dolor abdominal (30%). Los vómitos son muy frecuentes en niños mayores de un año, mientras que en los lactantes se suele desarrollar sólo diarrea, acuosa sin moco ni sangre, con un promedio de 4 a 8 evacuaciones al día (Kaplan, *et al.*, 1982).

En individuos sanos, la enfermedad en general se resuelve espontáneamente entre las 24 y 48 horas siguientes a la aparición de los síntomas. Sin embargo, estos síntomas pueden persistir en adultos mayores y niños (<11 años) entre 4 y 6 días, tiempo en el cual la infección se autoelimina. Incluso, se ha reportado casos en la que la infección sintomática ha perdurado por períodos superiores a un año en pacientes pediátricos oncológicos (Simon, *et al.*, 2006) y en adultos inmunodeprimidos (Glass, *et al.*, 2000).

Los norovirus pueden ocasionar otras manifestaciones extraintestinales. Así, en un brote que afectó a las tropas británicas en Afganistán, algunos soldados afectados presentaron rigidez de nuca, fotofobia, confusión y coagulación intravascular diseminada (CDC, 2002). Además, se han reportado síntomas graves poco comunes, como encefalopatías en niños, que provocaron alteraciones en las funciones cerebrales como cambios de conducta o en los niveles de conciencia (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

Se han descrito casos graves y fallecimientos de pacientes debido principalmente a la deshidratación crónica y la incapacidad de reponer los líquidos perdidos en vómitos y diarreas (Ribes y Buesa, 2010). La gravedad de la enfermedad, comparada con la diarrea por rotavirus, parece ser ligeramente menor en estudios basados en pacientes extra hospitalarios, mientras que, en niños hospitalizados, posee una gravedad similar (Sakai, *et al.*, 2001).

1.4.6.2 Patogénesis

Gran parte de los conocimientos sobre la patogénesis de las infecciones por norovirus proviene de datos con voluntarios sanos que han participado en estudios relacionados (Schreiber, Blacklow & Trier, 1973).

Generalmente, las infecciones agudas por norovirus dan lugar a lesiones anatomopatológicas reversibles en el yeyuno provocando un incremento del espacio intercelular y acortamiento de las microvellosidades (Schreiber, Blacklow & Trier, 1973). Estos cambios histológicos son acompañados con la secreción de una cantidad variable de líquido intestinal, pero no se ha asociado con la producción de enterotoxinas (Mandell, *et al.*, 2005). Además, existe un retraso del vaciamiento gástrico y una alteración de la motilidad gástrica que pueden ser responsables de las náuseas y los vómitos (Schreiber, Blacklow & Trier, 1973).

No se observan cambios histológicos en el fundus gástrico (porción más distal del estómago), o en la mucosa del colon (Dolin, Levy, Wyatt, Thornhill & Gardner, 1975). El sitio de la replicación del virus aun no ha sido identificado (Dolin, *et al.*, 1975).

1.4.6.3 Virulencia

1.4.6.3.1 Capacidad infectiva

Los norovirus poseen una elevada capacidad infectiva y una dosis infectiva relativamente baja. Se calcula que de 10 a 100 partículas víricas son suficientes para causar una infección, aunque esta cantidad puede variar en función de la cepa y la vulnerabilidad del hospedero (Ribes y Buesa, 2010).

Los norovirus sorprenden también, por su elevada estabilidad en el ambiente. Sobreviviendo en un amplio margen de temperaturas (desde la congelación hasta la desecación) y

a una amplia gama de *pHs*, (desde ácidos hasta básicos). Explicando que sobrevivan al paso por el medio ácido del estómago (Cannon, *et al.*, 1991).

Adicionalmente, soportan dosis de rayos ultravioleta superiores a 103 mJ/cm² y radiación gamma de 2 a 4 kGy, que usualmente se utilizan para tratar alimentos (*Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria [ACSA]*, 2011).

Varios experimentos han demostrado que los norovirus mantienen su potencial infeccioso después de ser tratados con éter, cloroformo, etanol, detergentes suaves y disolventes orgánicos (Green, 2007). Sin embargo, se ha visto que los norovirus se inactivan con dosis de hipoclorito de sodio superiores a 300 ppm, a diferencia de las bacterias que solo necesitan una dosis de 70 ppm (Barker, Vipond & Bloomfield, 2004).

1.4.6.3.2 Período de transmisibilidad

El período de transmisibilidad incluye toda la fase aguda, siendo máxima las primeras 24 - 48 horas de la enfermedad. Incluso, hasta dos semanas después de que hayan desaparecido los síntomas. Debido principalmente a la elevada excreción de partículas virales en las heces, 10⁷ – 10¹⁰ partículas/gramo (Ribes y Buesa, 2010).

1.4.6.3.3 Estacionalidad

La transmisión del norovirus ocurre a lo largo de todo el año, sin embargo el tema de la estacionalidad de la infección es controvertido.

Inicialmente se había descrito una frecuencia mayor durante los meses de invierno en climas templados (Treanor & Dolin, 2005). Otros estudios refieren dicha estacionalidad solo en los brotes de transmisión interpersonal (Marshall, Dimitriadis, & Wright, 2005). Mientras que algunos autores no refieren estacionalidad alguna (Fankhauser, *et al.*, 2002).

Probablemente, sólo cuando se lleve a cabo una vigilancia adecuada de las infecciones por norovirus en distintas comunidades y se estandaricen los procedimientos de diagnóstico a escala internacional se podrá tener una opinión más sólida (Kass & Rieman, 2006).

1.4.7 Respuesta inmune frente a norovirus

Los estudios acerca de la respuesta inmune y los parámetros que definen la inmunidad protectora frente a norovirus, son poco conocidos, debido principalmente a la incapacidad de estos virus para ser cultivados en líneas celulares. El desarrollo de modelos animales experimentales en los últimos años, han contribuido enormemente al entendimiento de la respuesta inmune (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

Los estudios realizados con voluntarios demostraron que, al parecer la respuesta inmune frente al virus, esta mediada fundamentalmente por anticuerpos, pero ésta es específica para cada cepa viral y es de corta duración, de entre 6 y 14 semanas. No obstante, las exposiciones múltiples parecen incrementar esta resistencia (Parrino, Schreiber, Trier, Kapikian & Blacklow, 1977).

Estudios más recientes revelaron que la infección por norovirus induce una respuesta inmune predominantemente de tipo-específica de anticuerpos séricos de las clases *IgG*, *IgA* e *IgM*, notándose que las respuestas de *IgA* e *IgM* parecen ser relativamente cortas en el tiempo, mientras que la presencia de *IgG* sérica específica frente a norovirus persiste durante meses (Wilhelmi, Román, Sánchez-Fauquier, 2003). Se ha observado que estos anticuerpos pueden estar involucrados en la existencia de un cierto grado de reactividad cruzada entre distintos genotipos, siempre y cuando se encuentren filogenéticamente muy relacionados (Koopmans, *et al.*, 2002).

1.4.8 Factores de riesgo involucrados con la infección por norovirus

Las infecciones por norovirus ocurren en personas de todas las edades. Pero, son considerados grupos de riesgo los niños (< 5 años) y ancianos (> 65 años) (Tregan, s/a). No existe diferencia significativa en la prevalencia de la infección en personas de uno u otro género (Tregan, s/a). Un

único estudio a gran escala entre el personal militar encontró que los afrodescendientes, tienen un menor riesgo de infectarse por norovirus que los miembros no- afrodescendientes, del grupo de estudio (Tregan, s/a).

La susceptibilidad a la enfermedad es universal y la mayoría de individuos se han infectado con norovirus alguna vez antes de llegar a la edad adulta (SEE, 2007). La tasa de adquisición de anticuerpos contra norovirus es distinta en las diferentes poblaciones, ya que mientras en países en vías de desarrollo se generan desde los primeros años de vida, en los países desarrollados suelen aparecer tardíamente (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

Por otra parte, estudios con voluntarios, llama la atención que, únicamente el 50% de los individuos involucrados desarrollan la enfermedad y que el 13 - 40% aproximadamente de los voluntarios no se infectan. En este grupo, también se observó que algunos voluntarios son resistentes a la infección cuando se exponen por primera vez al virus, pero al volverse a exponer uno o dos años más tarde, desarrollan manifestaciones clínicas, lo que sugiere que hay algún mecanismo de protección natural (Tregan, s/a).

Aunque, esta protección natural puede parecer de origen inmunológico, algunos voluntarios con altos niveles de anticuerpos son vulnerables a la infección. Mientras que otros que carecen de anticuerpos no lo son, esta aparente paradoja se explica por factores de susceptibilidad del huésped genéticamente determinados (Rockx, *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que la infección por norovirus depende de la presencia de *HBGA* específicos, que actúan como receptores para el virus en el intestino de los hospedadores (Rockx, *et al.*, 2005). La expresión de *HBGA* está regulada por el gen que codifica la enzima α -1,2-*fucosiltransferasa* (*FUT2*) que regula la expresión de *HBGA* en líquidos biológicos (Ribes y Buesa, 2010).

En la mayoría de las personas los *HBGA* no están presentes sólo en las células rojas de la sangre y las superficies epiteliales de varios órganos, sino también en los líquidos biológicos,

asociados con la capas de células mucosas, estos individuos denominado "*secretores*" (Lindesmith, *et al.*, 2003). Por otro lado, algunos de los *HBGA* no son expresados en la superficie de las mucosas de sus órganos, ni están presentes en forma soluble en el cuerpo, debido a la presencia de una mutación en el gen *FUT2*. A estos individuos llamados "*no-secretores*", se les asocia con la resistencia a la infección, ya que pueden carecer de receptores de norovirus en la superficie de la mucosa intestinal (Lindesmith, *et al.*, 2003).

Otros estudios, sin embargo han expuesto que la resistencia al virus determinada genéticamente, está asociado con el fenotipo sanguíneo *ABO*. Así los voluntarios con el grupo sanguíneo O al estar expuestos al virus, desarrollaron la infección con mayor frecuencia que los individuos del grupo sanguíneo B (Carlsson, *et al.*, 2009).

1.4.9 Diagnóstico de norovirus

1.4.9.1 Diagnostico de laboratorio

La sintomatología clínica asociada con enfermedades enterogástricas producidas por virus entéricos no son suficiente especificas para diferenciarlas de otras enfermedades producidas por bacterias, parásitos u otras causas. Por consiguiente, los procedimientos de laboratorio como: microscopía electrónica (EM), enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), passive particle agglutination test (PPAT), poliacrylamide gel electrophoresis (PAGE), o reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), son necesarios para confirmar un diagnóstico clínico de una gastroenteritis de origen viral (Gray *et al.*, 2008).

1.4.9.2 Diagnóstico clínico

En los casos en que la identificación de la causa de la infección, a través del diagnostico de laboratorio no sea posible, se pueden utilizar las características clínicas del paciente, para llegar a un diagnóstico tentativo (SEE, 2007).

Cuando se sospecha como agente etiológico de la infección al norovirus, se puede emplear los denominados “*criterios de Kaplan*” que contemplan tanto características clínicas como epidemiológicas:

- Vómitos (normalmente en proyectil) en más del 50% de los casos.
- Duración de la enfermedad de 12 a 60 horas.
- Período de incubación medio de 24 a 48 horas.
- Ausencia de aislamiento de ningún otro patógeno en el coprocultivo

Cuando estos criterios están presentes, es muy probable que la enfermedad sea causada por norovirus. En una revisión de 4.050 brotes ocurridos entre 1998 y 2000 se observó que los *criterios de Kaplan*, son altamente específicos (99%) y moderadamente sensibles (68%) en la discriminación de brotes confirmados (Turcios, Widdowson, Sulka, Mead & Glass, 2006).

1.4.10 Tratamiento

La gastroenteritis causada por norovirus no cuenta con tratamiento específico. Por lo tanto se debe tratar como cualquier otra enfermedad diarreica. Apoyándose en medidas encaminadas a restaurar la función fisiológica normal, especialmente en lo referente a la rehidratación (SEE, 2007).

Para ello se indica el inicio de forma precoz de aporte de líquidos en forma de solución rehidratante oral (SRO), que además de corregir el déficit hídrico existente, asegura un aporte adecuado de electrolitos frente a las pérdidas mantenidas por vómitos y diarrea (OMS, 2009). En los casos con incapacidad de ingesta de líquidos de forma oral, deshidratación grave o afectación clínica importante será necesario el ingreso hospitalario y la administración de fluidoterapia intravenosa y, en ocasiones, alimentación parenteral (Pachón, *et al*, 2006).

En la actualidad, se indica el comienzo precoz de la alimentación habitual del niño para favorecer la nutrición y la recuperación funcional del enterocito (*Sociedad Argentina de Pediatría [SAP]*, 2003). En estudios realizados administrando inmunoglobulinas orales se ha observado un

efecto beneficioso en lo referente con la disminución del cuadro clínico y del periodo de excreción viral (Khetawat, 2002). Además, estudios en los que se ha usado probióticos como los *lactobacillus*, en el tratamiento y prevención de las diarreas, han arrojado resultados prometedores (SAP, 2003).

Como en todas las infecciones virales, los antibióticos son inapropiados y actualmente no hay agentes antivirales efectivos contra norovirus (Rondon, 2006).

1.4.11 Vacunación

Pese a la elevada prevalencia de las infecciones por norovirus entre niños y ancianos principalmente, en la actualidad aun no se dispone de una vacuna contra la enfermedad. Desde 1996 estudios experimentales se han desarrollado, basados en la expresión de los antígenos presentes en la proteína principal de la cápside. Su éxito ha sido limitado, debido a la reducida comprensión de los factores de protección inmunológica y la existencia de múltiples tipos genéticos y antigénicos del virus (Deirdre, 2008).

La expresión de la proteína de la cápside en sistemas de expresión de proteínas (baculovirus o plantas transgénicas), han demostrado que esta proteína se autoensambla en *partículas pseudovíricas* o *VLP* con características morfológicas, bioquímicas y antigénicas similares a las de los virus nativos. Por tal razón, son empleados para investigación y desarrollo de métodos de diagnóstico, estudios estructurales, análisis de interacciones, capacidad de unión a receptores, relaciones antigénicas y por supuesto para el desarrollo de vacunas potenciales (Atmar & Estes, 2001).

En cuanto al desarrollo de vacunas, las *VLP* expresadas mediante estos sistemas se utilizan para producir antígenos e inmunógenos, con el fin de inmunizar animales y obtener sueros o anticuerpos monoclonales que reconozcan la partícula viral induciendo el sistema inmune del huésped (Deirdre, 2008).

Estudios pre-clínicos han demostrado que las *VLP* administradas como vacunas a ratones por vía parenteral, oral o intranasal son altamente inmunogénicas (SEE, 2007). En voluntarios, las *VLP* expresadas en plantas transgénicas, como papa y jitomate genéticamente modificados, administradas por vía oral, se observó que estimulaban la respuesta inmune contra norovirus, logrando que en 90% de los individuos generaran *IgG* y en 30 – 40% *IgA* contra las *VLPs* (Atmar & Estes, 2001).

Hay que recordar que los norovirus provocan la mayoría de las infecciones gastrointestinales en niños, siendo la segunda causa más común de diarrea grave en el mundo (OMS, 2009). Por lo tanto los destinatarios principales de ese tipo de vacunas serían los infantes, pudiendo desempeñar un papel clave en los calendarios de vacunación, con el fin de reducir la mortalidad infantil y el control de las enfermedades diarreicas (Atmar & Estes, 2001).

Debido a que estos virus, al igual que el de la influenza, adquieren frecuentemente mutaciones en su genoma, gracias a su rápida y continua evolución, es común que las nuevas variantes emergentes, requieran ser analizadas periódicamente para reformar las vacunas y proveer una protección efectiva contra estos virus. Haciéndose necesario implementar un proceso anual de selección de cepas, para adecuar la vacuna a la cepas que están en circulación (Deirdre, 2008).

1.4.12 Epidemiología y distribución geográfica de la infección por norovirus

Hasta finales de los años noventa, no se disponían de pruebas de diagnóstico apropiadas para establecer la etiología de los brotes de gastroenteritis que podían estar causados por norovirus. La aplicación de los *criterios de Kaplan* se convirtió en el principal medio disponible, que permitió distinguir estos brotes de los de etiología bacteriana (Gutiérrez, *et al.*, 2003).

Por tal motivo, la prevalencia de norovirus como causa de gastroenteritis esporádica, seguramente estaba subestimada debido a la carencia de un diagnóstico específico habitual. La

aplicación de nuevas técnicas moleculares, en los últimos años han demostrado que los norovirus son una causa frecuente de gastroenteritis a nivel mundial (CDC, 2010).

1.4.12.1 Norovirus y casos esporádicos de gastroenteritis

Es difícil determinar el número exacto de casos esporádicos de gastroenteritis aguda causados por norovirus dentro de una comunidad, debido a que muchas de estos procesos son leves y el agente etiológico no es identificado (CDC, 2006).

Varios estudios sobre la etiología de las enfermedades gastrointestinales esporádicas coinciden que los norovirus son una causa importante de EDA. Estimando una prevalencia de la infección por norovirus que oscila entre el 4% al 48%, registrando la más alta en niños hospitalizados en Italia (SEE, 2007).

1.4.12.2 Epidemiología de los brotes de gastroenteritis aguda por norovirus

El estudio de los brotes de gastroenteritis, entendiendo por brote *“la existencia de dos o más personas que presentan una clínica similar siempre que estén relacionadas epidemiológicamente”* (OMS, 2009). Permiten destacar la importancia del agente causal y el mecanismo de transmisión por el cual se ha llegado a producir el brote, cosa que no sucede con los casos esporádicos (Fankhauser, *et al.*, 2002).

1.4.12.2.1 Brotes en instituciones cerradas o semicerrados

Los brotes epidémicos por norovirus suelen afectar a colectivos más o menos cerrados, como hospitales, centros educativos, grupos militares, ancianatos, hoteles, cruceros, entre otros (Lopman, Adak, Reacher & Brown, 2003). Principalmente, debido a la convivencia en contacto estrecho y continuo de los individuos (CDC, 2001).

Así, un estudio realizado por el CDC sobre brotes de origen no bacteriano ocurridos durante tres años encontró que el 43% se habían producido en instituciones cerradas, hospitales y residencias particularmente, y que en el 93% de ellos se había detectado al *virus Norwalk* como responsable (CDC, 2006).

1.4.12.2.2 Brotes en instituciones abiertas

La vía de transmisión principal en brotes epidémicos en colectivos abiertos o al menos para generar brotes comunitarios, sería la ruta digestiva, es decir a través de la ingesta de agua y/o alimentos contaminados. Aunque también se ha postulado la vía aérea, pero su papel es controvertido (SEE, 2007).

a) Datos epidemiológicos sobre brotes de origen alimentario

Los brotes causados por alimentos suelen ser extensos, amplios y difíciles de controlar (OMS, 2009). Implican alimentos perecederos, cuya comercialización y posterior consumo se realiza en poco tiempo (CDC, 2001).

Estudios internacionales sobre evaluaciones de brotes alimentarios ocurridos en un país y en un período de tiempo concreto (*cuadro 1.1*), señalan al norovirus como un agente etiológico importante (CDC, 2010).

Cuadro 1.1 Estimación del papel de los norovirus en brotes causados por alimentos (CDC, 2006).

<i>País (referencia)</i>	<i>Años</i>	<i>Número de brotes</i>	<i>Brotes atribuidos a norovirus</i>
Inglaterra y Gales	1995 – 1996	341	6%
Suecia	1998 – 1999	85	6%
Holanda	2002	59	27%
Estados Unidos	2008	1034	49%
España	2006 – 2007	857	7,7%

Los alimentos pueden contaminarse mediante dos vías, en su origen y debido a su manipulación. Si bien, los alimentos contaminados en su origen pueden tener una gran repercusión mediática, sólo representan como máximo el 25% de los alimentos implicados en brotes por norovirus. Mientras que los alimentos que más frecuentemente resultan implicados son aquellos que requieren manipulación y que después no son sometidos a tratamiento térmico alguno (Lopman, *et al.*, 2003).

Por otro lado, la implicación de los manipuladores como fuente de infección para los alimentos es variable, pero alta: se estima del 32% en Inglaterra y Gales (Lopman, *et al.*, 2003) y del 48% en Estados Unidos (Widdowson, *et al.*, 2005).

En cuanto al tipo de alimento responsable de los brotes, se estima que los alimentos más frecuentes en Estados Unidos fueron las ensaladas (26%), frutas y productos frescos (17%), bocadillos (13%), y ostras (3%) (Widdowson, *et al.*, 2005). En cambio, en Inglaterra y Gales estos porcentajes serían del 23%, para las ostras, del 20% para las ensaladas y del 11% para la carne de pollo (Lopman, *et al.*, 2003).

b) Datos epidemiológicos sobre brotes hídricos

El norovirus es un virus muy resistente, capaz de sobrevivir a concentraciones de cloro utilizadas para inactivar a las bacterias en aguas de consumo, lo cual determina que sea un agente importante en los brotes hídricos (SEE, 2007).

En las evaluaciones de brotes de norovirus en Estados Unidos, señalan que los brotes hídricos tendrían un peso igual o inferior al 5% (Blantun, *et al.*, 2006). Porcentajes similares se documentaron en Suiza (Fretz, Svodova, Lüthi, Tanner & Baumgartner, 2005).

No obstante, en una evaluación de 41 brotes hídricos en Finlandia, se señala que el 44% de los brotes fueron causados por norovirus (Maunula, Miettinen & von Bonsdorff, 2005). Por su parte, en España las evaluaciones de brotes de norovirus efectuada para el período 1999 al 2002,

señalan que los brotes hídricos contribuirían el 11% de los brotes, pero en el año 2003 se documentó que este porcentaje sería sólo del 1,9% (GVEDN, 2004).

Una evaluación de los brotes hídricos diferenciando los causados por aguas de recreación, de las agua de consumo señaló que en el primer grupo, los norovirus serían responsables del 9,7%. Debido al baño en piscinas con agua no tratada correctamente o en aguas superficiales de lagos. En el grupo de brotes por agua de consumo, el norovirus sería responsable del 5,9% del total de los casos evaluados (CDC, 2006).

Cabe mencionarse que la mayoría de los brotes por norovirus se produjeron por aguas incorrectamente desinfectadas, por rotura en la red de aguas y también por contaminaciones procedentes de depósitos de aguas residuales. Evidenciando la ausencia de indicadores de contaminación fecal fiables para norovirus y medidas efectivas para monitorizar posibles contaminaciones por virus, especialmente en el agua de consumo humano (Godoy, *et al.*, 2006).

1.4.13 Recomendaciones y medidas de control o prevención para controlar un brote por norovirus

Dadas las características propias de los norovirus es difícil tomar medidas preventivas que eviten su introducción y posterior propagación (Ribes y Buesa, 2010). Existen diferentes documentos como los redactados por: *Centers for Disease Control and Prevention* de los EEUU, *Health Protection Agency of London*, *National Disease Surveillance Centre of Dublin*, *State Government of Victoria, Australia*, por mencionar algunos, donde se puede consultar este tipo de recomendaciones para controlar un brote de norovirus.

1.4.13.1 Medidas dirigidas para prevenir a la transmisión interpersonal

El contacto directo de persona a persona es la forma más frecuente de extender los brotes, por tanto su interrupción es difícil (OMS, 2009). Lavarse las manos frecuentemente con agua y jabón constituye un medio eficaz de prevención (CDC, 2006). Además, la implementación de rigurosas

prácticas de higiene y sanidad pueden ayudar a prevenir la propagación de infecciones por norovirus en la población (SEE, 2007).

1.4.13.2 Medidas dirigidas a los alimentos y sus manipuladores

En la actualidad, los esfuerzos por controlar la infección están dirigidos a limitar la exposición de los alimentos al virus, ya sea en su origen o durante el proceso de manipulación (SEE, 2007). Por esta razón, es necesario aplicar medidas preventivas y de control a lo largo de toda la cadena alimentaria. Así, en la fase primaria, se debe controlar la calidad de las aguas de irrigación (ACSA, 2011).

En cuanto se refiere a la prevención de la contaminación de los alimentos a partir de los manipuladores requiere el cumplimiento de forma estricta de las normas de higiene respecto a la limpieza de las manos y de las buenas prácticas para evitar las contaminaciones cruzadas entre los alimentos (García, DuPont, Long, Santos & Ko G, 2006).

1.4.13.3 Medidas dirigidas al agua

Los brotes por la contaminación puntual de una red de suministro público debido a la contaminación accidental procedente de aguas residuales o a lluvias torrenciales tienen gran importancia debido a la posible exposición masiva de un número potencialmente importante de personas (Maunula, *et al.*, 2005). Estas situaciones exigen el control estricto de los métodos de desinfección.

1.5 Sistema de hipótesis o pregunta de investigación

El norovirus *GII* es el genotipo más frecuente, relacionado con episodios esporádicos de diarrea aguda en niños menores de 5 años del cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas – Ecuador.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

Este estudio de investigación se realizó bajo el proyecto ECUAVIDA – “Cohorte de Nacimiento”, a cargo del Dr. Philip Cooper, director de la “*Fundación Ecuatoriana para Investigación en Salud*” (FEPIS), en colaboración con el hospital “*Pedro Alberto Buffoni*” del cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas – Ecuador.

2.2 Zona de estudio

2.2.1 Trabajo de campo

La zona en la cual se ejecutó el trabajo de campo: recolección de muestras, se encuentra ubicada en el perímetro urbano del cantón Quinindé (desde los recintos hasta la Marujita en la vía Santo Domingo de los Tsáchilas hasta Cupa en la vía Esmeraldas), ubicado en la provincia de Esmeraldas – Ecuador (*figura 2.1*).

2.3 Período de tiempo de investigación

El presente proyecto de investigación se realizó en un período de 12 meses, a partir de enero del 2011 a enero del 2012.

2.4 Población

Las muestras de heces que se analizaron para el presente estudio se obtuvieron a partir de 244 niños, menores de cinco años de edad, que presentaron episodios esporádicos de diarrea aguda, y vivían dentro del perímetro urbano de la ciudad de Quinindé. La recolección fue llevada a cabo durante el período de tiempo comprendido entre junio del 2009 y octubre del 2010 (17 meses).

2.5 Fuentes de datos

Los datos primarios fueron proporcionados por la “*Fundación Ecuatoriana para Investigación en Salud*”. Recopilados a través del empleo del “*Formulario N*” (*anexo A*), en el cual se describen las características socio-económicas y medioambientales en las cuales se desarrollan los menores, dentro de su entorno familiar.

2.6 Procedimientos

A continuación, se describen a detalle las actividades, procedimiento, materiales y métodos utilizados en el desarrollo del presente estudio.

2.6.1 Recepción, recolección y toma de muestras

Las muestras fecales correspondientes a la población en estudio, fueron receptadas en el consultorio 8 del hospital “*Pedro Alberto Buffoni*” del cantón Quinindé o en el domicilio del infante, según fuere el caso.

2.6.1.1 Protocolo para la recolección de heces

El presente estudio tuvo en consideración dos condiciones metodológicas: la primera, que las deposiciones fuesen durante la fase aguda de la infección (48 – 72 horas tras el inicio), hasta un período máximo de nueve días tras la aparición de los primeros síntomas. La segunda, que la cantidad o volumen de muestra recolectada sea superior a los cinco gramos para heces de textura pastosa o semisólidas y mayor a 10 mL en muestras líquidas (FEPIS, 2011).

Para muestras con volúmenes apropiados, las heces se recolectaron, con una espátula estéril desechable, en un frasco de plástico estéril de boca ancha y tapa rosca, de aproximadamente 50 cm³ de capacidad (FEPIS, 2011).

En el caso de que el pañal haya absorbido gran parte de la deposición o para muestras con poco volumen, se recortó aproximadamente 5 cm² de la zona impregnada de heces. Con una pinza de metal estéril se colocó en los frascos de recolección. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con 5 mL de solución salina estéril en agitación vigorosa por 10 minutos, para finalmente eliminar el residuo del pañal (FEPIS, 2011).

Nota: El corte del pañal, se lo realizó con una tijera lavada y autoclavada para evitar una posible contaminación cruzada (FEPIS, 2011).

2.6.2 Análisis coproparasitológico

Para muestras con una cantidad o volumen de heces superior o igual a los cinco gramos, se procedió a realizar el análisis en fresco, Kato–Katz y concentrado. Mientras que para muestras con volúmenes inferiores a los cinco gramos, incluyendo aquellas que se obtuvieron del recorte del pañal, se realizó únicamente el análisis en fresco (FEPIS, 2011).

En cada uno de los casos se tomó una alícuota de aproximadamente 1 mL antes de empezar con el análisis clínico de las muestras (FEPIS, 2011).

2.6.2.1 Examen microscópico directo o en fresco

El estudio de las muestras de heces en fresco, se inició con la observación directa al microscopio óptico. Con un lápiz de cera, se *rotuló* el código del infante en la parte izquierda del portaobjetos. Se colocó una gota de solución salina fisiológica en cada extremo del portaobjetos (en el centro de la mitad izquierda y en el centro de la mitad derecha). Con un aplicador de madera se depositó sobre la solución salina una pequeña porción de heces (de 1 a 4 mg) de la muestra previamente homogenizada.

La solución se mezcló cuidadosamente hasta formar una suspensión. Con el mismo aplicador se procedió a retirar las fibras y otros fragmentos gruesos, que pudieron estar presentes en la muestra. La suspensión de heces se cubrió con un cubreobjetos y se observó al microscopio con objetivos de 10X y 40X, recorriendo la lamina siguiendo un sentido direccional, ejemplo: de derecha a izquierda, o de arriba hacia abajo, hasta cubrir toda el área de la placa (adaptado de Olivas, 2004).

Para la interpretación de los resultados, se informó detalladamente la presencia de alguna forma parasitaria, indicando su especie y estado evolutivo (trofozoito, quiste en caso de un protozoarios) ó (huevo, larva en caso de un helminto) (ver *anexo B*). Todos los parámetros del estudio coproparasitológico positivo, se reportaron en cruces (+), de acuerdo con el *cuadro 2.1* (adaptado de la OMS, 1992).

Cuadro 2.1 Valores de referencia para del estudio coprológico (OMS, 1992).

Densidad parasitaria promedio (Quiste/Trofozoito, por campo)	Grado
1 – 15	+
16 – 25	++
26 – 35	+++
más de 36	++++

* Utilizando el objetivo de 40X

2.6.2.2 Técnica de Kato–Katz

Para empezar, se sumergió tiras de papel celofán (cortado de 2 x 3 cm) en una solución de glicerina (glicerina comercial y agua destilada [1:1]) por un período no menor a 24 horas. Con ayuda de una espátula de madera, se depositó una porción de heces, previamente homogenizada, sobre la superficie de una rejilla metálica (105 perforaciones por mm²).

El área de la rejilla que contenía la muestra se frotó y raspó para facilitar el paso de la materia fecal a través del tamiz. Se colocó una pequeña cantidad de la materia fecal tamizada (50 mg) sobre una plantilla rectangular de 3 X 4 cm, con un orificio central de 6 mm de diámetro y 1,37 mm de profundidad dispuesta sobre un portaobjetos limpio y rotulado. Cuidadosamente se rellenó el agujero de la plantilla y se alisó la superficie con una espátula limpia.

Se retiró delicadamente la plantilla del portaobjetos, de modo que todo el material fecal quede adherido sobre la superficie del mismo. Posteriormente se cubrió la muestra fecal del portaobjetos con una tira de papel celofán empapada en glicerol y con ayuda de una superficie lisa se extendió uniformemente a lo largo de las dimensiones del celofán, evitando la aglomeración de heces en un solo punto. Cuando existía un exceso de glicerol, este se retiraba con un trozo de papel secante. Las muestras preparadas se dejaban reposar a temperatura ambiente de 30 a 45 minutos para finalmente ser observadas al microscopio con objetivo 10X (adaptado de la OMS, 1992).

Una vez realizada la lectura de la placa de manera sistemática, los resultados a reportar fueron el número total de huevos observados, indicando su especie (FEPIS, 2011).

2.6.2.3 Técnica de concentración: formol- acetato etílico

Con un aplicador de madera se colocó aproximadamente 1 g de materia fecal en un vaso de precipitación limpio. Se añadió 10 ml de solución de formol al 10%, revolviendo enérgicamente hasta formar una suspensión ligeramente turbia. La suspensión se hizo pasar a través de un filtro

de gasa (2 o 3 capas) adaptado a un tubo de centrifugación de 15 mL, hasta alcanzar la marca de los 7 mL. Completado este volumen, cuidadosamente se retiró y eliminó el filtro junto con el residuo sólido en la superficie de este (adaptado de la OMS, 1992).

A continuación, se añadió 3 mL de acetato etílico, y se mezcló vigorosamente durante 30 segundos. El tubo fue llevado a centrifugación durante 2 minutos a 1500 rpm. Concluida esta fase se distingue claramente cuatro capas en el tubo (*figura 2.2*) (adaptado de la OMS, 1992).

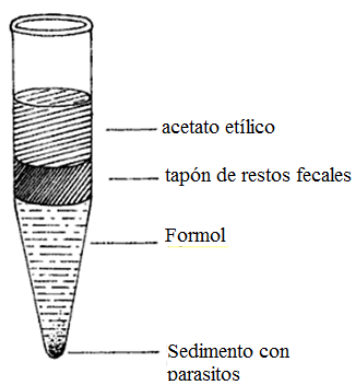


Figura 2.2 Tubo de centrifuga con las cuatro capas formadas después de realizar el método de concentración formol- acetato etílico (tomado de Botero, 2006).

El tapón graso (segunda capa) se despegó de las paredes del tubo con un palillo aplicador, y se descartó el sobrenadante invirtiendo rápidamente el tubo (adaptado de la OMS, 1992).

El sedimento fue homogenizado y suspendido con 1 mL de solución salina fisiológica. Se transfirió una gota de la solución anterior hacia un portaobjetos para examinarlo bajo el microscopio, utilizado objetivos de 10X y 40X con la finalidad de buscar huevos, quistes y larvas. Los resultados se reportan del mismo modo como se describen en la técnica de Kato – Katz (FEPIS, 2011).

2.6.2.4 Conservación y transporte de muestras

Las alícuotas de las muestras de heces permanecieron en congelación (-20°C) en el laboratorio clínico de “FEPIS”, sede Quinindé. Para su traslado hasta el laboratorio de biología molecular, ubicado en Quito se empleó un contenedor aislante del calor, conteniendo paquetes de gel congelante, con el propósito de salvaguardar la cadena de frío (FEPIS, 2011).

2.6.3 Análisis molecular

2.6.3.1 Codificación de los individuos participantes

Los códigos se asignaron en forma ordenada y ascendente, de acuerdo al orden de llegada al laboratorio. El código designado para cada muestra consistió en una numeración arábica de tres dígitos, desde 001 hasta 244.

Los nuevos códigos junto con la base de datos procedentes del laboratorio clínico de Quinindé (número del programa del niño, edad en meses y fecha de recolección) fueron ingresados en una hoja de cálculo electrónica desarrollada en *Microsoft Excel 2007*.

2.6.3.2 Pre-extracción: preparación de muestras

Se colocó 500 µL de *PBS* (pH 7,4) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidad. Se agregó de 50 a 100 mg de heces, con un palillo estéril (concentración ideal: 10 – 20% peso/volumen). Para muestras con materia fecal muy líquidas, se utilizó directamente 500 µL de la muestra sin diluir en *PBS* (FEPIS, 2011).

La mezcla se homogenizó en un vórtex, por alrededor de 1 minuto o hasta obtener una solución uniforme. Seguidamente se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm para sedimentar los sólidos. El sobrenadante clarificado fue empleado directamente para la extracción del ácido nucleico viral (FEPIS, 2011).

2.6.3.3 Extracción y purificación de *RNA viral*

Para la extracción y purificación de *RNA viral* se empleó el kit comercial *QIAamp[®] Viral RNA* (*QIAGEN*), de acuerdo a las especificaciones del fabricante (FEPIS, 2011).

2.6.3.4 *Real Time (TaqMan[®]) RT-PCR*

Para la identificación de la presencia de *RNA viral* de norovirus *GI* y *GII* se decidió emplear un ensayo de *Real Time RT-PCR* descrito para *7500 FAST Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*) y el kit comercial *AgPath-ID[™] One-Step RT-PCR* (*Applied Biosystems*) (FEPIS, 2011).

2.6.3.4.1 *Primers/probes*

Para la detección de norovirus *GI* y *GII*, se utilizaron los *primer* o cebadores y las sondas o *probe*, *TaqMan[®]* (tabla 2.1), cuyo objetivo se centra en una secuencia de cruce entre *ORF1* y *ORF2* del genoma del virus, donde se localiza una región muy conservada. Amplificando secuencias de 84 y 97 pb para *GI* y *GII* respectivamente (Trujillo, *et al.*, 2006).

Tabla 2.1 Descripción de la secuencia de *primers* y *probes* empleados para la amplificación de norovirus del *Genogrupo I* y *II* (FEPIS, 2011).

<i>Primer/Probe</i>	<i>Secuencia^a</i>
<i>Nombre</i>	<i>(de 5' a 3')</i>
GENOTIPO I	
Cog 1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA
Cog 1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C
Ring 1C	FAM – AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA – BHQ
GENOTIPO II	
Cog 2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG
Cog 2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA
Ring 2	QUA – TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT – BHQ

^a **R** = A o G; **B** = C, G o T; **Y** = C o T; **N** = Cualquier nucleótido

^b **GI** (Norwalk virus 68 [Genbank accession no. M87661]) y **GII** (Hawaii virus [GenBank accession no. U07611])

Los *primers* y *probes*, se obtuvieron comercialmente, procediéndose a preparar un *stock* de *primers/probes mix* [10µM], según se describe en la *tabla 2.2*.

Tabla 2.2 *Primer/probe mix* [10µM] (FEPIS, 2011).

<i>Primer/Probe</i>	<i>Stock Volumen</i>
<i>Nombre</i>	<i>(para 100 rxn)</i>
Cog 1F	10
Cog 1R	10
Ring 1C	5
Cog 2F	10
Cog 2R	10
Ring 2	5
Volumen Total	50

2.6.3.4.2 *Master mix*

La Real Time RT-PCR se ensambló incorporando en la *master mix* los reactivos que se detallan a continuación (*tabla 2.3*).

Tabla 2.3 Volúmenes finales de reactivos empleados en la *Real Time RT-PCR* (FEPIS, 2011).

<i>Componente</i>	<i>Volumen (μL)/rxn</i>
2X RT-PCR buffer*	12,50
Primer/probe Mix	0,5
25X RT-PCR Mix*	1
Detection enhancer*	1,67
Nuclease-free wáter*	6,33
<i>Volumen Total</i>	2 μL

AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems) * incluidos en el Kit

El volumen de reacción final se ajustó a 25 μL , añadiendo 3 μL de la muestra (FEPIS, 2011). Toda reacción contó con un control negativo denominado *Negative Template Control (NTC)* y dos controles positivos llamados *Viral Template Controls (VTCs)*, tanto para el *Genogrupo I* como para el *Genogrupo II*.

En el caso de los *NTC*, los 3 μL de muestra fueron reemplazados por 3 μL de *Nuclease-free wáter*. Para los *VTCs* se añadió 3 μL de una muestra positiva conocida (FEPIS, 2011).

Una vez ensamblada la *Real Time RT-PCR* se procedió a colocar las muestras en el termociclador *7500 FAST Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, bajo las siguientes condiciones de amplificación (*tabla 2.4*) (FEPIS, 2011).

Tabla 2.4 Parámetros de amplificación para *Real Time RT-PCR* (FEPIS, 2011).

<i>Ciclos</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
1	10 min	45
1	10 min	95
40	15 seg	95
	1 min	60

2.6.3.4.3 Análisis de resultados moleculares

A continuación, se describe brevemente las bases conceptuales para el análisis y posterior interpretación de los resultados obtenidos tras el empleo de la técnica de *Real Time RT-PCR*.

a) Ajuste de la línea de base (*baseline*)

La línea de base o *baseline*, se refiere a los ciclos iniciales en los que no existe cambios detectables en la cantidad de fluorescencia, y solo se detecta la fluorescencia basal (Bustin, 2005) (*figura 2.3 [a]*). Por lo tanto para su ajuste se procedió a revisar las curvas logarítmicas, así se estableció el punto inicial y el punto final diez valores y cinco valores, respectivamente, por debajo del valor más bajo de C_T obtenido en el ensayo (FEPIS, 2011).

b) C_T , ciclo umbral o ciclo crítico (*threshold cycle*)

El C_T , es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, es decir es la intersección entre la curva de amplificación y la línea de umbral (*figura 2.3 [b]*). Se evalúa en la fase exponencial de la curva de amplificación, siendo inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde (Pang, *et al.*, 2004).

En el presente estudio se consideró que los valores de C_T comprendidos entre ≥ 8 y < 40 ciclos, eran aceptables, por lo tanto los valores fuera de este rango, fueron excluidos de los resultados finales (FEPIS, 2011).

c) Establecimiento del umbral (*threshold*)

El umbral o *threshold* representa el nivel de fluorescencia por encima de la línea basal y dentro de la región de crecimiento exponencial de la gráfica de amplificación (Bustin, 2005). El establecimiento del umbral (*threshold*), se realizó analizando las curvas logarítmicas, estableciendo este en el punto medio de la parte lineal de la curva de amplificación del *VTC*, como se muestra en la *figura 2.3 [c]* (FEPIS, 2011).

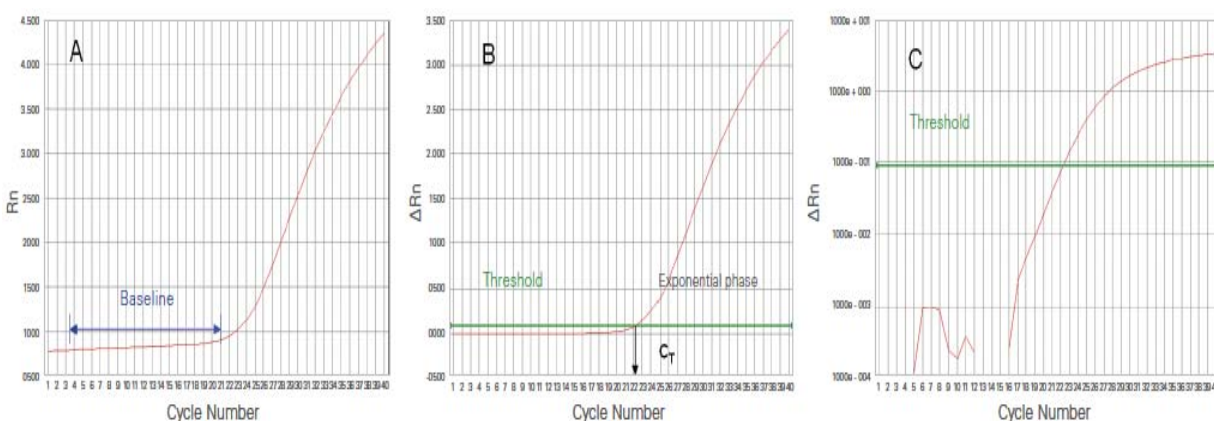


Figura 2.3 Parámetros para el análisis de los resultados, mediante real time RT-PCR. a) Baseline, b) C_t y c) Threshold (tomado de *Applied Biosystems*, 2008).

2.6.3.4.4 Interpretación de resultados del análisis molecular

Los resultados del análisis molecular para cada genogrupo (*GI* y *GII*) se estudiaron por separado (FEPIS, 2011).

a) *Negative template control (NTC)*

En el *NTC* no deben exhibir curvas fluorescentes que crucen o sobrepasen la línea de umbral (C_T) para el detector de *GI* o *GII*. En caso, que una o más curvas cruzasen el umbral, el experimento fue considerado como fallido y debió ser repetido (FEPIS, 2011).

b) *Viral template controls (VTCs)*

Las reacciones de *VTC*, deben exhibir curvas de fluorescencia que cruzar la línea de umbral (C_T), tanto para *GI* como para *GII*. En caso de no existir la correspondiente curva de amplificación el experimento fue descartado y se procedió a repetirlo (FEPIS, 2011).

c) **Muestras de ensayo**

Si todos los controles de calidad (*NTC* y *VTC*) han funcionado correctamente, una muestra puede ser considerada, positiva o negativa de acuerdo a la siguiente explicación:

Positivas: cuando se visualiza una curva exponencial que cruza el umbral en valores de C_T comprendidos entre ≥ 8 y < 40 ciclos (FEPIS, 2011).

Negativas: cuando los valores se encuentran por debajo del umbral de referencia o que no están presentes en el rango de aceptación (FEPIS, 2011).

2.7 Diseño estadístico

2.7.1 Cálculos estadísticos

2.7.1.1 Prevalencia

Sucesivamente a la aplicación de la *Real Time (TaqMan®) RT-PCR*, se procedió a calcular la prevalencia de norovirus, expresado en porcentaje, en la población de estudio, utilizando la siguiente formula:

$$P = \frac{\text{número total de casos positivos para norovirus}}{\text{número total de infantes}} \times 100$$

(Varela y Rial, 2008)

2.7.1.2 Análisis de potenciales factores de riesgo

2.7.1.2.1 Test para la igualdad de proporciones poblacionales

Inicialmente se realizó un análisis descriptivo de las variables de nivel socioeconómico del hogar y medio ambiente donde se desarrolla el niño. Con el fin de evaluar posibles diferencias estadísticas entre las variables se llevó a cabo el test de igualdad de proporciones poblacionales (z), descrito a continuación:

$$z = \frac{|p_2 - p_1|}{\sqrt{\frac{p_1 q_1}{N_1} + \frac{p_2 q_2}{N_{21}}}}$$

(Prieto & Herranz, 2010)

Donde:

$p_{\#}$ = proporción de positivos

$q_{\#}$ = proporción de negativos

$N_{\#}$ = número de la muestra

Intervalo de confianza al 95%, para proporciones poblacionales

$$IC_{95\%}(\pi_2 - \pi_1) = (p_2 - p_1) \pm z \sqrt{\frac{p_1 q_1}{N_1} + \frac{p_2 q_2}{N_2}}$$

(Prieto & Herranz, 2010)

Donde:

$z = 1.96$ al 95%

$p_{\#}$ = proporción de positivos

$q_{\#}$ = proporción de negativos

$N_{\#}$ = número de la muestra

2.7.1.2.2 Chi-cuadrado (χ^2)

Para conocer las relaciones entre la presencia de norovirus y los diferentes indicadores se realizaron *tests de Chi-cuadrado* (χ^2).

$$x_{obs}^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(n_i - f_i)^2}{f_i}$$

(Díaz, 2006)

Donde:

n_i = frecuencia observada

f_i = frecuencia esperada

k = categoría

2.7.1.2.3 Odds ratio (OR)

Las asociaciones obtenidas en el análisis anterior fueron cuantificadas utilizando razones de prevalencia (*Odds ratio*) en un análisis bivariado y multivariado de regresión logística, a través del método *Backward* que permitió la selección del mejor modelo estadístico.

$$OR = \frac{\text{Posibilidad de que un niño expuesto presente la enfermedad}}{\text{Posibilidad de que un niño no expuesto presente la enfermedad}} = \frac{ad}{bc}$$

(Taucher, 1997)

Si la exposición no se relaciona con la enfermedad, el *Odds ratio* será igual a 1; si se relaciona positivamente, será mayor a 1 y si se relaciona negativamente, será menor a 1 (Gordis, 2005).

Intervalo de confianza al 95% del Odds ratio (IC_{95%})

$$\ln(\text{límite inferior}) = \ln(OR) \pm z * DS[\ln(OR)]$$

(Taucher, 1997)

Donde:

DS = desviación estándar

OR = Odds ratio

z = 1.96

Cabe destacar que tanto para los análisis bivariados como multivariados, se consideró como asociaciones significantes aquellas que presentaban valores de $p < 0.100$ con un intervalo de confianza del 95%. La descripción conceptual de cada una de las herramientas estadísticas empleadas en la presente investigación se describe en el *anexo C*.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Descripción general de la muestra

El presente estudio partió de un total de 244 niños menores de 5 años de edad, que presentaron episodios esporádicos de diarrea aguda en el cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas – Ecuador.

El 76.6% (187/244) de los casos tuvieron lugar durante la temporada seca, comprendida entre los meses de julio a diciembre, mientras que el 23.4% (57/244) restante ocurrieron en la estación lluviosa, de enero a junio.

3.2 Resultados del análisis coproparasitológico

En cuanto a la identificación parasitológica se encontró que 36 de los 244 niños fueron positivos en al menos uno de los estudios coproparasitológico realizados, identificándose algún tipo de parásito intestinal. En la *figura 3.1* se resume la distribución porcentual de los diferentes protozoarios y helmintos intestinales observados empleando las técnicas descritas en el *capítulo II*.

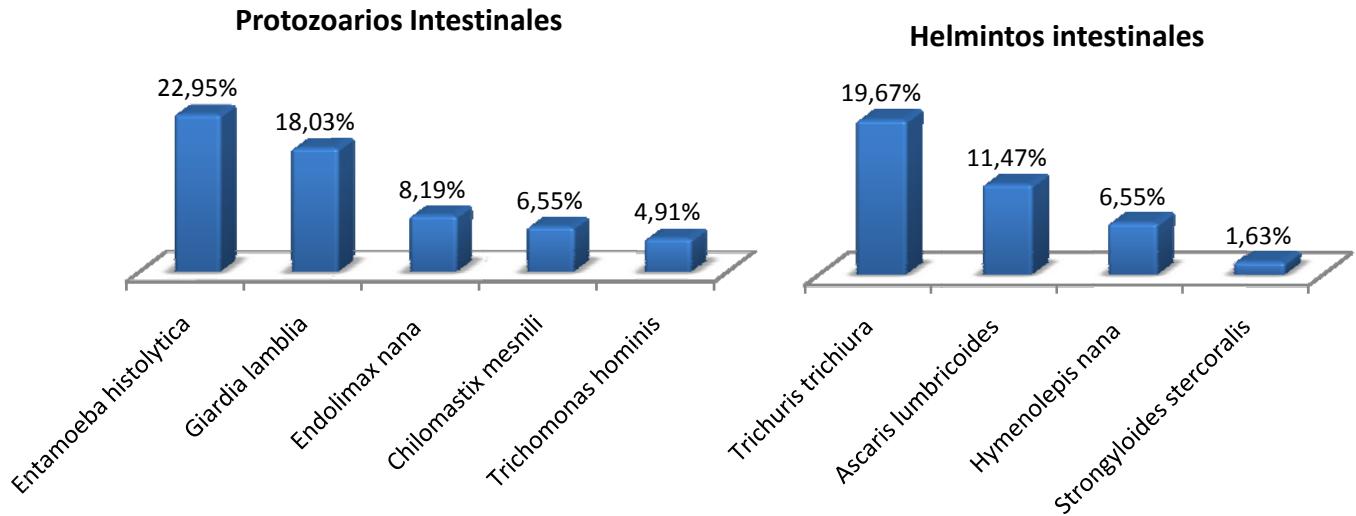


Figura 3.1 Distribución porcentual de los diferentes parásitos intestinales observados mediante análisis coproparasitoscópico.

3.3 Resultados del análisis molecular

La utilización de *Real Time (TaqMan®) RT-PCR* para detectar y genotipificar norovirus *GI/GII* (*Figura 3.2; Figura 3.3*) permitió identificar 72 muestras positivas para norovirus, de las cual 53 correspondieron al *Genotipo II*, 12 al *Genotipo I* y 7 hacen referencia a una infección simultanea o mixta entre el *Genotipo I y II*.

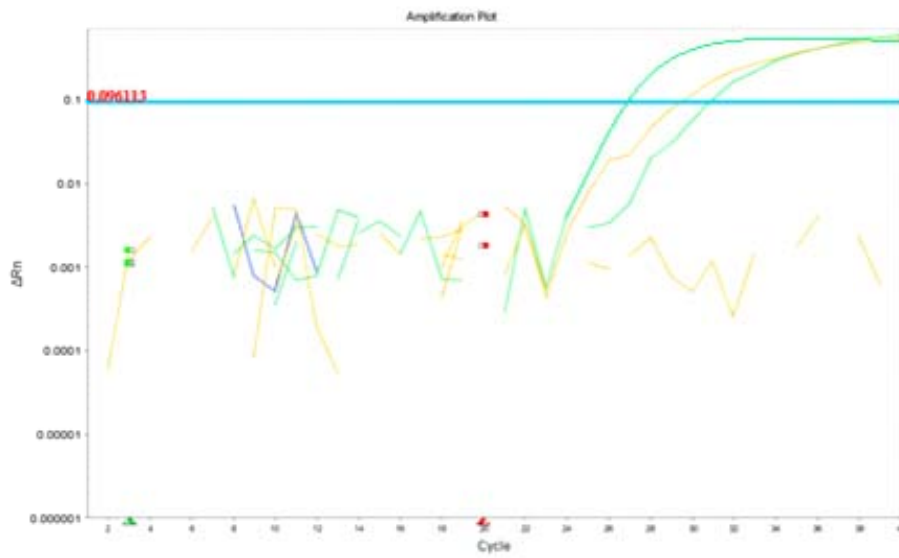


Figura 3.2 Amplificación de *RNA viral* para norovirus *GI*: curva VTCs (de color verde) y muestras de ensayo, utilizando la técnica de *Real Time (TaqMan®) RT-PCR*.

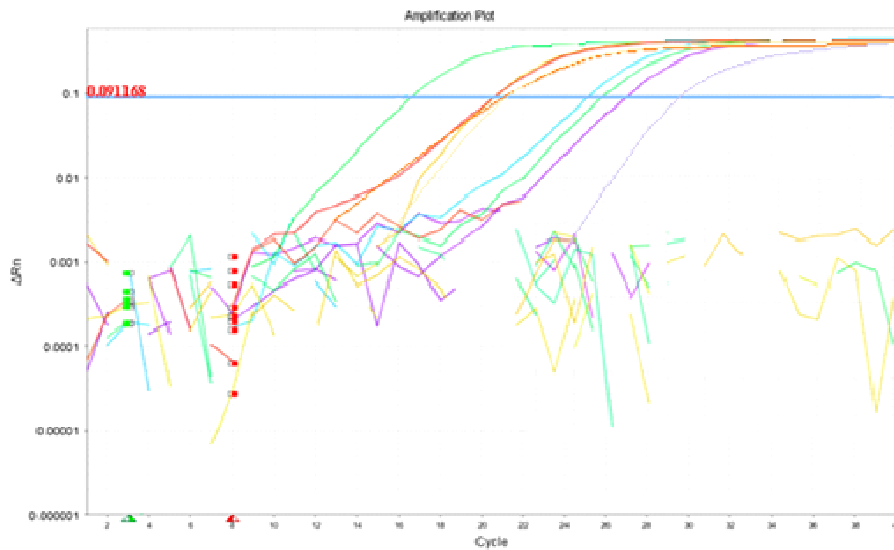


Figura 3.3 Amplificación de *RNA viral* para norovirus *GI*: curva VTCs (de color verde) y muestras de ensayo, utilizando la técnica de *Real Time (TaqMan®) RT-PCR*.

Basado en estos resultados se determinó que la prevalencia de norovirus en niños menores de cinco años, del cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas fue del 29,5% (72/244) distribuido como se indica en la *figura 3.4*.

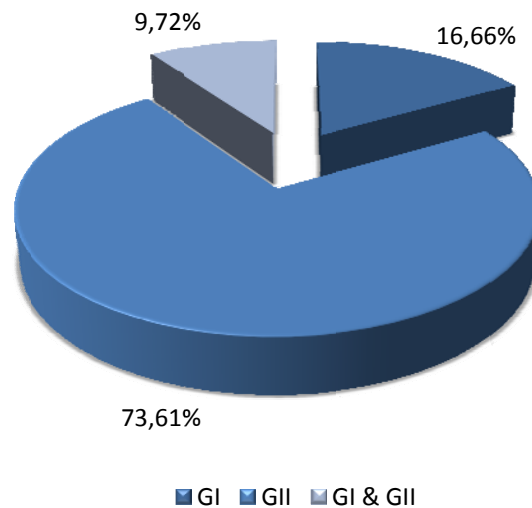


Figura 3.4 Distribución porcentual de los genotipos de norovirus observados en la población en estudio.

3.4 Análisis de potenciales factores de riesgo asociados a la expresión del potencial patogénico de norovirus

Con la finalidad de determinar las variables que representen posibles factores de riesgo asociados con la expresión del potencial patogénico de norovirus, se realizó la prueba de *Chi-cuadrado* (χ^2) en primera instancia. Posteriormente se determinó el *Odd ratio* (OR) en un análisis bivariado, seguido de un multivariado de las covariables representativas, empleando el paquete estadístico *InfoStat*.

3.4.1 Distribución estacional de la infección por norovirus *GI/GII*

La distribución estacional de los casos de norovirus a lo largo del año no presentó ningún patrón estacional significativo ($P = 0.786$), reportándose casos durante todo el año con una frecuencia similar tanto en la estación seca (junio a diciembre), como en la época lluviosa (enero a mayo) del 29,9% (56/187) y del 28,1% (16/57) [IC_{95%}: 0,473 – 1,761] respectivamente.

3.4.2 Edad de la población

La edad de la población se analizó en dos grupos: lactantes, menores de un año edad ($\bar{x} = 8$ meses) e infantes comprendidos entre los 13 y 60 meses ($\bar{x} = 24$ meses) observándose una prevalencia ligeramente superior en el primer grupo 31,30% (50/160), en relación con el 26,19% (22/84) del segundo. No se evidencio una diferencia estadística significativa entre los grupos de edad ($P = 0,410$) [IC_{95%}: 0,709 – 2,311].

3.4.3 Nivel socio-económico, condiciones sanitarias y presencia de animales domésticos en el entorno

Con la finalidad de evaluar el comportamiento simultáneo de las variables estadísticamente significativas ($P < 0.100$) involucradas con la presencia de norovirus *GI/GII*, se analizó un

modelo multivariado de regresión logística, ajustado a la edad de la población, con ayuda del programa estadístico *InfoStat*.

Al igual que en los casos anteriores, se realizó la asociación de las variables del entorno socio-económico, sanitario y medioambiental de la población en estudio con la finalidad de encontrar posibles factores determinantes en la presencia de norovirus. A continuación se puntualizan las variables estadísticamente relevantes para el presente estudio (*tabla 3.1*).

Tabla 3.1 Modelo estadístico multivariado, regresión logística, del comportamiento de los potenciales factores determinantes de la expresión patogénica de norovirus.

Variables		Sig.	Exp(B)	95% C.I. for Exp(B)	
				Lower	Upper
Edad	> 1 año	0,511	0,809	0,430	1,523
Material de construcción de la vivienda	Cemento/bloque/ladrillo	0,044	2,082	1,020	4,250
# de electrodomésticos	3 a 4	0,092	1,727	0,915	3,257
Fuente de agua	Entubada	0,087	1,700	0,926	3,120
Presencia de animales domésticos	Perro dentro de la vivienda	0,007	0,265	0,101	0,695
	Caballo alrededor de la vivienda	0,075	2,936	0,897	9,615

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

En la actualidad, las enfermedades diarreicas agudas son la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años a nivel mundial (OMS, 2009). La etiología de muchos de estos procesos, especialmente los que se dan como casos esporádicos, no se llega a conocer, debido principalmente a que la sintomatología clínica asociada con enfermedades enterogástricas provocadas por virus entéricos no son lo suficientemente específicas (Gallimore, *et al.*, 2004). Sin mencionar la carencia de adecuadas metodologías y tecnologías de diagnóstico en el laboratorio de rutina, capaces de incluir a todos los posibles agentes causales (Glass, *et al.*, 2000).

Dentro de los agentes causales de EDA los virus juegan un papel importante (Blacklow & Greenberg, 1991). Sin embargo en nuestro medio, los estudios sobre los diversos agentes virales que provocan gastroenteritis aguda son limitados, escasos o inexistentes. Los datos que existen a nivel mundial son sobre todo de rotavirus, dejando de lado otros enterovirus como: adenovirus, astrovirus y calicivirus humanos, que en la actualidad reportan un considerable aumento en su incidencia (CDC, 2006).

El presente estudio trata de dar a conocer el impacto del norovirus *GI/GII* en niños menores de cinco años de edad, del cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas, basado en la determinación de la prevalencia del virus. La técnica de *Real Time (TaqMan®) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* permitió amplificar un fragmento muy conservado de 84 pb (GI) y 97 pb (GII), localizado en el sitio de cruce entre *ORF1* y *ORF2* del genoma del virus (Trujillo, *et al.*, 2006). Complementariamente, se identificó la presencia de parásitos intestinales en la población. Los casos positivos para norovirus se analizaron en detalle para establecer potenciales factores de riesgo involucrados con la expresión patogénica del virus durante la infancia.

3.1 Etiología del síndrome diarreico agudo

3.1.1 Parasitología de la gastroenteritis aguda

Durante el período de tiempo comprendido entre junio del 2009 y octubre del 2010, en el cantón Quinindé, 244 niños menores de cinco años de edad, que forman parte del programa “*Cohorte de Nacimiento*” a cargo de la *Fundación ecuatoriana para investigación en salud*, presentaron un cuadro clínico esporádico característico de EDA.

Las muestras de heces recolectadas a partir de cada uno de los pacientes, fueron analizadas a través de un estudio coproparasitoscópico, determinándose que el 14,75% (36/244) del total de la población infantil en estudio presentó algún tipo de parásito intestinal. Este valor difiere de los encontrados por Sackey & Weigel (2001) quienes reportan una prevalencia de casi el 90% de parásitos intestinales. Otros estudios llevados a cabo en las cercanías de las zonas subtropicales del país, informaron una prevalencia de infecciones intestinales de origen parasitario del 92 - 95% (Weigel, *et al.*, 1992; Weigel & Armijos, 1995). Similar a lo que se ha observado para otros grupos tropicales que viven en la región Amazónica (Benefice & Barral, 1991; Sebastian and Santi, 2000) y la costa del Pacífico (Weigel & Castro, 2000).

Estudios más recientes reportan prevalencias de parásitos intestinales ligeramente inferiores, que varían entre 58,4% (Bosh, 2007) hasta el 61% (Gutiérrez, *et al.*, 2007). La disminución de la frecuencia de parasitosis en infantes puede atribuirse en parte, a la implantación de masivas campañas de prevención (administración de *albendazol* en forma sistemática a todos los niños mayores de 2 años, sin previa determinación de infección parasitaria), a cargo del *Ministerio de Salud Pública del Ecuador* en los últimos años (Bosh, 2007); y/o a la protección de la leche materna reportada en niños lactantes. Se piensa que lo más probable es que el bajo valor encontrado en este estudio es consecuencia de la edad de la población analizada. El 65,5% de los niños que formaron parte de la presente investigación fueron menores de un año de edad y representaron únicamente el 16,67% (6/36) del total de los casos positivos de parasitosis reportados vs el 83,33% (30/36) que corresponde a infantes mayores de un año (hasta cinco años). Estudios realizados por el *Instituto Nacional de Salud de Colombia*, sostienen que a la lactancia materna se le atribuyen efectos anti-infecciosos, por tal motivo se relaciona directamente su consumo con la disminución de la proporción de parasitismo intestinal (Alvarado y Vasquez,

2006). Otro hallazgo importante es la observación de un aumento significativo de la frecuencia de parásitos intestinales patógenos con la edad, correspondiente con el patrón del destete (Alvarado, *et al.*, 2005). Otros autores, aseguran que los anticuerpos maternos protegen de las infecciones parasitarias a los niños durante los primeros 12 meses de vida, mientras la exposición del niño a las condiciones exteriores sea limitado (Walterspiel, *et al.*, 1994). Así, un estudio transversal llevado a cabo en Brasil demostró que los niños menores de 2 años destetados presentaron más enteroparásitos que los niños que recibían leche materna (Costa, 2000).

De los resultados anteriores se evidenció un predominio de protozoarios intestinales con un 60,65% (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas hominis*, *Chilomastix mesnili* e *Endolimax nana*), sobre helmintos intestinales que alcanzaron el 39,34% (*Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis* e *Hymenolepis nana*). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Montero (s/a), que reporta una frecuencia de protozoarios del 94,1% vs 5,9% para helmintos, atribuyendo dichos resultados a la eficacia del *albendazol*, cuyo efecto tiene lugar principalmente sobre los helmintos intestinales (Vázquez, *et al.*, 1990).

3.1.2 Norovirus, como agente causal de EDA

La herramienta molecular utilizada para la detección y diferenciaion entre genotipos de norovirus fuea la *RT-PCR* (*Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) con sondas *TaqMan*®. A la fecha esta técnica es considerada como “*gold standard*” gracias a su alta sensibilidad y especificidad (Gunson & Carman, 2005).

La utilización de *Real Time* (*TaqMan*®) *RT-PCR* para detectar y genotipificar norovirus *GI/GII*, permitió determinar una prevalencia del virus de 29,5% (72/244) en niños menores de cinco años de edad. Esta cifra se encuentra entre los rangos de prevalencia reportados en otros países de Suramérica, como: Brasil del 14.5% (Soares, *et al.*, 2007), Venezuela con el 16,76% (Martínez, *et al.*, 2006), Chile del 17,4% (Berrios-Etchegaray, *et al.*, 2010), Argentina con el 24% (Gomes, Stupka, Gómez y Parra, 2007), Perú del 29,5% (Salazar, Méndez y Alcántara, 2007) y Colombia del 32% (Peláez, 2004). Es muy probable que las diferencias entre países sean,

al menos en parte, debidas a limitaciones en la notificación e investigación de los casos esporádicos en cuanto a la etiología vírica o a la sensibilidad de la técnica empleada, aunque en países limítrofes al nuestro la prevalencia es similar.

La alta prevalencia determinada en este estudio, sumada a la extraordinaria capacidad infectiva, variabilidad genética y estabilidad que presenta el virus en el ambiente, evidencia que en la actualidad los norovirus juegan un papel relevante como agente etiológico de diarreas agudas en niños menores de cinco años de edad en la población del noroccidental del país.

3.1.2.1 Distribución de los genotipos de norovirus en la población de estudio

El genotipo de norovirus predominante fue el *GII*, siendo responsable del 73,61% (53/72) del total de los casos positivos estudiados en esta investigación. También se detectaron cepas pertenecientes al *Genotipo I* con una frecuencia del 16,66% (12/72) y una infección mixta entre el *Genotipo I y II* del 9,72% (7/72). Estos resultados concuerdan con estudios realizados durante los últimos años tanto en países europeos como americanos (Estados Unidos, Brasil y Argentina), donde la mayoría de reportes de norovirus pertenecen a los *genogrupos I y II*, siendo el *GII* el más frecuente (Sánchez-Fauquier, *et al.*, 2007). Los norovirus del *GII*, como ya se ha demostrado para *GII-4*, contienen en una porción del gen de la cápside, específicamente en la secuencia del subdominio *P2*, información que le permite reordenar la superficie viral, alterando de esta forma la capacidad de unión con el receptor y las propiedades antigénicas de acuerdo a las necesidades medioambientales, proporcionando gran estabilidad y permitiéndole mantenerse en circulación entre la población (Lindesmith, *et al.*, 2008).

Además, la alta prevalencia del *GII* en la población se debe probablemente a la ausencia de inmunidad protectora, especialmente en la comunidad susceptible, provocando nuevos casos y brotes de gastroenteritis aguda (Gutierrez *et al.*, 2003).

3.2 Distribución estacional de la infección por norovirus GI/GII

Como ya se ha comentado en el apartado de patogenia y virulencia, el tema de la estacionalidad de las infecciones por norovirus es un tópico debatido.

En el presente estudio, debido a razones logísticas, el 76,6% del total de los casos analizados tuvieron lugar durante la temporada seca y solo el 23,4% ocurrieron en la estación lluviosa. Pese a esto, la prevalencia del virus no presentó ninguna diferencia estadística significativa entre las dos estaciones [$p > 0.100$]. Coincidiendo con trabajos como los de Fankhauser y colaboradores (2002), quienes sostienen que no existe ningún patrón estacional, en cuanto a lo relacionado con las infecciones entéricas provocadas por norovirus.

Otros autores, sin embargo advierten una frecuencia mayor durante los meses de invierno en sitios con climas templados (Treanor & Dolin, 2005). Así, estudios realizados en Brasil, Argentina y Paraguay advierten un pico de incidencia de la infección por norovirus durante los meses más fríos y secos del año (Soares, *et al.*, 2007). Sin embargo, en la mayoría de los estados de la región norte de Brasil, con clima tropical, no se observó un patrón estacional definido (Soares, *et al.*, 2007). El cantón Quinindé se caracteriza por un clima húmedo tropical lluvioso con una temperatura media que varía entre los 21 y 31°C a lo largo de todo el año, lo que hace suponer una situación similar a la observada en la región norte del Brasil. Aunque, seria necesario una vigilancia epidemiológica más prolongada en el tiempo para confirmarla.

3.3 Posibles factores de riesgo asociados a la expresión del potencial patogénico de norovirus

3.3.1 Edad

La prevalencia de norovirus tanto en lactantes, menores de un año, como en niños mayores, entre 13 y 60 meses, no presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo el análisis de *odds ratio* (OR) demostró que el riesgo de padecer gastroenteritis aguda causada por

norovirus en la lactancia se vio aumentado en 1,23 veces, con respecto al resto de la población. Este resultado es consistente con los datos de un estudio en niños hospitalizados en Pakistán, donde se propone que la disminución en la tasa de incidencia, después del año de edad, puede estar relacionada con el desarrollo de inmunidad protectora (Nguyen, *et al.*, 2007). Otros estudios, además sostienen que, en países desarrollados, se empiezan a detectar anticuerpos séricos a la edad de 3 - 4 años que podrían actuar como un mecanismo de protección natural contra infecciones provocadas por *calicivirus* (Makita, *et al.*, 2007).

3.3.2 Nivel socio-económico, condiciones sanitarias y presencia de animales domésticos en el entorno

Con respecto a las condiciones socio-económicas en las cuales se desarrollan los infantes, los análisis efectuados en este estudio permitieron determinar que las familias con acceso a un mayor número de electrodomésticos y una mejor calidad de la vivienda (cemento, ladrillo o bloque) incrementan el riesgo de padecer enfermedades diarreicas causadas por norovirus en 1,73 y 2 veces respectivamente, la interpretación de estos resultados no es simple ya que propone una paradoja interesante. Por lo común, el bajo nivel económico proporciona un escenario fértil para el surgimiento de agentes virales asociados a patologías gastrointestinales ya que desde el punto de vista ecológico, *“la enfermedad diarreica obedece a la interacción de un organismo patógeno con un huésped susceptible, en un ambiente que facilita la transmisión y la expresión de la patogenicidad del agente”* (OMS, 2009).

Debido a que hasta el momento no se ha reportado un vector confirmado responsable de la transmisión de las infecciones enterogástricas provocadas por norovirus. Las principales fuentes comunes relacionadas con la afección siguen siendo el consumo de agua o de algún tipo de alimento contaminado y el contacto directo con el virus (CDC, 2006).

Dentro del contexto sanitario, en el presente estudio, se observó que la disponibilidad de agua entubada (agua captada de fuentes naturales sin ninguna clase de tratamiento) como suministro de agua para la vivienda jugó un rol determinante en la patogenia del virus, ya que los

niños expuestos a este tipo de agua desarrollaron 1,70 veces más probabilidades de afectarse con norovirus. La implicación de brotes epidémicos de gastroenteritis aguda causada por norovirus de origen hídrico son reportados con menos frecuencia que los brotes de origen alimentario, del 2% al 20% del total de los casos (Blantun, *et al.*, 2006; CDC, 2006). Estudios preliminares hacen referencia que esta variedad de enterovirus incrementan su supervivencia en este tipo de aguas debido posiblemente a un efecto protector que encuentran cuando son adsorbidos por alguna clase las partículas solidad suspendidas (Bosch, Pinto & Abad, 2006).

Cabe mencionarse, que en el cantón Quinindé apenas desde el 2002 se llevan a cabo proyectos en la mejora de los servicios sanitarios, haciéndose habitual el uso de pozos de agua que en muchos de los casos componen la única red de suministro de agua. Los eventuales desbordamientos de ríos aledaños, posibles filtraciones de aguas residuales o cercanía de pozos sépticos en la red de suministro de agua, principalmente en la época de invierno, y la escasas de controles sanitarios eficientes hacen que la población se encuentre constantemente expuesta a potenciales infecciones enterogástricas provocadas por diversos patógenos entéricos. Por lo tanto se hace urgente la implementación de metodologías analíticas y microbiológicas que permitan vigilar, controlar y garantizar la calidad del agua de consumo.

Además, el presente estudio reveló que la exposición o contacto del menor con animales domésticos fue importante en la manifestación de la infección por norovirus. Por un lado la exposición con caballos elevo 3 veces la posibilidad de infectarse con norovirus; mientras que por otro el análisis estadístico demostró que la presencia de perros en la vivienda, cumplió un papel protector, dicho en otras palabras la usencia de un can en la morada donde se desarrolla el niño incrementa cerca de 4 veces el riesgo de sufrir una infección gastrointestinal a causa de norovirus

Esta influencia negativa también se la pudo observar en un estudio llevado a cabo por Peasey y colaboradores (2004), en el cual se identificó que el cuidado de ganado es asociado con mayores probabilidades de adquirir norovirus, lo que sugiere que el contacto con cualquier tipo de ganado, incluido equino, desempeña un rol primario en la transmisión de norovirus.

En contraste, en un estudio de seroepidemiología y factores de riesgo para la cepa *norovirus/México*, se manifiesta que la presencia de un perro cerca o dentro de la casa es un factor de riesgo involucrado con la expresión patogénica del virus, especialmente en niños de 1 a 4 años de edad (Peasey, *et al.*, 2004).

Por su parte, un estudio basado en la evidencia serológica sugirió que un tipo específico de *calicivirus* aislado en uno de los casos analizados pudo ser capaz de infectar tanto a seres humanos, como a perros (Humphrey, Cruickshank & Cubitt, 1984). Sin embargo, ensayos de secuenciación molecular de *calicivirus caninos* distinguen motivos de aminoácidos en los genes de la polimerasa y la cápside claramente distintos a los de *calicivirus humanos*. Hasta el momento, ningún aislamiento de *calicivirus canino* en humano ha sido reportado (Hashimoto, Roerink, Tohya & Mochizuki, 1999).

Si bien, en la actualidad no hay estudios que demuestran la transmisión de enfermedades zoonóticas de los *calicivirus*, autores como Van Der Poel y colaboradores (2000; 2003) han llegado a plantear la posibilidad de la existencia de un reservorio zoonótico de los *calicivirus humanos*, pero es necesario profundizar en el tema.

No se debe descartar el hecho de que existen otras razones, que si bien no están directamente involucradas con la expresión de la infección pueden ayudar a su surgimiento, como son: condiciones sanitarias precarias, pobres hábitos higiénicos, escasas de ventilación o posibles fluctuaciones de temperatura y/o humedad en el interior de la vivienda, ya que se ha observado que rangos de humedad relativa superiores a 40 – 70% favorecen al desarrollo de un ambiente insalubre (Martínez, Sarmiento y Urquieta, 2005).

Es necesario referir que la presente investigación es un estudio descriptivo. Además, el tamaño de la muestra y los sesgos de clasificación pudieron ser insuficientes para explicar certeramente algunas asociaciones. Por lo tanto se reconoce la necesidad de llevar a cabo estudios adicionales para investigar la contribución real de las condiciones socio-económicas y el riesgo de contraer enfermedades diarreicas provocadas por norovirus durante la infancia.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

La prevalencia de parásitos intestinales en niños menores de cinco años de edad del cantón Quinindé fue del 14,75%, de los cuales el 60,65% correspondió a protozoarios intestinales y el 39,34% a helmintos intestinales.

El uso de la *Real Time (TaqMan®) RT-PCR* permitió estimar una prevalencia del 29,5% para el síndrome diarreico agudo causado por norovirus *GI/GII*, en niños menores de cinco años de edad del noroccidente del país.

El genotipo de norovirus predominante fue el *GII*, siendo responsable del 73,61% del total de los casos positivos, seguidas por el *Genotipo I* con el 16,66% y el 9,72% restante se atribuyó a una infección mixta entre el *Genotipo I* y *II*.

No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en el patrón estacional de la infección por norovirus, distribuyéndose de forma uniforme a lo largo de todo el año.

Con respecto a la edad de la población se determinó que en la lactancia, el riesgo de padecer gastroenteritis aguda causada por norovirus se vio aumentado 1,23 veces.

Entre los potenciales factores de riesgo relacionados con las condiciones socio-económicas del hogar se determinó que el acceso a una mejor calidad de vida incrementó el riesgo de padecer enfermedades diarreicas causadas por norovirus.

La presencia de canes en el interior de la vivienda cumple un papel protector, mientras que la exposición o contacto de los menores con equinos eleva 3 veces la posibilidad de afectarse con norovirus.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

Debido a la alta prevalencia de norovirus encontrada en niños menores de cinco años de edad del noroccidente del país, se invita al ministerio de salud pública del Ecuador a profundizar el tema del impacto de los norovirus en la población infantil y los factores de riesgo involucrados con la afección que estos provocan, ampliando el presente estudio a escala nacional, con el fin de determinar la real prevalencia de norovirus en nuestro país.

Es prudente un análisis de secuenciación molecular de las diferentes cepas de norovirus *GI* y *GII* identificados mediante *Real Time (TaqMan®) RT-PCR*, con el fin de homologar y comparar mediante un análisis filogenético las cepas circulantes en el Ecuador con las especies reportadas en la región y el mundo.

Además, es necesario incluir en el presente, un análisis de norovirus en animales, así a través de una comparación de los patrones de similitud entre cepas de origen humano y cepas de origen animal, poder ayudar a esclarecer la posibilidad de un reservorio de *calicivirus humanos* en animales e incluso una potencial transmisión zoonótica.

Es necesario evaluar la calidad del agua que es suministrada y consumida por la población del cantón Quinindé, a través de estudios que permitan identificar la presencia de patógenos entéricos, incluyendo virus.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

Adler, J., & Zickl, R. (1969). Winter vomiting disease. J Infect Dis., 119, 668-73.

Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria [ACSA]. (2011). Riesgos emergentes. Extraído el 11 de diciembre, 2011, del sitio web: http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3226/acsabrief_2011_11_norovirus_es.pdf

Agus, S., Dolin, R., Wyatt, R., Tousimis, A., & Northrup, R. (1973). Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. Ann Intern Med., 79(1), 18-25.

Alvarado, E. y Vásquez, L. (2006). Determinantes sociales, prácticas de alimentación y consecuencias nutricionales del parasitismo intestinal en niños de 7 a 18 meses de edad en Guapi, Cauca. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Biomedica., 26, 001.

Alvarado, E. (2005). Épidémiologie de la croissance infantile: étude de déterminants sociaux et biologiques auprès d'enfants âges de 6 à 18 mois en Colombie. En Médecine sociale ET préventive. Montréal, QC: Université de Montréal.

Anderson, A., Heryford, A., Sarisky, J., Higgins, C., Monroe, S., & Beard, R. (2001). A waterborne outbreak of Norwalk-like virus among snowmobilers Wyoming. J Infect Dis., 187, 303-6.

Ando, T., Noel, J. & Fankhauser, R. (2000). Genetic classification of "Norwalk-like viruses. J Infect Dis., 181 Suppl 2:S336-S348.

Arnedo, P., González, F., Bellido, J., Marti, J., Safont, L., y Calvo, C. (1991). Brote de toxiinfección alimentaria de probable etiología vírica por virus Norwalk. Gac Sanit., 5(25), 169-73.

Berrios-Etcheagaray, P. (2010). Detección de Norovirus genogrupo I y II en el Instituto de Salud Pública de Chile. Instituto de Salud Pública de Chile. Extraído el 15 de noviembre, 2011, del sitio web: <http://virusberriostecheagaray.blogspot.com/2011/11/norovirus-en-chile-isp-2010.html>

Bertolotti, A., Crawford, S., Hutson, A., & Estes M. (2003). The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral cápside protein VP1: a novel function for the VP2 protein. J Virol., 77(21), 11603-15.

Blacklow, N. & Greenberg, H. (1991). Viral gastroenteritis. N Engl J Med., 325(4):252-64.

Blanton, L., Adams, S., Beard, R., Wei, G., Bulens, S., & Widdowson, M. (2006). Molecular and epidemiologic trends of calicivirus associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. J Infect Dis., 193,413-21.

Bosch, A. Pinto, R. & Abad, F. (2006). Survival and transport of enteric viruses in the environment. En: Goyal SM, editor. *Viruses in Food*. New York, Springer. p. 151-87.

Burroughs, J. & Brown, F. (1978) Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. J. Gen Virol., 41, 443–446.

Cannon, O., Poliner, J., & Hirschhorn, R. (1991). A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. J Infect Dis., 164(5), 860-3.

Carlsson, B., Kindberg, E., Buesa, J., Rydell, G., Lidon, F., & Montava, R. (2009). The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 Norovirus infection. PLoS ONE, 4(e), 5593.

Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2001). “Norwalk-like viruses:” Public health consequences and outbreak management. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 50 (No. RR-9), 1-18. Extraído el 7 de diciembre, 2011, del sitio web: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5009a1.htm>.

Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2002). Surveillance for waterborne disease outbreaks – United States, 1999-2000. MMWR, 51(SS-8), 1-47.

Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2002). Outbreak of acute gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses among British military personnel—Afghanistan. MMWR, 51(22), 477-9.

Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2006). Norovirus in Healthcare Facilities - Fact Sheet. Extraído el 2 de noviembre, 2011, del sitio web: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/id_norovirusFS.html.

Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2006). Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water – United States, 2003-2004 and Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water – United States, 2003-2004. MMWR, 55(SS-12), 1-48.

Clark, B., & McKendrick, M. (2004). A review of viral gastroenteritis. Curr Opin Infect Dis, 17, 461-9.

Costa, M. & Rey, L. (2000), Maternal and child intestinal parasitism and breast-feeding. Rev Soc Bras Med Tro, 33, 371-5.

Deirdre, A. (2008). Norovirus immunobiology and vaccine design. University of North Carolina at Chapel Hill. Department of Microbiology and Immunology.

Díaz, V. (2006). Metodología de la investigación científica y bioestadística: para médicos, odontólogos y estudiantes de ciencias de la salud. RIL Editores.

Dolin, R., Levy, A., Wyatt, R., Thornhill, T., & Gardner, J. (1975). Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response. Am J Med., 59(6):761-8.

Dominguez, A., Torner, N., Ruiz, L., *et al.* (2008). A etiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004-2005.

Donaldson, E., Lindesmith, L., Lobue, A., & Baric, R. (2008). Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. Immunol Rev., 225,190-211.

Dormitzer, P. (2005). Rotavirus. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editores. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6ª ed. Philadelphia, Elsevier.

Duizer, E., Schwab, K., Neill, F., Atmar, R., Koopmans, M., & Estes, M. (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. J Gen Virol., 85(Pt 1), 79-87.

Evans, M., Meldrum, R., Lane, W., *et al.* (2002). An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall. Epidemiol Infect., 129(2):355-60.

Fankhauser, R., Monroe, S., Noel, J. (2002). Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. J Infect Dis., 186(1), 1-7.

Fretz, R., Svodova, P., Lüthi, T., Tanner, M., & Baumgartner A. (2005). Outbreaks of gastroenteritis due to infections with Norovirus in Switzerland, 2001-2003. Epidemiol Infect., 133, 429-437.

Gallimore, C., Cubitt, D., du Plessis, N. & Gray, J. (2004). Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. J Clin Microbiol., 42(5):2271-4.

García, C., DuPont, H., Long, K., Santos, J., & Ko, G. (2006). Asymptomatic Norovirus infection in Mexican children. J Clin Microbiol., 44, 2997-3000.

Glass, R., Noel, J., Ando, T., Fankhauser, R., Belliot, G., Mounts, A., Parashar, U., & Bresse J. (2000). The epidemiology of enteric Caliciviruses from Humans: A reassessment Using New Diagnostics. The Journal Infections Disease, 181, 264-61

Glass, R., Parashar, U. & Estes, M. (2009). Norovirus Gastroenteritis. N Engl J Med., 361, 1776-1785. Extraído el 22 de noviembre, 2011, del sitio web: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra0804575>

Godoy, P., Torres, J., Guix, S., Prat, A., Alsedà, M., y Domínguez, A. (2000). Toxiinfección alimentaria por ostras causada por virus “Norwalk-like”. Med Clin (Barc.), 114(20), 765-768.

Godoy, P., Izcara, J., Bartolomé, R., Bach, P., Escobar, A., y Pal, M. (2005). Toxiinfección alimentaria por Norovirus debida al consumo de bocadillos. Med Clin (Barc.), 124,161-164.

Godoy, P., Nuin, C., Alsedà, M., Llovet, T., Mazana, R., y Domínguez, A. (2006). Brote de gastroenteritis por Norovirus causado por el consumo de agua de suministro público. Rev Clin Esp., 206, 435-7.

Gomes, K., Stupka, J., Gomez, J., & Parra, G. (2007). Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. J Med Virol., 79(11), 1703-9.

Green, K., Belliot, G., Taylor, J., Valdesuso, J., Lew, J., & Kapikian, A. (2002). A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland Nursing Homes for the elderly. J Infect Dis., 185, 133-46.

Grupo de Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico de Norovirus. (2004). Brotes de gastroenteritis por norovirus en España 1999-2002. Boletín Epidemiológico Semanal (BES)., 12:1-4.

Grupo de Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico de Norovirus. (2005). Brotes de gastroenteritis por norovirus en España, 2003. Boletín Epidemiológico Semanal (BES)., 13:241-52.

Guerrant, R., Hughes, J., Lima, N. & Crane, J. (2003). Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. Rev Infect Dis, 12 Suppl 1:S41-S50.

Gunson, R., & Carman, W. (2005). Comparison of two real-time PCR methods for diagnosis of norovirus infection in outbreak and community settings. J Clin Microbiol., 43, 2030-1.

Gutierrez, L., Vazquez, M., Escobar, J., & Hernandez, J. (2003). PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. Biochem Biophys Res Commun, 311(3), 759-66.

Gutiérrez, C., Rojas, P. y Revollo, C. (2007). Prevalencia de Parasitosis intestinales en niños en edad escolar en los distritos 4, 5, y 6 del municipio de Tiquipaya – tercera sección provincia Quillacollo. Extraído el 22 de febrero, 2012, del sitio web:

http://www.univalle.edu/publicaciones/%20revista_%20salud/revista03/pagina%2004.htm

Guyader, F., Estes, M., & Hardy, M. (1996). Evaluation of a degenerated primer for the PCR detection of human caliciviruses. Arch Virol., 141, 2225–35.

Hardy, M. (2005). Norovirus protein structure and function. Montana State University, Bozeman. United States.

Hashimoto, M., Roerink, F., Tohya, Y. & Mochizuki, M. (1999). Genetic analysis of the RNA polymerase gene of caliciviruses from dogs and cats. J Vet Med Sci., 61, 603–8.

Humphrey, T., Cruickshank, J. & Cubitt, W., (1984). An outbreak of calicivirus associated gastroenteritis in an elderly persons home: a possible zoonosis? J. Hyg (Lond)., 93, 293–9.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2011). Extraído el 13 de septiembre, 2011, del sitio web: www.ictvonline.org/

Kapikian, A., Wyatt, R., Dolin, R., Thornhill, T., Kalica, A., & Chanock R. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infections nonbacterial gastroenteritis. J Virol., 10, 1075-81.

Kaplan, J., Gary, G., Baron, R., Singh, N., Schonberger, LB., & Feldman, R., (1982). Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. Ann Intern Med., 96, 756-61

Kaplan, J., Schonberger, L., Varano, G., Jackman, N., Bied, J., & Gary, G. (1982). An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home. Demonstration of person to person transmission by temporal clustering of cases. Am J Epidemiol., 116, 940-8.

Kass, P. & Rieman, H. (2006). Epidemiology of foodborne diseases. En: Rieman HP, Cliver DO, editores. Foodborne Infections and Intoxications. 3^a ed. San Diego, Academic Press.

Khamrin, P., Takanashi, S., Chan-It, W., Kobayashi, M., Nishimura, S., & Katsumata, N. (2009). Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. J Virol Methods, 157, 219-22.

Koopmans, M., von Bonsdorff, CH., Vinje, J., de Medici, D., & Monroe S. (2002). Foodborne viruses. FEMS Microbiol Rev., 26, 187-205

Kosek, M., Bern, C. & Guerrant, R. (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ, 81(3):197-204.

Kukkula, M., Maunula, L., Silvennoinen, E., & von Bonsdorff, CH. (1999). Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. J Infect Dis., 180, 1771-6.

Kuusi, M., Nuorti, J., Maunula, L., Tran Minh, N., Ratia, M., Karlsson, J., & Von Bonsdorff, C. (2002). A prolonged outbreak of Norwalk-like calicivirus (NLV) gastroenteritis in a rehabilitation centre due to environmental contamination. Epidemiol Infect., 129, 133-8.

Kuyumcu, M., Belliot, G., Sosnovtsev, S., Chang, K., Green, K., & Lloyd, R. (2004) Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)- binding protein. J. Virol., 78, 8172–8182.

Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., LePendu J., & Baric, R. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. Nature Medicine, 9, 548 – 553.

Lindesmith, L., Donaldson, E., LoBue, A., Cannon, J., Zheng, D., Vinje, J., *et al.* (2008). Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. PLoS Med., 5, 269-90.

Lochridge, V., Jutila, K., Graff, J., & Hardy M. (2005). Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. J Gen Virol., 86(Pt 10), 2799-806.

López M. (2001). Nutrición en algunas patologías digestivas: gastroenteritis aguda, estreñimiento, obesidad y nutrición en hipercolesterolemia. An Esp Pediatr., 55, 463-76.

Lopman, B., Adak, G., Reacher, M., & Brown D. (2003). Two epidemiologic patterns of Norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. Emerg infect Dis., 9, 71-77.

Lopman, B., Reacher, M., Gallimore, C., Adak, G., Gray, J. & Brown, D. (2003). A summertime peak of “winter vomiting disease”: surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. BMC Public Health., 3, 13.

Lopman, B., Reacher, M., Van Duynhoven, Y., Hanon, F., Brown, D., Koopmans, M. (2003). Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. Emerg Infect Dis., 9(1), 90-6.

Mandell, G., Bennett, J., & Dolin, R. (2005). Enfermedades infecciosas: principios y práctica. España: Elsevier.

Makita, K., Hayakawa, Y., Okame, M., *et al.* (2007). First detection of IgA against norovirus in breast milk. Clin Lab., 53(3-4), 125-8.

Marshall, J., Dimitriadis, A., & Wright, P. (2005). Molecular and epidemiological features of norovirus-associated gastroenteritis outbreaks in Victoria, Australia in 2001. J Med Virol., 75(2), 321-31.

Martínez, P., Sarmiento, P. & Urquieta W. (2005). Evaluación de la humedad por condensación dentro de las viviendas sociales. Extraído el 6 de marzo, 2012, del sitio web:

<http://www.scribd.com/doc/14750900/Evaluacion-de-la-Humedad-por-Condensacion-dentro-de-Viviendas-Sociales>

Martínez, C., Noel, S., Nirsén G., y Monzón A. (2006). Prevalencia de Norovirus en muestras de heces procedentes del laboratorio del Hospital José Gregorio Hernández. Catia, Caracas. Trabajo

Especial de Investigación. Laboratorio de Producción y Control de Calidad Corpodiagnóstica C.A. Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec., 9 (2), 43-52.

Martínez, L., Silva, N., García, N. y Monzón A. (2006). Prevalencia de Norovirus en muestras de heces procedentes del laboratorio del Hospital José Gregorio Hernández. Catia, Caracas. Acta Científica de la SVBE., 9(2).

Maunula L, Miettinen IT, von Bonsdorff CH. (2005). Norovirus outbreaks from drinking water. Emerg Infect Dis., 11, 1716-21.

Montero, N. (s/a). Prevalencia de parasitosis intestinal en niños de la escuela Carlos Montufar de la parroquia rural “*El Lucero*”, cantón Calvas – Loja, Ecuador. Escuela Superior Politécnica “*Servio Tulio Montero Ludeña*”.

Morrow, A., Ruiz, G., Altaye, M., Jiang, X., Guerrero, M. & Meinzen J. (2004). Human milk oligosaccharide blood group epitopes and innate immune protection against Campylobacter and calicivirus diarrhea in breastfed infants. Adv Exp Med Biol 554:443-6.

Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, *et al.* (2003). Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. J Virol., 77(24):13117-24.

Nature Reviews Microbiology. (2010). Phylogenetics of the norovirus capsid protein. Extraído el 10 de septiembre, 2011, del sitio web: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n3/fig_tab/nrmicro2296_F2.html#figure-title

Nguyen, T., Khamrin, P., Takanashi, S., Le Hoang, P., Pham le, D., Hoang, K., *et al.* (2007). Evaluation of immunochromatography tests for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. J Trop Pediatr., 53, 264-9.

Nilsson, M., Hedlund, K., Thorhagen, M., Larson, G., Johansen, K., & Ekspong, A. (2003). Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. J Virol., 77, 13117-24.

Okada, S., Sekine, S., Ando, T., *et al.* (1990). Antigenic of small, round, structured viruses by immune electron microscopy. J Clin Microbiol., 28, 1244-8.

Olivas, E., Manual de practicas de Microbiología I y II y Parasitología. México: UACJ.

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (1992). Métodos básicos de laboratorio en parasitología medica. España: Graficas Reunidas. Extraído el 20 de diciembre, 2011, del sitio web: http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544101_%28part1%29.pdf

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2004). Enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes. Región de las Américas. Vol. 2, No. 17— 29.

Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2010). Norovirus. . Extraído el 13 de noviembre, 2011, del sitio web: <http://www.who.int/topics/es/>

Pachón, I., Martínez, M., Suárez, B., Sánchez, A., Salmerón, F., Soler, M. y Gómez, M. (2006). Situación epidemiológica de las gastroenteritis producidas por virus.

Pang X, Lee B, Boroumand N, Leblanc B, Preiksaitis JK, Yu Ip CC. (2004). Increased detection of norovirus using a real time reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. J Med Virol., 72(3):496-501.

Parashar, U., Quiroz, E., Mounts, A., Monroe, S., Fankhauser, R., Ando, T., *et al.* (2001). “Norwalk-like viruses”. Public health consequences and outbreak management. MMWR Recomm Rep., 50, 1-17.

Parrino, T., Schreiber, D., Trier, J., Kapikian, A., & Blacklow, N. (1977). Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. N Engl J Med., 297, 86-9.

Peasey, A., Ruiz, G., Quigley, M., Newsholme, W., Martinez, J., Rosales, G., Jiang, X. & Blumenthal, U. (2004). Seroepidemiology and Risk Factors for Sporadic Norovirus/Mexico Strain. The Journal of Infectious Diseases., 189:2027–36.

Peláez, D. (2004). Enfermedad diarreica aguda (EDA) nuevos agentes virales. Montería, Colombia. Revista MVZ Córdoba. 9. 002.

Prasad, B., Hardy, M., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M., & Estes, M. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science. 286(5438), 287-90.

Prieto, L. y Herranz, I. (2010). Bioestadística sin dificultades matemáticas. España: Ediciones Díaz de Santos.

Ribes J., y Buesa J. (2010). Infecciones por norovirus. Enferm Infecc Microbiol Clin., 28(Supl 1), 51-55.

Rivera, Z., Acevedo, C., Casanova, I., Hernández, S. & Malaspina, A. (1996). Enteroparasitoses in school children from two educatives rurals unites of the municipality "la Cañada". Zulia State Venezuela. Kasmera 24:151-177.

Rockx, B., Vennema, H., Hoebe, C., Duizer, E. & Koopmans, M. (2005). Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. J Infect Dis., 191(5):749-54.

Sackey, M. & Weigel, M. (2001). Intestinal parasitic infection: prevalence, risk factors and consequences for child growth, iron status and development in rural Ecuador. Extraído el 13 de marzo, 2012, del sitio web de Virginia Polytechnic and State University. Department of Human

Nutrition, Food and Exercise: <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-08232001-195222/unrestricted/finaletd.pdf>

Sakai, Y., Nakata, S., Honma, S., Tatsumi, M., Numata-Kinoshita, K., & Chiba, S. (2001). Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J.*, *20*, 849-53.

Sánchez-Fauquier, A., Wilhelmi, I., Román, E., Colomina, J., Montero, V., & Negro, A. (2007). Surveillance of human calicivirus in Spain. *Emerg Infect Dis.*, *11*, 1327-9.

Schreiber, D., Blacklow, N., & Trier, J. (1973). The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med.*, *288*, 1318-23.

Sebastian, M. & Santiago, S. (2000). Control of intestinal helminths in schoolchildren in Low-Napo, Ecuador: impact of two-year chemotherapy program, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.*, *33*, 69-73.

Siebenga, J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R., *et al.* (2007). Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.*, *81*, 9932-41.

Soares, C., Santos, N., Suzanne, R., Albuquerque, A., Maranhão A., *et al.* (2007). Norovirus Detection and Genotyping for Children with Gastroenteritis, Brazil. *Emerging Infectious Disease Journal Volume.*, *13*(8).

Sociedad Argentina de Pediatría [SAP] (2003). *Gastroenteritis y su prevención.* Comité Nacional de Infectología. Argentina.

Sociedad Española de Epidemiología [SEE]. (2007). *Epidemiología de las Gastroenteritis Agudas Víricas. Aspectos Actuales.* España: EMISA.

Stoltzfus, R., Kvalsvig, J., Chwaya, H., Montresor, A., Albonico, M. & Tielsch, J. (2001). Effects of iron supplementation and anthelmintic treatment on motor and language development of preschool children in Zanzibar: double blind, placebo controlled study. BMJ; 323:1-8.

Tan, M., Huang, P., Meller, J., Zhong, W., Farkas, T., & Jiang, X. (2003). Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. J Virol., 77(23), 12562-71.

Thomas, T. & Lynch, E. (2007). Infectious diarrhea. En: Slaven E, Stone S, López F, editores. Infectious diseases. New York, McGraw-Hill.

Thornhill, T., Wyatt, R., Kalica, A., Dolin, R., Chanock, R., & Kapikian, A. (1977). Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. J Infect Dis., 135(1), 20-7.

Treanor, J. & Dolin, R. (2005). Noroviruses and other caliciviruses. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6^a ed. Philadelphia, Elsevier Churcill Livingstone 2194-201.

Tregan, L. (s/a). Norovirus: Traveler's Diarrhea and Much More. California Association for Medical Laboratory Technology [CAMLT]. University of San Francisco.

Trujillo, A., McCaustland, K., Zheng, D., Hadley, L., Vaughn, G., Adams, S., Ando, T., Glass, R., & Monroe, S. (2006). Use of TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR for Rapid Detection, Quantification, and Typing of Norovirus. National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta.

Turcios, R., Widdowson, M., Sulka, A., Mead, P., & Glass, R. (2006). Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. Clin Infect Dis., 42, 964-71.

Van der Poel, W., Vinje, J., Van der Heide, R., Herrera, M., Vivo, A., & Koopmans, M. (2000). Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. Emerg Infect Dis., 6(1), 36-41.

Van Der Poel, W., Van Der Heide, R., Verschoor, F., Gelderblom, H., Vinje, J. & Koopmans, M. (2003). Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. Vet Microbiol., 92, 297-309.

Varela, J. y Rial, A. (2008). Estadística práctica para la investigación en ciencias de la salud. Netbiblo.

Vásquez, F., Mendoza, S., Mendoza, A. y Murrieta, F. (1990). Eficacia del albendazol en la población infantil de una comunidad abierta. Invest. Med. Int., 16(4): 208-12.

Velasco, C. (2006). Enfermedades digestivas en niños. Colombia: Universidad del Valle.

Walterspiel, J. Morrow, A., Guerrero, M., Ruiz, G. & Pickering, L. (1994). Secretary anti-*Giardia lamblia* antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. Pediatrics; 93: 28-31.

Weigel, M., Armijos, R., Monaco, M., Izurieta, R., Raines, R., Zurita, C. & Jaramillo, G. (1992). Nutritional and health status of rural women colonists in the subtropical lowlands of northwest Ecuador. Ecology of Food and Nutrition. 29, 25-43.

Weigel, M. & Armijos, R. (1995). Rapid assessment of the El Corazon and Magdalena Alta Communities. Final Technical report to the Center for Tropical Rainforest Investigations, Quito, Ecuador, pp 1 -35.

Weigel, M. & Castro M. (2000). The food acquisition, dietary practices, and nutritional status of minority womwn of African descent in tropical South America. Ecology of Food and Nutrition 19, 1-33.