

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.

Johanna E. Guambo C.¹

¹Fundación Ecuatoriana para Investigación en Salud, barrio *Fundo Limón*, cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas-Ecuador. E-mail: (elizabeth.guambo@yahoo.com)

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'es 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.

Keywords.- norovirus, prevalence, *Real Time (TaqMan®) RT-PCR*.

INTRODUCCION

De acuerdo con la *Organización Mundial de la Salud* (2009), las enfermedades diarreicas agudas (EDA) se definen como: “el aumento en la frecuencia de deposiciones, líquidas o disminuidas en consistencia, generalmente en número mayor de tres en veinticuatro horas, dentro de un período inferior a tres semanas”.

Según la *Organización Panamericana de la Salud* las enfermedades diarreicas constituyen un problema de salud pública importante a nivel mundial. Especialmente en países en desarrollo, donde representan una importante causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años⁶. Se ha estimado que solo en África, Asia y América Latina cada año mueren alrededor de 3 a 5 millones de niños^{31;6}, como consecuencia de este síndrome.

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 mayoría están producidos por virus³⁵, seguidos por orden de frecuencia, por bacterias y parásitos intestinales.

Dentro de las de origen viral, actualmente se reconocen a los norovirus (*NVs*), anteriormente llamados Norwalk-like Virus (*NLV*), pertenecientes a la familia *Caliciviridae*, como los principales agentes virales asociados con gastroenteritis epidémica y esporádica no bacteriana en personas de todas las edades, teniendo especial consideración niños y ancianos, alrededor del mundo⁸.

Los *NVs* son virus pequeños, con un diámetro aproximado de 27 a 38 nm, no envueltos e icosaédricos. Su genoma está constituido por una única molécula de ARN de cadena simple y sentido positivo, de un tamaño aproximado de 7,5 kb, que contiene tres pautas abiertas de lectura u ORF (*open reading frames*) que codifican los genes no estructurales y estructurales¹.

En base a estudios de diversidad genética, se han descrito cinco genogrupos para *NV* con 29 genotipos o *clusters*³⁶. Las cepas que infectan a los seres humanos pertenecen a los genogrupos I, II y IV, mientras que a los genogrupos III y V pertenecen las cepas que infectan a los animales.

Los *NVs* son virus muy infecciosos y soportan condiciones ambientales

adversas. La vía de transmisión más frecuente es la ruta fecal-oral y/o por el consumo de agua o alimentos contaminados⁹.

La infección por NVs se caracteriza clínicamente por la aparición brusca de náuseas, vómitos, diarrea no sanguinolenta, fiebre y dolor abdominal¹³. El período de incubación de la infección por NVs es, generalmente, de 10-52 horas²².

Debido a su variabilidad genética y a la carencia de inmunidad a largo plazo, un individuo puede sufrir varias infecciones por NVs a lo largo de su vida⁷.

METODOLOGIA

Población y zona de estudio

Se estudiaron 244 muestras de heces pertenecientes a infantes menores de cinco años de edad, que presentaron episodios esporádicos de diarrea aguda, durante el periodo de tiempo comprendido entre junio de 2009 y octubre de 2010, en el cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas-Ecuador.

Fuente de datos

Mediante la aplicación de un cuestionario, llevo a cabo a la mujer cabeza de cada hogar, se conocieron las condiciones socioeconómicas y sanitarias, donde se desarrolla el menor. Las variables analizadas fueron instrucción de la madre, ingreso mensual del hogar, tipo de construcción de la vivienda, número de personas por habitación, número de electrodomésticos, acceso a servicios sanitarios, fuente de agua para el consumo del hogar y la presencia de

animales domésticos en el interior o en los exteriores de la vivienda.

Recolección de muestras

Las muestras de heces fueron receptadas en el consultorio 8 del hospital “*Pedro Alberto Buffoni*” del cantón Quinindé, o en el domicilio del paciente. En lo posible, las deposiciones fueron recolectadas durante la fase aguda de la infección, 48 – 72 horas tras la aparición de los síntomas, hasta un periodo máximo de 9 días.

Análisis parasitológico

Para la búsqueda de parásitos intestinales se realizó un examen microscópico directo de las heces y los métodos de concentración: Kato-Katz y formol-acetato etílico.

Conservación y transporte de muestras

Las muestras fueron preservadas en un congelador a (-20°C) hasta el momento de su procesamiento.

Análisis molecular

Preparación de muestras

Las heces se diluyeron (10 – 20% peso/volumen) en PBS (pH 7,4), con el fin de clarificar la muestra.

Extracción y purificación de RNA viral

Para la extracción y purificación de RNA Viral se empleó el kit comercial *QIAamp[®] Viral RNA (QIAGEN)*, siguiendo las instrucciones detalladas en el kit.

Real Time RT-PCR

Para la identificación de *NVs GI* y *GII* se realizó un ensayo de *Real Time RT-PCR*, empleando AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems)¹².

Primer y probe.- los cebadores y sondas se basan en la detección de una secuencia de cruce entre *ORF1* y *ORF2*, donde se localiza una región muy conservada del genoma del virus, amplificando secuencias de 84 pb para *GI* y de 97 pb para *GII*²⁸ (tabla 1).

Tabla 1. Descripción de la secuencia de *primers* y *probes* empleados para la amplificación de *NVs GI/GII*.

Primer/Probe name	Sequence
Genogroup I	
Cog 1F	CGY TGG ATG CGI TTY CAT GA
Cog 1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C
Ring 1C	FAM – AGA TYG CGI TCI CCT GTC CA – BHQ*
Genogroup 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])

Master mix.- la *Real Time RT-PCR* se ensambló incorporando en la *master mix* los reactivos que se detallan a continuación¹² (tabla 2).

Tabla 2. *Primer/probe mix* [10µM].

Component	Vol (µL/rxn)
2X RT-PCR buffer*	12,50
Primer/probe ^a Mix	0,5
25X RT-PCR Mix*	1
Detection enhancer*	1,67
Nuclease-free wáter*	6,33
<i>Volumen Total</i>	22 µL

*incluidos en el Kit

El volumen de reacción final se ajustó a 25µL, añadiendo 3µL de la muestra. Una vez ensamblada la *Real Time RT-PCR* se procedió a amplificar bajo las siguientes condiciones (tabla 3).

Tabla 3. Volúmenes finales de reactivos empleados para cada reacción de *Real Time RT-PCR*.

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

Interpretación de los resultados obtenidos.- las muestras se consideraron positivas si los valores de amplificación estaban comprendidos entre > 8 y < 40 ciclos, mientras que las muestras negativas, fueran aquellas que tenían valores de amplificación por debajo del umbral de referencia o que no están presentes en el rango de aceptación.

Análisis estadístico

Para analizar los factores de riesgo asociados con las infecciones esporádicas provocadas por *NVs* en la población de estudio, se partió de los resultados positivos para *NVs GI/GII*.

Por lo tanto, inicialmente se realizó un análisis descriptivo de las variables de interés, seguidamente de un test de igualdad de proporciones poblacionales con el fin de observar posibles diferencias estadísticas, a través del empleo del test de *Chi-cuadrado* (χ^2), las asociaciones obtenidas en el análisis anterior fueron cuantificadas utilizando razones de prevalencia (*Odds ratio*) en un análisis bivariado y multivariado de regresión logística (ajustados por la edad) al 95% intervalos de confianza a través del método *Backward* que permitió la selección del mejor modelo estadístico, considerándose asociaciones significativas aquellas que presentaban valores de $p < 0,10$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis parasitológico

El estudio coproparasitológico llevado a cabo determinó que el 14,75% (36/244) del total de la población infantil presentó algún tipo de parásito intestinal (*figura 1*), este valor difiere de los encontrados por Sackey & Weigel²³, quienes reportan una prevalencia de casi el 90% de parásitos intestinales, al igual que otros estudios previos llevados a cabo en las cercanías de zonas subtropicales, que informaron una prevalencia de infecciones intestinales de origen parasitario del 92 - 95%^{32,33}, similar a lo que se ha observado para otros grupos tropicales que viven en la región Amazónica^{2,18} y la costa del Pacífico.³⁴ Estudios más recientes ponen en evidencia una prevalencia de parasitosis inferior, que varía entre 58,4%⁴ hasta el 61%¹⁰.

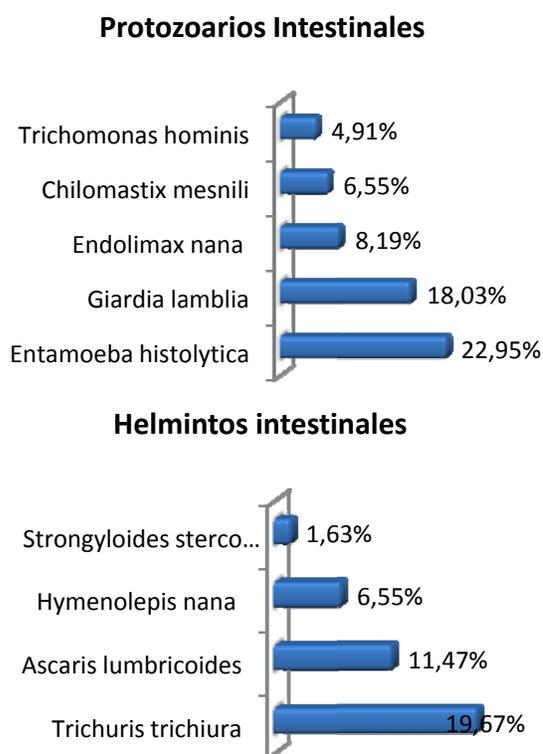
La disminución de la frecuencia de parasitosis en infantes puede atribuirse en parte, a la implantación de masivas

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)

Además, de los resultados anteriores se evidenció un predominio de protozoarios intestinales con un 60,65% sobre helmintos intestinales que alcanzaron el 39,34%, lo que coincide con los resultados de Montero²², que reporta una frecuencia de protozoarios del 94.1% vs 5,9% para helmintos lo que es atribuible a la eficacia del *albendazol*, cuyo efecto tiene lugar principalmente sobre los helmintos³⁰.

Figura 1. Distribución porcentual de los diferentes parásitos intestinales observados mediante el análisis coproparasitológico.



Norovirus, como agente causal de EDA

La utilización de *Real Time (TaqMan®) RT-PCR* para detectar y genotipificar *NVs GI/GII*, permitió identificar una prevalencia de 29,5% (72/244) en niños

menores de cinco años de edad, cifra que se encuentra entre los rangos reportados en otros países de Suramérica como en Brasil del 14.5%²⁴ Venezuela con el 16,76%²⁴, Chile del 17,4%³, Argentina con el 24%⁷, Perú del 29,5%¹⁶ y Colombia del 32%²¹ 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 se debe mencionar que en países limítrofes al nuestro la prevalencia es similar.

Este hecho, sumado a la extraordinaria capacidad infectiva, variabilidad genética y estabilidad que presenta el virus, pone en evidencia que en la actualidad los *NVs* juegan un papel relevante como agente etiológico de diarreas agudas en niños menores de cinco años de edad en la población noroccidental del país.

Distribución de los genotipos de norovirus en la población de estudio

El genotipo de *NVs* 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). Concordando con estudios realizados durante los últimos años tanto en países europeos como americanos (Estados Unidos, Brasil y Argentina), donde la mayoría de los reportes de los casos clínicos analizados demostraron estar originados por cepas de *NVs* pertenecientes a los genogrupos I y II, siendo el *GII* el más frecuente²⁴ debido a que los *NVs* 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 población¹⁴.

Además, la alta prevalencia del *GII* en la población es debida probablemente a la ausencia de inmunidad protectora, especialmente en la comunidad susceptible, provocando nuevos casos y brotes de gastroenteritis aguda.

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

El tema de la estacionalidad de las infecciones por *NVs* es un tópico debatido. Algunos investigadores continúan observando este patrón de distribución estacional²⁷, mientras que otros observan un incremento en los meses de invierno sólo para los brotes de transmisión interpersonal¹⁵ o bien no hallan ningún patrón estacional⁵, esta última sería la situación observada en este estudio, aunque sería necesaria una vigilancia más prolongada en el tiempo para confirmarla.

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

Edad

La prevalencia de *NVs* tanto en lactantes, menores de un año, como en niños mayores, entre 13 y 60 meses, no presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$), sin embargo el análisis de *odds ratio*

(OR) demostró que el riesgo de padecer gastroenteritis aguda causada por *NVs* en la lactancia se vio aumentado en 1,23 veces [IC_{95%}: 0,710 – 2,311], con respecto al resto de la población en estudio, este resultado es consistente con los datos de un estudio en niños hospitalizado en Pakistán, donde se propone que la disminución en la tasa de incidencia después del año edad puede estar relacionada con el desarrollo de inmunidad protectora²⁰. 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*.⁶

Nivel socio-económico

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 una mejor calidad de vida incrementan el riesgo de padecer enfermedades diarreicas causadas por *NVs*. La interpretación de estos resultados no es simple ya que propone una paradoja interesante, pues 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.”¹⁹

Debido a que hasta el momento no se ha reportado un vector confirmado responsable de la transmisión de las

infecciones enterogástricas provocadas por NVs. 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.¹⁹

Condiciones sanitarias

Dentro del contexto sanitario, la disponibilidad de agua entubada como fuente de agua para la vivienda es otro factor interesante implicado con la expresión del virus, ya que los niños expuestos a este tipo de agua desarrollaron 1,70 veces [$p=0,087$; $IC_{95\%}$: 0,926 – 3,120] más probabilidades de afectarse con NVs, entendiéndose como agua entubada al agua que ha sido captada de fuentes naturales sin ninguna clase de tratamiento. La implicación de brotes epidémicos de gastroenteritis aguda causada por NVs cuyo origen común fue la ingesta de agua contaminada son reportados con menos frecuencia que los brotes de origen alimentario. 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 solididad suspendidas¹⁸.

Cabe mencionarse que 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 y en muchos de los casos componen la única red de suministro de agua.

Presencia de animales domésticos en el entorno

Además, el presente estudio reveló que la exposición o contacto del menor con

caballos eleva 3 veces [$p=0,075$; $IC_{95\%}$: 0,897 – 9,615] la posibilidad de afectarse con NVs, apreciación que también se pudo observar en un estudio llevado a cabo por Peasey³⁹ en el cual se identificó que el cuidado de ganado es asociado con mayores probabilidades de adquirir NVs, mismo que sugiere que el contacto con cualquier tipo de ganado, incluido equino, desempeña un rol primario en la transmisión de NVs.

Curiosamente, el análisis estadístico empleado mostró también que la presencia de perros dentro de la vivienda, cumple un papel protector [$p=0,007$; $IC_{95\%}$: 0,101 – 0,695], dicho en otras palabras la usencia de un can en la morada donde se desenvuelve el niño incrementa cerca de 4 veces el riesgo de sufrir una infección gastrointestinal a causa de NVs, estos resultados contrastan con un estudio de seroepidemiología y factores de riesgo para la cepa de *norovirus/México* en el que 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 edad³⁹.

Por otra parte, un estudio basado en la evidencia serológica sugirió que un tipo específico de *calicivirus* aislado en uno de los casos analizados puede ser capaz de infectar tanto seres humanos, como a perros¹². 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* y ningún aislamiento de *calicivirus canino* en humano ha sido reportado¹¹.

Si bien, en la actualidad no hay estudios que demuestran la transmisión de enfermedades zoonóticas de los

calicivirus, autores como Van Der Poel²⁹, han llegado a plantear la posibilidad de la existencia de un reservorio zoonótico de los *calicivirus humanos*, por lo tanto 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.¹⁷

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 NVs durante la infancia.

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 NVs, 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 NVs 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 NVs.

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 NVs.

AGRADECIMIENTOS

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, porque 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.

Y, a todas las personas que directa o indirectamente me ayudaron en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

¹Ando, T., Monroe, S., Gentsch, J., Jin, Q., Lewis, D. & Glass, R. (1995). Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. J Clin Microbiol(33): 64-71.

²Benefice, E. & Barral, H. (1991). Differences in the life style and nutritional status between settlers and Siona-Secoya Indians living in the same Amazonian milieu. Ecology of Food and Nutrition 25, 307-322.

³Berrios-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>

⁴Bosh, V. (2007). Estado nutricional de hierro y parasitosis intestinal en niños de Valencia, Estado Carabobo, Venezuela. An Venez Nutr. 20(1):5-11.

⁵Fankhauser, 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.

⁶Glass, R. & Kilgore, P. (1997). Etiology of acute viral gastroenteritis. Philadelphia. Lippincott-Raven.

⁷Gomes, 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.

⁸Green, K., Lew, J., Jiang, X., Kapikian, A. & Estes, M. (1993). A comparison of the reactivities of the baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with the native Norwalk virus in serologic assays and some epidemiologic observations. Jour Clin Microbio.;2185-2191.

⁹Gutierrez, 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.

¹⁰Gutiérrez, 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

¹¹Hashimoto, 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.

¹²Humphrey, 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.

¹³Kaplan, 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.

- ¹⁴Lindesmith, 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.
- ¹⁵Lopman, 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.
- ¹⁶Martínez, 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).
- ¹⁷Martínez, 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>
- ¹⁸Maunula L, Miettinen IT, von Bonsdorff CH. (2005). Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg Infect Dis.*, *11*, 1716-21.
- ¹⁹Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2009). Norovirus. . Extraído el 13 de noviembre, 2011, del sitio web: <http://www.who.int/topics/es/>
- ²⁰Pang, X., Honma, S., Nakata, S. & Vesikari, T. (2000). Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis.*, *181*(2): S288-94.
- ²¹Peláez, D. (2004). Enfermedad diarreica aguda (EDA) nuevos agentes virales. Montería, Colombia. *Revista MVZ Córdoba.* *9*. 002.
- ²²Ribes J., y Buesa J. (2010). Infecciones por norovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, *28*(Supl 1), 51-55.
- ²³Sackey, 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>
- ²⁴Sánchez-Fauquier, A., Wilhelmi, I., Román, E., Colomina, J., Montero, V., & Negrodo, A. (2007). Surveillance of human calicivirus in Spain. *Emerg Infect Dis.*, *11*, 1327-9.
- ²⁵Sebastian, M. & Santiago, S. (2000). Control of intestinal helminths in schoolchildren in Low-Napo, Ecuador: impact of two-year chemotherapy program. *Revista da Sociedade de Brasileira de Medicina Tropical.*, *33*, 69-73.
- ²⁶Soares, 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).
- ²⁷Treanor, J. & Dolin, R. (2005). Noroviruses and other caliciviruses. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6ª ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone 2194-201.
- ²⁸Trujillo, 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.
- ²⁹Van 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.
- ³⁰Vásquez, 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.
- ³¹Velásquez, F., García, H., Rodríguez, E., Cervantes, I., Gómez, A., Melo, M., *et al.* (2004). Diarrhea morbidity and mortality in Mexican children: impact of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J*(23) (Suppl 10): S149-55.
- ³²Weigel, 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.

³³Weigel, 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.

³⁴Weigel, 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.

³⁵Wilhelmi, I., Román, E., & Sánchez-Fauquier, A. (2003). Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.*, 9, 247-62.

³⁶Zheng, D., Ando, T., Fankhauser, R., Beard, R., Glass, R., Monroe, S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346, 312-23.