

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA - León
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Tesis para optar al título de Máster en Ciencias con mención en Microbiología Médica.



Respuesta inmunológica contra cepas de Norovirus humanos en cerdos criados artesanalmente de León y Chinandega 2012.

Autor:

Lic. Fredman Ricardo González Hernández
Estudiante de Maestría
Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosa
UNAN - León

Tutor:

Filemón Bucardo Rivera PhD
Profesor Titular
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Ciencias Médicas
UNAN - León

León, Agosto 2014

“A la libertad por la Universidad”

A mis padres, hermanos y familiares.
Con amor para mi esposa *Elyin Rugama.*
Por su optimismo y dedicación sin límites
Tú haces que todo sea posible.

*“No dejes apagar el entusiasmo, virtud tan valiosa como necesaria;
trabaja, aspira, tiende siempre hacia la altura”*

Rubén Darío

AGRADECIMIENTOS

A *Dios* dador de vida y fortaleza, por hacer palpable su amor a través de los que me rodean.

De manera muy especial deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Filemón Bucardo, por su valiosa tutoría, sugerencias, apoyo científico y por transmitirme su vocación investigadora.

Agradezco a las personas que colaboraron con la realización de este estudio, a los trabajadores de Departamento de Microbiología, al Dr. Pedro Cano médico veterinario por su apoyo técnico y a todos los involucrados directa e indirectamente.

Este estudio fue realizado con fondos de proyecto Zoonosis y Antroponosis de los Norovirus en áreas rurales de Nicaragua (NETROPICA Grant 05-N-2010).

RESUMEN

Norovirus es la mayor causa de brotes gastrointestinales de origen viral en el mundo, estudios recientes relacionan genética y antigénicamente cepas de Norovirus humano y porcino. Sin embargo el potencial zoonótico de los cerdos como reservorio viral no se ha establecido y la información relacionada es limitada, especialmente en áreas donde los cerdos conviven cerca del humano. Este estudio pretende contribuir a la comprensión del rol de los cerdos en la infección con Norovirus. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, la muestra estuvo constituida por 137 cerdos, distribuidos de forma homogénea según edad y sexo. El muestreo se realizó en las siguientes comunidades: Monte Redondo (n = 50), Lechecuagos (n = 25), El Convento (n = 25), El Tololar (n = 18), La Ceiba (n = 14) y La Virge, Posoltega (n = 5). Un médico Veterinario realizó la extracción de sangre de la vena yugular en tubos vacutainer con y sin anticoagulante. Una dilución 1:200 de los sueros fue analizada mediante un ELISA, estandarizado en este estudio, para determinar anticuerpos IgG porcinos que reconocen partículas virales sintéticas (VLPs) derivadas de Norovirus que infectan humanos. Se encontró que el 69% de los sueros evaluados reconocen la cepa GII.4 (HS194/2009/US), aislada de un niño con diarrea acuosa en EEUU. También se observó que el 70% de estos mismos sueros reconocen la cepa GII.4 (Dijon171/96) aislada de un niño en Francia. Así mismo el 58% de los sueros porcinos estudiados presentaban anticuerpos contra la cepa GII.3 (Chron1), aislada de un paciente Sueco con diarrea crónica. Estos datos se relacionan con los reportados por Farkas y colaboradores, donde encontraron que el 63% de sueros de cerdos de granjas de EEUU presentaron anticuerpos contra VLP derivada de la cepa Norwalk (GI.1) y el 52% de los mismos presentaron anticuerpos frente a la cepa Hawaii (GII.1) ambas cepas también de origen humano. Dado que algunos estudios sugieren una asociación entre el tipo sanguíneo O y la infección con Norovirus en humanos, dicha características se investigó en los cerdos, encontrando que la detección de anticuerpos anti-Norovirus fue mayor en el tipo O que en A ($p < 0.01$). El presente estudio describe por primera vez la presencia de anticuerpos porcinos que reconocen VLPs derivadas de Norovirus humanos, contribuyendo de esta manera al entendimiento del potencial zoonótico que tienen los cerdos en las infecciones por Norovirus en Nicaragua.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	5
5. OBJETIVOS	6
5.1 Objetivo General.....	6
5.1.2 Objetivos Específicos	6
6. MARCO TEÓRICO	7
6.1 Historia y clasificación de los Norovirus	7
6.2 Morfología y estructura molecular	9
6.3 Diversidad genética	10
6.4 Potencial zoonótico.....	11
6.5 Transmisión.....	12
6.6 Características clínicas.....	13
6.7 Replicación viral	14
6.8 Patogénesis y modelos animales de infección.....	15
6.9 Inmunología y susceptibilidad genética.....	17
6.10 Diagnóstico.....	19
7. MATERIAL Y MÉTODO	25
8. RESULTADOS	30
9. DISCUSIÓN	38
10. CONCLUSIONES	43
11. RECOMENDACIONES.....	44
12. REFERENCIAS.....	45
13. ANEXOS.....	53

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
DS	Desviación estandar
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas
GI	Genogrupo I
GII	Genogrupo II
HBGA	Antígenos de grupos histo-sanguíneos
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
IgG	Inmunoglobulina G
NSP	Proteínas no estructurales
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RdRp	ARN Polimerasa dependiente de ARN
VLPs	Partículas virales sintéticas
VP1	Proteína Viral 1
VP2	Proteína Viral 2

1. INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis por Norovirus es una enfermedad común en todo el mundo que causa a menudo casos esporádicos y brotes epidémicos.¹ Se estima que más del 80% de los brotes de gastroenteritis no bacterianos son debidos a Norovirus, dando lugar a más de 267 millones de infecciones a nivel mundial por año, incluyendo 23 millones de casos en los EE.UU.^{1,2}

Actualmente los Norovirus son reconocidos como la principal causa de gastroenteritis en personas de todas las edades, siendo causa probable de hospitalización, se transmite comúnmente por aguas y alimentos contaminados a través de la vía fecal-oral.^{2,3} Recientemente se ha indicado que en países en desarrollo Norovirus puede ser responsable de hasta 200.000 muertes en niños menores de 5 años por año.⁴ En Nicaragua la prevalencia de Norovirus, entre 2005 y el 2010, fue del 12 al 24%.⁵⁻⁷

La aplicación de métodos moleculares ha facilitado el reconocimiento de la alta diversidad de los Norovirus y además, ha permitiendo conocer la importancia de cada variante genética o genotipo.⁸ De los 18 genotipos del genogrupo II, el genotipo GII.4 fue responsable de las cuatro grandes epidemias ocurridas en los últimos 15 años y también ha sido responsable de aproximadamente el 90% de los casos de diarrea por Norovirus que ocurren en la comunidad y el hospital.^{8,9}

La historia natural de las infecciones por este patógeno involucra una compleja interacción entre diferentes factores, tales como: alta persistencia del virus en el ambiente, alta tasa de mutaciones, factores genéticos del huésped y la posible transmisión zoonótica del virus.⁹

El potencial zoonótico de la enfermedad es incierto, sin embargo hay evidencias que sugieren la existencia de una relación genética entre Norovirus que infectan humanos y los que infectan animales¹⁰, sobre todo entre Norovirus porcino y humanos, los cuales comparten el mismo genogrupo (GII).^{11, 12} Sin embargo, el conocimiento de las características antigénicas de los Norovirus porcinos y humanos es limitado, debido a

la resistencia de estos virus de crecer en los cultivos celulares y la falta de un modelo animal pequeño que replique la enfermedad.

Dicha limitación ha sido parcialmente superada mediante el desarrollo de partículas virales sintéticas (VLPs), recombinantes. Estas VLPs recombinantes son actualmente una fuente de antígeno similar a los que contienen las partículas virales naturales. En algunos estudios se han utilizado VLPs de Norovirus humanos para investigar títulos de anticuerpos de un genotipo en particular, por ejemplo, GI.1 y GII.3. Sin embargo dichos estudios en animales son limitados por la falta de VLPs relacionadas con especies animales.^{13, 14}

El presente estudio describe aspectos zoonóticos de la infección por Norovirus en cerdos, enfocado particularmente en la respuesta inmunológica de los cerdos criados artesanalmente hacia cepas de Norovirus (VLPs) que infectan humanos. Las VLPs usadas en este estudio se derivan de las cepas GII.4 (HS194) de EEUU, GII.4 (Dijon) de Francia y GII.3 (Chron1) de Suecia, todas aisladas en humanos.

2. ANTECEDENTES

Dentro de la familia *Caliciviridae* se agrupan virus entéricos que infectan animales y que son morfológicamente indistinguibles y genéticamente muy relacionado con los Norovirus humanos.¹⁵ Sin embargo, todavía no se ha comprobado la infección natural de Norovirus de animales en humanos y vice-versa, lo que sugiere que el rango de infección es limitado por especie.

En cerdos libres de gérmenes (gnotobióticos) se ha logrado la infección experimental con Norovirus humanos (GII.4-HS66) bajo condiciones controladas. Estos cerdos desarrollaron diarrea leve, excretaron el virus inoculado y mostraron seroconversión a la cepa infectante. Además, se observó mediante inmuno-fluorescencia, la presencia de partículas virales en el duodeno y jejunio.¹⁶

También, se ha demostrado que los cerdos libres de gérmenes expresan antígenos de grupos histo-sanguíneos HBGA en enterocitos, iguales a los que expresan los humanos, los cuales han sido sugeridos como posible receptor viral.¹⁷

Un estudio realizado en Canadá, sugiere que los cerdos pueden infectarse con la cepa GII.4 humana. Este estudio encontró segmentos cortos (172 bp) de genoma de Norovirus en muestras de heces de cerdos, dichas secuencias fueron similares a la cepa GII.4.¹² Sin embargo los investigadores no descartan contaminación de las muestras con desechos humanos.

El único estudio en describir anticuerpos anti-Norovirus en cerdos es el de Farkas y colaboradores, publicado en el 2005. Los resultados revelaron que el 71% de los cerdos procedentes de EEUU y el 36% de los cerdos procedentes de Japón presentaban anticuerpos anti-Norovirus contra la cepa porcina SW918. Además, el 63% y 52% de los cerdos procedentes de EEUU presentaron anticuerpos contra VLP derivadas de los Norovirus humanos, Norwalk (GI.1) y Hawaii (GII.1), respectivamente.¹⁸

3. JUSTIFICACIÓN

A diferencia de la creciente comprensión de la diversidad genética de los Norovirus y del rol de los factores genéticos del huésped en la infección, la comprensión de la transmisión entre especies es muy poco explorada, en particular en áreas donde los animales domésticos conviven con el humano.

La relación genética de las cepas de Norovirus humanos y porcinas, así como, su amplia distribución en diferentes especies y la infección experimental en cerdos libres de gérmenes incitan a especular sobre la posible transmisión de Norovirus entre humanos y porcinos. Un evento de transmisión entre especies, puede dar origen a cepas con un potencial patogénico desconocido.

Este estudio contribuirá en general a la comprensión de la historia natural de la infección por Norovirus en Nicaragua y en particular al posible rol de los cerdos como reservorios de los Norovirus patógenos de humanos.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Poseen los cerdos criados artesanalmente de León y Chinandega anticuerpos IgG que reconozcan al principal Norovirus que infecta a los humanos?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la presencia de anticuerpos IgG anti-Norovirus en cerdos criados artesanalmente en áreas rurales de León y Chinandega, utilizando como antígeno partículas virales sintéticas derivadas de Norovirus que infectan humanos.

5.1.2 Objetivos Específicos

1. Estandarizar un ensayo inmuno-enzimático, en formato de ELISA para la detección de anticuerpos IgG anti-Norovirus en cerdos.
2. Determinar la presencia de anticuerpos IgG anti-Norovirus en suero de cerdos criados artesanalmente en comunidades rurales de León y Chinandega.
3. Determinar la frecuencia de los tipos sanguíneos en la población porcina estudiada y su asociación con la presencia de anticuerpos IgG anti-Norovirus.

6. MARCO TEÓRICO

La gastroenteritis aguda por Norovirus es la causa más importante de epidemias gastrointestinales no bacterianas en todo el mundo, estas infecciones pueden ocurrir esporádicamente, en pequeños grupos familiares o entre personas de entornos cerrados.⁸

6.1 Historia y clasificación de los Norovirus

Una enfermedad similar a la causada por Norovirus fue descrita por primera vez en 1929 por Zahorsky y la definió como “enfermedad de los vómitos de invierno” caracterizada por la aparición repentina de vómitos y diarrea durante los meses fríos.³ En 1972 Kapikian y colaboradores descubrieron la etiología al demostrar partículas virales con un tamaño de 27 a 32 nm en muestras de heces colectadas durante un brote de gastroenteritis ocurrido en un colegio de Norwalk / Ohio / EE.UU en 1968.^{3, 19}

El análisis de las proteínas del virus Norwalk, la clonación y caracterización de su genoma mostraron gran similitud genética y antigénica con la familia *Caliciviridae*, convirtiéndose en el prototipo del género Norovirus que constituye 1 de los 5 géneros de la familia; los otros cuatro géneros son: Sapovirus anteriormente llamado “virus Sapporo”, Lagovirus, Vesivirus y Nebovirus. (fig. 1).³

Análisis filogenéticos del gen de la ARN-polimerasa (RdRp) y los genes de la cápside indican que los Norovirus se pueden clasificar en genogrupos y genotipos (fig. 1).³ Los Norovirus que tiene una homología entre 49% y 55% en la proteína de la capsida, pertenecen al mismo genogrupo y los Norovirus con homología entre 56% y 86% pertenecen al mismo genotipo.²⁰

Los genogrupos que infectan humanos son I, II y IV, de estos GII es el genogrupo más ampliamente detectado en seres humanos; basado en análisis filogenéticos del gen de la cápside se han clasificado dentro de GII varias cepas porcinas GII.11, GII.18 y GII.19 de las cuales GII.11 es la más cercana a las cepas humanas.^{11, 21} Norovirus bovino constituye el genogrupo III que se divide en dos genotipos. Norovirus murino se

encuentra en el genogrupo V y el genogrupo VI probablemente infecta humanos y canes.^{3, 15}

En relación a la clasificación genética de la especie porcinas de Norovirus, la primera cepa porcina fue detectada en Japón (Sw43/1997/JP) y se clasificó dentro del genogrupo GII.11.²² Posteriormente se identificaron dos cepas porcinas procedentes de EEUU (QW101/2003/US GII.18 y QW170/2003/US GII.19); cuyas similitudes en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de la cápside fue de 71% y entre el 61 - 81% de identidad respecto a otros genotipos de Norovirus incluyendo la cepa porcina GII.11 (Sw43).^{11, 22}

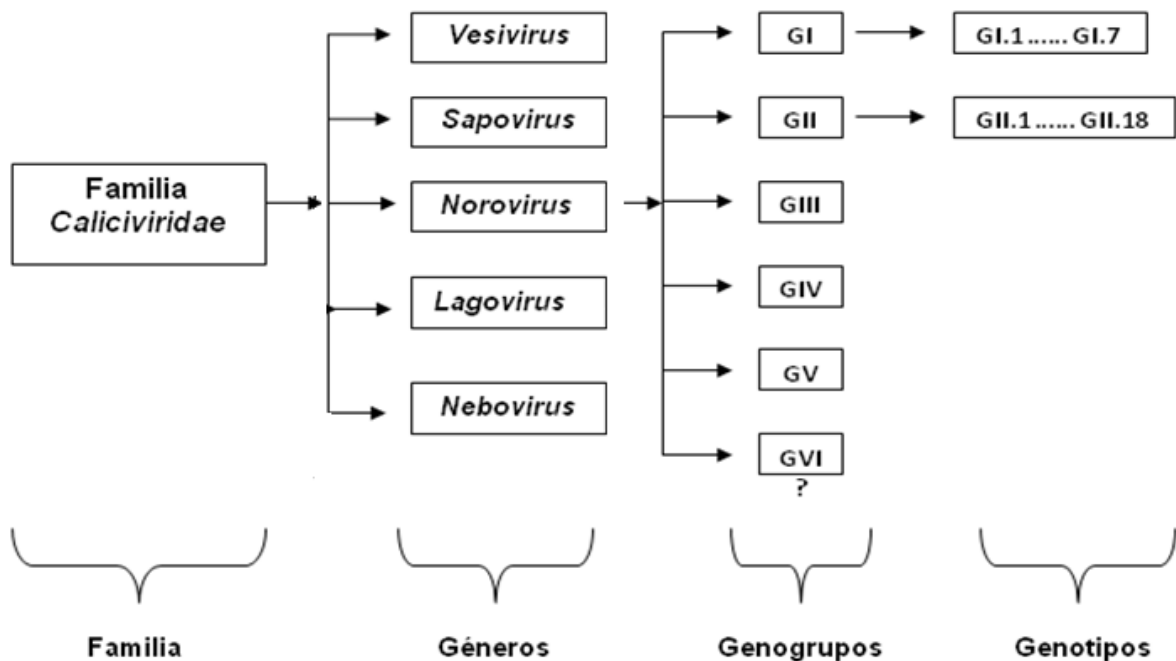


Figura 1. Clasificación de los miembros de la familia Caliciviridae según el ICTV. El género Norovirus se sub-divide en 6 genogrupos (GI-VI) y en genotipos en base a la diversidad de secuencias completas de la proteína de la cápside VP1. Las cepas humanas se agrupan dentro de GI, GII, GIV y posiblemente GVI, cepas porcinas se agrupan dentro de GII.

6.2 Morfología y estructura molecular

Los Norovirus son virus pequeños, con un diámetro aproximado entre 27 - 35 nm, son virus no envueltos cuya nucleocápside es de simetría icosaédrica.²³ Su genoma está constituido por una única molécula de ARN de cadena simple de sentido positivo (~7,5 kb), que contiene tres Marcos de lectura abierta (ORF) que codifican para genes estructurales y no estructurales (fig. 2).⁸

El ORF1 ubicado en el extremo 5' del genoma codifica para una poliproteína de ~ 194 kDa que se escinde por una proteasa viral en seis proteínas no estructurales involucradas en el la transcripción y replicación. El ORF2 codifica la proteína VP1 de la cápside de ~ 60 kDa. El ORF3 es considerada la región más variable en el genoma y codifica una proteína VP2 de ~ 23 - kDa que interactúa con el genoma durante la formación del virión.²³

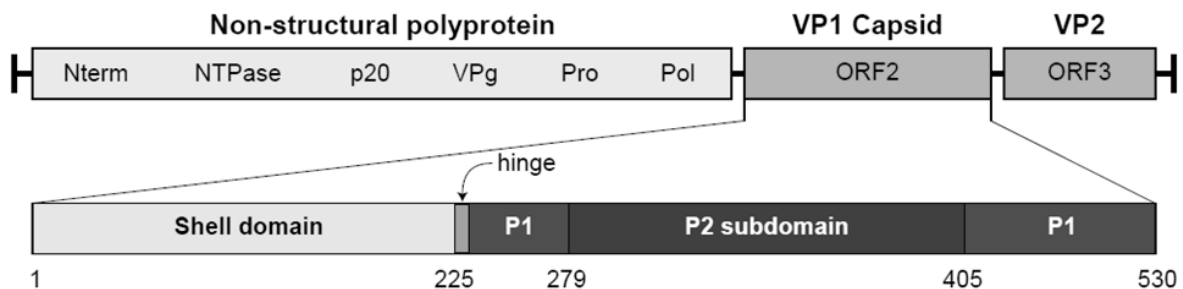


Figura 2. Organización genómica de los Norovirus. El ORF 1 se expresa como una poliproteína que se escinde por 3CLpro en al menos seis proteínas no estructurales. Los componentes maduros son: **proteína N-terminal** (NS1/2); **NTPasa** (NS3); **proteína 20** (NS4); **VPg, proteína viral del genoma** (NS5); **Pro, proteasa** (NS6); **Pol, polimerasa** (NS7). ORF 2 codifica la cápside viral (~550 aa). ORF 3 codifica una pequeña proteína básica de función desconocida. Tomado de Vildevall Malin, 2011.

En relación a la función de las proteínas virales algunos estudios sugieren que la proteína viral VPg desempeña un papel en la iniciación de traducción del ARN viral a través de interacciones proteína-proteína con la maquinaria de traducción de la célula

hospedera.²⁴ Se cree que la proteína pro funciona como proteínasa viral, la proteína p48 desempeña un papel en el tráfico intracelular, NTPasa nucleósido trifosfato y proteína p20 están probablemente involucradas en el tráfico de componentes a través membrana celular y la replicación de complejos víricos y la polimerasa (RdRp) necesaria para la replicación del genoma viral.^{25, 26}

El fragmento ORF2 codifica para la principal proteína de la cápside VP1 la cual se autoensambla para formar la cápside, esta proteína presenta alta especificidad de reconocimiento del receptor, es altamente inmunogénica y proporciona diversidad entre cepas.¹⁵

La proteína VP1 consta de dos subunidades; la porción interna de la cápside S (shell) y la porción protuberante P. La porción S es altamente conservada entre los Norovirus y su función es proporcionar un andamio icosaédrico para la partícula viral. El dominio P está compuesto por subunidades P1 y P2; P2 es el dominio hipervariable de la cápside de los Norovirus siendo su principal función ser ligando a la célula hospedera, confiere especificidad de hospedador y diversidad entre cepas, el subdominio P1 situado entre S y P2 proporciona ajuste adicional para colocar el subdominio P2.^{27, 28}

El ORF3 que se encuentra en el extremo 3' del genoma codifica la proteína estructural menor VP2 de ~ 20 kDa, cuya función se relaciona con la expresión y la estabilidad de proteína de la cápside VP1 al proporcionar estabilidad y protección de la degradación de proteasas.²⁹

6.3 Diversidad genética

Los Norovirus son un género muy diverso presentando aproximadamente 46% de divergencia en la secuencia de nucleótidos entre genogrupos (GI- GVI).²⁰ La diversidad entre los Norovirus se mantiene a través de la acumulación de mutaciones puntuales asociadas principalmente con la falta de corrección de la ARN polimerasa, así como la recombinación genética que implica el intercambio de secuencias entre cepas altamente relacionadas.^{20, 30, 31}

La relación entre cepas de Norovirus puede desarrollar co-infecciones entre virus humanos y animales, recombinarse y dar lugar a la generación de nuevos virus con potencial patogénico desconocido y tropismo alterado entre especies animales y humanas.¹⁹

Debido al potencial de recombinación de los Norovirus son necesarios análisis de secuenciación de la cápside, para la caracterización de cepas zoonóticas aunque no se haya determinado si algunos animales puedan actuar como reservorio.³² Las diferencias estructurales en los el dominio P2 de la cápside entre Norovirus humanos y animales sugieren que es poco probable la zoonosis de manera frecuente y solo se presente en casos excepcionales.³³

6.4 Potencial zoonótico

El potencial zoonótico de Norovirus es incierto, sin embargo, su estudio es relevante ya que, algunos animales como el cerdo pueden actuar como reservorios de Norovirus humanos. Dentro de la especie porcina existen Norovirus que están relacionados genéticamente con el genogrupo (GII) de Norovirus humano, pudiéndose producir recombinación homóloga entre ambos y dar lugar a nuevas variantes con patogenia y características únicas.^{34, 35}

Por ser Norovirus un virus de ARN está sujeto a variación genética continua durante la replicación, produciendo mutantes virales estrechamente relacionadas y recombinantes denominadas cuasiespecies.³⁶ La aparición de "nuevas" variantes con cambios de tropismo o capacidad de transmitirse o replicarse en una especie diferente plantea un riesgo zoonótico. En síntesis los datos sugieren que las condiciones apropiadas podrían favorecer la aparición de Norovirus recombinantes y/o una transmisión entre especies genéticamente compatibles, sin embargo no se ha encontrado hasta el momento ninguna cepa recombinante entre especies.²¹

6.5 Transmisión

La ruta fecal - oral es generalmente la forma más importante de transmisión de Norovirus, el vómito y la transmisión mecánica a través de superficies ambientales contaminadas pueden explicar la rápida infestación en entornos cerrados, como hospitales, hoteles y cruceros. A menudo los brotes epidémicos son el resultado de la exposición a alimentos o agua contaminados; se ha sugerido que algunos Calicivirus entéricos son capaces de resistir en el medio ambiente e inclusive infectar mariscos reportándose la presencia de Norovirus en ostras procedente de Japón y EEUU.³⁷⁻³⁹

Las características biológicas, físico-químicas y epidemiológicas de los Norovirus constituyen un serio desafío para su control, son virus muy contagiosos, se pueden necesitar tan sólo 10 a 100 partículas para provocar la infección, son altamente resistentes a la inactivación por congelación, calentamiento a 60 °C, la exposición al cloro, niveles de pH de 2.7 y el tratamiento con éter, etanol o productos de limpieza a base de detergentes (Tabla 1).⁴⁰

También los factores meteorológicos y/o ambientales contribuyen a este fenómeno; las epidemias de brotes de Norovirus suelen producirse en los meses más fríos del año en el hemisferio norte y meses más cálidos del año en el hemisferio sur.⁴¹ Por otro lado se sugiere que las precipitaciones pueden ser capaces de desempeñar un papel en brotes, los investigadores relacionaron la presencia de casos de Norovirus y las precipitaciones encontrando una relación estadística significativa entre la ocurrencia de ambos efectos .⁴²

Tabla 1. Características de los Norovirus que facilitan su propagación durante las epidemias.³

Característica	Observación	Consecuencia
Baja dosis infecciosa	<10 ² partículas virales	Rápida propagación y permanencia en el ambiente.
Diseminación asintomática	≤ 2 semanas	Aumento del riesgo de propagación, problemas en manipuladores de alimentos
Estabilidad	Resiste la congelación y temperaturas de 60 °C y 10 ppm de cloro	Difícil de eliminar del agua contaminada, el virus se mantiene en hielo y vapor ostras
Múltiple diversidad genética y antigénica	Necesidad de variedad diagnóstica, infecciones a repetición por múltiples tipos antigénicos	Pueden limitar la sensibilidad del diagnóstico y por lo tanto dar lugar a subestimación de la prevalencia de la enfermedad.
Falta de inmunidad duradera	La enfermedad puede ocurrir con la reinfección	La infección no protege en la edad adulta; es difícil desarrollar vacunas con protección de por vida.

6.6 Características clínicas

Los Norovirus infectan a personas de todas las edades, el período de incubación es, generalmente corto, de 24 a 48 horas, y se caracteriza clínicamente por la aparición brusca de náuseas (79%), vómitos (69%), diarrea no sanguinolenta (66%), fiebre (37%) y dolor abdominal (30%) pudiéndose presentar manifestaciones clínicas atípicas y complicaciones en inmunodeprimidos con excreción viral prolongada.^{43, 44}

El vómito es frecuentes en niños mayores de 1 año, mientras que en lactantes suele desarrollarse sólo diarrea, los síntomas generalmente se superan a los tres días, sin embargo pueden persistir entre 4 y 6 días o prolongarse varias semanas por ciertas circunstancias en pacientes hospitalizados, en niños menores de 11 años y personas mayores con enfermedades crónicas.^{8, 45}

Algunos estudios han informado que no todas las infecciones por Norovirus producen síntomas clínicos; pudiendo estos individuos asintomáticos actuar como reservorios y facilitar la transmisión de la enfermedad.^{46, 47} Graham y colaboradores, inocularon a 50

voluntarios vía oral con el virus de Norwalk a los cuales se les monitoreo las características clínicas encontrando que 41 pacientes (82%) se infectaron de los cuales el 68% presentaron síntomas y 32% fueron asintomáticos.⁴⁸

La mortalidad por este virus oscila entre 0.8 y 2.8%, en personas mayores los casos graves se acompañan de deshidratación reportándose casos de enterocolitis necrosante y fallecimientos durante brotes en residencias de ancianos.⁴⁹⁻⁵¹

Un estudio realizado por Simon A y colaboradores refieren que la persistencia de los síntomas por Norovirus puede durar más de 1 año en pacientes pediátricos oncológicos teniendo mayor riesgo de complicaciones graves.⁵² Lo mismo ocurre con pacientes trasplantados que reciben terapia inmunosupresora.⁵³

6.7 Replicación viral

Debido a la falta de un sistema de cultivo celular para Norovirus, la información sobre la replicación viral se ha deducido en gran parte de los estudios sobre otros Calicivirus animales, de los que se disponen de sistemas de cultivo viral.^{54, 55}

Durante los eventos tempranos de unión algunos estudios sugieren que determinadas cepas de Norovirus humanos dentro del genogrupo GII tienen al menos dos especificidades de unión: la primera es con carbohidratos alfa 1,2-fucosilados codificados en el gen S dependiente-secretor y la otra relacionada con carbohidratos alfa 2,3 - sialiladas de la cadena tipo 2 como los sialisil-Lewis.⁵⁶ Además varios estudios han puesto en relieve el papel que juegan el heparan sulfato y los antígenos de grupo histosanguíneo (HBGA) en la susceptibilidad a la infección causada por Norovirus sin embargo aun queda por determinar si estos receptores actúan como moléculas de unión o como receptores funcionales para el virus.^{57 58}

Los Norovirus se unen a los receptores celulares a través del dominio P2 específico de la proteína de la cápside que expresa determinantes de unión al receptor y epítopes reconocidos para anticuerpos.^{8, 28} El virus se replica en el citoplasma del enterocito donde el ARN de polaridad positiva actúa como ARNm.⁵⁴

La iniciación de la síntesis de proteínas virales en el ribosoma de la célula hospedera implica, la interacción de la proteína viral VPg con factores de iniciación celular, la VPg unida covalentemente a los ARN virales da inicio al proceso de traducción para la síntesis de proteínas.^{24, 59} La traducción del genoma de Norovirus produce tres marcos de lectura abierta, ORF1, ORF2 y ORF3.⁶⁰ Una vez que se ha producido la replicación del genoma el ARN viral y las proteínas son ensambladas dando como resultado la producción de partículas víricas infecciosas, esta etapa del ciclo de replicación del virus ha sido la menos estudiada, por lo tanto el conocimiento en los acontecimientos de biosíntesis que se dan son limitados.⁵⁴

6.8 Patogénesis y modelos animales de infección

El estudio de los mecanismos moleculares de patogénesis está limitado por la incapacidad de los Norovirus de replicarse *in vitro*.^{8, 61} La información sobre la patogénesis es poca, estudios con voluntarios humanos infectados con Norovirus muestran a través de biopsias duodenales atrofia en las vellosidades y presencia de mal-absorción desarrollando diarrea, así como cambios histológicos que incluyen embotamiento y acortamiento de las microvellosidades, dilatación del retículo endoplasmático y aumento en los órganos multivesiculares intracelulares.^{62, 63}

No obstante, las limitaciones de los seres humanos como un sistema modelo son numerosas: la experimentación es difícil y costosa, la toma de muestras es limitada y técnicamente exigente, los requisitos de contención biológica para el virus vivo son varios por ser altamente infeccioso y por último la capacidad para estudiar virus vivo se reduce por la falta de un sistema de cultivo.⁵⁴

Grandes esfuerzos se han hecho en el desarrollo de un modelo animal para estudiar Norovirus humanos; varias especies de primates han sido estudiadas como macacos rhesus, macacos cola de cerdo y el chimpancé; sin embargo, el éxito ha sido limitado en comparación con el huésped humano.⁸

Un buen modelo para el estudio de las enfermedades entéricas por Norovirus son los cerdos gnobióticos (Gn) ya que se asemejan a los humanos en su anatomía gastrointestinal, la fisiología y la respuesta inmune.⁶⁴

Se ha observado que en modelos neonatales de cerdo gnobióticos la infección por Norovirus humanos ha producido diarrea, eliminación del virus por las heces, seroconversión, cambio inmuno – citopático en las secciones intestinales y viremia transitoria.⁶⁵

Desarrollo del sistema inmune en porcinos: La transferencia de inmunidad en los porcinos difiere al de los humanos. En los cerdos no se permite el paso transplacentario de moléculas de inmunoglobulina ya que la estructura de la placenta es de tipo epitelio coriónica, es decir, el epitelio coriónico fetal establece contacto con el epitelio uterino intacto evitando el paso de anticuerpos maternos. No obstante en esta especie el traspaso de inmunidad de la madre al a progenie es a través del calostro.

El tipo de protección que brindan las hembras de la especie porcina a su descendencia por medio del calostro se denomina inmunidad pasiva. La inmunidad del cerdo neonato está en principio limitada por la cantidad y calidad de anticuerpos en el calostro y por la cantidad del mismo que el neonato es capaz de consumir y absorber.

La inmunoglobulina predominante en el calostro de la mayor parte de los mamíferos domésticos es la IgG, la cual representa entre el 65 al 90% del contenido total de anticuerpos; la IgA y las otras inmunoglobulinas casi siempre son componentes menores, aunque importantes. Los anticuerpos transferidos por el calostro son absorbidos por las células que recubren el tracto intestinal y pasan inmediatamente al torrente sanguíneo.

La transmisión de inmunidad de las cerdas a los recién nacidos es un fenómeno único en la prevención de enfermedades infecciosas, sin embargo las marranas solo pueden transmitir la inmunidad que ellas poseen y esta no dura mucho. Existe un vacío entre el descenso de la inmunidad adquirida a través del calostro y el desarrollo de inmunidad en los cerdos.⁶⁶

6.9 Inmunología y susceptibilidad genética

Los datos iniciales sobre las respuestas inmunitarias del huésped contra Infección por Norovirus fueron generados por inoculación de voluntarios humanos con filtrado de heces o durante brotes naturales, estos reportes indican un inusual patrón clínico de inmunidad, los individuos desarrollan una respuesta inmunitaria después de la infección, aunque de corta duración entre 6 y 14 semanas hasta unos 6 meses.^{61, 67, 68} Esta inmunidad a corto plazo no se extiende necesariamente a la protección heteróloga por Norovirus pudiendo ser susceptible a la infección 1-2 años más tarde.⁶⁹

Algunos estudios han demostrado que los individuos con títulos más elevados de anticuerpos séricos o de coproanticuerpos tienen más probabilidad de infectarse con Norovirus que las personas con concentraciones bajas de anticuerpos, este hecho se explica porque las personas sin anticuerpos frente a una cepa determinada de Norovirus no son genéticamente susceptibles a ella.⁶¹ También se observó que individuos que fueron sintomáticos podían re-infectarse cuando se les volvía a inocular Norovirus 27- 42 meses más tarde.⁸

La infección por Norovirus estimula una respuesta inmune de mucosa con producción de IgA específica presentando menor reacción cruzada entre genogrupos que la IgG.⁷⁰ El pico máximo de IgM es alrededor de 2 semanas después de la infección aumentando después de la re-exposición.⁷¹ Se ha observado que en cerdos al igual que los humanos la infección por GII de Norovirus provoca una predominante pero no exclusiva respuesta Th1.⁶⁵

La susceptibilidad del hospedador es importante en el desarrollo de la enfermedad, se ha demostrado que la infección depende de la presencia de antígenos de grupo histosanguíneo específicos, que actúan como receptores para el virus en el intestino de los hospedadores susceptibles. La combinación de la unión específica de cada cepa de Norovirus a receptores HBGA específicos y la expresión variable de los mismos puede explicar la distinta susceptibilidad a la infección, tanto en el contexto de brotes como en voluntarios sanos.^{8, 61}

Se sabe que Norovirus reconoce antígenos HBGA los cuales son una familia compleja de glucanos presentes en la superficie de células sanguíneas, en los epitelios intestinales y respiratorios y en secreciones biológicas, como la saliva y la leche.⁷²

La expresión de HBGA está regulada por varios genes que determinan la vía biosintética específica que establece los fenotipos ABO, Lewis y Secretor, la presencia o la ausencia de alelos de los genes, que codifican las enzimas FUT1, FUT2 y FUT3, que glucosilan de forma secuencial distintos precursores, determinan si un individuo es susceptible a la infección por una cepa determinada de Norovirus.⁸

El estado denominado “Secretor” depende de la expresión del gen que codifica la enzima α -1,2-fucosiltransferasa (FUT2) y determina la susceptibilidad a las infecciones por Norovirus. Las personas que son “no secretoras” (20% de los europeos) son resistentes a la infección por el virus Norwalk (GI.1).⁷³

Se ha observado que algunas cepas de Norovirus infectan sólo a un conjunto de la población humana y se han identificado ocho patrones distintos de HBGA que permiten la unión a diversos genotipos de Norovirus dentro de los genogrupos GI y GII, lo que hace posible que prácticamente todos los individuos sean susceptibles a la infección por alguna cepa de Norovirus. Aunque parece que los HBGA son esenciales para la infección, pueden existir otros receptores adicionales, o los Norovirus podrían unirse a otros hidratos de carbono no identificados todavía.⁷⁴

Antígenos de tipo histosanguíneo en cerdos: estudios en cerdos gnotobióticos demuestran la presencia de HBGA en saliva e intestino, así como la unión de cepas específicas de Norovirus humanos a estos antígenos. Por definición y a través de varios estudios se ha determinado que los cerdos pueden ser tipo sanguíneo A y tipo sanguíneo O utilizando el sistema de ABO de tipificación sanguínea.^{17, 66}

6.10 Diagnóstico

Durante los años 1970 y 1980, las pruebas para el diagnóstico de infecciones por Norovirus eran diseñadas utilizando reactivos provenientes de seres humanos infectados voluntariamente; sin embargo el número de partículas de virus en las heces de los sujetos era pequeño para producir sueros hiperinmunes en animales.⁷⁵

Hasta 1993, el único método disponible para diagnosticar las infecciones por Norovirus era la microscopía electrónica.⁸ La clonación molecular del genoma del virus Norwalk dio lugar a la comprensión de la virología molecular y epidemiología de Norovirus, una vez conocida la secuencia nucleotídica del genoma, la RT-PCR se convirtió en la técnica de referencia para su diagnóstico, pudiendo detectar Norovirus en muestras clínicas, ambientales, agua y alimentos.^{2, 3, 8}

Uno de los principales problemas para el diagnóstico de las infecciones por este agente al utilizar técnicas inmunológicas o moleculares es la alta diversidad genética y antigénica que presentan los Norovirus.^{20, 21, 76}

El desarrollo de métodos diagnósticos se ha visto obstaculizado por la falta de un sistema de cultivo; no obstante, recientemente, un sistema complejo de cultivo de células 3D que consiste en un modelo tri-dimensional fisiológicamente similar al epitelio del intestino delgado humano ha permitido el crecimiento de cepas de GI y GII de Norovirus humano pudiendo ser el comienzo de una nueva era para el desarrollo de herramientas diagnósticas, sin embargo estos resultados no se han reproducido en otros laboratorios.^{77, 78}

El diagnóstico actual del laboratorio se centra en la detección de antígenos virales y la respuesta de anticuerpos séricos. La microscopía electrónica (EM), el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), el PCR en tiempo real y las VLPs recombinantes son herramientas ampliamente utilizados para el diagnóstico de las infecciones por Norovirus.²¹

6.10.1 Microscopía Electrónica

El prototipo de los Norovirus, el virus Norwalk se detecto por inmuno microscopía electrónica (IEM).⁷⁹ La inmuno-microscopia no es una técnica muy sensible y tiene un límite de detección de 106 partículas por ml de heces.⁷⁵ La especificidad de IEM depende de la calidad del antisuero utilizado en los procedimientos experimentales, dentro de las desventajas se incluyen la necesidad de personal altamente calificado, los equipos son costosos, el tiempo requerido para examinar las muestras individualmente es prolongado; por lo tanto , no es un método práctico para la investigación de un gran número de muestras.^{80, 81}

6.10.2 RT – PCR

Actualmente el RT - PCR es el principal ensayo para la detección de Norovirus humanos y animales, aunque varios factores pueden afectan la sensibilidad y la especificidad de estos ensayos incluyendo la calidad de la muestra, los métodos utilizados para la extracción y purificación del ARN, los cebadores, entre otros.⁸²⁻⁸⁴

Los cebadores determinan la especificidad de las reacciones, el RT-PCR anidada tiene una sensibilidad de 10-1,000 veces más que los ensayos inmuno-enzimáticos y la microscopia, no obstante se corre un alto riesgo de contaminación.⁷⁵ Real-time RT - PCR es más sensible y se ha convertido en un método alternativo para la detección de pequeñas cantidades de virus, sobre todo a partir de muestras ambientales.⁸⁵

- 1. Extracción de ARN:** se debe considerar la eficiencia de la recuperación de ARN y la capacidad para eliminar los inhibidores, el método de extracción más aceptado para las muestras de heces es una mezcla de tiocianato de guanidinio (GTC), extracción con fenol y cloroformo y la precipitación del ARN por el alcohol.²¹
- 2. Los Primers o cebadores:** la diversidad genética entre Norovirus imposibilita desarrollar un par de cebadores universales capaces de detectar todas las cepas circulantes, la mayoría de los cebadores han sido diseñados sobre la región de la polimerasa (RdRp) la más conservada del genoma, sin embargo, análisis de la secuencia de la región de la polimerasa de una amplia gama de cepas de virus

indicó que esta región también es variable, con la identidad baja de nucleótidos 53% entre cepas de diferentes genogrupos y 60-64% dentro de los genogrupos.⁸⁶⁻⁸⁸

En general los cebadores están diseñados para detectar el gen de la ARN-polimerasa viral (región A) o el gen de la cápside (región C), los dos cebadores comúnmente utilizados para identificar el gen de la ARN-polimerasa son JV12Y (ATACCACTATGATGCAGAYTA) y JV13I (TCATCATCACCATAGAAIGAG).^{8, 89}

6.10.3 Real-time RT – PCR

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos en tiempo real como SybrGreen y TaqMan para la detección de Norovirus humanos.^{85, 90} En comparación con la RT-PCR convencional, el tiempo real es más sensible, más rápido y puede cuantificar la cantidad de ADN formado, también evita los pasos de confirmación como electroforesis en gel y la hibridación, se ha informado que PCR en tiempo real es 10.000 veces más sensible que la PCR convencional y el límite de detección es de 5 a 5×10^6 copias de ARN por reacción.^{91, 92}

6.10.4 Ensayos inmunoenzimáticos - ELISA

Un gran avance en la investigación de los Norovirus lo constituye la expresión de la proteína de la cápside en sistemas de expresión de proteínas, como en baculovirus o en el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), esta proteína se autoensambla en partículas virales sintéticas o VLPs (del inglés virus-like particles) con morfología y antigenicidad similares a las del virión infectivo.

Las VLPs expresadas mediante estos sistemas se han utilizado para producir antígenos y determinar la respuesta de anticuerpos. También se han empleado las VLPs como inmunógenos, con el fin de inmunizar animales y obtener sueros o anticuerpos monoclonales que reconozcan la partícula viral. Por último, las VLPs han servido para estudiar las interacciones entre las células susceptibles y el virus.⁸

Estos ensayos son altamente sensibles en comparación con microscopia electrónica, pero su uso en laboratorios de diagnóstico está limitado por la diversidad antigénica.

Los ELISA son útiles debido a su rapidez y simplicidad para el cribado de gran número de muestras.^{75, 93}

Los antígenos utilizados en el ELISA para la detección de Norovirus han demostrado ser sensible (límite de detección ~0.025 ng de proteína de la cápside), se ha observado que antisueros hiperinmune producido contra algunas VLPs son muy específicas en relación a cepas homólogas, por ejemplo: utilizando suero hiperinmune contra GII-3/Mexico no fue capaz de detectar VLPs derivadas de GII4/Grimsby y viceversa, esto se debe probablemente a que la región más variable (subdominio P2) está en la superficie de las VLPs y contiene los epítomos inmunodominantes que le confieren especificidad.^{94, 95}

Actualmente se han generado anticuerpos monoclonales (MAbs) ampliamente reactivos contra Norovirus GI y GII procedentes de ratones inmunizados por vía oral.⁹⁶ Los primeros MAbs reportados se obtuvieron a partir de ratones inmunizados con un solo tipo de VLP lo que significa que existen epítomos comunes entre los virus dentro del género Norovirus que pueden ser utilizados para desarrollar un ensayo de diagnóstico de reacción cruzada para la detección de otras cepas.^{96, 97}

Fases de optimización de un ELISA: Etapa de recubrimiento, bloqueo, lavado y detección de los complejos formados.

La Etapa de recubrimiento o sensibilización de la placa es crucial, la naturaleza hidrófoba del poliestireno permite la adsorción de los antígenos al pozo la cual tendrá lugar a un pH ligeramente por encima del punto isoeléctrico de las proteínas, la adsorción es óptima a pH 7 – 9. Tres tampones de recubrimiento son ampliamente utilizados: carbonato 50 mM pH 9,6, Tris 10 mM, pH 8,5, y PBS 10 mM pH 7,2.

El tiempo óptimo para asegurar una adsorción completa y baja variación entre pocillos es durante toda la noche (16-18 horas) a 4°C de temperatura con los pozos sellados para evitar la evaporación. El tiempo de adsorción se puede acelerar al incubar a temperatura de 37 °C entre 4-8 hrs. Sin embargo, no es recomendable a menos que se garantice una temperatura uniforme en toda la placa.

El antígeno de recubrimiento debe ser altamente purificado, preferiblemente hasta la homogeneidad, de otra manera la sensibilidad se reduce y el potencial de reactividad cruzada se incrementa.

Posterior al recubrimiento existen sitios hidrofóbicos desocupados en el plástico, estos sitios se deben bloquear para evitar la unión no específica de reactivos subsiguientes. Algunas proteínas (albúmina sérica bovina - BSA, leche en polvo sin grasa – NFDM, caseína o caseinato) son utilizadas como agentes de bloqueo capaces de cubrir todos los sitios desocupados hidrófobos e hidrófilos en la superficie del plástico y puede servir como agentes estabilizantes, evitando de este modo la desnaturalización.

Durante las incubaciones del ELISA se forman interacciones entre los reactivos para ello se debe lavar varias veces con el fin de eliminar el exceso de reactivos a un nivel de fondo indetectable. La solución de lavado consiste en un tampón que evite la desnaturalización de los complejos y preserve la actividad de la enzima. Tampones tales como PBS, TBS, o imidizol son ideales para esto, acompañado de un detergente de lavado como Tween 20 o Triton X-100 en concentraciones de 0,01% a 0,05%.

Para la detección de los complejos formados se utilizan enzimas que pueden convertir un sustrato de incoloro a un color, en un ELISA la enzima debe estar unida a una Inmunoglobulina (conjugado), existen muchas variedades de conjugados con HRP (peroxidasa de rabano picante) o bien, AP (fosfatasa alcalina).

Limitaciones del método: la técnica de ELISA proporciona información sobre la presencia de un analito pero no hay información en sus propiedades bioquímicas, tales como el peso molecular o su distribución espacial en un tejido.

6.10.5 Producción de partículas similares al virus VLPs

Los sistemas de expresión recombinantes se han usado ampliamente para facilitar la amplificación de la proteína de la cápside de Norovirus in vitro que luego se auto-ensambla espontáneamente en partículas similares a virus (VLP), las cuales son morfológica y antigénicamente indistinguible de la estructura mayor de la cápside que

es el principal determinante inmunogénico y antigénico de los virus naturales y pueden ser producidas en cantidades suficientes para ser caracterizadas y utilizadas como reactivos inmunológicos.⁹⁸

El sistema más utilizado para el desarrollo de VLPs es el sistema baculovirus, este sistema de expresión inicia mediante la transfección de ADN de tipo salvaje (ADN viral) y ADN del vector baculovirus, la transferencia contiene una copia de ADNc de un gen de la cápside de Norovirus. Las partículas de baculovirus que expresan con éxito la cápside se purifican y se utilizan para infectar células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), para expresar VLPs que se extraen en gradiente de sacarosa.⁷²

El procedimiento de síntesis de las VLPs involucra la amplificación por PCR de ORF2 y ORF3 de las cepas de Norovirus. Los fragmentos de PCR se insertan en un genoma lineal de Baculovirus para dar origen a un genoma de Baculovirus Recombinante el cual es transfectado en células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). El sobrenadante se examina utilizando inmunoblotting con anti-suero específico. Posteriormente las VLPs del sobrenadante de cultivo se concentran mediante ciclos de ultra-centrifugación y se purifican en gradiente de Cloruro de Cesio. La estructura de la cápside se confirma mediante microscopía electrónica. Estas VLPs son utilizadas como antígenos para sensibilizar las placas de ELISA.

6.10.6 Ensayos inmunocromatográficos

Debido a las dificultades técnicas, no se había desarrollado ninguna técnica inmunocromatográfica para el diagnóstico rápido de Norovirus; sin embargo, recientes publicaciones describen el desarrollo y la aplicación diagnóstica de métodos inmunocromatográficos estos trabajos demuestran niveles de sensibilidad cercanos al 100% y una especificidad del 75%, pudiendo diferenciar entre genorupos GI y GII; más recientemente utilizados para la detección de genotipos específicos circulantes (GII/3, GII/4, GII/6, GII/13, GII/15 y GII/16) durante brotes epidémicos.⁹⁹⁻¹⁰²

7. MATERIAL Y MÉTODO

Tipo de Estudio: Descriptivo de corte transversal

Población de Estudio: Estuvo conformada por cerdos sanos de todas las edades, razas y de ambos sexos de comunidades rurales de León (Lechecuagos, La Ceiba, El Convento, El Tololar, Monte Redondo) y Chinandega (La Virgen, Posoltega).

Periodo del estudio de campo: Mayo – Agosto 2012.

Muestra de estudio: Un total de 137 cerdos.

Muestreo: Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, para tener sujetos de estudio de todas las edades y de toda la comunidad.

Recolección de la información: la información fue obtenida a través de la entrevista realizada a los propietarios de los porcinos utilizando un cuestionario donde se registraron los datos epidemiológicos de interés. El peso y la raza de los porcinos fue suministrada por el veterinario colaborador del estudio.

Obtención y conservación de la muestra: Después de la autorización del dueño y del llenado de la ficha el veterinario procedió a la obtención de una muestra de sangre de la yugular; se tomaron 6 ml de sangre divididos en dos tubos vacutainer con y sin anticoagulante. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología de la UNAN-León en termos refrigerados entre 4-8 °C, una vez en el laboratorio fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para obtener el suero y plasma que se guardo en crioviales a -20 °C hasta ser analizadas.

Determinación del tipo sanguíneo de los cerdos:

Se procedió a determinar el tipo sanguíneo mediante el método de hemaglutinación en lamina utilizando el kit comercial de Cypress Diagnostics (REF. 403 LOT. 280311). Se colocaron 3 gotas de sangre en la lámina y se mezclaron con anticuerpos anti-A, anti-B y anti-D, respectivamente. La aglutinación franca con un anticuerpo dado indicó, la presencia del antígeno. La falta de aglutinación con anti-A o anti-B indicó tipo O.

Etapas para la estandarización del ELISA.

Antígeno. El antígeno utilizado fueron VLPs derivadas de Norovirus que infectan humanos, la VLP derivada de la cepa GII.4 (HS194/2009/US) fue proporcionada por la Dra. Linda J Saif de la Universidad Estatal de Ohio, EEUU, aislada de las heces de un infante con diarrea acuosa.¹⁰³ Las VLPs GII.3 (Chron1) aislada en las heces de un paciente inmunosuprimido que presentó diarrea crónica durante un año⁵⁶ y la VLP GII.4 (Dijon171/96) aislada de un niño en Francia durante el invierno de 1995-1996,¹⁰⁴ fueron proporcionadas por el Prof. Lennart Svensson de la Universidad de Linköping. La VLP (GII.4-Dijon), fue inicialmente desarrollada por el doctor E. Kohli de la Universidad de Burgundi, Dijon, Francia.¹⁰⁵

Reactividad del antígeno frente a sueros humanos: Un panel de 92 muestras de suero de adultos sanos del archivo del proyecto Link-Gastroenteritis, fue utilizado para evaluar la capacidad antigénica de las VLPs. Los sueros se diluyeron 1:200 con PBS, 7.4 y se consideraron positivos cuando las lecturas de Densidad Óptica (D.O) fueron \geq 0.200, como se recomienda en la referencia de Farkas y colaboradores.¹⁸

Concentración óptima de antígenos (VLPs). Las placas de ELISA NUNC Maxisorp de 96 pocillos (Sigma, M9410) fueron sensibilizadas por duplicado con las siguientes concentraciones del antígeno diluido en PBS, 7.4; 0.25 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g y 4 μ g.

Dilución óptima de la muestra. Para este propósito se utilizaron sueros positivos y sueros negativos, los cuales fueron diluidos como se describe a continuación: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 hasta 1:1,600.

Dilución óptima del conjugado. Para la detección del anticuerpo IgG porcino en suero, se utilizó un anticuerpo IgG anti-porcino de conejo conjugado con HRP (Sigma A-5670). Las diluciones ensayadas fueron las siguientes: 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000 y 1:256000.

Tiempo de reacción enzimática. El tiempo de reacción enzimática (desarrollo de color azul) dependiente de la reacción inmunológica fue definido utilizando sueros positivos, sueros negativos y PBS, se procedió a leer especto-fotográficamente la placa de ELISA en diferentes intervalos de tiempo en minutos (3', 6', 15', 20', 25', 30' y 35') así como visualmente tomando como referencia el control de PBS (blanco). Este método ha sido utilizado por otros investigadores, por que el tiempo de reacción puede depender, del tipo de sustrato, de la casa comercial que lo distribuye y del lote. El sustrato utilizado fue TMB de Sigma (T0440).

Detección de anticuerpos IgG anti- HuNoV en cerdos.

Este procedimiento se realizó mediante el ELISA “in house” estandarizado en este estudio. Las placas de ELISA se sensibilizaron con 100 µl de VLP 0.5 µg/ml diluida en PBS e incubación a 4°C durante la noche, en cámara húmeda. La placa se lavó por una vez con PBS-tween-20 al 0.05% y se bloqueó con PBS-BSA al 3% durante 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Después de 2 lavados con PBS-tween-20 al 0.05%, se agregaron 100 µl de suero diluido 1:200 con PBS por duplicado y se incubó durante 2 horas a 37°C. Después de 4 lavados se agregaron 100 µl de conjugado IgG anti-pig-HRP diluido 1:10000 con PBS-BSA-Tween, y se incubó a 37°C por 1h. Se lavó 4 veces, se agregaron 100 µl del sustrato de TMB y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción enzimática se detuvo con ácido sulfúrico 2N. Finalmente se obtuvieron lecturas de absorbancia a 450 nm con un filtro diferencial de 630nm. Se consideró la presencia de anticuerpos IgG si la Densidad Óptica era ≥ 0.200 .

Reacciones cruzadas entre diferentes VPLs.

Para investigar si los sueros porcinos reconocían alguna o todas las cepas derivadas de Norovirus humanos, todos los sueros fueron probados con cada una de las VLPs disponibles para este estudio. El ELISA se realizó siguiendo el procedimiento antes descrito, con la única variante que placas de ELISA independientes fueron sensibilizadas con VLPs derivadas de las cepas GII.4/HS194, GII.4/Dijon y GII.3/Chron1 respectivamente.

ELISA competitivo:

Para investigar si los anticuerpos IgG anti-Norovirus presentes en los sueros humanos ejercían algún efecto sobre el ELISA que detecta IgG anti-Norovirus en Porcinos se realizó un ensayo modificando los volúmenes de muestra como se describe en la siguiente tabla. También se investigó el proceso inverso, es decir, si los anticuerpos IgG anti-Norovirus presentes en los sueros porcinos ejercían algún efecto sobre el ELISA para detectar IgG anti-Norovirus en humanos.

Tabla 2. Esquematación del ELISA competitivo.

No. del pocillo	ELISA para detectar IgG anti-NoV en Porcinos		ELISA para detectar IgG anti-NoV en Humanos	
	Competencia con la IgG Porcina		Competencia con la IgG Humana	
	Suero Porcino 1:200	Suero Humano 1:200	Suero Humano 1:200	Suero Porcino 1:200
1	50 µl	0 µl + 50 µl PBS	50 µl	0 µl + 50 µl PBS
2	50 µl	10 µl + 40 µl PBS	50 µl	10 µl + 40 µl PBS
3	50 µl	20 µl + 30 µl PBS	50 µl	20 µl + 30 µl PBS
4	50 µl	30 µl + 20 µl PBS	50 µl	30 µl + 20 µl PBS
5	50 µl	40 µl + 10 µl PBS	50 µl	40 µl + 10 µl PBS
6	50 µl	50 µl + 0 µl PBS	50 µl	50 µl + 0 µl PBS

Consideraciones éticas:

- Antes de acceder a los domicilios se solicitó permiso y se explicó los objetivos del estudio a los dueños de los domicilios.
- Los datos del estudio son utilizados únicamente para fines investigativos y educativos.
- Durante el muestreo los cerdos fueron manejados por un médico veterinario, siguiendo las buenas prácticas para la toma de muestras en animales, establecidas en la Declaración Universal de los Derechos del Animal (1978) y ratificada en la Declaración universal sobre Bioética y Derechos Humanos (2005).

Análisis Estadístico.

Los datos de laboratorio y de la ficha epidemiológica fueron introducidos en una base de datos diseñada en el programa SPSS, Inc. Chicago IL. (Statistical Package for the Social Sciences) versión 15.0.1. Se calcularon las frecuencias y porcentajes y se realizó cruce entre variables epidemiológicas y variables de laboratorio. Los datos se tabularon y se utilizó la prueba de chi cuadrado (X^2) como medida de asociación a un nivel de confianza del 95% y $p < 0.05$. Los gráficos se realizaron en el programa Excel de Microsoft y los resultados se editaron en Microsoft Word, tablas y gráficos fueron utilizados para presentar los resultados obtenidos.

8. RESULTADOS

El presente estudio se realizó en dos fases, la primera fase consistió en estandarizar un método de detección de anticuerpos anti-Norovirus, ya que no existía una metodología disponible comercialmente. La siguiente fase consistió en la ejecución de un estudio de seroprevalencia en cerdos de comunidades rurales utilizando el método optimizado. Los resultados de ambas fases se describen a continuación.

Parámetros de estandarización del ELISA “in house”. La reactividad de los antígenos (VLPs) se confirmó utilizando un panel de 92 muestras de suero de adultos sanos con altos títulos ($D.O \geq 0.200$) de anticuerpos anti-Norovirus; el 99% de los sueros humanos reaccionaron ante los antígenos utilizados en este estudio, indicando alta reactividad del antígeno. La concentración óptima de VLPs para recubrir la placa de ELISA fue de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, a esta concentración se obtuvieron altas lecturas ($D.O \geq 0.200$) en sueros-positivos, muy bajas D.O en el PBS y bajo consumo del reactivo limitante (VLP). La dilución óptima del suero es 1:200, diluciones mayores de los sueros positivos muestran disminución de los valores de D.O; referente a los sueros negativos se observa a que una dilución 1:200 o mayor tuvieron D.O por debajo de 0.200 (Fig.1A). La dilución óptima del conjugado IgG anti-porcino-HRP fue de 1:10,000, a esta dilución las DO de los sueros negativos se acercan al cero, las lecturas de los sueros positivos sobrepasa el 0.200 de D.O y el consumo de este reactivo se reduce (Fig.1B). El tiempo óptimo de reacción entre la enzima (HRP) y el sustrato (TMB) es dependiente del cambio de color en el PBS, a los 20 minutos las lecturas de D.O del PBS se acercaban al cero, el control negativo tenía valores de $D.O \leq 0.200$ mientras que el control positivo sobrepasaban el 0.200 de D.O. (Fig.1C). En estas condiciones pudimos designar como valor de corte 0.200 de D.O.

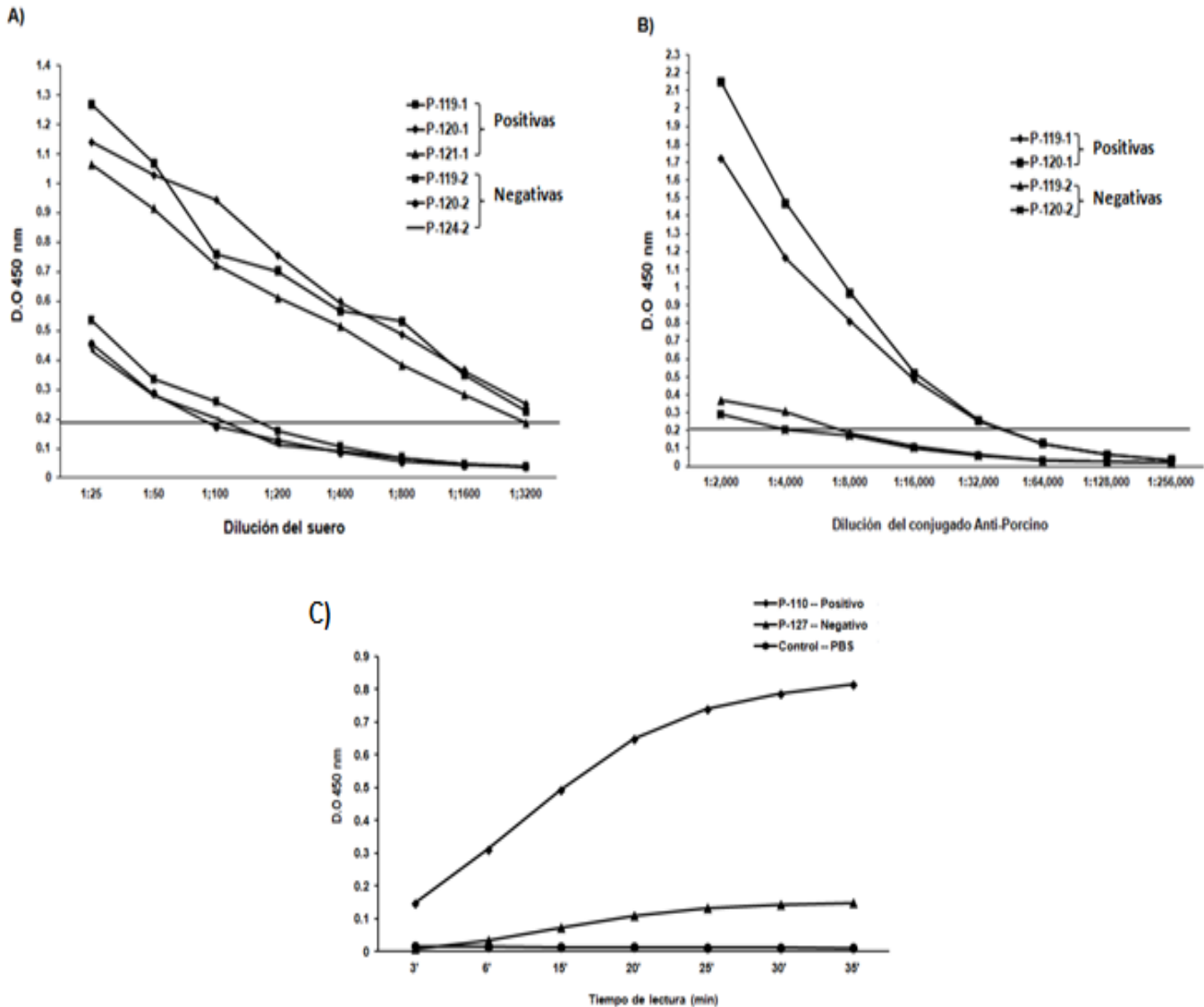


Fig.1. Estandarización del ELISA “in house”. **A)** Dilución óptima del suero. Las muestras cuyo código va seguido del número 1 o 2 representan sueros porcinos de tres días de nacidos y un mes de vida respectivamente. **B)** Dilución óptima del conjugado. La línea horizontal muestra el punto de corte a una densidad óptica de 0.200. **C)** Optimización del tiempo de revelado: se utilizó un anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa de rabano picante (HRP) y como sustrato tetrametil benzidime (TMB). Todas las muestras diluidas 1:200. fueron testadas frente a la VLPs derivada de la cepa humana GII.4/HS-194.

Perfil epidemiológico de la población porcina estudiada: Las edades de los 137 cerdos investigados en este estudio estuvieron comprendidas entre los 0 - 12 meses de vida, con una media de 6 meses (DS = 3.7). El grupo etario con mayor número (n = 48) de casos estudiados fue el 0 - 3 meses, y el grupo con menos casos (n = 24) fue el de 4-5 meses. En relación a la distribución por sexo, 58% (n = 80) fueron machos y 42% (n = 57) hembras. Todos los cerdos investigados fueron de la raza criolla. Según el modo de crianza se observó que únicamente el 12% de los porcinos fueron criados en chiqueros ubicados en el perímetro de las viviendas estudiadas, mientras que el resto se criaban libremente. La distribución según procedencia fue del 4% Posoltega, 10% La Ceiba, 13% El Tololar, 18% Lechecuagos, 18% El Convento y 37% Monte Redondo.

Seroprevalencia de IgG anti-Norovirus Humano en porcinos: Las prevalencias de anticuerpos anti-Norovirus en los 137 cerdos investigados en este estudio fueron 69% (n = 94), 70% (n = 96) y 58% (n = 80), contra GII.4/HS194, GII.4/Dijon y GII.3/Chron1 respectivamente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las seroprevalencias de cada una de las VLPs analizadas (Fig.2). En todas las cepas investigadas los cerdos con edades ≥ 10 meses presentaron el mayor número de casos positivos y el grupo con menos casos positivos fue el de ≤ 3 meses. Se observó una correlación positiva entre la edad y la seropositividad a todas las VLPs analizadas, así como una asociación estadística entre estas variables ($p=0.0001$) (Fig. 3). En lo referente al sexo la presencia de anticuerpos anti-Norovirus fue mayor en los machos que en las hembras, no observándose asociación estadísticamente significativa entre géneros ($p>0.05$), (Tabla 2). La mayor presencia de anticuerpos contra las tres cepas se obtuvo en Monte Redondo ($p=0.0001$) y la menor presencia fue en Posoltega. No se observó asociación estadística entre la presencia de anticuerpos anti-Norovirus y el modo de crianza de los porcinos ($p>0.05$).

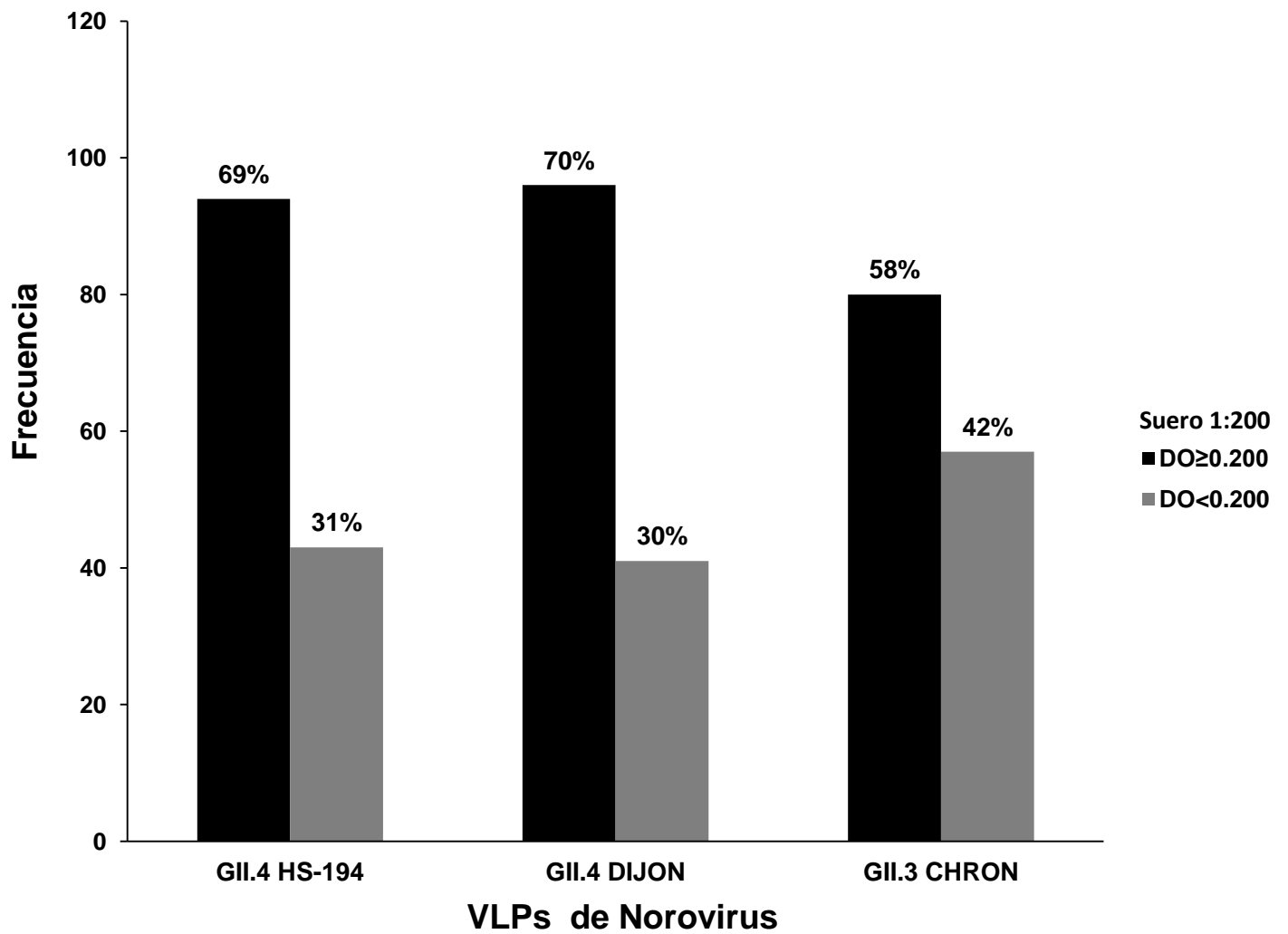


Figura. 2. Prevalencia de anticuerpos IgG anti-Norovirus humanos en porcinos. Las barras de color negro representan el porcentaje de sueros porcinos con valores de Densidad Óptica ≥ 0.200 a una dilución del suero 1:200 contra VLPs derivadas de cepas de Norovirus Humanos.

Tabla 2. Perfil seroepidemiológico según procedencia, sexo y ubicación de los porcinos en las viviendas frente VLPs derivadas de Norovirus Humanos.

Procedencia	Seroprevalencia			
		GII.4 HS-194	GII.4 DIJON	GII.3 CHRON
	Nº	Nº post (%)	Nº post (%)	Nº post (%)
Posoltega	5	0(0)	2(40)	2(40)
Lechecuagos	25	19(76)	18(72)	13(52)
La Ceiba	14	9(64)	8(57)	7(50)
El Convento §	25	14(56)	10(40)	9(36)
Monte Redondo §	50	42(84)	46(92)	42(84)
El Tololar	18	10(56)	12(67)	7(39)
Total	137	94(69)	96(70)	80(58)
Sexo*				
Hembra	57(42)	37(65)	42(74)	31(54)
Macho	80(58)	57(71)	54(68)	49(61)
Ubicación*				
Chiquero	17(12)	14(82)	12(71)	10(59)
Al aire libre	120(88)	80(67)	84(70)	70(58)

§ = valor de $p \leq 0.0002$

* = valor de $p \geq 0.05$

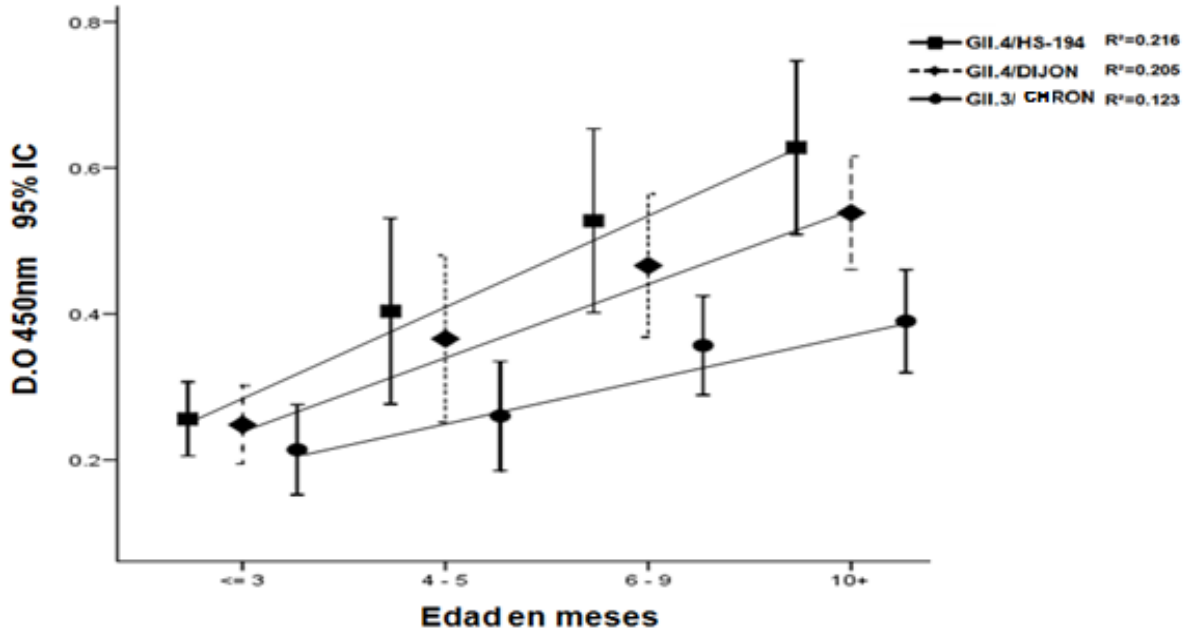


Figura. 3. Asociación entre valores de D.O. y la edad de los porcinos estudiados. El gráfico presenta las medias de las densidades ópticas (95%IC) de sueros porcinos frente a VLPs derivadas de Norovirus Humanos para cada grupo de edad; los sueros porcinos fueron testados a una dilución 1:200.

Seroconversión por exposición natural. Para investigar la adquisición pasiva y activa de anticuerpos anti-Norovirus, un total de 6 cerdos recién nacidos fueron investigados por 5 meses. Los datos revelan que al tercer día de nacidos, todos los cerditos evaluados tenían anticuerpos IgG anti-Norovirus. Sin embargo, dichos valores de anticuerpos (1:200, D.O. ≤ 0.200), no se observaron en muestras colectadas a los 34 días, pero después del segundo mes de vida los niveles de anticuerpos incrementan hasta alcanzar su máximo a los 5 meses (Fig. 4).

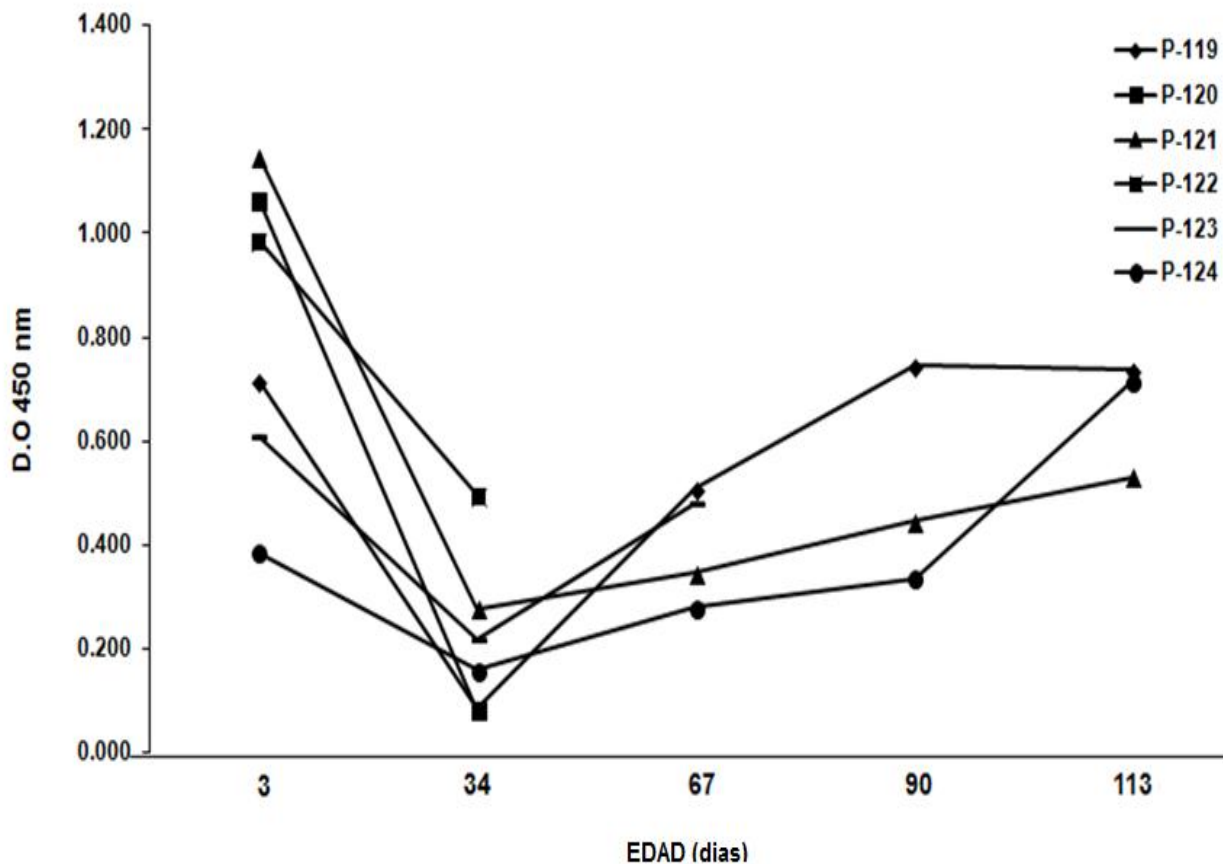


Figura. 4. Asociación entre anticuerpos IgG anti-Norovirus y días de nacidos de los porcinos. Los sueros de los porcinos se diluyeron 1:200 y se testaron frente a la cepa GII.4/HS-194.

Asociación entre la presencia de anticuerpos anti-Norovirus y la frecuencia del tipo sanguíneo. Las frecuencias de ABO en los 137 cerdos investigados fue: 53% (n = 72), 47% (n = 65) y 0% para los tipos O, A y B, respectivamente. Se observó una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre la frecuencias de tipo sanguíneo y la presencia de anticuerpos anti-Norovirus. El 76%, 79% y 68% de cerdos con tipo sanguíneo O presento anticuerpos IgG anti-norovirus en comparación con 60%, 60% y 48% de los cerdos tipo sanguíneo A contra GII.4/HS194, GII.4/Dijon y GII.3/Chron1 respectivamente. (Tabla 3).

Tabla 3. Relación entre la presencia anticuerpos IgG anti-Norovirus humanos y el tipo sanguíneo de los porcinos estudiados.

Tipo sanguíneo	Seroprevalencia						
	GII.4 HS-194		GII.4 DIJON		GII.3 CHRON		
	Nº	Nº post (%)	p	Nº post (%)	p	Nº post (%)	p
O	72	55(76)	<0.03	57(79)	<0.01	49(68)	<0.01
A	65	39(60)		39(60)		31(48)	
B	0(0)	0(0)	---	0(0)	---	0(0)	---
AB	0(0)	0(0)	---	0(0)	---	0(0)	---
Total	137	94(69)	---	96(70)	---	80(58)	

Efecto de competencia entre sueros humanos y porcinos. EL suero de personas con anticuerpos anti-Norovirus no inhibe el ELISA para la detección de anticuerpos anti-Norovirus en cerdos observándose un ligero aumento en los valores de D.O al incrementar los volúmenes de suero humano (Fig. 5A). En el proceso inverso los datos muestran que las D.O de sueros humanos disminuyen cuando se agrega 10% de suero porcino, y dicha disminución se mantiene con el incremento de los porcentajes. (Efecto de saturación). (Fig. 5B).

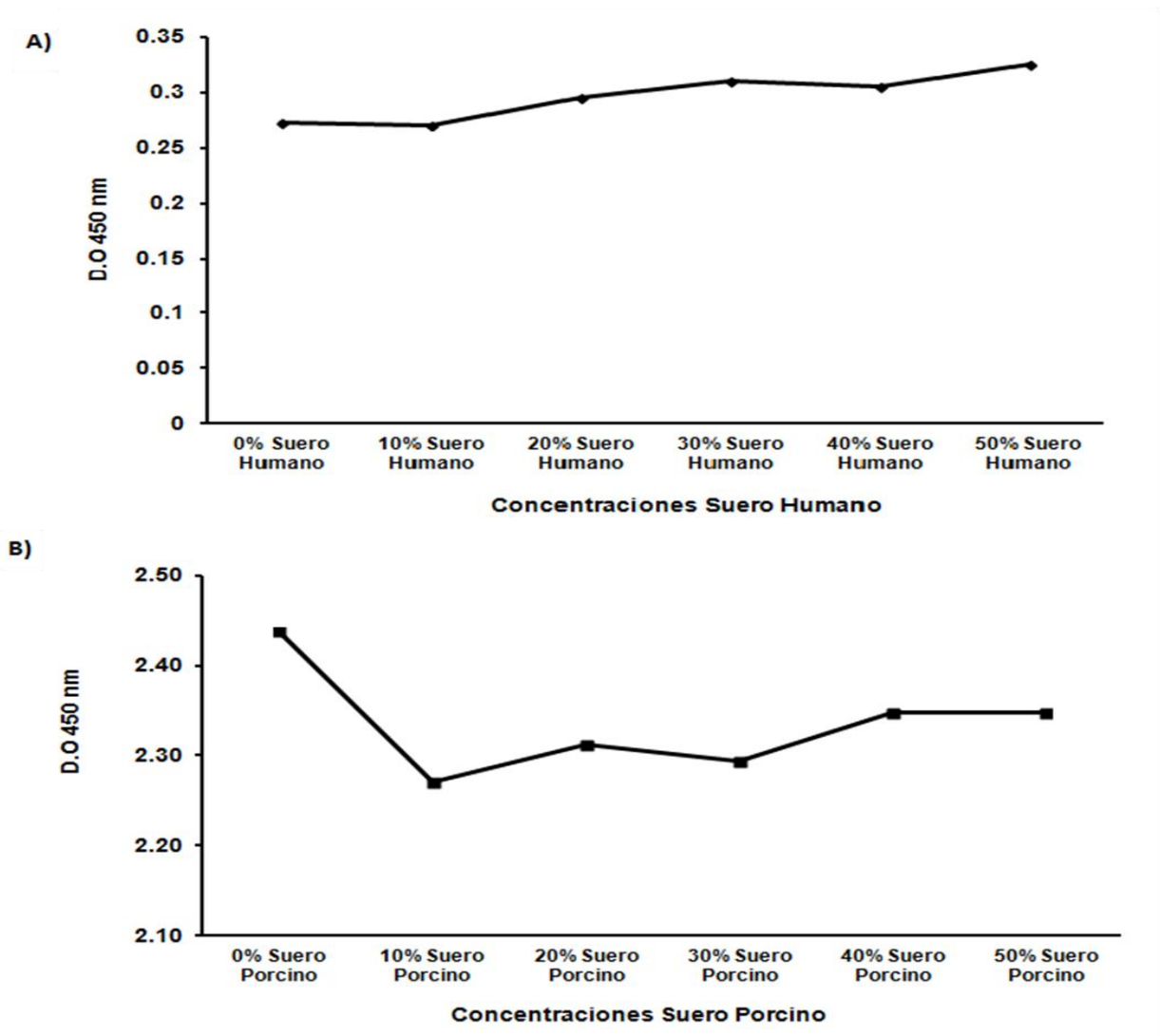


Figura. 5. ELISA competitivo de anticuerpos IgG anti-Norovirus porcino utilizando suero Humano y viceversa. **A)** Evaluación del efecto de competencia utilizando suero humano a un volumen constante de suero porcino. **B)** Evaluación del efecto de competencia utilizando suero porcino a un volumen constante de suero humano. Los sueros se diluyeron 1:200 y se utilizó como antígeno la VLP GII.4/HS-194.

9. DISCUSIÓN

Algunos estudios han relacionado genéticamente Norovirus humanos y porcinos, pero la relación antigénica entre Norovirus que infectan diferentes especies ha sido muy poco estudiada. Los Norovirus porcinos se clasifican en el genogrupo GII donde se agrupan la mayoría de las cepas de Norovirus que infectan humanos, indicando que las cepas porcinas y humanas comparten entre el 60% y 81% de homología a nivel del gen de la cápside.^{11, 12, 18}

Con el propósito de investigar si los cerdos de áreas rurales de dos departamentos del país presentaban anticuerpos contra Norovirus de humanos se estandarizó un método inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) capaz de detectar anticuerpos IgG anti-Norovirus en muestras de suero porcinos. Los experimentos de optimización se basaron en la determinación de la concentración del antígeno de recubrimiento (0.5 µg/ml de VLPs), la dilución del suero (1:200) y conjugado (1:10,000) así como el tiempo óptimo de reacción enzimática (20 min). El propósito de optimizar estos parámetros es que permiten disponer de una metodología diagnóstica capaz de proporcionar datos confiables y comparables con datos de otros estudios similares, tal como el realizado por Farkas y colaboradores en cerdos provenientes de granjas de Estados Unidos y Japón. Además este tipo de metodología se puede utilizar en estudios clínicos para evaluar la eficacia de las vacunas anti-Norovirus o los candidatos a vacunas que están en proceso de desarrollo.

Entre las ventajas de utilizar un ensayo inmunoenzimático podemos destacar que son herramientas de fácil ejecución con resultados rápidos y reproducibles, algunas investigaciones han utilizado este formato para determinar la seroprevalencia de Norovirus, por ejemplo en Nicaragua se encontró que el 62% de personas provenientes de diferentes partes del país tenían anticuerpos contra la cepa GII.3 (VLP).¹⁴ También se ha utilizado para determinar la presencia de anticuerpos IgA e IgG anti Norovirus (Norwalk) en saliva y suero respectivamente.¹⁰⁶ Sin embargo, la utilización de estos ensayos es limitado, pocos laboratorios tienen la capacidad, el personal entrenado y equipamiento para desarrollar las partículas virales sintéticas.

Una vez estandarizado el ELISA se procedió a determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-Norovirus en cerdos. Este estudio describe por primera vez la presencia de anticuerpos porcinos que reconocen cepas de Norovirus humanos en cerdos criados artesanalmente en Nicaragua. Los datos revelan que el 69% de los sueros evaluados reconocen la cepa GII.4 (HS194/2009/US), aislada de un niño con diarrea acuosa en EEUU. También se observó que el 70% de estos mismos sueros reconocen la cepa GII.4 (Dijon171/96) aislada de un niño en Francia. Se observó también que el 58% de los sueros porcinos estudiados presentaban anticuerpos contra la cepa GII.3 (Chron1), aislada de un paciente Sueco con diarrea crónica e inmunosuprimido. Estos datos se relacionan con los reportados por Farkas y colaboradores, donde el 63% de los cerdos estudiados procedentes de EEUU presentaron anticuerpos contra VLPs derivada de la cepa Norwalk (GI.1) y el 52% de los mismos sueros presentaron anticuerpos frente a la cepa Hawaii (GII.1), ambas cepas fueron aisladas de niños con diarrea.¹⁸ Las cepas de Norovirus utilizadas en nuestro estudio pertenecen al genotipo GII.4 las cuales son responsables de dominar los brotes epidémicos a nivel mundial y la cepa GII.3 la cual infecta a las personas independientemente del estado de secretor.¹⁰⁷ En comparación, con las cepas utilizadas en el estudio de Farkas y colaboradores, donde se utilizaron cepas Norwalk y Hawaii la cuales han causado brotes epidémicos esporádicos.

En países subdesarrollados donde los cerdos tienen constante contacto con los humanos este tipo de estudio no se había realizado, nuestros hallazgos demuestran anticuerpos anti-Norovirus humanos en cerdos provenientes de la comunidad donde las condiciones sanitarias, culturales y ambientales juegan un papel importante en la interacción entre cepas humanas y animales, debemos recordar que en nuestro medio las familias que habitan en las comunidades utilizan la crianza artesanal de cerdos como abono a sus economías existiendo familias que se dedican completamente a esta actividad.

Interesantemente la seroprevalencia frente a todas las VLPs utilizadas en este estudio es alta. Sugiriendo el desarrollo de una respuesta inmune por parte de los cerdos contra cepas de Norovirus humanos. En apoyo a esta sugerencia experimentos en

cerdos libres de gérmenes, han demostrado que dichos cerdos se infectan con Norovirus humanos y desarrollan diarrea e inmunidad.¹⁶ Otra explicación de la alta prevalencia es la reacción cruzada que pueda existir entre cepas de Norovirus humanos y porcinos. Siendo posible que la mayoría de los anticuerpos detectados en este estudio sean el resultado de las respuestas heteróloga contra diferentes tipos antigénicos.¹⁰⁸ Es decir, que anticuerpos presentes en los sueros porcinos reconozcan sitios antigénicos en los Norovirus humanos y no sean producto de una respuesta inmune de tipo específica. Para verificar esta hipótesis sería necesario realizar ensayos de inhibición utilizando VLPs derivadas de cepas porcinas.

Para investigar el posible efecto de competencia entre sueros humanos y porcinos, se realizaron análisis en un ELISA de competencia, las observaciones obtenidas en este estudio demuestran que los anticuerpos en el suero humano no ejercen ningún efecto de competencia sobre el suero porcino, suponemos que se debe a que los anticuerpos porcinos y humanos reconocen sitios antigénicos diferentes en la VLPs. En el proceso inverso se observó que los sueros porcinos ejercían un ligero efecto de competencia (lecturas de D.O) sobre los sueros humanos. Podemos, especular entonces que una porción de anticuerpos porcinos compiten por sitios antigénicos que también son reconocidos por anticuerpos humanos. En apoyo a esta hipótesis de reacción cruzada, algunos estudios con anticuerpos monoclonales (MAbs) indican reactividad cruzada entre genogrupos y genotipos de Norovirus que infectan humanos. Dichos epítopes son regiones conservadas en la parte C-terminal del subdominio P1 de la cápside.¹⁰⁸ También se ha demostrado que MAbs reconocen un epítotope lineal localizado en el interior de la cápside de diferentes Norovirus, mostrando que este epítotope (residuos 52-56) es altamente conservado entre los Norovirus humanos.¹⁰⁹ Otra posible explicación se deriva del constante contacto entre humanos y cerdos como resultado de las condiciones de crianza que se presentan en las comunidades, con lo que cepas humanas de Norovirus podrían infectar a los porcinos permitiendo en estos el desarrollo de una respuesta inmunológica.

Otro resultado relevante de este estudio es la correlación positiva que se observó entre la edad y la seropositividad a todas las VLPs analizadas ($p=0.0001$) lo que sugiere

que, a mayor edad, mayor es el tiempo de exposición a cepas humanas o porcinas y mayor probabilidad de encontrar anticuerpos frente a estas. Sin embargo nuestro estudio no tiene el alcance para indicar si la exposición es a Norovirus Humanos o porcinos.

Con el propósito de comprender la adquisición de anticuerpos de manera pasiva y activa se investigaron 6 cerditos por 5 meses demostrándose seroconversión por exposición natural, es decir la aparición de anticuerpos después del destete. Los datos revelan que al tercer día de nacidos, todos los cerditos evaluados tenían anticuerpos IgG anti-Norovirus procedente de la leche materna, por que en los cerdos la transferencia de IgG es por un mecanismo de absorción de inmunoglobulinas a nivel intestinal, a diferencia de los humanos que es transplacentaria.⁶⁶ Sin embargo estos anticuerpos transferidos desaparecen después del destete, como se observa en la figura 4. Después del segundo mes de vida aparecen anticuerpos producto de la infección natural y se incrementan sus valores en el tiempo, esta observación se puede explicar por la infección de los porcinos por cepas de Norovirus y el desarrollo de una respuesta inmune en el cerdo.

Estudios recientes han relacionado las infecciones por Norovirus con antígenos de grupo histosanguíneos (HBGAs) presentes en el hospedero humano, además se ha sugerido que estos HBGAs son receptores virales o factores intervinientes en la interacción virus – huésped. Dichos HBGAs son: antígeno H que define el estado de secretor, antígenos del sistema ABO y antígeno de Lewis.^{14, 18} Estudios sobre patogénesis de Norovirus utilizando cerdos libres de gérmenes han encontrado que los cerdos expresan HBGAs similares a los expresados en humanos, sugiriendo que los cerdos potencialmente pueden infectarse con Norovirus humanos.¹⁶ Para investigar la asociación entre la presencia de HBGAs y anticuerpos anti-Norovirus se determinó la frecuencia de los tipos sanguíneos en los cerdos y se asociaron con la presencia de anticuerpos IgG anti-Norovirus, los tipos sanguíneos prevalentes fueron O y A, la bibliografía refiere que los porcinos no presentan ningún otro tipo sanguíneo además de los encontrados en este estudio.⁶⁶ Se observó también una asociación estadística significativa entre el tipo sanguíneo O y la presencia de anticuerpos anti Norovirus

frente a todas las cepas evaluadas ($P < 0.05$). La misma asociación fue reportada por Hutson y colaboradores después de infectar con Norovirus a voluntarios humanos, sus datos revelaron que las personas con tipo sanguíneo O tenían una alta probabilidad ($OR = 11.8$) de infectarse en comparación con los otros tipos sanguíneos.¹¹⁰ Estas observaciones sugieren que la infección porcina con cepas humanas de Norovirus es probable.

En síntesis la mayoría de los cerdos evaluados presentaron anticuerpos anti-Norovirus humanos, los cuales pueden ser producto de reacción cruzada. No obstante la estrecha relación genética entre cepas de Norovirus humanos y porcinos junto con la presencia de antígenos de grupo histosanguíneos en cerdos, similares a los expresados en humanos plantea la posibilidad que los cerdos sean reservorios de Norovirus humanos. No obstante la confirmación del potencial zoonótico de los cerdos en las infecciones por Norovirus requiere del aislamiento de cepas de Norovirus genéticamente similares a las cepas humanas o la identificación de cepas porcinas en humanos (homología $> 95\%$).

10. CONCLUSIONES

- Se estandarizó un ensayo inmunoenzimático ELISA capaz de detectar anticuerpos IgG anti-Norovirus humanos en sueros porcinos. Esta metodología puede ser utilizada en estudios seroepidemiológicos en animales y humanos, especialmente para la evaluación de estudios con vacunas.
- Los datos revelan que el 69% de los sueros evaluados reconocen la cepa GII.4 (HS194/2009/US), aislada de un niño con diarrea acuosa en EEUU. También se observó que el 70% de estos mismos sueros reconocen la cepa GII.4 (Dijon171/96) aislada de un niño en Francia. Así mismo el 58% de los sueros porcinos estudiados presentaban anticuerpos contra la cepa GII.3 (Chron1), aislada de un paciente Sueco con diarrea crónica.
- Existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de anticuerpos IgG Anti-Norovirus humanos y la edad de los porcinos estudiados ($p=0.0001$).
- Las frecuencias de seroprevalencia de los cerdos tipo O contra las cepas GII.4/HS194, GII.4/Dijon y GII.3/Chron1 fueron 76%, 79% y 68%, respectivamente. Mientras que en los cerdos tipo A las seroprevalencias contra las mismas cepas fueron del 60%, 60% y 48%, respectivamente, observándose una asociación estadística ($p < 0.05$).

11. RECOMENDACIONES

- Ensayar todas las muestras porcinas frente a VLPs derivadas de Norovirus que infectan cerdos a fin de obtener una seroprevalencia de Norovirus porcino.
- Realizar un estudio que permita determinar antígenos de grupo histoanguíneos Lewis y estatus de secretor en los porcinos y asociarlos con la presencia de anticuerpos anti-Norovirus humanos y porcinos.
- Realizar un estudio epidemiológico molecular en cerdos con el propósito de detectar Norovirus porcinos e investigar la asociación genética entre cepas provenientes de ambas especies.

12. REFERENCIAS

1. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterology clinics of North America*. 2006 Jun;35:275-90.
2. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus Gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*. 2009;361:1776-85.
3. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: A comprehensive review. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;44:1-8.
4. Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging infectious diseases*. 2008 Aug;14:1224-31.
5. Bucardo F, Lindgren PE, Svensson L, Nordgren J. Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. *PloS one*. 2011;6:e25962.
6. Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Paniagua M, Lindgren PE, Espinoza F, et al. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Aug;46:2573-80.
7. Bucardo F, Reyes Y, Svensson L, Nordgren J. Predominance of norovirus and sapovirus in nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. *PloS one*. 2014;9:e98201.
8. Fernandez JM, Gomez JB. Infecciones por norovirus. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2010 Jan;51-5.
9. Marshall JA, Bruggink LD. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. *International journal of environmental research and public health*. 2011 Apr;8:1141-9.
10. Wolf S, Williamson W, Hewitt J, Lin S, Rivera-Aban M, Ball A, et al. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Veterinary microbiology*. 2009 Jan 1;133:184-9.
11. Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerging infectious diseases*. 2005 Dec;11:1874-81.
12. Mattison K, Shukla A, Cook A, Pollari F, Friendship R, Kelton D, et al. Human noroviruses in swine and cattle. *Emerging infectious diseases*. 2007 Aug;13:1184-8.
13. Green KY, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ, Estes MK. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *Journal of clinical microbiology*. 1993 Aug;31:2185-91.
14. Bucardo F, Kindberg E, Paniagua M, Grahn A, Larson G, Vildevall M, et al. Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. *Journal of medical virology*. 2009 Apr;81:728-35.
15. Scipioni A, Mauroy A, Vinje J, Thiry E. Animal noroviruses. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 2008 Oct;178:32-45.

16. Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *Journal of virology*. 2006 Nov;80.10372-81.
17. Cheetham S, Souza M, McGregor R, Meulia T, Wang Q, Saif LJ. Binding patterns of human norovirus-like particles to buccal and intestinal tissues of gnotobiotic pigs in relation to A/H histo-blood group antigen expression. *Journal of virology*. 2007 Apr;81.3535-44.
18. Farkas T, Nakajima S, Sugieda M, Deng X, Zhong W, Jiang X. Seroprevalence of noroviruses in swine. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Feb;43.657-61.
19. Bank-Wolf BR, Konig M, Thiel HJ. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Veterinary microbiology*. 2010 Jan 27;140.204-12.
20. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 2006 Mar 15;346.312-23.
21. Wang QH, Costantini V, Saif LJ. Porcine enteric caliciviruses: genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine*. 2007 Jul 26;25.5453-66.
22. Sugieda M, Nakajima S. Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus "Norwalk-like viruses". *Virus research*. 2002 Aug;87.165-72.
23. Guadagnucci Morillo S, Sampaio Tavares Timenetsky MD. Norovirus: an overview. *Revista da Associação Médica Brasileira (1992)*. 2011 July - August;57.462-7. Norovirus: uma visão geral.
24. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *The EMBO journal*. 2003 Jun 2;22.2852-9.
25. Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *Journal of virology*. 2003 Oct;77.10957-74.
26. Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS microbiology letters*. 2005 Dec 1;253.1-8.
27. Chen R, Neill JD, Noel JS, Hutson AM, Glass RI, Estes MK, et al. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *Journal of virology*. 2004 Jun;78.6469-79.
28. Tan M, Hegde RS, Jiang X. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *Journal of virology*. 2004 Jun;78.6233-42.
29. Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of virology*. 2003 Nov;77.11603-15.
30. Smith DB, McAllister J, Casino C, Simmonds P. Virus 'quasispecies': making a mountain out of a molehill? *The Journal of general virology*. 1997 Jul;78 (Pt 7).1511-9.
31. Xerry J, Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Allen DJ, Gray JJ. Transmission events within outbreaks of gastroenteritis determined through analysis of nucleotide sequences

- of the P2 domain of genogroup II noroviruses. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Mar;46:947-53.
32. Bull RA, White PA. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends in microbiology*. 2011 May;19:233-40.
33. Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *Journal of virology*. 2003 Jan;77:405-15.
34. Souza M, Costantini V, Azevedo MS, Saif LJ. A human norovirus-like particle vaccine adjuvanted with ISCOM or mLT induces cytokine and antibody responses and protection to the homologous GII.4 human norovirus in a gnotobiotic pig disease model. *Vaccine*. 2007 Dec 5;25:8448-59.
35. Shen Q, Zhang W, Yang S, Cui L, Hua X. Complete genome sequence of a new-genotype porcine norovirus isolated from piglets with diarrhea. *Journal of virology*. 2012 Jun;86:7015-6.
36. Domingo E, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Martin-Hernandez AM, Saiz JC, Escarmis C. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerging infectious diseases*. 1998 Oct-Dec;4:521-7.
37. Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Shinohara M, Kato M, Fukuda S, et al. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Applied and environmental microbiology*. 2003 Oct;69:5782-6.
38. Costantini V, Loisy F, Joens L, Le Guyader FS, Saif LJ. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Applied and environmental microbiology*. 2006 Mar;72:1800-9.
39. Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN, et al. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--United States, 2002. *The Journal of infectious diseases*. 2004 Jul 1;190:27-36.
40. Dolin R. Noroviruses — Challenges to Control. *New England Journal of Medicine*. 2007;357:1072-3.
41. Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *The Journal of infectious diseases*. 2000 May;181 Suppl 2:S284-7.
42. Bruggink LD, Marshall JA. The incidence of norovirus-associated gastroenteritis outbreaks in Victoria, Australia (2002-2007) and their relationship with rainfall. *International journal of environmental research and public health*. 2010 Jul;7:2822-7.
43. Kaplan JE, Schonberger LB, Varano G, Jackman N, Bied J, Gary GW. An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home. Demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *American journal of epidemiology*. 1982 Dec;116:940-8.
44. Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends in microbiology*. 2004 Jun;12:279-87.
45. Tu ET, Bull RA, Kim MJ, McIver CJ, Heron L, Rawlinson WD, et al. Norovirus excretion in an aged-care setting. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Jun;46:2119-21.
46. Garcia C, DuPont HL, Long KZ, Santos JI, Ko G. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Aug;44:2997-3000.

47. de Wit MAS, Koopmans MPG, Kortbeek LM, Wannet WJB, Vinjé J, van Leusden F, et al. Sensor, a Population-based Cohort Study on Gastroenteritis in the Netherlands: Incidence and Etiology. *American journal of epidemiology*. 2001 October 1, 2001;154.666-74.
48. Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *The Journal of infectious diseases*. 1994 Jul;170.34-43.
49. Lopman BA, Adak GK, Reacher MH, Brown DW. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerging infectious diseases*. 2003 Jan;9.71-7.
50. Turcios-Ruiz RM, Axelrod P, St John K, Bullitt E, Donahue J, Robinson N, et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *The Journal of pediatrics*. 2008 Sep;153.339-44.
51. Chadwick PR, Beards G, Brown D, Caul EO, Cheesbrough J, Clarke I, et al. Management of hospital outbreaks of gastro-enteritis due to small roundstructured viruses. *The Journal of hospital infection*. 2000 May;45.1-10.
52. Simon A, Schildgen O, Maria Eis-Hubinger A, Hasan C, Bode U, Buderus S, et al. Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2006 Jun;41.693-9.
53. Kaufman SS, Chatterjee NK, Fuschino ME, Magid MS, Gordon RE, Morse DL, et al. Calicivirus enteritis in an intestinal transplant recipient. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003 Jun;3.764-8.
54. Vashist S, Bailey D, Putics A, Goodfellow I. Model systems for the study of human norovirus Biology. *Future virology*. 2009 Jul;4.353-67.
55. Takanashi S, Saif LJ, Hughes JH, Meulia T, Jung K, Scheuer KA, et al. Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. *Archives of virology*. 2013 Aug 23.
56. Rydell GE, Nilsson J, Rodriguez-Diaz J, Ruvoen-Clouet N, Svensson L, Le Pendu J, et al. Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology*. 2009 Mar;19.309-20.
57. Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N. Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *Journal of virology*. 2004 Apr;78.3817-26.
58. Le Pendu J, Ruvoen-Clouet N, Kindberg E, Svensson L. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Seminars in immunology*. 2006 Dec;18.375-86.
59. Chaudhry Y, Nayak A, Bordeleau ME, Tanaka J, Pelletier J, Belsham GJ, et al. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Sep 1;281.25315-25.
60. Daughenbaugh KF, Wobus CE, Hardy ME. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology journal*. 2006;3.33.
61. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *The New England journal of medicine*. 1977 Jul 14;297.86-9.
62. Agus SG, Dolin R, Wyatt RG, Tousimis AJ, Northrup RS. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. *Histologic and enzymatic*

alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Annals of internal medicine*. 1973 Jul;79:18-25.

63. Dolin R, Levy AG, Wyatt RG, Thornhill TS, Gardner JD. Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response. *The American journal of medicine*. 1975 Dec;59:761-8.

64. Saif LJ, Ward LA, Yuan L, Rosen BI, To TL. The gnotobiotic piglet as a model for studies of disease pathogenesis and immunity to human rotaviruses. *Archives of virology Supplementum*. 1996;12:153-61.

65. Souza M, Cheetham SM, Azevedo MS, Costantini V, Saif LJ. Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). *Journal of virology*. 2007 Sep;81:9183-92.

66. Tizard. *Inmunologia Veteinaria* 6ta ed. Mc Graw Hill 2002.

67. Blacklow NR, Herrmann JE, Cubitt WD. Immunobiology of Norwalk virus. *Ciba Foundation symposium*. 1987;128:144-61.

68. Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *The Journal of infectious diseases*. 1990 Jan;161:18-21.

69. Matsui SM, Greenberg HB. Immunity to calicivirus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2000 May;181 Suppl 2:S331-5.

70. Lindesmith L, Moe C, Lependu J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *Journal of virology*. 2005 Mar;79:2900-9.

71. Iritani N, Seto T, Hattori H, Natori K, Takeda N, Kubo H, et al. Humoral immune responses against norovirus infections of children. *Journal of medical virology*. 2007 Aug;79:1187-93.

72. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nature reviews Microbiology*. 2010 Mar;8:231-41.

73. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature medicine*. 2003 May;9:548-53.

74. Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, Rydell GE, Lidon MF, Montava R, et al. The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 Norovirus infection. *PloS one*. 2009;4:e5593.

75. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical microbiology reviews*. 2001 Jan;14:15-37.

76. Smiley JR, Hoet AE, Traven M, Tsunemitsu H, Saif LJ. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Jul;41:3089-99.

77. Straub TM, Honer zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, et al. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging infectious diseases*. 2007 Mar;13:396-403.



78. Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *The Journal of general virology*. 2004 Jan;85:79-87.

79. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of virology*. 1972 Nov;10:1075-81.
80. Riepenhoff-Talty M, Barrett HJ, Spada BA, Ogra PL. Negative staining and immune electron microscopy as techniques for rapid diagnosis of viral agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1983;420:391-400.
81. Lewis DC. Three serotypes of Norwalk-like virus demonstrated by solid-phase immune electron microscopy. *Journal of medical virology*. 1990 Jan;30:77-81.
82. van Der Poel WH, Vinje J, van Der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MP. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerging infectious diseases*. 2000 Jan-Feb;6:36-41.
83. Yin Y, Tohya Y, Ogawa Y, Numazawa D, Kato K, Akashi H. Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. *Archives of virology*. 2006 Sep;151:1749-59.
84. Kim HJ, Cho HS, Cho KO, Park NY. Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses. *Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health*. 2006 May;53:155-9.
85. Pang X, Lee B, Chui L, Preiksaitis JK, Monroe SS. Evaluation and validation of real-time reverse transcription-pcr assay using the LightCycler system for detection and quantitation of norovirus. *Journal of clinical microbiology*. 2004 Oct;42:4679-85.
86. Vinje J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DW, Koopmans MP. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Archives of virology*. 2000;145:223-41.
87. Wang QH, Chang KO, Han MG, Sreevatsan S, Saif LJ. Development of a new microwell hybridization assay and an internal control RNA for the detection of porcine noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR. *Journal of virological methods*. 2006 Mar;132:135-45.
88. Le Guyader F, Estes MK, Hardy ME, Neill FH, Green J, Brown DW, et al. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Archives of virology*. 1996;141:2225-35.
89. Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol*. 2002 Aug;25:233-5.
90. Jothikumar N, Lowther JA, Henshilwood K, Lees DN, Hill VR, Vinje J. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Applied and environmental microbiology*. 2005 Apr;71:1870-5.
91. Gunson RN, Carman WF. Comparison of two real-time PCR methods for diagnosis of norovirus infection in outbreak and community settings. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Apr;43:2030-1.
92. Richards GP, Watson MA, Fankhauser RL, Monroe SS. Genogroup I and II noroviruses detected in stool samples by real-time reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers. *Applied and environmental microbiology*. 2004 Dec;70:7179-84.

93. Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barrett E, et al. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *The Journal of infectious diseases*. 2000 May;181 Suppl 2.S349-59.
94. Jiang X, Wang J, Estes MK. Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. *Archives of virology*. 1995;140.363-74.
95. Hale AD, Crawford SE, Ciarlet M, Green J, Gallimore C, Brown DW, et al. Expression and self-assembly of Grimsby virus: antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1999 Jan;6.142-5.
96. Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N, Ciarlet M, Jiang X, Takeda N, et al. Identification of an epitope common to genogroup 1 "norwalk-like viruses". *Journal of clinical microbiology*. 2000 Apr;38.1656-60.
97. Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *Journal of clinical microbiology*. 2004 Jun;42.2587-95.
98. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of virology*. 1992 Nov;66.6527-32.
99. Thongprachum A, Khamrin P, Chaimongkol N, Malasao R, Okitsu S, Mizuguchi M, et al. Evaluation of an immunochromatography method for rapid detection of noroviruses in clinical specimens in Thailand. *Journal of medical virology*. 2010 Dec;82.2106-9.
100. Khamrin P, Takanashi S, Chan-It W, Kobayashi M, Nishimura S, Katsumata N, et al. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *Journal of virological methods*. 2009 May;157.219-22.
101. Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Le Hoang P, Pham le D, Hoang KT, et al. 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. *Journal of tropical pediatrics*. 2007 Aug;53.264-9.
102. Takanashi S, Okame M, Shiota T, Takagi M, Yagyu F, Tung PG, et al. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroups I and II. *Journal of virological methods*. 2008 Mar;148.1-8.
103. Jung K, Wang Q, Kim Y, Scheuer K, Zhang Z, Shen Q, et al. The Effects of Simvastatin or Interferon- α on Infectivity of Human Norovirus Using a Gnotobiotic Pig Model for the Study of Antivirals. *PloS one*. 2012;7.e41619.
104. Nicollier-Jamot B, Pico V, Pothier P, Kohli E. Molecular cloning, expression, self-assembly, antigenicity, and seroepidemiology of a genogroup II norovirus isolated in France. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Aug;41.3901-4.
105. Rydell GE, Svensson L, Larson G, Johannes L, Römer W. Human GII.4 norovirus VLP induces membrane invaginations on giant unilamellar vesicles containing secretor gene dependent α 1,2-fucosylated glycosphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2013 8//;1828.1840-5.
106. Moe CL, Sair A, Lindesmith L, Estes MK, Jaykus LA. Diagnosis of norwalk virus infection by indirect enzyme immunoassay detection of salivary antibodies to recombinant norwalk virus antigen. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004 Nov;11.1028-34.

107. Ramani S, Atmar RL, Estes MK. Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Current opinion in gastroenterology*. 2014 Jan;30.25-33.
108. Almanza H, Cubillos C, Angulo I, Mateos F, Caston JR, van der Poel WH, et al. Self-assembly of the recombinant capsid protein of a swine norovirus into virus-like particles and evaluation of monoclonal antibodies cross-reactive with a human strain from genogroup II. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Dec;46.3971-9.
109. Parra GI, Azure J, Fischer R, Bok K, Sandoval-Jaime C, Sosnovtsev SV, et al. Identification of a Broadly Cross-Reactive Epitope in the Inner Shell of the Norovirus Capsid. *PloS one*. 2013;8.e67592.
110. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *The Journal of infectious diseases*. 2002 May 1;185.1335-7.

13. ANEXOS

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA - León PROYECTO: NOROVIRUS ZONOSIS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA</p>	
---	---	---

Ficha de recolección de datos Porcino

Fecha de recolección _____
Código de campo _____
Código de vivienda _____ Código laboratorio _____
Dirección: _____

Propietario: _____

I. Datos de la vivienda

Número de habitantes: _____

Deposición de excretas:

Inodoro: si _____ no _____ Letrina: si _____ no _____ Fecalismo: si _____ no _____

Deposición de agua:

Potable si _____ no _____ Pozo si _____ no _____ Rio: si _____ no _____

II. Datos del cerdo

Numero de cerdos en la vivienda _____ Número de cerdos muestreados _____

Nombre del cerdo: _____

Característica de identificación: _____

Edad en meses: _____ Sexo: Macho _____ Hembra _____

Raza: _____ Peso: _____ kg _____ Lb

Presencia de diarrea en los últimos 10 días: si _____ no _____

Sintomatología: _____

Ubicación del cerdo en la vivienda: Corral: si _____ no _____

III. Datos del laboratorio

Resultado ELISA: positivo _____ negativo _____ valor de absorbancia: _____

Resultado tipo sanguíneo: A _____ B _____ AB _____ O _____