

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**  
**CENTRO DE INVESTIGACION DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**



**Tesis para optar al título de Master en Ciencias con mención en  
Microbiología Médica**

**“Detección y Caracterización Molecular de *Sapovirus* en niños con  
gastroenteritis y en cerdos asintomáticos de la ciudad de León”.**

**Autor:**        ***Lic. Ana Patricia Blandón Roiz***

**Tutor:**        ***Dr. Filemón Bucardo Rivera.***  
Prof. Titular del Dpto. de Microbiología y Parasitología  
UNAN-León

**Asesor:**      ***Dr. Erick Amaya***  
Prof. Titular del Dpto. de Microbiología y Parasitología  
UNAN-León

***“A la Libertad por la Universidad.”***  
**Julio 2011**

## **DEDICATORIA**

Con Amor para lo más grande que Dios me ha podido regalar, esto es para ti Sara Camila.

TE AMO MI PRINCESA

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias Señor Jesús primeramente por haberme brindado la oportunidad de ser parte de esta cohorte de maestría y por permitirme ahora culminar esta etapa en mi vida. Gracias Sara Camila por estar y ser parte de este logro. Gracias a mi Tutor Dr. Filemon Bucardo y Cotutor Dr. Erick Amaya, quienes en ningún momento me dejaron sola, siempre brindándome su apoyo en mis momentos de desánimo, gracias de corazón.

Le agradezco a mi familia en especial a mi esposo José Luis Aguilera, mis padres Flor de María Roiz y Pedro José Blandón que siempre me han brindado su apoyo y ánimo en cada una de las decisiones, metas y logros que me he propuesto.

Gracias a Lic. Pedro Cano, estudiante de veterinaria por su ayuda en la recolección de las muestras. Además quiero agradecer a mis compañeros y amigos del Laboratorio que de una u otra manera siempre me apoyaron.

Este estudio fue realizado con fondos del Proyecto Norovirus- Zoonosis (05-N-2010) de NETROPICA.

GRACIAS A TODOS DE CORAZON



## RESUMEN

En Nicaragua, como en Centro América no existen antecedentes documentados sobre brotes de gastroenteritis asociada a SaV o casos esporádicos de diarrea por SaV. Este estudio describe por primera vez la epidemiología molecular de los SaV en la diarrea infantil en Nicaragua y la presencia de dichos virus en cerdos criados de forma artesanal. Los SaV son virus ARN de polaridad positiva, pertenecen a la familia *Caliciviridae* y se asocian con brotes de gastroenteritis. En este estudio muestras fecales de niños  $\leq 5$  años ( $n = 100$ ) y de cerdos criados de forma domiciliar ( $n = 86$ ) de la ciudad de León fueron analizadas mediante RT-PCR. SaV fue encontrado en 16% (14) y en 13% (2) de los niños con diarrea y sin diarrea, respectivamente. La edad más afectada por SaV fue niños  $\leq 6$  meses y el sexo más afectado fue el femenino. Se observó una mayor frecuencia en niños de la comunidad (16%) que en hospitalizados (5%). El genogrupo I fue el más común (43%) en los niños sintomáticos y asintomáticos, tanto del hospital como de la comunidad. La secuenciación de nucleótidos de un SaV-positivo de niños, seleccionado de forma aleatoria revela una similitud del 98% con la secuencia de la cepa Sapporo, que pertenece al genotipo 1 (GI/1), prototipo del género SaV. En estudios internacionales la frecuencia de SaV reportada en niños con diarrea ha sido entre 0 y 10%.

Interesantemente SaV fue encontrado en 9% (8) de los cerdos examinados. Todas los SaV porcinos fueron negativas para los genogrupos I, II, IV y V, los cuales son comúnmente encontrados en humanos. Nuestros resultados revelan que los SaV son agentes etiológicos importantes en la diarrea infantil en León y que además infecta a los cerdos criado de forma domiciliar, sugiriendo que los cerdos puede representar un reservorio de estos virus.

## ABREVIACIONES

<b>ADN</b>	<b>Acido desoxirribonucleico</b>
<b>AMPC</b>	<b>Adenosin Monofosfato cíclico</b>
<b>ARN</b>	<b>Ácido Ribonucleico</b>
<b>bp</b>	<b>Pares de base</b>
<b>cDNA</b>	<b>Acido Desoxirribonucleico Complementario</b>
<b>EDA</b>	<b>Enfermedad Diarreica Aguda</b>
<b>ELISA</b>	<b>Ensayo inmuno-absorbente enzimático.</b>
<b>EM</b>	<b>Microscopia Electrónica</b>
<b>HEODRA</b>	<b>Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguello</b>
<b>HpeV</b>	<b>Parecovirus Humano</b>
<b>HboV</b>	<b>Bocavirus Humano</b>
<b>ICTV</b>	<b>Comite internacional sobre taxonomia de virus</b>
<b>NoV</b>	<b>Norovirus</b>
<b>ORF</b>	<b>Marco de Lectura Abierta</b>
<b>PBS</b>	<b>Tampon salino fosfatado</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>
<b>PEC</b>	<b>Calicivirus Enterico Porcino</b>
<b>RdRp</b>	<b>Polimerasa dependiente de ARN</b>
<b>Rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>Transcripción reversa – Reacción en cadena de la Polimerasa</b>
<b>SaV</b>	<b>Sapovirus</b>
<b>SG</b>	<b>Subgrupo</b>
<b>SPSS</b>	<b>Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales</b>
<b>TBE</b>	<b>Tampón Tris Acido-Bórico EDTA</b>
<b>VLPs</b>	<b>Particulas como virus</b>
<b>VPg</b>	<b>Proteina genomica viral</b>

# INDICE

RESUMEN .....	I
ABREVIACIONES .....	II
INDICE.....	III
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. MARCO TEÓRICO .....	4
3.1 Gastroenteritis Viral .....	4
3.1.1 Aspectos Epidemiológicos de la Gastroenteritis Aguda (EDA).....	4
3.1.2 Fisiopatología de la diarrea.....	5
3.1.3 Transmisión Zoonótica.....	6
3.2 Virus causantes de diarrea.....	7
3.2.1.1. Rotavirus (RoV).....	7
3.2.1.2. RoV en animales .....	8
3.2.1.3. Zoonosis.....	8
3.2.2.1 Calicivirus .....	10
3.2.2.2. Norovirus (NoV).....	11
3.2.2.3. NoV en animales .....	11
3.2.2.4. Zoonosis.....	12
3.2.3. Bocavirus.....	12
3.2.4 Parechovirus.....	13
3.2.5 Sapovirus .....	13
3.2.5.1 Sintomatología .....	15
3.2.5.2 Tratamiento .....	15
3.2.5.3 Vías de Transmisión .....	15
3.2.5.4 SaV en el Medio Ambiente .....	17
3.2.5.5 Mecanismo de Patogénesis.....	18
3.2.5.6 Estudios Voluntarios .....	18
3.2.5.7 Diagnóstico de SaV.....	20
3.2.5.8 Microscopía Electrónica .....	20
3.2.5.9 RT-PCR.....	20
3.2.5.10 Secuenciación de Ácidos Nucleicos .....	21
4. MATERIAL Y METODO .....	22
4.1 Tipo de Estudio .....	22
4.2 Muestras.....	22
4.3 Recolección de la información.....	22
4.4 Recolección de las Muestras .....	23
4.5 Análisis de los datos.....	23
4.6 Procesamiento de las Muestras .....	23
4.7 Extracción de ARN .....	23
4.8 Transcripción Reversa .....	24
4.9 Tamizaje para SaV por PCR.....	24
4.10 Visualización por Electroforesis en Agarosa .....	25
4.11 Genogrupo SaV .....	25
4.11.1. PCR Genérico.....	25

4.11.2. Genotipificación SaV .....	26
4.12 Análisis estadístico .....	26
5. RESULTADOS .....	27
6. DISCUSIÓN.....	32
7. CONCLUSION .....	36
8. RECOMENDACIONES .....	37
9. REFERENCIAS .....	38

# 1. INTRODUCCION

Se define a la diarrea como el aumento de la frecuencia, contenido líquido, y volumen de las heces [W.H.O., 1992.]. Este problema de salud constituye la primera causa de morbilidad y de mortalidad en la población infantil en los países en vías de desarrollo. La gastroenteritis puede ser producida por parásitos, bacterias o virus [UNICEF, 2009]. Los virus son responsables de más de la mitad de todos los casos de gastroenteritis agudas en niños. En la gastroenteritis viral *Rotavirus* (RoV) es el más frecuentemente identificado [Blacklow NR and HB., 1991], seguido por *Norovirus* (NoV), *Astrovirus* y *Adenovirus* ([Blacklow and Greenberg, 1991; Wilhelmi et al., 2003]

Debido a las limitaciones en el diagnóstico, otros virus, tales como *Sapovirus* (SaV) son raramente investigados. Actualmente se carece de pruebas rápidas para el diagnóstico de estos virus y la única forma de detectarlos es mediante Microscopia Electrónica (EM) y técnicas moleculares que requieren equipos y personal especializado.

SaV, es un género de la familia *Caliciviridae*. Los SaV son altamente diversos genéticamente. Actualmente se clasifican en 7 genogrupos (G) de los cuales GI, GII, GIV y GV infectan humanos y GIII, GVI y GVII infectan porcinos [Barry et al., 2008; Hansman et al., 2007a]. SaV fue descubierto en 1976 durante un brote de gastroenteritis en una guardería de Sapporo, Japón y fueron identificando en años siguientes una serie de brotes ocurridos en la misma institución [Chiba et al., 2000]. La vía de transmisión se cree que es fecal-oral o por medio de alimentos contaminados [Moreno-Espinosa et al., 2004]. Muy pocos estudios han evaluado la importancia de estos virus en la diarrea infantil, pero se estima que SaV podría representar hasta un 10% de casos de gastroenteritis que ocurren en la comunidad. SaV además de infectar humanos

también es capaz de infectar cerdos, no obstante la relevancia de estos virus en la salud animal no ha sido completamente demostrada [Zintz et al., 2005]

En Nicaragua la crianza de cerdos es una práctica muy común en los sectores rurales [Lopez, 2006]. En muchas ocasiones los cerdos conviven con los miembros de la familia, pudiendo contaminar con materia fecal fuentes de agua y alimentos que posteriormente son ingeridos por los humanos. En contraste, los cerdos pueden contaminarse con materia fecal proveniente de humanos en las áreas donde se practica el fecalismo. Dado que los SaV pueden infectar diferentes especies es relevante investigar si las cepas aisladas en niños son genéticamente similares a las cepas aisladas en cerdos.

Dicha evidencia permitiría identificar la posible transmisión zoonótica o antroponótica de estos virus. Tomando en cuenta estos elementos se ha llevado a cabo un estudio que pretende identificar SaV en humanos y porcinos, y además investigar su correlación genética.

## **2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Identificar y caracterizar genéticamente SaV aislados en niños con gastroenteritis y en cerdos asintomáticos de la ciudad de León.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Describir el perfil clínico y epidemiológico de las infecciones por SaV en niños con diarrea.
2. Investigar la presencia de SaV en cerdos criados a nivel domiciliar.
3. Investigar la diversidad genética de los SaV aislados en niños y en cerdos.

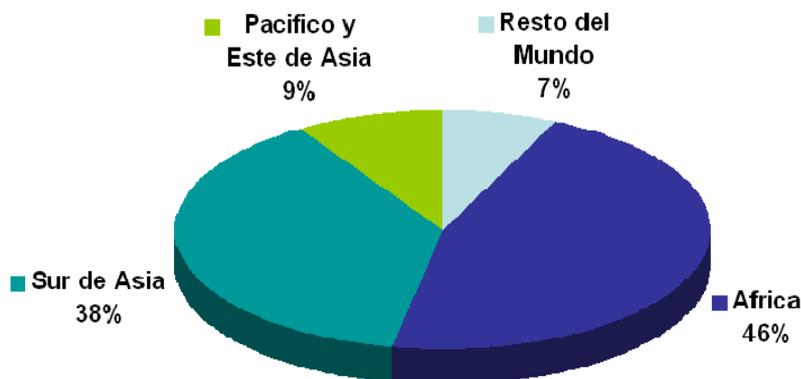
### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Gastroenteritis Viral**

##### **3.1.1 Aspectos Epidemiológicos de la Gastroenteritis Aguda (EDA)**

Las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países subdesarrollados [McMahan and DuPont, 2007]. Cada año se estiman 2,5 billones de casos de diarrea entre niños  $\leq 5$  años de edad. Más de la mitad de estos casos se encuentran en África y Asia meridional, en donde los brotes de diarrea son más propensos a causar la muerte u otros resultados graves. La incidencia de enfermedades diarreicas varía mucho según las estaciones climáticas y la edad del niño, así como, según las condiciones de vida de las personas, su nivel educacional y estatus socioeconómico [González, 2007]. Los niños más pequeños son los más vulnerables; la incidencia es más alta durante los dos primeros años de vida y disminuye a medida que el niño crece [UNICEF, 2009]. La mortalidad por diarrea en niños  $\leq 5$  años ha disminuido en las últimas dos décadas, pasando de 5 millones a 1,5 millones en el 2004. A pesar de este descenso, la diarrea sigue siendo la segunda causa más común de muertes entre los niños  $\leq 5$  años a nivel mundial. En algunos países africanos y asiáticos la mortalidad infantil por diarrea es del 80% (Figura 1) [UNICEF, 2009]. En Nicaragua la enfermedad diarreica aguda continúa siendo un problema de salud pública, según el boletín epidemiológico del Ministerio de Salud (MINSAL) hasta la semana 33 del año 2008 se habían reportado 143,476 casos de EDA en todo el territorio Nicaragüense [MINSAL, 2008].

**Figura 1. Distribución de muertes por Diarrea según región geográfica.**  
[UNICEF, 2009]



### 3.1.2 Fisiopatología de la diarrea

La diarrea es el resultado de un rápido movimiento de las heces por el intestino grueso [Guyton and Hall, 2000]. Existen diferentes síndromes clínicos en los individuos con diarrea infecciosa cada uno con su conjunto de agentes causales [Brooks Geo F., 2005]. La diarrea secretora (o no inflamatoria) ocurre con patógenos que inducen secreción intestinal, por medio de enterotoxinas las cuales actúan a través del adenosin monofosfato cíclico (AMPC), estimulando la secreción activa de agua y electrolitos hacia la luz intestinal, con pérdida de sodio. Estos individuos generalmente se presentan con una diarrea acuosa, náuseas, vómitos y calambres abdominales. La diarrea inflamatoria es producida por agentes que inducen inflamación en el colon por invasión por citotóxicas. Estas personas presentan una diarrea de poco volumen, con sangre o moco y acompañada de fiebre. La gastroenteritis aguda es una inflamación de la mucosa gástrica e intestinal. Se traduce clínicamente en un cuadro de diarrea de instauración rápida, con o sin signos y síntomas acompañantes tales como náuseas, vómitos, fiebre o dolor abdominal. Diarrea osmótica se produce cuando hay permanencia en la luz intestinal de cantidades no usuales de solutos poco absorbibles y activos osmóticamente, lo cual causa retención de

volúmenes equivalentes de agua. Diarrea mal absorptiva se da por disminución de la superficie de absorción de la mucosa originando pérdidas intermedias de electrolitos y ocasionalmente pueden producir deposiciones con moco y estrías de sangre [Brooks Geo F., 2005; Guyton and Hall, 2000].

Tanto la diarrea secretora como la inflamatoria pueden ser agudas cuando duran menos de dos semanas; o persistentes, cuando duran más de 2 semanas [McMahan and DuPont, 2007].

### **3.1.3 Transmisión Zoonótica**

Algunos animales portan agentes patógenos que pueden desarrollar enfermedad clínica entre los seres humanos. Actualmente, las zoonosis y las enfermedades transmisibles al hombre y a los animales han sido objeto de mayor atención en todo el mundo. Los cambios sociales y demográficos también han acentuado la importancia de estudiar a profundidad los procesos infecciosos causados por la zoonosis [Dabanch P., 2003]. La zoonosis puede ser:

Directas, aquellas que se dan entre un huésped vertebrado infectado y otro huésped vertebrado susceptible por contacto directo, por manipulación de un objeto contaminado o mediante un vector mecánico. Ejemplo: Influenza

Ciclozoonosis, necesitan más de un hospedador vertebrado para lograr mantenerse en la naturaleza sin que intervenga algún invertebrado, el hombre puede actuar como hospedador definitivo o intermedio. Ejemplo: Teniasis.

Metazoonosis necesita de un hospedador vertebrado y de uno invertebrado para mantenerse en la naturaleza. Ejemplo: Flavivirus.

Saprozoonosis es la única forma de transmisión que no requiere de un reservorio animal, son infecciones producidas por agentes que requieren un lugar de desarrollo (plantas, suelos, materia orgánica) [Bank-Wolf et al.].

La mayoría de los patógenos que causan diarrea tienen un modo similar de transmisión, sin embargo pueden existir diferencias como las antes mencionadas, es decir transmisión de animal a persona, e inducir una zoonosis [Bank-Wolf et al.]. En la actualidad aun no se ha podido concretar este tipo de transmisión en la diarrea de tipo viral.

### **3.2 Virus causantes de diarrea**

#### **3.2.1.1. Rotavirus (RoV)**

RoV es el agente etiológico viral más importante de la diarrea infantil, se estima que en Nicaragua causa alrededor del 40% de todas las admisiones hospitalarias por diarrea en niños  $\leq 5$  años de edad. A nivel mundial se producen 100 millones de episodios de diarrea por RoV resultando 600,000 muertes infantiles [Bishop, 1996]. En América Latina se indica que el síndrome diarreico por RoV es responsable de 75,000 hospitalizaciones y 15,000 muertes anuales. En Nicaragua la incidencia de EDA por RoV es de aproximadamente 1,4 episodios por niño por año en menores de 2 años de edad [Espinoza, 2004].

RoV está compuesto por un genoma segmentado de doble cadena de ARN, envuelto en tres capas de proteínas. La proteína VP6 conforma la cápside interna, y por sus características antigénicas, se clasifica en grupos (A-G) y subgrupos (SG) SGI, SGII, SGI y II, no SGI y no SGII, detectándose con mayor frecuencia los grupos de la A-C, con SGII en los humanos y el SGI en los animales [Greenberg, 1983] [Kapikian, 2001]. Las proteínas VP7 y VP4 de la cápside externa, poseen epítomos de clasificación de los serotipos G y P. Hasta la fecha se han reportado 19 serotipos G y 27 serotipos P. Los que circulan con

mayor frecuencia en animales y humanos son G1-G4, P1A, P1B, P2A y P2B [Kapikian, 2001] .

### **3.2.1.2. RoV en animales**

De todos los tipos de RoV el grupo A, es el que se asocia con la gastroenteritis en diversas especies de mamíferos y aves, entre los que se reportan: mono, cerdo, caballo, oveja, chivo, perro, gato, vacas, conejo, rata, ratón, pavo, pato, gallo [Gerardo G. Polanco-Marín].

Investigaciones efectuadas en animales con diarrea infecciosa aguda, han reportado cepas de RoV G1 y G3, con una homología del 85% con cepas de humanos [Cook et al., 2004].

En algunas especies de animales, se han reportado serotipos muy específicos, un ejemplo de estos es el G7, el cual se ha encontrado solamente en aves de corral, sugiere que algunas cepas de RoV son especies específicas y otras se comparten entre humanos y animales [Gerardo G. Polanco-Marín].

### **3.2.1.3. Zoonosis**

La vigilancia de RoV circulantes en la población humana ha puesto de manifiesto la presencia de genotipos poco frecuentes. Muchos de ellos han sido encontrados también en animales domésticos, y es posible que se haya podido transmitir a la población humana a través de mecanismos de zoonosis [Cook et al., 2004; González, 2007].

**Tabla 1. Principales virus causantes de gastroenteritis.**

Virus	Familia	Tamaño (nm)	Apariencia	Ácido Nucleico
Rotavirus	Reoviridae	70	Rueda	ARN de doble cadena segmentado
Norovirus	Caliciviridae	20-35	Virus pequeños de estructura redonda con cálices	ARN de cadena sencilla sentido positivo
Sapovirus	Caliciviridae	20-35	Virus pequeños de estructura redonda con cálices	ARN de cadena sencilla sentido positivo
Astrovirus	Astroviridae	28-30	Virus en forma de estrella	ARN de cadena sencilla sentido positivo
Parechovirus*	Picornaviridae	20-30	Virus ARN pequeños	ARN de cadena sencilla sentido positivo
Bocavirus*	Parvoviridae	20-26nm	Similar a Parvovirus Bovino y Canino	ADN de cadena sencilla

\* Su papel como causa de EDAs está en proceso de investigación [Boivin et al., 2005; Han et al., 2009]

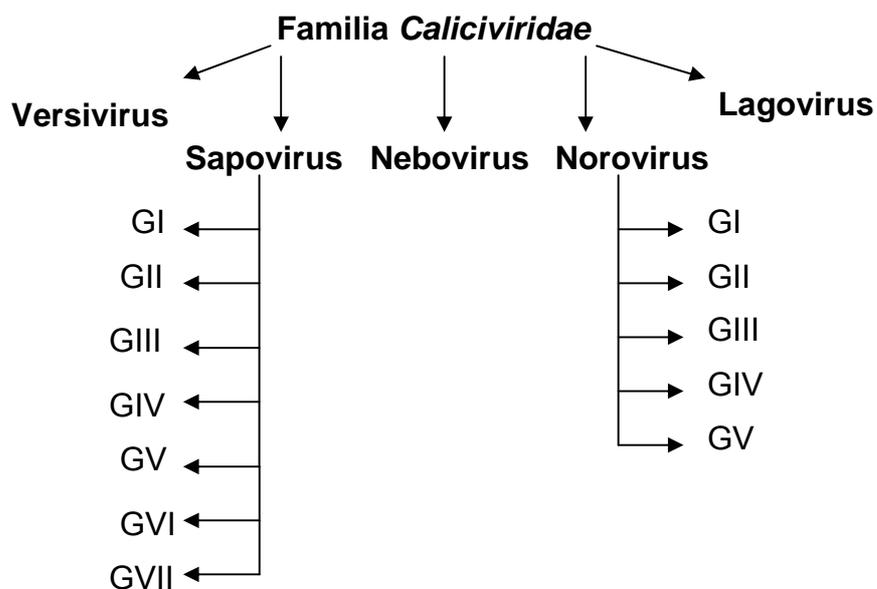
### 3.3. Calicivirus

Los Calicivirus conforme a una reglamentación vigente del “International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)” se clasifican en 5 géneros: NoV, SaV, Versivirus, Lagovirus y Nebovirus (Figura 2) [ICTV, 2009]. Cada uno de los géneros son especies específicas. NoV y SaV infectan predominantemente a humanos [Rockx et al., 2002].

Estos virus pueden infectar al humano de forma repetitiva, principalmente los NoV [Glass RI, 2009]. La importancia de Calicivirus en gastroenteritis en comunidades endémicas es pobremente conocida, principalmente en países con bajos ingresos. Una de las características de los Calicivirus es su alta variabilidad genética [Zheng et al., 2006] .

Los géneros NoV y SaV se clasifican filogenéticamente en genogrupos respectivamente (Figura 2) [Zheng et al., 2006] .

**Figura. 2 Familia *Caliciviridae***



### **3.3.1. Norovirus (NoV)**

Los NoV son muy diversos genéticamente, actualmente se han identificado 29 genotipos, distribuidos en 5 genogrupos (Tabla1) (Figura 2). Los genogrupos GI, GII, GIV infectan humanos, el GIII se ha encontrado en bovinos y el GV en ratones [Zheng et al., 2006]. NoV es la causa más importante de gastroenteritis aguda no bacteriana en todas las edades en los seres humanos, tanto en países subdesarrollados como en países desarrollados. Recientemente se ha estimado que cada año NoV causa 64,000 episodios de diarrea que requieren hospitalización y hasta 200,000 muertes en niños  $\leq 5$  años de edad en países en desarrollo [Pathel, 2008]. NoV causa brotes de gastroenteritis aguda en instituciones, como: escuelas, restaurantes, hospitales, cruceros y casas de reposo. La transmisión ocurre principalmente a través de la vía fecal-oral, aunque también se ha conocido que puede ocurrir mediante aerosoles de vomito contaminado [Marks et al., 2003] [Marks et al., 2000].

#### **3.3.1.2. NoV en animales**

Poco después del descubrimiento del virus de Norwalk humanos, los científicos identificaron NoV en terneros con diarrea [Gunther and Otto, 1987; Woode and Bridger, 1978].

La primer cepa animal de NoV denominado Bo/Newbury2/1976/UK, fue detectado en terneros con enteritis en el Reino Unido en 1976 [Dastjerdi et al., 1999]. En 1978 otro genotipo distinto de NoV bovino, denominado (Bo/Jena/78/GENA), fue identificado en Alemania en muestras de heces de Ganado. En 1998, NoV fue detectado por primera vez en muestras de cerdos adultos en el Japón, más tarde en Europa y en EEUU [van Der Poel et al., 2000] [Sugieda et al., 1998] [Saif et al., 1980].

Aunque el papel de los NoV como causa de diarrea en el cerdo no está definido todavía, los cerdos podrían desempeñar un papel importante en la evolución de los Calicivirus.

### **3.3.1.3. Zoonosis**

La transmisión de NoV de animales al hombre y viceversa tendría consecuencias de largo alcance en la epidemiología de la diarrea, sin embargo la detección de NoV humanos en animales, o la presencia de NoV animales en humanos no ha sido completamente demostrada. Cabe señalar que se han detectado anticuerpos anti-NoV animal en humanos y anti-NoV humanos en cerdos. La infección experimental de terneros y cerdos gnotobióticos con NoV humanos demostró que la replicación del virus y la seroconversión puede ocurrir, lo que sugiere que estos virus podrían transmitirse entre especies. En consecuencia, la estrecha relación genética y antigénica entre los NoV humanos y los NoV porcinos encontrados en los últimos años plantea interrogantes sobre su potencial zoonótico, y la posibilidad de que el cerdo constituya un reservorio para la emergencia de nuevas cepas epidémicas humanas [Qiu-Hong Wang, 2006b].

### **3.3.2. Bocavirus**

El Bocavirus humano (HBoV) es un Parvovirus (Tabla1) recientemente asociado con enfermedades respiratorias e intestinales. Parvovirus ha sido reconocido como causa de gastroenteritis en especies animales principalmente en perros y gatos [Chow et al.].

Desde su descubrimiento en 2005, HBoV se ha asociado con enfermedades del tracto respiratorio superior e inferior. Recientemente han sido implicados de 0,8 - 9,1% en enfermedades gastrointestinales. Virus relacionados con HBoV han

sido reconocidos y nombrados provisionalmente Bocavirus humanos 2 (HBoV2) y Bocavirus humanos 3 (HBoV3) [Chow et al., ; Han et al., 2009].

La epidemiología y las manifestaciones clínicas asociadas a estos virus hasta ahora están siendo estudiadas.

### **3.3.3. Parechovirus**

Parechovirus es un género de la familia Picornaviridae (Tabla1). Son virus pequeños sin envoltura y de ARN sentido positivo. El género se compone de dos especies: Parechovirus humano (HPeV) y Virus de Ljungan. Seis tipos de HPeV se han identificado: HPeV-1 (antes Echovirus 22), HPeV-2 (antes Echovirus 23), y HPeV-3, 4, 5 y 6, respectivamente. Se le ha dado un relevante reconocimiento a la importancia clínica de estos virus luego de ser descubiertos los últimos 4 tipos. Estos virus, en particular, HPeV-1, se han asociado con infecciones del tracto gastrointestinal y respiratorio [Boivin et al., 2005].

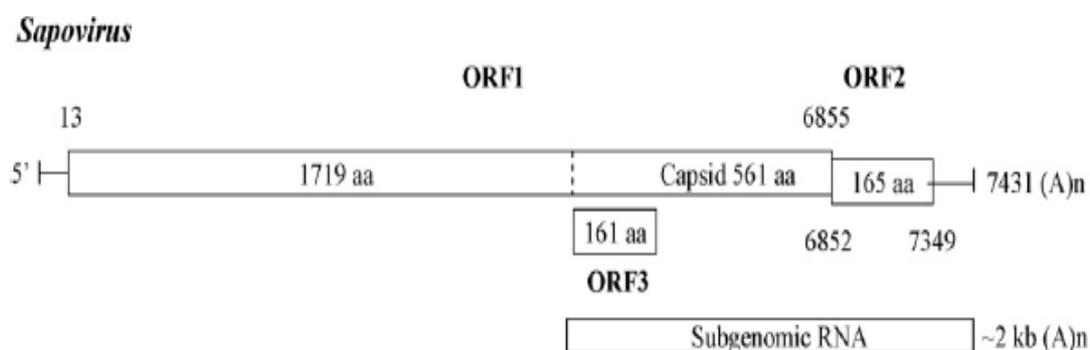
### **3.4 Sapovirus**

SaV es el segundo género diferenciado en el año 2002 dentro de la familia Caliciviridae [ICTV, 2009], estos virus han sido asociados en casos de gastroenteritis en niños y además se conoce que afectan animales [Hansman et al., 2007a]. Los SaV fueron encontrados y observados por primera vez en muestras diarreicas durante un brote de gastroenteritis en una guardería en la ciudad de Sapporo, Japón en el año de 1977 [Chiba et al., 2000].

SaV presentan un genoma poliadenilado de cadena sencilla y de sentido positivo, su ARN mide aproximadamente 7.5 Kb de longitud y se caracterizan por tener una organización genómica de tres Marcos de Lectura Abierta (Open Reading Frame o ORFs) (Figura 3) de los cuales ORF1 codifica para proteínas no estructurales, incluyendo proteasas, ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y una proteína de la cápside (VP1) [Hansman et al., 2007b]. En los

viriones maduros de Calicivirus se encuentran tres proteínas: VP1, VP2 y VPg. La principal proteína estructural de SaV es VP1, de aproximadamente 60.000 daltons (d) y se encuentran 180 copias (90 dímeros) por virión. La predominancia de VP1 en la formación de la estructura de la cápside vírica es consistente con su papel como determinante de fenotipo antigénico y en las interacciones del virus con las células huésped. ORF2 codifica para una proteína pequeña que se cree es similar a VP2 de NoV y un ORF3 adicional el cual se ha encontrado superpuesto en la parte final de la región 5' del gen de la cápside, cuya significancia o importancia todavía es incierta [Okada et al., 2006] [Hansman et al., 2007a].

**Figura 3. Estructura del genoma de SaV.** [Qiu-Hong Wang, 2006b]



Los SaV están divididos en 7 diferentes genogrupos (GI-GVII), de los cuales GI, GII, GIV y GV infectan humanos y GIII, GVI y GVII se caracteriza en afectar particularmente a porcinos de todas las edades (Figura 2) [Hansman et al., 2007b]. Estas cepas de SaV porcinos son relacionadas genética y antigénicamente con cepas de NoV humanos. La clasificación se basa en la diferencia de la secuencia de aminoácidos de VP1 [Hansman et al., 2007a].

La diversidad genética de cepas de SaV porcino dificulta la creación de primers específicos que puedan detectar todas las cepas circulantes [Guo et al., 1999]. La mayoría de primers utilizados son específicos para RdRp. Basados en la región RdRp y cápside los SaV porcinos se clasifican en 2 genogrupos (GIII y

GVI/JJ681-like), y existen 2 sin clasificar (G/QW19 and G/LL26), estas cepas han sido reportadas de países como: Estados Unidos, Venezuela, el Sur de Corea y Japón [Barry et al., 2008; Qiu-Hong Wang, 2006b].

#### **3.4.1. Sintomatología**

En casos esporádicos y brotes por SaV los principales síntomas han sido diarrea, vómitos y fiebre [Rockx et al., 2002], la duración de los síntomas puede prolongarse durante una media de 6 días. La enfermedad se caracteriza por vómitos en el 1er y 2do día, esto difiere con las infecciones por NoV, en las que los vómitos son el signo dominante, las infecciones por SaV presentan diarrea durante aproximadamente los primeros 5 días, la fiebre parece ser mayor a los 37°C entre los pacientes infectados por SaV que entre los pacientes con infección por NoV [Bank-Wolf et al.].

#### **3.4.2. Tratamiento**

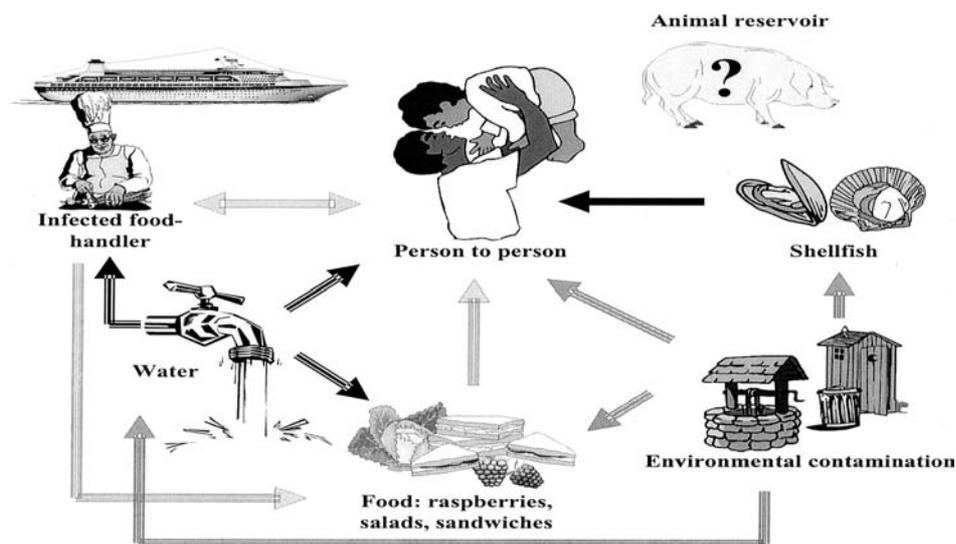
No existe un tratamiento específico para la infección por SaV. La enfermedad causada por estos virus son generalmente leves y autolimitados, y la resolución se produce sin secuelas. La hospitalización para la rehidratación rara vez se requiere para los adultos. El tratamiento consiste en terapia sintomática, con rehidratación oral en general. En casos raros, la administración parenteral de líquidos por vía intravenosa es necesaria. En la actualidad, no hay medicamentos antivirales para tratar la salida de los SaV [Atmar and Estes, 2001].

#### **3.4.3. Vías de Transmisión**

Se sugiere que la transmisión de SaV ocurre principalmente a través de alimentos contaminados, se ha sugerido que SaV también puede ser transmitido por vía fecal-oral, mediante aerosoles contaminados provenientes

de vómitos de individuos infectados (Figura 4) [Moreno-Espinosa et al., 2004]. Otra medio de transmisión se cree es mediante el agua ya sea sistemas de agua municipales, suministros de agua semi-publica, agua en cruceros y en centros de piscinas de recreación [Schaub and Oshiro, 2000].

**Figura 4. Vías de Transmisión de Calicivirus Humanos**



Se estima que la dosis para el inicio de infección por SaV es de 10 a 100 partículas virales. Las bajas dosis infecciosas de SaV permiten fácilmente la propagación por aerosoles, fómites, transmisión persona a persona y por contaminación ambiental (Figura 4). Las infecciones por SaV suelen ocurrir en los meses de invierno [Moreno-Espinosa et al., 2004].

SaV infecta tanto a niños como adultos y ha sido encontrado como causa de brotes de gastroenteritis en guarderías, centros de salud y en escuelas primarias [Chiba et al., 2000; Wilhelmi et al., 2003]. Se han realizado estudios epidemiológicos en algunos países incluyendo Australia, Canadá y Finlandia, se sabe que la tasa de incidencia promedio es de 9.3%. En otros países como México, EEUU, Rusia, Tailandia, Tunicia se ha observado que en niños  $\leq 5$  años la tasa de incidencia oscila entre 0.2-1.4%. En Japón la tasa de incidencia

de SaV en niños  $\leq 2$  en guarderías es de 2.3%; en niños  $< 5$  años hospitalizados se observa una incidencia de 1.2-5% como es el caso de países como Reino Unido, Pakistán, EEUU y Tailandia; la detección y prevalencia global de infecciones por SaV varia de país a país pudiendo ser afectados por las técnicas diagnósticas usadas. Las tasas de detección de SaV son más bajas que NoV. Además, la gastroenteritis por SaV parece producir síntomas más leves que los de NoV [Zintz et al., 2005] .

SaV tiene una distribución a nivel mundial. Estudios sero-epidemiológicos realizados en adultos han demostrado la propagación de miembros del género SaV aunque este se caracteriza por afectar principalmente a bebés y niños  $\leq 5$  años y adultos mayores (ancianos) en los que quizás SaV induce una infección inaparente [Atmar and Estes, 2001]. En comparación con NoV el estudio sobre SaV es menos avanzado, esto debido a la no disponibilidad de métodos de diagnóstico, además que la enfermedad es de muy corta duración y menos agresiva [Moreno-Espinosa et al., 2004].

#### **3.4.4. SaV en el Medio Ambiente**

Recientemente se ha encontrado SaV en 10% de muestras de aguas sin tratar, aguas residuales tratadas y muestras de agua de río. Aun no se ha encontrado SaV en muestras de agua de mar abierto. SaV persiste en el ambiente, siendo también encontrado en moluscos de consumo humano. La reciente detección de SaV en agua y muestras de moluscos crea una mayor conciencia de estos virus y presenta una posible vía de transmisión por alimentos [Schaub and Oshiro, 2000].

Las condiciones ambientales y climáticas como las diferencias culturales que incluyen los hábitos alimenticios y prácticas de higiene son factores que pueden estar involucrados en las diferencias de tasas de detección de SaV entre los diferentes países. Debido a la creciente detección que este virus a nivel

mundial, actualmente es considerado enteropatógeno de significancia global [Hansman et al., 2007a; Schaub and Oshiro, 2000].

### **3.4.5. Mecanismo de Patogénesis**

Las infecciones por SaV tienen un período de incubación de 24 a 48 horas, la enfermedad puede durar de 3 a 4 días, es autolimitada. Se considera que la excreción del virus en las heces puede durar 2 semanas. Los niños de menor edad ( $\leq 2$  años) tienden a excretar los virus por mayor tiempo en relación con jóvenes y personas adultas [Moreno-Espinosa et al., 2004].

En la actualidad se conoce que SaV al igual que los demás Calicivirus infectan el borde en cepillo del intestino, evitando una absorción adecuada de agua y nutrientes, esto da lugar a diarrea, vómitos, calambres abdominales, náuseas, dolor de cabeza, malestar general y fiebre [Rockx et al., 2002]. Los Calicivirus Humano (SaV) entran en el cuerpo principalmente por vía oral. Los viriones son estables a los ácidos siendo capaces de sobrevivir el paso por el estómago. El sitio primario de replicación de SaV no ha sido establecido, pero se supone que se replica en el tracto superior intestinal. Existen pocos estudios acerca de lo que ocurre en las vellosidades del intestino delgado proximal, pero se sabe que la mucosa permanece intacta histológicamente y se ha observado infiltración de células mononucleares y vacuolización citoplasmática. Mediante la observación con microscopía electrónica (EM) se observan las células epiteliales intactas sin acortamiento de las microvellosidades [Green et al., 2000].

### **3.4.6. Estudios Voluntarios**

Hasta el momento es muy poco lo que se ha podido conocer sobre enfermedades diarreicas relacionadas con SaV por lo que se encuentran en desarrollo estudios investigativos en modelos animales y algunos en humanos voluntarios con el fin de conocer como estos pueden llegar a infectar tanto

especies animales como humanos y sus posibles daños internos. La Dra. Saif y sus colaboradores en 1980 aislaron la Cepa Entérica Porcina de SAV (PEC) denominada "Cowden", en un cerdo joven con diarrea. Para comprobar que dicha cepa producía diarrea en cerdos, inocularon un filtrado de las heces que contenía la cepa Cowden en cerdos gnotobióticos y observaron que dicho filtrado producía diarrea y además, una nueva progenie de la cepa Cowden era excretado. Histológicamente se pudo observar atrofia de las vellosidades en el intestino delgado. Estos resultados fueron confirmados también por los experimentos de nuevas infecciones en las que se observaron atrofia de vellosidades e hiperplasia de las criptas. Curiosamente ARN de SaV también se pudo detectar en el suero de cerdos infectados oralmente lo cual sugiere la ocurrencia de viremia [Bank-Wolf et al.].

Otros experimentos con la misma cepa mostraron un aplanamiento de las vellosidades intestinales, similar a la observada durante la infección por NoV [Flynn et al., 1988]. Los análisis por inmunofluorescencia revelaron que las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado estaban infectadas, y el mayor número de células infectadas estaba en el duodeno. Este estudio se realizó en 18 cerdos gnotobióticos de los cuales 12 fueron inoculados con PEC y 7 fueron placebo. La inoculación se realizó vía oral a los 4 días de nacidos. Como resultado se desarrolló diarrea leve en todos los cerdos inoculados con PEC a los 3 días post-infección y persistió durante hasta los 7 días. Se produjo diarrea severa en dos cerdos infectados entre el 4 y 5 días después de la inoculación. Finalmente los cerdos inoculados con PEC y los placebo fueron sacrificados al 7mo día para la realización de estudios patológicos, encontrándose pequeñas manchas de inmunofluorescencia en células epiteliales de las vellosidades principalmente en el duodeno y el yeyuno, a excepción de un cerdo el cual fue sacrificado después de los 7 días de la inoculación, con esto se determinó la longitud de las vellosidades en cortes histológicos tanto en el intestino delgado de los cerdos de control y los cerdos inoculados además se observó significancia estadística ( $p < 0,01$ ) de atrofia en

las vellosidades del duodeno y el yeyuno de cerdos con 3-7 días de inoculados. Estas observaciones fueron confirmadas por ME, que puso de manifiesto el acortamiento, la fusión de las vellosidades en el duodeno y el yeyuno de cerdos con 3–7 días de inoculación. Las lesiones no fueron vistas en los cerdos control. Se observaron partículas de Calicivirus mediante Microscopía Electrónica en el contenido del intestino grueso y las heces de los cerdos con 1 a 7 días de inoculación [Flynn et al., 1988].

#### **3.4.7. Diagnóstico de SaV**

El diagnóstico de laboratorio para SaVs se basa principalmente en la detección de la partícula viral mediante ME y detección del ARN viral mediante PCR (convencional y en tiempo real). La proteína recombinante de la cápside (VLP) ha sido utilizada como antígeno para la detección de anticuerpos anti-SaV en estudios sero-epidemiológicos [Kitamoto et al., 2002].

#### **3.4.8. Microscopía Electrónica**

SaV fue detectado por primera vez mediante ME directa, la cual es poco sensible, con un límite de detección de  $10^6$  partículas por ml de heces [Atmar and Estes, 2001]. Las desventajas de la ME incluyen la necesidad de expertos altamente calificados y equipos costosos, por tanto, no es un método práctico para el diagnóstico de rutina de un gran número de muestras [Cubitt, 1989].

#### **3.4.8. RT-PCR**

Hoy en día, la combinación de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) del ARN viral, es el método de diagnóstico de elección de SaV. Dos diferentes estrategias se han utilizado, la primera utiliza primers específico para la región RdRp de los calicivirus, esta técnica permite identificar

SaV y NoV de diferentes especies, incluyendo humanos y porcinos [Atmar and Estes, 2001; Wang et al., 2006]. La segunda estrategia está basada en primers específicos para el extremo 5' del gen de la cápside de los SaV humanos [Vinje et al., 2000]. Recientemente una nueva estrategia que permite además de identificar SaV, investigar genogrupos ha sido propuesta [Okada et al., 2006].

La sensibilidad y la especificidad de los ensayos de RT-PCR para el diagnóstico de SaV puede ser afectada por factores, tales como; la calidad de la muestra (ciclos de congelación-descongelación), el método utilizado para extracción y purificación del RNA, los primers y los métodos para la detección de amplicones [Hansman et al., 2007c].

#### **3.4.9. Secuenciación de Ácidos Nucleicos**

Una herramienta fundamental en la investigación de virus con alta diversidad genética es la secuenciación de productos de PCR. Mediante el PCR podemos identificar el género y los genogrupos de SaV, pero no podemos identificar genotipos. La combinación entre el RT-PCR descrito por Okada y colaboradores más la secuenciación de los productos de PCR, nos permite conocer los genotipos e investigar diversidad genética.

## **4. MATERIAL Y METODO**

### **4.1 Tipo de Estudio**

Descriptivo de corte Transversal.

### **4.2 Muestras**

#### **Humanos**

Un total de 100 especímenes fueron seleccionadas al azar de una colección de 868 muestras fecales recolectadas de niños  $\leq 5$  años en un estudio sobre diarrea infantil realizado en León, en el 2005 [Vilchez et al., 2009]. Dicha colección contiene niños hospitalizados con diarrea severa, niños de la comunidad con diarrea leve o moderada y niños sin síntomas de diarrea.

#### **Porcinos**

Mediante visitas domiciliarias a familias que se dedican a la crianza de cerdos artesanal en los repartos de los poetas (Rubén Darío, Antenor Sandino y Salomón de la Selva) y sectores rurales aledaños se recolectaron un total de 86 en cerdos sin síntomas de gastroenteritis. Se tomaron muestras en cerdos de todas las edades, razas y de ambos sexos. Las muestras se recolectaron entre Enero y Agosto del 2009

### **4.3 Recolección de la información**

La información clínica y epidemiológica de los niños fue obtenida mediante una entrevista realizada por una enfermera, la cual les explicaba a los pacientes y/o familiares responsables los objetivos del estudio y pidió el consentimiento de los mismos para participar, una vez que estos aceptaron y lo manifestaron por escrito firmando un consentimiento informado, se procedió a llenar una ficha de recolección de información que incluía datos generales y sintomatología presentada por el paciente.

En los cerdos la información se obtuvo mediante entrevista a los dueños y la evaluación física del animal, la cual fue realizada por estudiantes de veterinaria

colaboradores de este estudio. Se tomaron en consideración las siguientes variables; peso, edad, raza, sexo etc.

#### **4.4 Recolección de las Muestras**

Tanto las muestras de los niños como la de los cerdos se recolectaron en frascos plásticos y trasladadas al Laboratorio de Microbiología ubicado en el Campus Medico de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, dicho traslado fue realizado en termos con refrigerantes a temperatura de 4 °C.

#### **4.5 Análisis de los datos**

Los datos obtenidos de las fichas fueron almacenados en una base de datos diseñada en el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 12.0.1. El análisis descriptivo de los datos se realizó utilizando el mismo programa.

#### **4.6 Procesamiento de las Muestras**

En el laboratorio se preparó una suspensión de las heces 1:10, es decir, 0.1 g de heces en 1 ml de PBS y se almacenaron a –20 °C hasta ser analizadas.

#### **4.7 Extracción de ARN**

Se utilizaron 140 µL de la muestra diluida en PBS, la cual fue mezclada en un vial de 1.5 mL con 560 µL de buffer AVL (agente disociante que lisa y solubiliza las células) se homogenizó mediante vortex por 15 s e incubó a temperatura ambiente (15-25 °C) por 10 min., esta mezcla fue centrifugada a 8000 rpm por 1 min., seguido se agregó 560 µL de etanol (96-100%) y se homogenizo. De esta mezcla se colocaron 630 µL en una columna QIAamp contenida en un tubo colector de 2 ml y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min., nuevamente se colocaron en la misma columna 630 µL de la mezcla, utilizando un nuevo tubo colector, dicha columna fue centrifugada una segunda vez a 8000 rpm por 1 min. Se colocó un nuevo colector y se agregó a la columna 500 µL de Buffer de

lavado AW1 (agente caotropico), fue centrifugada a 8000 rpm por 1 min., se agregó 500 µL de Buffer AW2 para un segundo lavado con un nuevo colector y se centrifugó a 14000 rpm por 3 min. Al terminar la columna fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 ml. y se agregó 60 µL de buffer AVE (eluyente) colocándolo directamente en el centro del filtro de la columna, se incubo a temperatura ambiente por 1 min. y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min., el ARN viral extraído fue guardado a -20 °C hasta su posterior análisis.

#### **4.8 Transcripción Reversa**

En viales de 250 µL se realizó una mezcla que contenía 17 µL de Agua libre de RNase/DNase, 5 µL de Primer Random pd(N)<sub>6</sub> (0.5 µg/µL) y 28 µL del ARN viral extraído. Luego se colocó en el termociclador (Mastercycler personal, eppendorf, Made in Germany) y se corrió el programa el cual consta de incubación a 97 °C por 5 minutos. Pasado los 5 min. Los viales fueron colocados por 2 min. en hielo y se les agregó a cada uno una RT-PCR beads, se les dio un micro-spin y posteriormente fueron colocados en el termociclador a 42 °C por 30 min. Una vez finalizado los viales con cDNA se mantuvieron a -20 °C hasta seguir con el análisis.

#### **4.9 Tamizaje para SaV por PCR**

Se realizó una mezcla que contenía 20.5 µL de agua libre de RNase/ DNase, 1 PCR bead, 2 µL de los Primer Forward y Reverse, 2.5 µL de cDNA para un volumen final de 25 µL. Luego se colocó en el termociclador con el programa de desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min., desnaturalización 94 °C por 1 min., hibridación 40 °C por 30 s elongación 74 °C por 1 min. 30 s luego se realizaron 30 ciclos desde el paso 2 al 4, una vez realizados estos ciclos el programa en el termociclador continuo con un quinto paso que comprendía la elongación a 72 °C por 10 min. y al finalizar se procedió a su visualización.

#### **4.10 Visualización por Electroforesis en Agarosa**

Para la realización del gel de agarosa se pesó 1.6 g. de agarosa (Agarose, Fisher Scientific, Made in United States), luego fueron disueltos en 80 ml de TBE 1X (900 ml de agua destilada con 100 ml de TBE 10X) en el microondas por aproximadamente 2 min. hasta llevar a ebullición y lograr la disolución completa, luego fue enfriado con agua pero no completamente y se añadió 5.3  $\mu$ L de Bromuro de etidio (cancerígeno), se homogenizó y colocó en molde para su polimerización.

Una vez polimerizado el gel, se retiraron los peines y este se colocó en la cámara electroforetica (Electrophoresis Hood 0.7X (EPH-7)) que contenía TBE1X.. En cada pocillo se colocó la muestra que contenía 3  $\mu$ L de Loading (TrackIt™ Cyan/Yellow Loading Buffer, invitrogen) y 7  $\mu$ L de producto de PCR, en el primer pocillo se colocó el Marcador de peso Molecular (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder, invitrogen), en los siguientes se colocó las muestras y en los últimos pocillos se colocaron los controles negativo y positivo. La electroforesis se realizó a 100 V por 45 min. Los productos de PCR se visualizaron en un trans-iluminador de luz ultravioleta (UV, Fisher Scientific ) se consideró positivo todo aquel producto de PCR al que se le observara un amplimero de 330 bp. Se tomó fotografía para registro con cámara fotográfica de electroforesis (Polaroid Gel Cam Tominon 1:4.5 f=105mm, Made in Japan).

#### **4.11 Genogrupo SaV**

##### **4.11.1. PCR Genérico**

Se realizó una mezcla que contenía: 20.5  $\mu$ L de agua libre de RNase/DNase, 1 PCR bead, 2  $\mu$ L de Primer (0.5  $\mu$ L de VF14, 0.5  $\mu$ L de VF13, 0.5  $\mu$ L de R13, 0.5  $\mu$ L de R14), 2.5  $\mu$ L de cDNA para una mezcla de volumen final de 25  $\mu$ L. Se colocó en el termociclador con el programa de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min., desnaturalización 95 °C por 30 s, hibridación 48 °C por 30 s, elongación 74 °C por 45 s, luego se realizaron 35 ciclos desde el paso dos al

cuarto una vez realizados se continuo con un quinto paso de elongación a 74 °C por 5 min. Una La visualización del producto se realizó por electroforesis en gel de Agarosa siguiendo protocolo descrito anteriormente, en el que se observaría un amplimero de 800 bp.

#### **4.11.2. Genotipificación SaV**

Se realizó una mezcla de volumen total de 25 µL para cada muestra, conteniendo Producto de 800 bp 4 µL, Primer coctel 25pmol (VF14, VF13, SG1, SG2, SG4, SG5) 1 µL, agua libre de RNase/DNase 20 µL y finalmente 1 PCR beads. Los viales fueron colocados en el termociclador y se inició el programa de genotipificación el que consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min., una desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a 48 °C por 30 s, un proceso de elongación a 45 °C por 45 s. se realizaron 35 ciclos partiendo del paso 2 al 4, una vez finalizados los 35 ciclos se da una elongación final a 74 °C por 5 min. La visualización del producto de PCR fue por electroforesis en agarosa siguiendo protocolo descrito anteriormente, en el que se observarían amplimeros de 500 bp para SG1, 430 bp para SG2, 360 bp para SG4 y de 290 bp para SG5.

#### **4.12 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo en el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 12.0.1. mediante estadística descriptiva con cruce de variables. Además se analizaron algunos OR (Odds Rates) y valores de p con el programa Epidat version 3.1.

## 5. RESULTADOS

**Perfil epidemiológico.** SaV fue detectado en 16 (16%) de las 100 muestras de niños analizadas. Según el estatus clínico, se observa 16% de infecciones por SaV en niños con diarrea y 13% en niños sin diarrea. La infección con SaV fue más frecuente (20%) en los casos de la comunidad que en los hospitalizados (5%) (OR = 4.4, p = 0.12). Al estratificar según grupos de edades se observa que la infección sintomática fue significativamente (OR = 0.4, p = 0.11) más frecuente niños menores de  $\leq 6$  meses (45%) que en los otros grupos de edades. Resultados similares se observa al comparar ambos sexo, donde las niñas resultaron más frecuentemente infectadas que los niños significativamente (33% vs 6%) (OR = 0.1 p = 0.003)(Tabla 2).

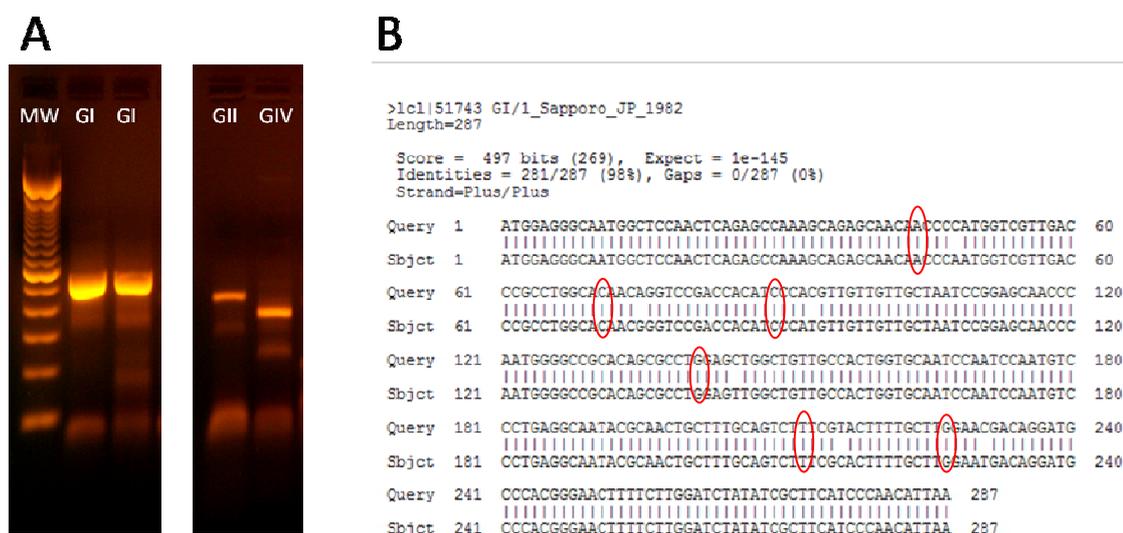
**Perfil clínico.** En los 14 niños sintomáticos infectados con SaV, la característica más común fue pérdida del apetito (64%), seguido de vómitos (43%), náuseas (28%), y fiebre (28%). Solamente 1 niño de los infectados con SaV requirió hospitalización y rehidratación intravenosa.

**Tabla 2.: Perfil Epidemiológico de Muestras SaV Positivas.**

	<i>Sintomáticos (n=85)</i>		<i>Asintomáticos (n=15)</i>	
	Total	SaV positivo (%)	Total	SaV positivo (%)
<b>Ubicación</b>				
<i>Comunidad</i>	66	13(20)	15	2(13)
<i>Hospital</i>	19	1(5)	0	-
<i>Ambos</i>	85	14 (16)	15	2(13)
<b>Sexo</b>				
<i>Masculino</i>	52	3(6)	6	1(17)
<i>Femenino</i>	33	11(33)	9	1(17)
<b>Edad en meses</b>				
$\leq 6$	11	5(45)	0	-
7 – 12	18	1(5)	5	1(20)
12 – 24	29	3(10)	9	1(11)
25 - 60	27	5(18)	1	

**Tipificación genética de los Sapovirus.** Para investigar la diversidad genética de los SaV que infectan a los niños en León los 16-SaV positivos fueron analizados mediante un PCR. Todos los genogrupos de SaV que infectan a los humanos fueron encontrados en los niños sintomáticos y asintomáticos de este estudio. De los 14 SaV-positivos encontrados en los niños sintomáticos, el genogrupo más frecuente fue GI con 43%, seguido de GII con 29%. GIV con 7% y GV con 7%. En 2 niños se encontraron co-infecciones con GI:GII y GII:GIV, respectivamente (Tabla 3). Los 2 SaV-positivos encontrados en niños asintomáticos, pertenecían a GI y GIV, respectivamente.

**Figure 5 Secuenciación de Mx. SaV GI aislada de una niña.**



**Análisis de la secuencia de nucleótidos.** Para investigar que variante genética (genotipo) del GI fue predominante en este estudio, se realizó la secuenciación parcial del extremo 5' del gen de la cápside de un espécimen de GI aislado de una niña con deshidratación leve. Los resultados revelan un 98% de homología con la cepa "Sapporo 82", prototipo del género SaV, y clasificada como genotipo 1 (GI/1) (Fig 5).

**Tabla 3.: Tipificación Genética de SaV aislados en Niños**

<i>Genogrupo</i>	<i>Sintomáticos (%)</i>	<i>Asintomáticos (%)</i>
<i>GI</i>	6 (43)	
<i>GII</i>	4 (29)	1 (50)
<i>GIV</i>	1 (7)	-
<i>GV</i>	1 (7)	1 (50)
<i>GII:GV</i>	1 (7)	-
<i>GI:GII</i>	1 (7)	-

**Detección de Sapovirus en Cerdos.** Para investigar si los cerdos criados de forma domiciliar son portadores de SaV, se investigaron un total de 86 muestras recolectadas en cerdos asintomáticos, encontrando 8 (9%) muestras positivas. Lo más interesante, es que los primers utilizados en este análisis, fueron diseñados para la detección de SaV en humanos. Estos resultados indican que las cepas de SaV encontradas en humanos y en cerdos en este estudio tienen un grado de homología en los sitios de hibridación de los primers en la secuencia de nucleótidos.

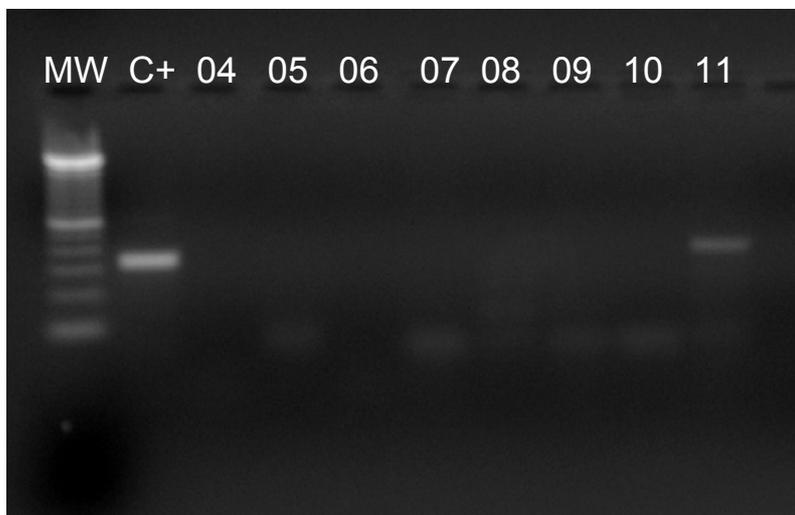
**Características epidemiológicas de las infecciones por SaV en cerdos.** Las infecciones por SaV fueron más frecuente (75%) en cerdos machos. La infección es más común (75%) en cerdos  $\leq$  6 meses de edad. Los cerdos de la raza criolla tienen mayor tendencia a la infección que los de la raza Landrace (75% vs 12.5%, OR = 0.4, p = 0.3).

**Tabla 4.: Perfil epidemiológico de las infecciones por SaV en cerdos asintomáticos.**

<i>Característica Epidemiológica</i>	<b>Total 86</b>	<b>SaV positivo 8 (9%)</b>
<i>Sexo</i>		
Macho	48	6 (75%)
Hembra	38	2 (25%)
<i>Edad en Meses</i>		
≤ 6	64	6 (75%)
7 – 12	16	2 (25%)
13 a mas	6	-
<i>Raza</i>		
Criollo	73	6 (75%)
Landrace	7	1 (12.5%)
Duroc	1	-
Desconocida	5	1 (12.5%)

**Tipificación genética de SaV en cerdos.** Para investigar la diversidad genética de los SaV encontrados en las muestras de cerdos positivos se realizó un PCR utilizando primers específicos para GGI, GGII, GGIV, GGV, en ninguna muestra se logró obtener un resultado positivo, indicando que los SaV-positivos de cerdos encontrados en este estudio pertenecen a un genogrupo diferente a los investigados.

**Figura 6. Visualización muestras de cerdos SaV positivas mediante electroforesis en gel de agarosa**



## 6. DISCUSIÓN

En Nicaragua, como en Centro America no existen antecedentes documentados sobre brotes de gastroenteritis asociada a SaV o casos esporádicos de diarrea por SaV. Este estudio describe por primera vez la epidemiología molecular de los SaV en la diarrea infantil en Nicaragua y la presencia de dichos virus en cerdos criados de forma artesanal.

Un estudio sobre enfermedades víricas debe prestar atención a la existencia de virus que potencialmente pudiesen afectar a las personas y otras especies como los cerdos. Un ejemplo típico de este tipo de virus es influenza. El potencial patogénico de un virus depende de la dosis infecciosa del virus, la susceptibilidad del huésped y la estabilidad del virus en el medio ambiente. Los Calicivirus se adaptan perfectamente a su papel como patógenos, el género SaV son virus sin envoltura, resistentes a la desinfección, el calor y los cambios de pH y la dosis infecciosa es muy baja. SaV es cada vez más reconocido a nivel mundial como causa de brotes de gastroenteritis [Blanton L, ; Chiba et al., 2000; Farkas T et al., 2004; Gallimore C et al., 2006; Johansson PJ, 2005; Phan T, 2006]. SaV además de infectar a los humanos también se ha demostrado que infectan cerdos y diversos estudios reportan su existencia en cerdos asintomáticos [Collins PJ., 2009; Hyun-ok Keum, 2009; Janet Zimsek Mijovski, 2010].

En este estudio SaV fue encontrado en un 16% en los niños  $\leq 5$  años, de igual forma estudios de prevalencia de SaV en individuos hospitalizados y ambulatorios han sido realizados en países como Tunicia, encontrando una prevalencia de apenas el 0.8% [Khira Sdiri-Loulizi, 2011]; sin embargo, otros estudios han reportado altas prevaletías de infecciones por SaV, por ejemplo, en niños con gastroenteritis aguda en Finlandia y Japón se encontraron prevalencias de 10% y 17,6%, respectivamente [Phan T, 2006] y en Finlandia (10%) [Pang XL, 2000].

En años anteriores en Nicaragua Bucardo et. al., realizó un estudio en el cual determinó una prevalencia de NoV del 12% en niños  $\leq 5$  ambulatorios y 16% en hospitalizados [Bucardo et al., 2008], [Glass RI, 2001]. A pesar que SaV es considerado un patógeno poco común en la diarrea, este estudio revela una prevalencia superior (12% vs 16%) a la reportada de NoV en estudios previos, indicando una alta tasa de transmisión, probablemente facilitada por las insipientes condiciones higiénicas sanitarias o por el refinamiento de los métodos de diagnóstico. Según los datos presentados en este estudio y los estudios previos los calicivirus (NoV y SaV) podrían considerarse la principal causa de diarrea viral (28%) en la época post-vacuna rotavirus, ya que antes de la introducción de la vacuna rotavirus era considerado la principal causa de diarrea (30%).

SaV tiene una alta diversidad genética lo que explica que existan diversos genogrupos que pudiesen ser detectados entre las muestras SaV positivas de este estudio. En investigaciones realizadas en otros países como Túnez, se ha notado que el genogrupo que se encuentra con mayor frecuencia normalmente es GI [Khira Sdiri-Loulizi, 2011], siendo este mismo genogrupo el que predominó en nuestro estudio con 43% seguido del GII con 29%. Además se logró determinar una muestra GIV (6.25%) el cual también ha sido encontrado en países como Japón, Tailandia, Pakistán y China [Akihara S, 2005; Phan TG, 2007].

Los SaV humanos en este estudio fueron detectados con mayor frecuencia en la temporada de invierno (62.5%), esto coincide con un estudio realizado en Japón por Okada et. al. en donde los casos de Gastroenteritis por SaV fueron encontrados en mayor proporción en la temporada de invierno (6.6%) [Okada, 2002], sin embargo Chiba et. al. indica que los brotes por SaV ocurren durante todo el año, no mostrando un patrón claro de ocurrencia [Chiba et al., 2000].

Hay que resaltar que los casos encontrados en este estudio como SaV positivos incluían a individuos asintomáticos (13%) al igual que en un estudio clínico reciente en Nagano, Japón que indica que hay personas asintomáticos con alta carga viral, ya que la excreción de SaV incluso después de la recuperación de los síntomas de la gastroenteritis es alta [Yoshida, 2009]. En otro estudio realizado en la India por Mónica et al. se determinó SaV en muestras de heces de 13 niños asintomáticos menores de 3 años de edad en la comunidad [Monica, 2007].

Recientes estudios revelan que 2 diferentes variantes de SaV de un mismo genogrupo pueden sufrir eventos de recombinación y dar origen a una variante (hija) con características genéticas de los virus que le dieron origen (paternas). Sin embargo, recombinación genética entre SaV de diferentes genogrupos todavía no ha sido observada, si este fenómeno se produjera tendría consecuencias serias, pues virus que infectan diferentes especies podrían recombinarse y dar origen a variantes con potencial patogénico desconocido. Hansman et. al. analizó 2 diferentes cepas que probablemente tuvieron origen en la recombinación de los genogrupos GGII y GIV. Martella et al describieron SaV humanos genéticamente relacionados con SaV porcinos [Hansman, 2005]. Estos hallazgos revelan que la recombinación entre cepas de diferentes genogrupos puede ser posible, pero hasta el momento no hay evidencia sólida que dichos eventos ocurren.

En la actualidad se ha detectado SaV en cerdos con diarrea en fincas de países como EEUU (62%), Europa (7.6%), Korea (11.2%) [Gabor Reuter, 2010; Hyun-ok Keum, 2009; Qiu-Hong Wang, 2006a], de igual forma otros estudios revelan que SaV no solo está presente en cerdos con diarrea sino que también en cerdos asintomáticos como se encontró en países como Brasil (30.1%) y Eslovenia (7.1%) [Barry et al., 2008; Janet Zimsek Mijovski, 2010]. En el corriente estudio hemos demostrar la presencia de SaV en cerdos de crianza

domiciliar en la ciudad de León, en donde se determinó que SaV estaba presente en un 9% de los cerdos asintomáticos. Para investigar si estos SaV porcinos tiene relación genética con SaV humanos se necesitan estudios de secuenciación genética y análisis filogenéticos.

## 7. CONCLUSION

- SaV fue encontrado en 16% y 13% de los niños  $\leq 5$  años sintomáticos y asintomáticos, respectivamente. La mayoría de niños SaV positivos provenían de la comunidad (20%).
- La epidemiología molecular nos revela que SaV GGI (43%) es el más frecuente detectado, seguido de SaV GGII (29%).
- Se determinó que los cerdos también son infectados con SaV (9%) aun siendo asintomáticos.
- Los cerdos SaV positivos fueron en su mayoría menores a 6 meses de edad.
- El genogrupo de SaV porcino en las cepas identificadas en este estudio es diferente de GGI, GGII, GGIV, GGIV.

## **8. RECOMENDACIONES**

- Realizar estudios de secuenciación de todas de las cepas encontradas tanto en humanos como en cerdos.
- Extender el estudio de SaV en otras especies animales como los bovinos, para investigar posibles vías de transmisión zoonóticas

## 9. REFERENCIAS

- Akihara S PT, Nguyen TA, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE. 2005. Identification of sapovirus infection among Japanese infants in a day care center. *J Med Virol* 77:595–601.
- Atmar RL, Estes MK. 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 14(1):15-37.
- Bank-Wolf BR, König M, Thiel HJ. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Vet Microbiol* 140(3-4):204-212.
- Barry AF, Alfieri AF, Alfieri AA. 2008. High genetic diversity in RdRp gene of Brazilian porcine sapovirus strains. *Vet Microbiol* 131(1-2):185-191.
- Bishop RF. 1996. Natural history of human Rotavirus infection.
- Blacklow NR, HB. G. 1991. Viral gastroenteritis.
- Blacklow NR, Greenberg HB. 1991. Viral gastroenteritis. *N Engl J Med* 325(4):252-264.
- Blanton L AS, Beard RS. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000–2004. *J Infect Dis* 2006:193:413-121.
- Boivin G, Abed Y, Boucher FD. 2005. Human parechovirus 3 and neonatal infections. *Emerg Infect Dis* 11(1):103-105.
- Brooks Geo F. BJS, Morse Stephen A. 2005. *Microbiologia Medica de Jawetz, Melnick y Adelberg*
- Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Paniagua M Lindgren PE, Espinoza F, Svensson L. 2008. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol* 46(8):2573-2580.
- Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S. 2000. Sapporo virus: history and recent findings. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S303-308.
- Chow BD, Ou Z, Esper FP. Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. *J Clin Virol* 47(2):143-147.
- Collins PJ. MV, Buonavoglia C., O`Shea H. 2009. Detection and characterization of porcine Sapoviruses from asymptomatic animals in Irish farm. US National Library of Medicine.
- Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara MI, El-Attar L, Gray J. 2004. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect* 48(4):289-302.
- Cubitt WD. 1989. Diagnosis, occurrence and clinical significance of the human 'candidate' caliciviruses. *Prog Med Virol* 36:103-119.
- Dabanch P. J. 2003. Zoonosis.
- Dastjerdi AM, Green J, Gallimore CI, Brown DW, Bridger JC. 1999. The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* 254(1):1-5.
- Espinoza F. 2004. Rotavirus in Pediatric Gastroenteritis in Nicaraguan Children. Stockholm: Karolinska Institute.
- Farkas T, Zhong W, Jing Y. 2004. ;Genetic diversity among sapoviruses

149:1309-1323.

Flynn WT, Saif LJ, Moorhead PD. 1988. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 49(6):819-825.

Gabor Reuter JZ-M, Mateja Poljsak, Ilaria di Bartolo, Franco Maria Ruggeri. 2010. Incidence, Diversity and Molecular epidemiology of Sapoviruses in Swine across Europe. *Clinical Microbiology*

Gallimore C, Iturriza-Gomara M, Lewis D, Cubitt D, Cotterill H, J G, . 2006. Characterization of sapoviruses collected in the United Kingdom from 1989–2004. *J Med Virol* 78:673-682.

Gerardo G. Polanco-Marín MB-B, Javier Cámara-Mejía, Marilyn Puerto-Solís, María del R. González-Losa, Fernando I. Puerto. Transmisión natural de rotavirus entre humanos y animales.

Glass RI BJ, Jiang B, Gentsch J, Ando T, Fankhauser R, Noel J, Parashar U, Rosen B, Monroe SS. 2001. Gastroenteritis viruses: an overview.

Novartis Found Symp 238:235-219.

Glass RI PU, Estes MK. 2009. Norovirus gastroenteritis. *The new England Journal of Medicine*.

González dCDR. 2007. Gastroenteritis de Etiología Viral no causadas por Rotavirus. *VOX PAEDIATRICA* 15.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S322-330.

Greenberg H, V. McAuliffe, J. Valdesuso, R. Wyatt, J. Flores, A. Kalica, Y. Hoshino, and N. Singh. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infection and Immunity* 39:91-99.

Gunther H, Otto P. 1987. [Diarrhea in young calves. 7. "Zackenvirus" (Jena agent 117/80)--a new diarrhea pathogen in calves]. *Arch Exp Veterinarmed* 41(6):934-938.

Guo M, Chang KO, Hardy ME, Zhang Q, Parwani AV, Saif LJ. 1999. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. *J Virol* 73(11):9625-9631.

Guyton A, Hall J. 2000. Textbook of medical physiology. Company S, editor. Philadelphia.

Han TH, Chung JY, Hwang ES. 2009. Human bocavirus 2 in children, South Korea. *Emerg Infect Dis* 15(10):1698-1700.

Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N. 2007a. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 17(2):133-141.

Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N. 2007b. Antigenic diversity of human sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 13(10):1519-1525.

Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, Takeda N. 2007c. Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. *J Clin Microbiol* 45(4):1347-1349.

Hansman GST, N.; Oka, T.; Oseto, M.; Hendlund, K.O.; Katayama, K. 2005. Intergenogroup recombination in Sapoviruses. *Emerg Infect Dis*.

Hyun-ok Keum H-JM, Seong-jun Park, Hye-kwon Kim, Se-mi Rho. 2009. Porcine Noroviruses and Sapoviruses on Korean swine farms. Springer-Verlag.

ICTV. 2009. Virus Taxonomy: 2009 Release.

Janet Zimsek Mijovski MP-P, Andrej Steyer, Darja Barlic-Maganja, Srecko Koren. 2010. Detection and Molecular characterisation of Noroviruses and Sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farm. Elsevier.

Johansson PJ BK, Larsson P, . 2005. A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. . Scand J Infect Dis:37:200-204.

Kapikian AZ, Hoshino, Y., and Chanock R. M. 2001. Rotaviruses. In: Knipe ID, editor. Field Virology: Lippincott Williams and Wilkins.

Khira Sdiri-Loulizi MH, Hakima Gharbi-khelifi, Zaidoun Aouni. 2011. Molecular detection of genogroup I sapovirus in Tunisian children suffering from acute gastroenteritis.

Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X, Estes MK. 2002. Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. J Clin Microbiol 40(7):2459-2465.

Lopez CJ. 2006 Tecnologia Sostenible.

Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. Epidemiol Infect 124(3):481-487.

Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO. 2003. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. Epidemiol Infect 131(1):727-736.

McMahan ZH, DuPont HL. 2007. Review article: the history of acute infectious diarrhoea management--from poorly focused empiricism to fluid therapy and modern pharmacotherapy. Aliment Pharmacol Ther 25(7):759-769.

MINSA N. 2008. Enfermedades Sujetas a Vigilancia Epidemiológica NICARAGUA , Semana N° 33.

Monica B, S. Ramani, I. Banerjee, B. Primrose, M. Iturriza-Gomara, C. I. Gallimore, D. W. Brown, F. M. P. D. Moses, J. J. Gray, and G. Kang. 2007. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. 77.

Moreno-Espinosa S, Farkas T, Jiang X. 2004. Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. Semin Pediatr Infect Dis 15(4):237-245.

Okada M, K. Shinozaki, T. Ogawa, and I. Kaiho. 2002. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. 147.

Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Shinozaki K. 2006. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. Arch Virol 151(12):2503-2509.

Pang XL HS, Nakata S, Vesikari T. 2000. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. ;. J Infect Dis 2000:181(Suppl 182):S288-194.

Pathel MM, Widdowson M. A., Glass R. I., Akazawa K., Vinje J., and Parashar U. D. 2008. Systematic literature review of role of Noroviruses in sporadic gastroenteritis.

Phan T TQ, Yagyu F, . 2006. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka city, Japan during 2004–2005. *J Med Virol* 78:839-846.

Phan TG KP, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S. 2007. Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. . *Infect Genet* 7:542–546.

Qiu-Hong Wang MS, Julie A. Funk, Wei Zhang and Linda J. Saif. 2006a. Prevalence of Noroviruses and Sapoviruses in Swine of various ages determined by Reverse Transcription-PCR and Microwell Hybridization Assays.

Qiu-Hong Wang VC, Linda J. Saif. 2006b. Porcine enteric Caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human Caliciviruses, diagnosis and epidemiology.

Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. 2002. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 35(3):246-253.

Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. 1980. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol* 12(1):105-111.

Schaub SA, Oshiro RK. 2000. Public health concerns about caliciviruses as waterborne contaminants. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S374-380.

Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. 1998. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 143(6):1215-1221.

UNICEF Wa. 2009. Why children are still dying and what can be done.

van Der Poel WH, Vinje J, van Der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MP. 2000. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* 6(1):36-41.

Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Mollby R, Weintraub A. 2009. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. *J Med Microbiol* 58(Pt 5):630-637.

Vinje J, Deijl H, van der Heide R, Lewis D, Hedlund KO, Svensson L, Koopmans MP. 2000. Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *J Clin Microbiol* 38(2):530-536.

W.H.O. G. 1992. WHO: Readings on Diarrhoea - A student Manual.

Wang QH, Chang KO, Han MG, Sreevatsan S, Saif LJ. 2006. Development of a new microwell hybridization assay and an internal control RNA for the detection of porcine noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 132(1-2):135-145.

Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9(4):247-262.

Woode GN, Bridger JC. 1978. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J Med Microbiol* 11(4):441-452.

Yoshida T, S. Kasuo, Y. Azegami, Y. Uchiyama, K. Satsumabayashi, T. Shiraishi, K. Katayama, T. Wakita, N. Takeda, and T. Oka. 2009. Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load 45.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346(2):312-323.

Zintz C, Bok K, Parada E, Barnes-Eley M, Berke T, Staat MA, Azimi P, Jiang X, Matson DO. 2005. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Infect Genet Evol* 5(3):281-290.