

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN – 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



***“Epidemiología molecular de Norovirus en niños con  
diarrea inmunizados contra Rotavirus. 2009 – 2010”***

**Autor:** Lic. Yaoska Isabelia Reyes Berrios.  
Asistente de Investigación  
Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas

**Tutor:** Dr. Filemón Bucardo Rivera  
Profesor titular  
Departamento de Microbiología y Parasitología  
Facultad de Ciencias Médicas  
UNAN – León

León, Octubre 2012

Para mis padres, *Julio y María Eugenia* y con  
todo mi amor para mi hija, *Alondra Dayana*.

*“Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero aprovechar el momento  
adecuado, es la clave de la vida”.*

*Arthur Schinitzler*

## AGRADECIMIENTOS

Gracias *Jehová Dios* por darme vida y salud para culminar este estudio, gracias a mis padres por su apoyo incondicional en las diferentes etapas de mi vida.

Quiero agradecerle al MSc. Orlando Mayorga por haberme brindado la oportunidad de ingresar a la Maestría en Microbiología Médica.

Muchas gracias al Dr. Filemón Bucardo por su confianza y por creer en mi capacidad para realizar este estudio. Igualmente agradezco infinitamente a todos los trabajadores del Departamento de Microbiología que estuvieron involucrados directa e indirectamente en la realización de mi tesis.

Agradezco muy sinceramente al Dr. Johan Nordgren por su revisión y los comentarios realizados en este estudio.

Este estudio fue realizado con fondos de los proyectos Norovirus – Zoonosis (Netropica Grant 05-N-2010) y LINK – Gastroenteritis, financiado por el consejo Sueco de Investigación (Grant No. 348-2011-7420).

## RESUMEN

Norovirus (NoV) es una de las principales causas de gastroenteritis no bacteriana en todo el mundo. Antes de la introducción de la vacuna anti-rotavirus (RotaTeq®) en Nicaragua, se encontró que NoV era una causa importante de gastroenteritis en niños  $\leq 5$  años. En el presente estudio pretendemos investigar si la prevalencia de NoV se ha incrementado en la misma población infantil a expensas de la presión inmunológica ejercida por la vacuna anti-RV o si la vacuna induce un efecto de protección no específico como fue sugerido en los ensayos clínicos. Este es un estudio descriptivo de corte transversal donde participaron 345 niños  $\leq 5$  años de edad que se presentaron con diarrea aguda entre el 2009 y 2010 a las salas de emergencia de los hospitales HEODRA y Victoria Mota de León y Jinotega, respectivamente, así como a los puestos de Salud de los repartos Rubén Darío y Antenor Sandino de León. La prevalencia global de NoV en este estudio fue del 22%, casi el doble de lo reportado en el 2005 (12%). Puede que este incremento se deba al efecto de la vacunación, es decir la prevalencia de NoV aumentó a expensas de la presión inmunológica ejercida por la vacuna anti-RV, sin embargo, el método utilizado en este estudio es más sensible que el utilizado en el 2005. Un dato relevante reportado es que NoV fue encontrado en el 40% de los niños  $< 6$  meses de edad que recibieron lactancia materna exclusiva y en el 31% de los niños que contaban con una sola dosis de la vacuna anti-RV. NoV GII fue el genogrupo más común con el 90% seguido por GI con 9% y un caso de coinfección con ambos genogrupos. La secuenciación de nucleótidos y los análisis filogenéticos ( $n = 60$ ) permitieron reconocer 7 genotipos diferentes en ambos genogrupos (GII.4, GII.6, GII.9, GII.13, GI.2, GI.3 y GI.4), predominando el genotipo GII.4 (81%). Se pudo observar que la variante de GII.4 denominada Hunter que circuló entre el 2005 y el 2007 en León y Nicaragua fue reemplazada completamente por Minerva en el 2009 y aparentemente esta a su vez fue sustituida por la variante “2010”. Este estudio sugiere que NoV es actualmente la principal causa de gastroenteritis viral en Nicaragua y que la vacuna anti-RV no ejerce ningún efecto de protección, además NoV GII.4 permanece como la variante genética circulante más común al igual de lo que se reporta a nivel mundial. Este estudio amplía conocimientos previos acerca de la influencia de la vacuna RV sobre la ecología de virus asociados con gastroenteritis.

## ABREVIACIONES

---

aa	Aminoácidos
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	Acido Desoxirribonucleico complementario
ARN	Acido Ribonucleico
Ct	Cycle Treshold (Umbral de ciclos)
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FUT	Fucosiltransferasa
HBGA	Histo Blood Group Antigen (Antígenos de grupo histo-sanguíneo)
HEODRA	Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales
IC	Intervalo de Confianza
ICTV	Internartional Committee on Taxonomy of viruses (Comité Internacional de Taxonomía de Virus)
kb	kilobases
mM	Milimolar
NoV	Norovirus
NS	N-terminal Shell
nt	Nucleótidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds Ratio
ORF	Open Reading Frame (Marco de lectura abierta)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RV	Rotavirus
SPSS	Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales
Tm	Temperatura de disociación
VLPs	Viral like particles (Partículas sintéticas como virus)
VPg	Proteína viral ligada al genoma

---

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
OBJETIVOS.....	5
MARCO TEÓRICO.....	6
I.    Estructura de Norovirus.....	8
II.   Diversidad Genética de Norovirus.....	10
III.  Características clínicas.....	15
IV.  Epidemiología .....	18
V.    Patogénesis.....	19
VI.   Inmunidad contra Norovirus.....	21
VII.  Susceptibilidad genética.....	22
VIII. Diagnóstico.....	24
MATERIAL Y METODO.....	36
RESULTADOS.....	41
DISCUSION.....	49
CONCLUSION.....	53
RECOMENDACIONES.....	54
REFERENCIAS.....	55
ANEXOS.....	67

## INTRODUCCIÓN

Estudios recientes estiman que cada año Norovirus (NoV) puede causar aproximadamente 900,000 episodios de gastroenteritis que requieren atención médica y 64,000 hospitalizaciones entre los niños < 5 años de edad que residen en países desarrollados [1]. En países en desarrollo la proporción global de niños con una enfermedad grave por NoV se aproxima al 12%, además puede causar hasta 1,1 millones de hospitalizaciones y 218,000 muertes.

Los NoV son virus pequeños de aproximadamente 27-38 nm de diámetro y poseen una sola hebra de ARN de sentido positivo. Fueron descubiertos en 1972 por Albert Kapikian en filtrado de heces infecciosas derivadas de un brote de gastroenteritis ocurrido en una escuela primaria de Norwalk, Ohio en 1968. Fueron denominados "Virus Norwalk-like" o virus pequeños de estructura redondeada, debido al lugar donde ocurrió el brote o debido a su forma [2]. En el 2002 el ICTV propuso al virus Norwalk como el prototipo del género Norovirus dentro de la familia *Caliciviridae*.

La familia *Caliciviridae*, se divide en cinco géneros que son patógenos humanos y/o de animales. El género NoV se subdivide en seis genogrupos (G), de los cuales GI y GII son los principales patógenos humanos [3, 4]. Cada genogrupo además puede subdividirse en genotipos, hasta la fecha, se han descrito 18 genotipos en GII y 7 en GI [5]. Estudios recientes revelan 2 nuevos genotipos pertenecientes a GII aun no clasificados, el primero es derivado de humanos (GII.18 NICA) y el segundo de cerdos (GII.18 QW) [6].

Los NoV que infectan humanos no pueden cultivarse en líneas celulares y todavía falta encontrar un modelo animal que replique la infección, para realizar estudios sobre patogénesis viral. Sin embargo, el desarrollo de técnicas moleculares ha proporcionado una visión más clara sobre el impacto epidemiológico de NoV en la salud pública en muchos países [7].

Antes de la introducción de la vacuna pentavalente anti-rotavirus (RotaTeq®) en Nicaragua, se encontró que NoV era una causa importante de gastroenteritis en niños  $\leq 5$  años [6]. En este estudio pretendemos investigar si la prevalencia de NoV se ha incrementado en la misma población infantil a expensas de la presión inmunológica ejercida por la vacuna anti-RV. Además, verificar si la vacuna induce selección de cepas virales dentro del género NoV.

Basado en los hallazgos de los ensayos clínicos con la vacuna RotaTeq® dicho incremento no se observaría, porque, la eficacia de la vacuna fue de 74% contra la gastroenteritis por RV y 98% contra la diarrea severa de otras causas [8]. Es decir, la vacuna produce un “efecto de protección no específico”, de mecanismo desconocido, contra la diarrea de otras causas.

## JUSTIFICACION

En Nicaragua se han realizado diferentes estudios con el objetivo de determinar el impacto de la vacunación contra RV sobre la diarrea infantil. El estudio realizado por Patel y colaboradores, demostró una eficacia del 46% contra la diarrea que requiere hidratación intravenosa o admisión hospitalaria, 58% contra la diarrea severa, y 77% contra la diarrea muy severa [9]. Otro estudio realizado por Becker-Dreps y colaboradores revela que la incidencia de la diarrea severa disminuyó [10], sin embargo la incidencia de la diarrea en el país sigue siendo alta, el más reciente estudio realizado por Bucardo y colaboradores. mostró una baja prevalencia de Rotavirus y una alta prevalencia de NoV en aguas residuales de la ciudad de León, sugiriendo que existe una alta transmisión de NoV entre la población [11].

Estos datos muestran que la vacuna ha sido eficaz contra la diarrea severa y la tasa de RV es baja pero todavía existe una alta incidencia de la diarrea por otras causas, la necesidad de investigar el verdadero panorama de las infecciones causadas por NoV y la realización de este estudio contribuirá al conocimiento epidemiológico-molecular de NoV como causante de gastroenteritis aguda en Nicaragua después de la introducción de la vacuna anti-rotavirus.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Cuál será el efecto, desde el punto de vista epidemiológico-molecular, de la inmunización contra Rotavirus sobre las infecciones gastrointestinales causadas por Norovirus en niños  $\leq 5$  años de edad de la ciudad de León y Jinotega durante el periodo Septiembre 2009 – Octubre 2010?

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Describir la epidemiología molecular de las infecciones por Norovirus en niños  $\leq 5$  años con diarrea inmunizados contra Rotavirus.

### **Objetivos Específicos**

1. Describir las características clínicas y epidemiológicas, así como el grado de inmunización contra Rotavirus en niños con diarrea por Norovirus hospitalizados y de la comunidad en León y Jinotega entre 2009 y 2010.
2. Correlacionar el grado de excreción de Norovirus tanto con el grado de inmunización contra Rotavirus, así como con la severidad de la diarrea.
3. Investigar la distribución genotípica de Norovirus mediante análisis filogenéticos de la región NS de la cápside de los Norovirus encontrados en este estudio.
4. Correlacionar la distribución genotípica con las características clínicas, epidemiológicas y el grado de inmunización contra Rotavirus.

## MARCO TEORICO

La gastroenteritis aguda se define como inflamación y/o disfunción intestinal producida por un agente infeccioso o sus toxinas. Se caracteriza por un síndrome diarreico, acompañado o no de vómitos y dolor abdominal. El proceso es más frecuente y grave en los niños que en el adulto sano [12].

Las causas de gastroenteritis incluyen una gran variedad de bacterias, parásitos y virus, pero en muchos lugares la contribución relativa de estos agentes es desconocida. Sin embargo, estudios recientes que emplean métodos moleculares para la detección de virus entéricos han ayudado a esclarecer la etiología de estas infecciones [13].

RV es una de las principales causas de diarrea severa, potencialmente mortal en niños  $\leq 5$  años [14]. RV causa unos 111 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 527,000 muertes cada año en este rango de edad [14].

Con el fin de disminuir la incidencia de la diarrea por RV, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó el uso rutinario de las vacunas contra RV en todos los países, particularmente en aquellos con altas tasas de mortalidad atribuibles a enfermedades diarreicas [15]. Varios ensayos clínicos se han llevado a cabo con el fin de valorar la eficacia de la vacuna Rotateq® contra la gastroenteritis severa provocada por RV, observándose diferentes tendencias tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo [8, 16, 17]. Un estudio realizado en EEUU y Finlandia con 68,038 niños, indicó que la eficacia de la vacuna RotaTeq contra la gastroenteritis por RV G1-G4 fue del 74% y contra la gastroenteritis severa por RV fue del 98% [17].

Por el contrario, un estudio realizado en Bangladesh y Vietnam reportaron que la eficacia de la vacuna contra la gastroenteritis severa fue del 48%, de igual modo otro estudio llevado a cabo en niños africanos mostró un 30% de eficacia contra todas las causas de gastroenteritis severa [18, 19].

En Nicaragua después de la introducción de la vacuna contra RV, se observó que la vacuna tenía una eficacia del 58% contra la diarrea severa, indicando una cobertura media contra los casos de gastroenteritis severa causada por RV [9].

Aunque se ha notado una disminución de los casos severos de gastroenteritis, la incidencia de la diarrea en Nicaragua sigue siendo alta, lo que puede sugerir que otros agentes patógenos estén involucrados [10].

## I. ESTRUCTURA DE NOROVIRUS

Norovirus (anteriormente denominado agente Norwalk), pertenece a la familia *Caliciviridae* otros géneros dentro de esta familia son: Sapovirus, Lagovirus y Vesivirus. Recientemente, Nebovirus y Recovirus han sido propuestos como nuevos géneros [20-22]. NoV fue descubierto por Albert Kapikian en 1972 en filtrados de heces derivados de un brote de gastroenteritis aguda ocurrido entre alumnos y profesores de una escuela de Norwalk en Ohio, EEUU. El virus fue descubierto con una técnica nueva para la época conocida como microscopía inmunoelectrónica [2], que consistía en la observación de inmunocomplejos, virus-anticuerpos, en filtrados de heces, y se le denominó agente Norwalk. Este fue el primer agente etiológico de naturaleza vírica asociado con gastroenteritis [23].

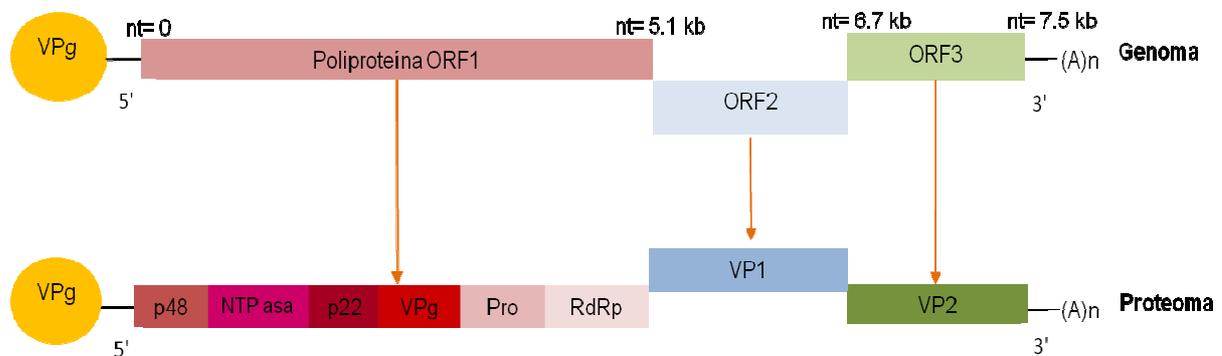
En 1993 Jiang y colaboradores descubrieron la secuencia nucleotídica completa del genoma del virus Norwalk. Los análisis de la secuencia de nucleótidos revelaron un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 7.7 kb [24]. En el extremo 5' se encuentra una proteína del virus (VPg) que está ligada covalentemente al genoma, mientras que el extremo 3' es poliadenilado, lo que permite la protección del ARN frente a la degradación, aumentando su vida media en el citosol, de modo que se puede sintetizar mayor cantidad de proteínas.

Los análisis estructurales indican que el genoma viral está protegido por una cápside de proteínas, la cual contiene depresiones en forma de Copa ó cálices, de ahí el nombre de Calicivirus [25].

El genoma de ARN de NoV se compone de tres marcos de lectura abierta (ORFs). ORF1 codifica una poliproteína no estructural que es subdividida por la proteasa viral en 6 proteínas: p48, una nucleósido trifosfatasa, p22, VPg, proteasa (Pro) y la polimerasa dependiente de ARN (RdRp). La traducción de ORF2 codifica para la proteína de la cápside VP1, que es la principal proteína estructural de NoV. ORF3 codifica VP2, una

proteína estructural cuya función se asocia con la regulación de la expresión de VP1 en *cis* y la estabilización de VP1 en la estructura del virus [26] (Fig.1). Estructuralmente, el monómero de la cápside de la proteína VP1 se divide en dos dominios. El dominio “S” o shell que forma el núcleo de la partícula y el dominio “P” o protuberante que se extiende fuera del núcleo. El dominio P se subdivide en los subdominio P1-1, P2 y P1-2 (aa 226–278, 279–405, 406–520) [25]. El subdominio P2 es la región más expuesta de la partícula viral y está bien posicionado para interactuar con posibles anticuerpos neutralizantes y ligandos de antígenos de grupo histosanguíneo (HBGA) [27-31].

Estudios anteriores han demostrado que el subdominio P2 de la proteína de la cápside mayor de cepas GII.4 está evolucionando rápidamente, dando como resultado nuevas cepas epidémicas con la alteración de las propiedades de unión al ligando de carbohidratos y antigenicidad variable [28, 32-37].



**Figura 1.** Organización del genoma y proteoma de NoV. En la parte superior se muestra los tres marcos de lectura abierta (ORF) del genoma de NoV y en la parte inferior se muestra el proteoma que traduce las proteínas estructurales (VP1 y VP2) y no estructurales (p48, NTPasa, p22, VPg, Pro, RdRp). Las posiciones de nucleótidos (nt) son basadas en la secuencia del genoma de la cepa Lordsdale (GII.4) X86557.

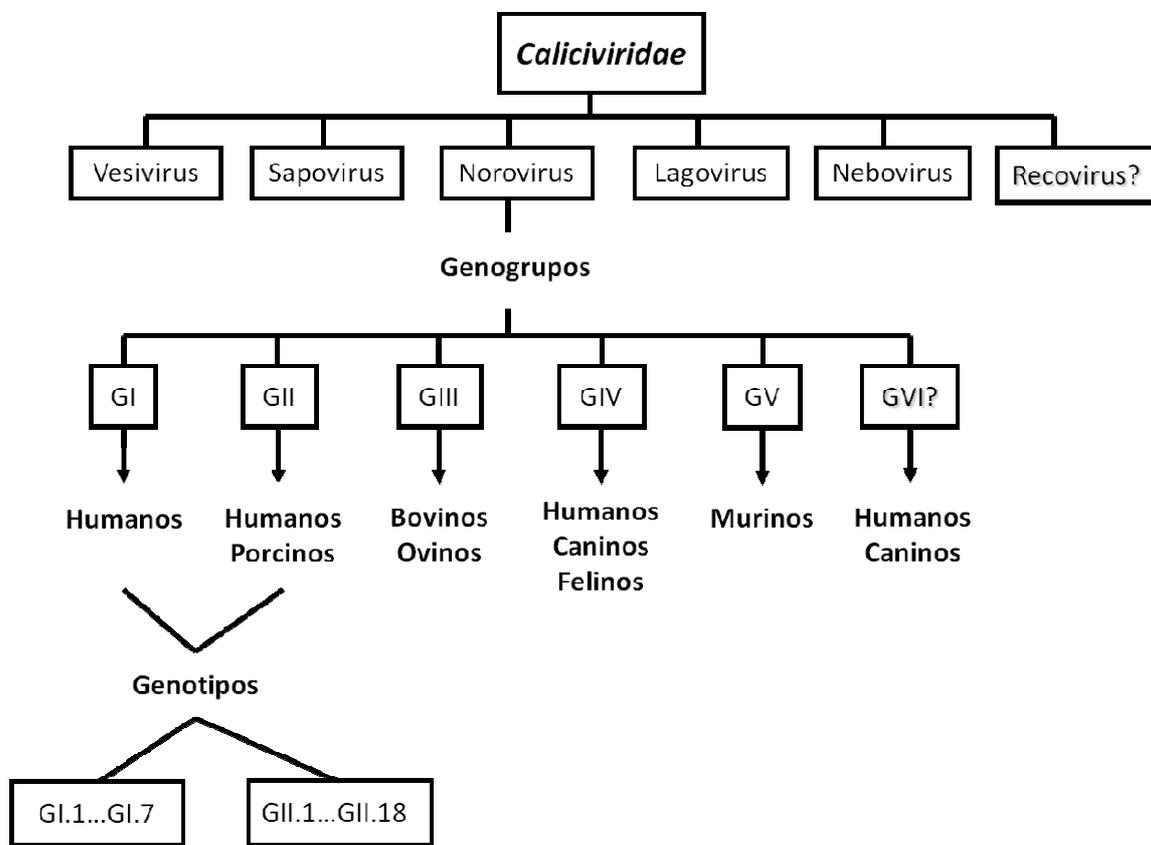
## II. DIVERSIDAD GENETICA DE NOROVIRUS

Genéticamente los Norovirus son altamente diversos, dicha diversidad se atribuye a mutaciones puntuales (sustituciones y deleciones) y recombinación genómica entre cepas del mismo genogrupo de NoV [38]. NoV se ha clasificado en cinco genogrupos basado en el análisis filogenético del gen de la cápside viral (VP1) y se ha subdividido en clústeres genéticos llamados también genotipos (Fig.2). Los cinco genogrupos infectan a una amplia gama de especies; GI infecta a los seres humanos [20], GII infecta a los seres humanos y a la especie porcina [20, 39], GIII infecta especies bovina y ovinas [40, 41], GIV infecta a los seres humanos, caninos y felinos [4, 42, 43] y GV infecta especies murinas [44]. Un sexto genogrupo se ha propuesto recientemente, con infecciones aisladas tanto en los seres humanos como en los perros [45].

Dentro de los genogrupos GI y GII, se han descrito hasta la fecha 8 y 17 genotipos respectivamente. Los NoV del GI son comúnmente encontrados en brotes epidémicos asociados a contaminación alimentaria y el genotipo GI.1 es el dominante [46]. En cambio los NoV GII se encuentran tanto en brotes epidémicos como en casos esporádicos, el genotipo GII.4 es dominante a nivel global y es comúnmente observado en casos graves de gastroenteritis por NoV [47].

Se han observado discrepancias sobre cuántos genotipos existen realmente, debido a que pocos estudios han examinado secuencias de cápside completas, y ninguno ha incluido secuencias de los cinco genogrupos, además cada año se reporta un gran número de secuencias en el GenBank. Entre los estudios más reconocidos está un análisis de 39 secuencias de la cápside de NoV humano que los clasificó en 23 diferentes grupos genéticos (7 en GI, 15 en GII y 1 en GIV) [46]. Otro estudio realizado por Kageyama y colaboradores basaron sus análisis en la secuencia parcial de la cápside y en la región RdRp y reportaron 14 genotipos dentro de GI y 17 genotipos en GII [48].

Para obtener un consenso sobre la clasificación de NoV, Zheng y colaboradores examinaron 164 secuencias de aminoácidos de la cápside de los NoV humanos y de animales. Estos autores identificaron cinco genogrupos que comprende 29 genotipos, con 8 genotipos en GI, 17 en GII, 2 en GIII y uno en GIV y GV [5]. Esta clasificación es usada actualmente como referencia. Un dato interesante de este estudio es que los investigadores sugieren que la región C (NS) puede ser usada para identificar genotipos en estudios epidemiológicos.



**Figura 2.** Clasificación de los Calicivirus según el ICTV. En la parte superior la familia *Caliciviridae* que se divide en 5 géneros. Recovirus? representa un sexto género propuesto recientemente pero todavía no aceptado por el ICTV. El género Norovirus se ha dividido en seis genogrupos basado en el análisis de la cápside. Los genogrupos se han subdividido en genotipos, 7 en GI y 18 en GII actualmente.



**Cuasiespecies.** Según la Enciclopedia de Virología (Encyclopaedia of virology) “Se denominan cuasiespecies víricas las distribuciones dinámicas de genomas víricos no idénticos pero estrechamente relacionados entre sí” [49]. Por lo general, una población de cuasiespecies consta de un genoma cuantitativamente dominante, rodeado de una nebulosa de secuencias diferentes [50, 51]. Dentro de esta nube heterogénea de variantes genéticas, se generarán mutantes con mayor capacidad para adaptarse a diversos ambientes. Un clon será predominante bajo las condiciones existentes ya que se ajusta mejor, pero cuando ocurre un cambio de condiciones, otros clones pueden adaptarse mejor a las nuevas condiciones y, por tanto, este nuevo clon dominará.

Los virus de ARN tienen una alta tasa de mutaciones debido a la pobre actividad correctora de las RdRp ( $10^{-4}$  mutaciones por nucleótido copiado). Los estudios han demostrado que la tasa de mutación de los virus de ARN podría ser hasta de 1 millón de veces mayor que la tasa de mutación del genoma humano [50, 52]. Es decir la actividad correctora de las ADN polimerasas del humano son altamente eficientes.

Dada la alta tasa evolutiva y de mutación de NoV, hay una alta probabilidad que las poblaciones de cuasiespecies ocurran dentro de un mismo individuo [33, 53]. Debido a que NoV no crece en cultivos celulares, resulta difícil estudiar *in vitro* el fenómeno de cuasiespecies. No obstante, el estudio *in vivo* es factible, ya que NoV puede causar infecciones persistentes en pacientes inmunocomprometidos. El primer estudio de este tipo, fue realizado en un paciente con trasplante de corazón que desarrolló diarrea crónica y excreción de NoV durante un año [54]. Los análisis iniciales revelaron que durante un año se produjeron 32 sustituciones de aminoácidos en el gen de la cápside y que el dominio P2 fue la región más afectada. Estudios posteriores indicaron que la evolución en los dominios P1-1 y P2 es dependiente del tiempo [55].

Siebenga y colaboradores durante una vigilancia intra-hospitalaria de NoV encontraron que aproximadamente el 8% de todas las infecciones nosocomiales de NoV, fueron crónicas [56]. También encontraron una correlación entre el grado de inmunosupresión y el número

de mutaciones de aminoácidos en el dominio P2 de la cápside. El estudio concluyó que entre más se suprime el sistema inmunológico, menos mutaciones de aminoácidos ocurren en la población de cuasiespecies virales, lo que sugiere una selección inmuno-modulada de clones virales.

La hipótesis de una respuesta inmuno-modulada en la evolución de NoV en pacientes inmunocomprometidos fue confirmado más tarde por Schorn y colaboradores [57]. Ellos encontraron la acumulación de mutaciones puntuales dependientes del tiempo en los dominios P2 y P1-2 de cepas de NoV GII.4, GII.7 y GII.17, aisladas en pacientes con trasplante de riñón. Muchas mutaciones resultaron en cambios de aminoácidos, y hasta 25 mutaciones de aminoácidos fueron acumulados durante un período de casi dos años.

En otro estudio realizado por Hoffmann y colaboradores se investigó la evolución de NoV (genotipo GII.4 y GII.7) en tres pacientes con infección crónica. Claramente, los resultados sugirieron que las cuasiespecies de NoV evolucionaron bajo selección positiva en lugar de un cambio incidental. En promedio se acumularon 5 - 9 mutaciones por 100 días en cada genotipo [58]. También se ha observado un patrón evolutivo similar en chimpancés inoculados con NoV GI.1 humano (cepa de Norwalk) [53]. Durante la infección el mayor número de sustituciones de aminoácidos se encontraron en el dominio P2 de la cápside.

Siguiendo la misma línea Boon y colaboradores realizaron un análisis de la evolución de la cápside de NoV GII.3 y GII.4 sobre una perspectiva de 31 años [59]. El análisis evolutivo llegó a la conclusión de que NoV GII.3 y GII.4 tienen una tasa evolutiva aproximada de  $4.16 \times 10^{-3}$  sustituciones de nucleótidos por sitio por año (reloj estricto). Aparentemente el patrón de cambios es genotipo-dependiente. En dichos estudios observaron que mientras NoV GII.3 ha mantenido un patrón de cambios estable, NoV GII.4 ha evolucionado más rápido.

En resumen, los individuos crónicamente infectados con NoV suelen aumentar en la sociedad moderna, como consecuencia del aumento del número de pacientes con trasplantes de órganos. Un individuo inmunocomprometido crónicamente infectado por

NoV, no será capaz de eliminar el virus eficientemente, y permitirá mantener una alta tasa evolutiva. Esta condición dentro del tiempo permitirá el desarrollo de un subconjunto de clones virales (cuasiespecies virales) capaces de producir epidemias, es decir un individuo infectado crónicamente, podría ser un reservorio viral [55].

**Evolución de Nov GII.4.** NoV utiliza dos mecanismos evolutivos: mutación y recombinación homóloga. Ambos mecanismos han sido propuestos en la evolución del linaje de GII.4 [28, 60].

Durante las últimas dos décadas, la mayoría de los brotes de NoV han sido causado por cepas del GII, genotipo 4 (cepas GII.4). Entre 1995 y 2006, cuatro pandemias de Norovirus, asociadas con cepas GII.4 fueron caracterizados mediante estudios epidemiológicos moleculares. Así, a mediados de los 90 la cepa US95/96 fue responsable de aproximadamente el 55% de los brotes de NoV en EEUU [61] y el 85% de los brotes en los Países Bajos [62]. En el 2002, la cepa US95/96 fue reemplazada por la cepa Farmington Hills [63], que se asoció con aproximadamente el 80% de los brotes de NoV en los EEUU [4]. En el 2004, la variante GII.4 Hunter se detectó en Australia, Europa, Asia y América, incluyendo Nicaragua [6, 47, 64, 65]. Las cepas Hunter fueron reemplazadas en 2006 por dos nuevas variantes de GII.4, Laurens (2006a) y Minerva (2006b) [64, 66, 67]. Más recientemente, una nueva variante GII.4.2009 Nueva Orleans, ha sido la cepa predominante de los brotes, aunque GII.4.2006 Minerva sigue circulando en niveles bajos [68, 69].

### III. CARACTERISTICAS CLINICAS

NoV puede causar gastroenteritis aguda en personas de todas las edades. Las características clínicas incluyen náuseas, dolor abdominal, vómito y diarrea no sanguinolenta. Sin embargo, algunos pacientes pueden tener formas graves, con síntomas vinculados a náuseas y vómitos, seguidos por diarrea abundante, que puede resultar en deshidratación y ocasionalmente la muerte [70]. La enfermedad normalmente dura sólo 2 a 3 días pero puede durar más tiempo (4 a 6 días) en infecciones nosocomiales y entre los niños menores de 11 años de edad [71, 72].

También pueden estar asociados con la infección dolores de cuerpo y fiebre baja y por lo tanto el término "gripe estomacal" a menudo se utiliza para describir la enfermedad, aunque no hay ninguna asociación biológica con la gripe.

Aproximadamente el 10% de las personas con NoV requieren atención médica, incluido el tratamiento de la deshidratación y hospitalización [73-75]. Algunos estudios comunitarios, refieren que la enfermedad clínica causada por NoV parece ser más leve que la causada por Rotavirus; sin embargo, los niños hospitalizados con infecciones por NoV tienden a tener cuadros de gravedad similar aquellos con infecciones por Rotavirus [6, 76, 77].

Del 12 al 30% de las infecciones de NoV son de tipo asintomático; sin embargo, estas personas pueden transmitir el virus, aunque en niveles más bajos que individuos sintomáticos [78, 79]. Aún no está claro el papel de la infección asintomática en la transmisión y los brotes de NoV.

#### **IV. EPIDEMIOLOGIA**

En 1929, Zahorsky describe por primera vez el nombre "enfermedad del vómito invernal" que se refiere a la epidemiología observada para la enfermedad causada por NoV, caracterizada por la aparición de vómitos y diarrea autolimitada que alcanzaba su punto máximo durante los meses más fríos.

Debido a su baja dosis infecciosa (~10 a 100 partículas) [80] NoV es altamente contagioso, provocando así casos esporádicos donde los individuos están dispersos o grandes brotes de diarrea aguda donde las personas están agrupadas como en: hospitales, escuelas, universidades, lugares de camping, cruceros, hoteles, instituciones militares y restaurantes [81, 82].

Las características epidémicas y de temporalidad de NoV, son notablemente consistentes año tras año. NoV circula alrededor de todo el año, con una incidencia pico durante el invierno [83]. Sin embargo, se han observado brotes de NoV durante el verano, aunque a un ritmo reducido [84], estos han sido asociados principalmente a brotes alimentarios provocados por mayormente por GI.

NoV es la principal causa de gastroenteritis aguda no bacteriana en humanos, se transmite a través de alimentos o de persona a persona por la ruta fecal oral, afectando a niños y adultos en todo el mundo. Algunos estudios sugieren que la transmisión del virus también puede ser aérea, tales como en vómitos explosivos ocurridos durante la enfermedad [85, 86]. La transmisión también puede producirse a través de fuentes de agua contaminadas con aguas subterráneas. Igualmente la prolongada duración de excreción viral (~28 días) [87], incluso después de resolver los síntomas, aumenta el riesgo de propagación secundaria; y las infecciones repetidas que pueden producirse a lo largo de la vida con re-exposición, probablemente debido a falta de protección cruzada completa contra las diversas cepas de NoV y la inadecuada inmunidad a largo plazo.

Se estima que cada año NoV causa 64,000 episodios de diarrea que requieren hospitalización y 900,000 visitas clínicas entre los niños en los países industrializados y hasta 218,000 muertes de niños < 5 años de edad en los países en desarrollo [1].

NoV representa el 12% de los casos de gastroenteritis severa entre los niños < 5 años de edad y también de los casos de diarrea leve y moderada entre las personas de todas las edades.

Koopmans realizó un estudio con el objetivo de proporcionar nuevos conocimientos necesarios para comprender la transmisión, patogenia, cambios evolutivos y formas de control de NoV. Se realizó una revisión sistemática de 22 estudios epidemiológicos publicados que revelaron prevalencias de NoV en niños con gastroenteritis aguda que van del 6 al 48% con un promedio global del 14% [88] (Tabla 1).

**Tabla1. Resumen de estudios epidemiológicos sobre NoV en personas sintomáticas por países. Modificado de Koopmans [88]**

<b>País</b>	<b>Población de estudio</b>	<b>Estudiados</b>	<b>Prevalencia (%)</b>	<b>Año</b>	<b>Método</b>	<b>Ref.</b>
Japón	Hospitalizado	515	66(13)	2001/03	PCR	[89]
Reino Unido	Hospitalizado	259	36(14)	2000/03	PCR	[90]
Reino Unido	Comunidad	203	18(9)	2000/03	PCR	
Irlanda	Hospitalizado	220	24(11)	2006/07	PCR	[91]
Canadá	Comunidad	1166	141(12)	2003/04	PCR	[92]
Italia	Hospitalizado	192	92(48)	2004	PCR	[93]
Brasil	Hospitalizado	68	27(40)	2004/06	PCR	[94]
Brasil	Comunidad	44	4(9)	2004/06	PCR	
Tailandia	Hospitalizado	248	35(14)	2002/03	PCR	[95]
México	Infantes <sup>a</sup> , cc <sup>b</sup>	127	38(30)	1998	PCR	[96]
Albania	Hospitalizado	313	19(6)	NR	PCR	[97]
Túnez	Hospitalizado	252	49(19)	2003/05	PCR	[98]
Túnez	Comunidad	380	36(10)	2003/05	PCR	
Vietnam	Hospitalizado	502	32(6)	2005/06	PCR	[99]
Nicaragua	Hospitalizado	133	20(15)	2005/06	EIA	[6]
Nicaragua	Comunidad	409	45(11)	2005/06	EIA	
Ghana	Comunidad	243	23(9)	2005/06	PCR	[100]
India	Hospitalizado	350	53(15)	2001/04	PCR	[101]
India	Comunidad	673	44(7)	2001/04	PCR	
Bangladesh	Hospitalizado	917	41(4)	2004/05	PCR	[102]
Madagascar	Hospitalizado	237	14(6)	2004/05	PCR	[103]
Tanzania	Hospitalizado	270	37(14)	2005/06	EIA	[104]
Iraq	Hospitalizado	260	78(30)	2005	PCR	[105]

<sup>a</sup>5 – 15 meses, <sup>b</sup>cc: cohorte comunitario

## V. PATOGENESIS

Gran parte de la comprensión de la patogénesis de infecciones por NoV proviene de datos obtenidos a partir estudios realizados con voluntarios. Los especímenes de biopsia de yeyuno proximal de voluntarios enfermos muestran una ampliación y debilidad de la vellosidad intestinal, hiperplasia de células de la cripta, vascularización citoplasmática e infiltración de células mononucleares y polimorfonucleares en la lámina propia, aunque la mucosa permanece intacta.

El grado de participación del intestino delgado se desconoce porque no se ha podido estudiar la participación más distal del intestino delgado, y el sitio de replicación del virus no ha sido identificado, aunque se presume podría ser la parte superior del tracto intestinal.

También hay disminución de la actividad enzimática (fosfatasa alcalina, sacarosa y trehalosa) en el borde de las vellosidades del intestino delgado, resultando en esteatorrea leve y malabsorción de carbohidratos transitorios [106]. La actividad de la adenilatociclasa en el yeyuno no es elevada; la secreción gástrica, de ácido clorhídrico, pepsina y el factor intrínseco han sido asociados con estos cambios histológicos. Por el contrario, se retrasa el vaciamiento gástrico, y la reducida motilidad gástrica pueden ser responsables de las náuseas y vómitos asociados con esta gastroenteritis [106-108].

Se han realizado grandes esfuerzos en el desarrollo de un modelo animal que replique la enfermedad como ocurre en los humanos. Varias especies de primates han sido utilizados en investigaciones con NoV humanos, tales como macaco rhesus, macaco de cola de cochino y el chimpancé. Un estudio reciente establece al chimpancé como un modelo animal viable para el estudio de la replicación de NoV y la inmunidad. Además muestra que las vacunas a partir de las VLPs de NoV podrían inducir inmunidad homóloga protectora incluso después de largos períodos de tiempo [53].

Sin embargo se ha observado un éxito limitado para la infección clínica y enfermedad en primates no humanos en comparación con el huésped humano. Estos modelos son dignos de evaluación debido a su parentesco genético y fenotípico en muchos aspectos con los seres humanos.

Los cerdos libres de gérmenes o Gnotobióticos (Gn) constituyen un modelo más prometedor para los NoV GII.4 humanos y actualmente está bajo investigación y desarrollo; esto se debe a que los cerdos comparten varias características con los seres humanos en su anatomía gastrointestinal, fisiología, sistema inmunológico, así como la presencia de HBGAs, como los antígenos A y H en superficies mucosas. En un modelo de cerdo Gn neonatal, la infección por el NoV humano provocó diarrea, diseminación del virus, seroconversión, cambio inmuno-citopático en las secciones intestinales y viremia transitoria [109-111].

Resultados similares se han observado también en terneros Gn, estudios realizados con las cepas de NoV bovinos GIII.2 CV186-OH y Newbury demostraron que ambas cepas infectan las vellosidades de las células epiteliales del intestino delgado, especialmente las del duodeno y yeyuno, pero un poco menos las del íleon. La infección causa destrucción celular y diarrea severa [112, 113]. Otro estudio demostró que la cepa de NoV humano HuNoV-HS66 se puede replicar en el intestino de terneros Gn e induce enteropatogenicidad, revelando aspectos importantes en intestino y nódulos linfáticos mesentéricos y respuesta inmune sistémica en bazo y sangre [114].

Estos hallazgos sugieren que estos modelos animales (cerdos y terneros Gn) pueden ser útiles para el estudio de la inmunología y patogénesis de los NoV, además pueden servir para la evaluación de vacunas y antivirales contra los NoV humanos.

El NoV murino (GV) también se ha utilizado para el estudio de la patogenia, inmunología y replicación de los NoV generando una gran cantidad de datos [115, 116]. Sin embargo, las limitaciones de este modelo son evidentes debido a la diferencia entre los virus que infectan

humanos y murinos. El NoV murino no produce diarrea y vómito, el receptor del huésped es ácido siálico, y los tipos de células infectadas son células dendríticas y macrófagos [117].

## **VI. INMUNIDAD CONTRA NOROVIRUS**

Parrino y colaboradores indican dos formas de inmunidad para la gastroenteritis viral, una corta y otro de larga duración. Otros factores distintos a los anticuerpos séricos parecen ser importantes en la inmunidad a gastroenteritis producida por NoV (Norwalk) [118].

Sin embargo, recientes estudios dudan de estos hallazgos iniciales, ya que la dosis que se requiere para infectar el 50% de los voluntarios es tan bajo como 18 partículas infecciosas, y la dosis utilizada en el estudio de Parrino era  $10^5$  veces más alta [80].

Johnson y colaboradores mediante un estudio de inoculación experimental de adultos voluntarios en Estados Unidos demostraron que anticuerpos séricos preexistentes al virus Norwalk no parecen estar asociados con la inmunidad protectora, pero los niveles de anticuerpos se asocian con protección después de la exposición repetitiva. La resistencia a corto plazo dura  $\geq 6$  meses después de la exposición, y un pequeño porcentaje de individuos resistentes mantuvieron los títulos de anticuerpos bajos incluso después de múltiples exposiciones [119]. Estos autores sugirieron que algunos individuos carecían de un receptor viral funcional y por lo tanto eran intrínsecamente no susceptibles a la infección por el virus.

Recientemente se realizó el primer estudio clínico con NoV GII.4 en voluntarios humanos y se evaluó la relación entre los antígenos de grupos histo-sanguíneos, la infección por NoV y la asociación a la enfermedad [120]. Los resultados revelaron que la infección ocurre en secretores, pero es independientemente del grupo de sangre ABO y la severidad de la enfermedad fue de leve a moderada y tiene una duración de 1-3 días. Los investigadores concluyeron que el estado de secretor determina la susceptibilidad a NoV GII.4 y que además este tipo de estudio en humanos debería ser útil para evaluar vacunas contra NoV y agentes antivirales.

## VII. SUSCEPTIBILIDAD GENETICA

La función biológica de los antígenos ABH se ha especulado ampliamente, pero debido a su ubicación externa en las células epiteliales se ha sugerido que pueden servir como receptores para microorganismos [121]. Debido a la naturaleza altamente polimórfica de los genes del grupo ABO, Secretor y Lewis, la especie humana tiene una gran diversidad de receptores diferentes en la superficie celular a nivel poblacional. Esto es una ventaja en términos de supervivencia de la humanidad como especie, ya que un patógeno con preferencias por un receptor específico de carbohidratos sería incapaz de infectar a todos los seres humanos.

La susceptibilidad genética a infecciones por NoV está relacionada con la expresión de antígenos de grupo histo-sanguíneo (HBGAs) en la superficie mucosa de las células epiteliales intestinales. Los HBGAs son carbohidratos que actúan como receptores putativos o correceptores para NoV, estos incluyen antígenos ABO, Lewis y antígenos precursores de tipos sanguíneos expresados en las células epiteliales [122]. Cada individuo tiene un grupo sanguíneo particular, dependiendo de qué antígenos estén presentes en los glóbulos rojos (A, B, AB y O). Los antígenos ABO (H) también se han encontrado en las células epiteliales en todos los órganos que están en contacto con el ambiente externo, por ejemplo el tracto respiratorio superior e inferior, el tracto genitourinario y el tracto gastrointestinal. Sin embargo, la expresión de los antígenos ABH está fuertemente regulada por varias glicosiltransferasas, que a través de una adición gradual de monosacáridos a una molécula precursora construye los carbohidratos [123].

Los antígenos de Lewis parecen que interactúan con NoV. El sistema de Lewis está relacionado con el sistema de grupo sanguíneo ABO, ya que tienen estructuras y vías de síntesis similares y además pueden estar presentes en las mismas cadenas de carbohidratos.

Los antígenos Lewis y ABH se encuentran principalmente en cuatro cadenas de diferentes carbohidratos, denominadas H tipo 1-4.

La susceptibilidad genética del huésped y patrones de unión de HBGA parecen ser NoV-específica, con diferentes cepas de NoV. El HBGA más importante relacionado con la susceptibilidad a la gastroenteritis por NoV es el antígeno H1, cuya presencia depende de la enzima fucosiltransferasa (FUT), que determina el estado de secretor. Los huéspedes con alelos homocigoto mutantes nulos de FUT2 son descritos como no secretores. Los no secretores han demostrado ser resistentes a la infección con NoV GI, incluyendo cepas de virus de Norwalk y NoV GII.4, el genotipo predominante de NoV asociado con brotes en todo el mundo [122, 124]. Sin embargo, se reportó un individuo no secretor que desarrolló gastroenteritis en un brote por NoV GII.4, sugiriendo que la mutación de G428A en FUT2 proporciona una protección fuerte pero no absoluta contra infección sintomática de NoV GII.4 [125].

## VIII. DIAGNÓSTICO

**Microscopía Electrónica (ME).** La microscopía electrónica es una técnica que requiere instrumentos de alta complejidad y personal altamente especializado. Se utilizan la microscopía electrónica de transmisión o convencional y la de barrido. La ME se utilizó originalmente para identificar NoV pero tiene muy baja sensibilidad (< 25%) en comparación con la Reacción en cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (RT-PCR) [126]. Este método de diagnóstico clásico detecta partículas de virus con 27 a 30 nm de diámetro, todavía se utiliza en los laboratorios de salud pública de algunos países.

En 1972, el Dr. Kapikian utilizó la inmunomicroscopía electrónica (IEM) para identificar partículas virales de 27nm en un filtrado de heces de personas con gastroenteritis que sería utilizado en un ensayo clínico con voluntarios humanos [2]. Posteriormente las partículas del virus fueron precipitadas mediante una reacción antígeno-anticuerpo, utilizando suero de la fase convaleciente de los voluntarios que se enfermaron después de la inoculación con el filtrado fecal. Los complejos antígeno-anticuerpo fueron luego visualizados con un microscopio electrónico. El ensayo fue modificado para cuantificar la cantidad de anticuerpos en suero y demostró que significativamente había más anticuerpos presentes en el suero de la fase convaleciente que en el suero de la fase aguda. Debido a que este y otros experimentos cumplieron los postulados de Koch, el virus de Norwalk (NV) fue propuesto como el agente etiológico del brote de gastroenteritis en Norwalk, Ohio. Este fue el primer virus que se identificó como causa de gastroenteritis en los seres humanos.

**Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).** El ELISA es una técnica que combina la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de un ensayo enzimático. Esta técnica es utilizada para medir tanto antígenos como anticuerpos, de manera cualitativa, semicuantitativa y cuantitativa. Los antígenos o anticuerpos se encuentran adheridos a una fase sólida (superficie del poliestireno), estos reconocen a la molécula de destino y se unen a ella. El complejo antígeno-anticuerpo es reconocido por un anticuerpo secundario que se

encuentra unido a una enzima que cataliza la reacción, produciendo un color específico. La densidad óptica de este color puede medirse a través de un espectrofotómetro.

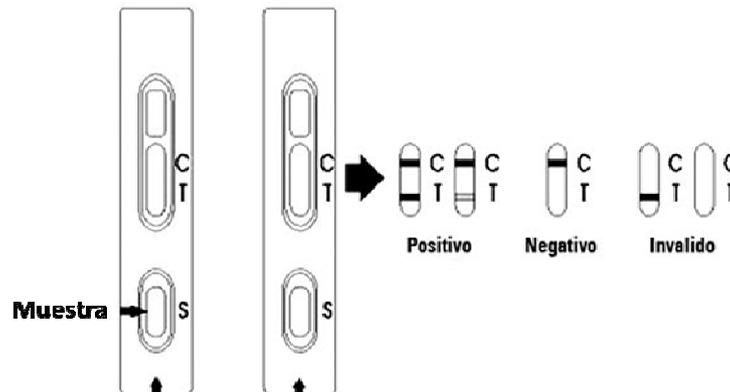
El ELISA para detectar antígenos de NoV en muestras fecales, utiliza anticuerpos monoclonales producidos mediante la inoculación de diferentes especies de animales con VLPs (Virus like particles) [127]. Las VLPs fueron generadas a partir de la expresión de la proteína de la cápside de NoV en un sistema de expresión de Baculovirus [127]. Estas VLPs son morfológica y antigénicamente similares al NoV nativo, e inducen una respuesta de anticuerpos específicos [128, 129]. Las VLPs son seguras de manejar, ya que no son infecciosos debido a la ausencia del genoma de ARN.

Los métodos disponibles comercialmente para diagnosticar NoV directamente desde las heces incluyen: SRSV (II)-AD (Denka Seiken, Tokio, Japón, 2002), IDEIA *Norovirus*, (*OXOID*, Cambridgeshire, UK) RIDASCREEN (R-Biopharm AG, Alemania). Estos kits varían en sensibilidad y especificidad comparados con el PCR convencional, oscilando entre 36 – 80%, y entre 47 – 100%, respectivamente. [126, 130-133].

**Inmunocromatografía.** La inmunocromatografía se basa en la migración de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa. La muestra es añadida en la zona del conjugado, el cual está formado por un anticuerpo específico contra uno de los epítomos del antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el antígeno a problema, éste se unirá al conjugado formando un complejo inmune y migrará a través de la membrana de nitrocelulosa. La zona de captura está formada por un segundo anticuerpo específico contra otro epítomo del antígeno. Al llegar la muestra a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y conjugado quedarán retenidos y la línea se coloreará (muestras positivas). La zona control está formada por un tercer anticuerpo que reconoce al reactivo de detección (Conjugado) e indica que el ensayo ha funcionado bien, y debe colorearse siempre, con muestras positivas y negativas (Fig.3).

Varias empresas japonesas han desarrollado kits inmunocromatográficos para la detección NoV en muestras fecales. Estos kits han sido evaluados mediante el examen de muestras fecales de Japón [134-137] y Vietnam [138]. En un estudio realizado en Japón, investigaron

la sensibilidad y especificidad de la inmunocromatografía en comparación con el RT-PCR y encontraron 71.4 y 88.8% de sensibilidad, 99.2 y 84.7% de especificidad y 95.0 y 87.1% para las detección de NoV GI y GII, respectivamente [139].



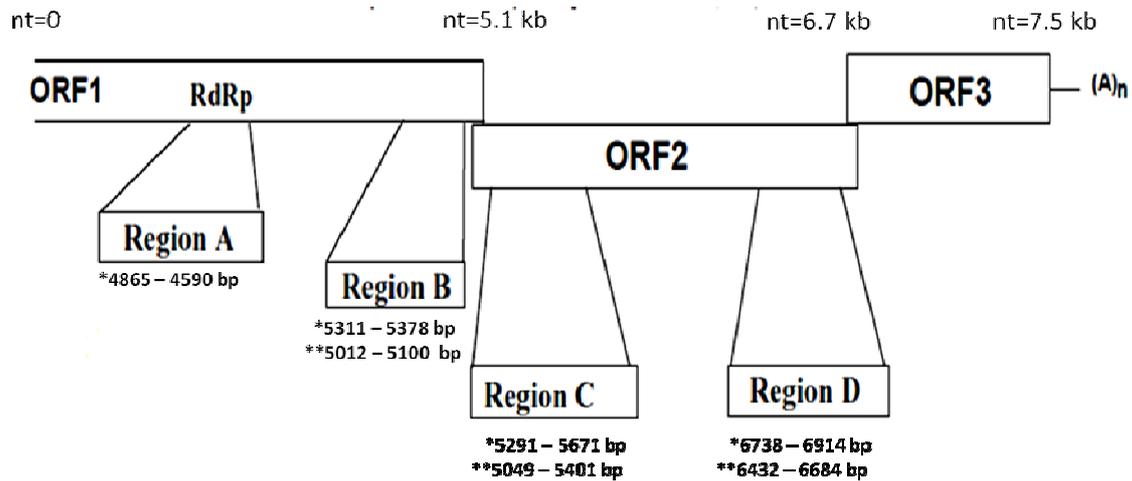
**Figura 3.** Prueba Inmunocromatográfica. La letra “S” indica el lugar donde se coloca la muestra, la letra “T” indica el resultado de la prueba y la letra “C” representa el control de la prueba.

**PCR Convencional.** La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una técnica utilizada para amplificar un fragmento de ADN en varios órdenes de magnitud, generando millones de copias de una determinada secuencia de ADN.

Una vez conocida la secuencia del genoma de NoV, se diseñaron *primers* para utilizarse en ensayos de PCR, dichos *primers* reconocen cuatro regiones conservadas en el genoma de NoV (Fig.4). Estas regiones son llamadas región A (el gen RdRp ubicada en ORF1), región B (el extremo 3' de ORF1), región C (segmento ubicado cerca del extremo de 5' de ORF2) y región D (ubicado en el final de 3' de ORF2) [46, 140].

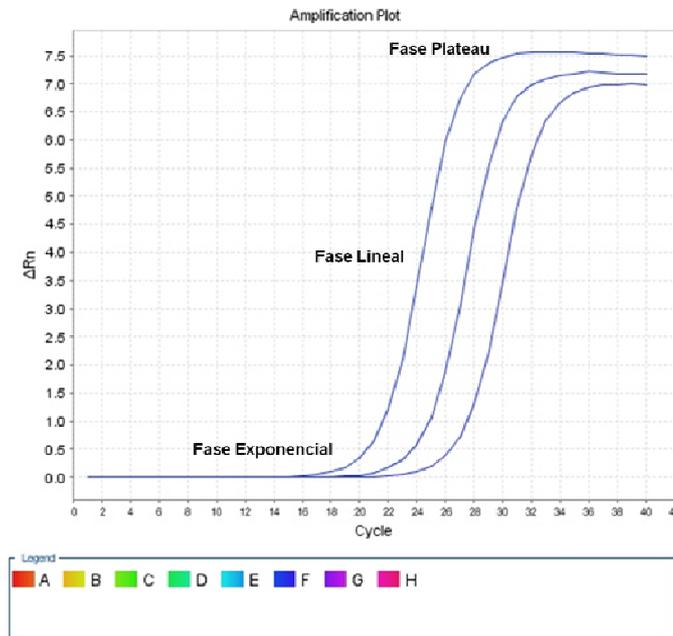
El PCR de transcripción reversa (RT-PCR) se convirtió en el método de referencia para la detección de NoV en diferentes matrices, incluyendo heces, agua y alimentos [141]. Este

método es sensible y específico, lo que permite realizar estudios epidemiológicos y de brotes de gastroenteritis.



**Figura 4.** Representación esquemática de las regiones conservadas del genoma de NoV (A-D) utilizadas para detección y genotipificación. Las ubicaciones de las regiones se basan en la secuencia de los prototipos de GI\* (Norwalk, M87661) y GII\*\* (Lordslade, X86557). Modificado de Vinje et al [46].

**PCR en tiempo real.** El PCR en tiempo real ha demostrado ser un método más rápido y más sensible que el RT-PCR convencional. En el PCR en tiempo real, la cantidad de ADN es medida después de cada ciclo por el uso de marcadores fluorescentes que son incorporados dentro del producto de PCR. El incremento de la señal de fluorescencia es directamente proporcional al número amplicones generados en la fase exponencial de la reacción (Fig.5). Los reporteros fluorescentes o fluoróforos usados incluyen: fluoróforos que se unen al ADN (SYBR), *primers* fluorescentes (LUX) y sondas que son incorporadas en el producto durante la amplificación (Taqman). El cambio en la fluorescencia durante el curso de la reacción es medido por un instrumento que combina el termociclado con la capacidad de escaneado. Se han desarrollado varios ensayos para la detección rápida de NoV que permiten analizar un gran número de muestras de heces durante brotes de gastroenteritis epidémicas y endémicas.

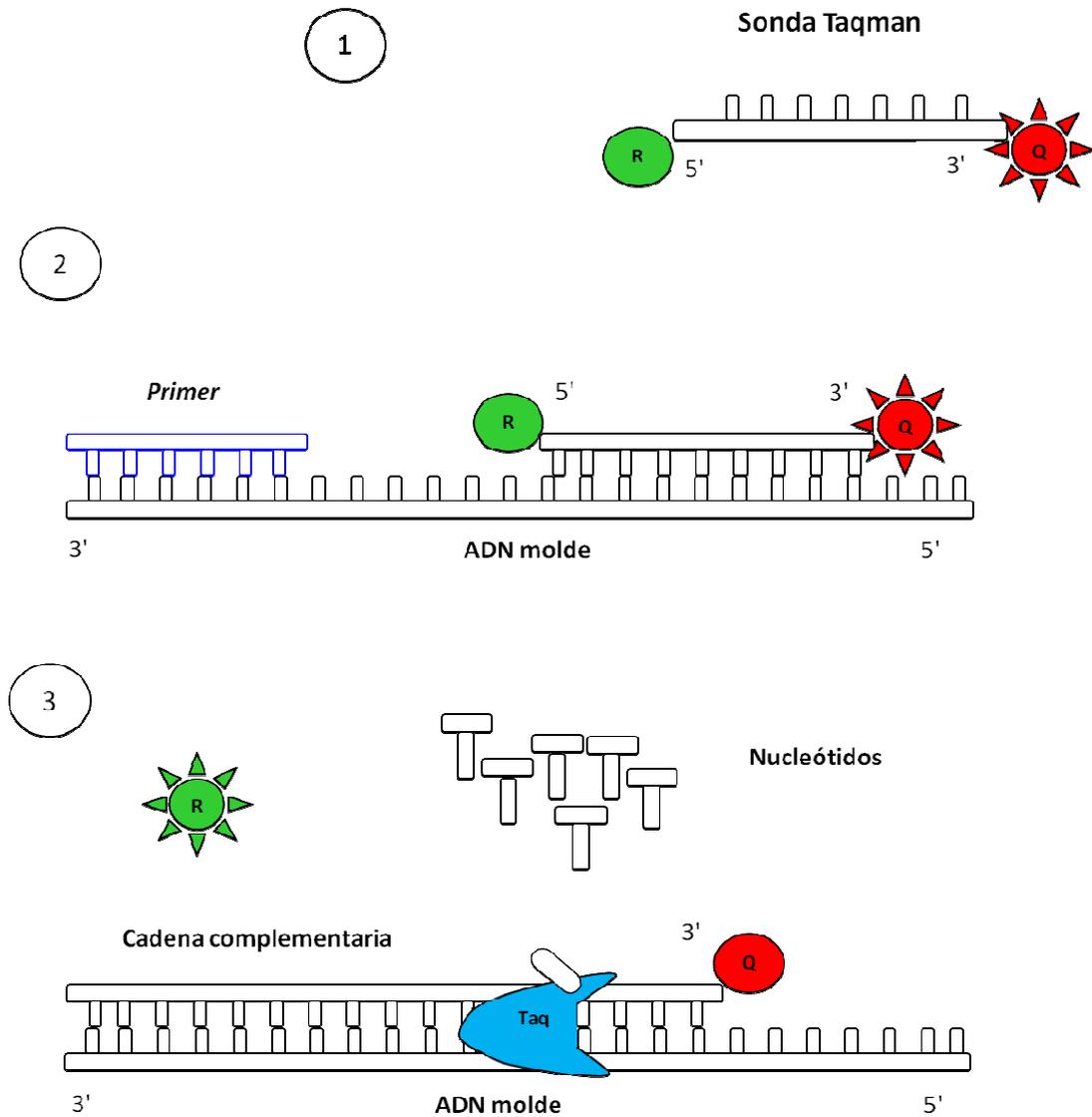


**Figura 5.** Modelo gráfico del PCR cuantitativo en tiempo real. Se grafican los valores de  $\Delta Rn$  versus el número de ciclo. El  $\Delta Rn$  representa el incremento de la señal fluorescente en cada momento.

Los ensayos de PCR en tiempo real utilizan mayormente tecnologías TaqMan y SYBR Green, las cuales permiten cuantificar secuencias específicas de ADN o ARN en muestras clínicas mediante las lecturas de fluorescencia emitida desde el primer ciclo de amplificación [142-145].

Las **sondas TaqMan** permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas con dos fluorocromos (Fig.6). Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés «quencher»). De este modo, cuando se efectúa el PCR (con la sonda más el par de *primers* específicos), la sonda híbrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', provocando la separación del quencher y fluoróforo y, por tanto, la emisión de fluorescencia. Esta fluorescencia está relacionada con la cantidad de amplicón producido,

es decir, la fluorescencia incrementa de forma exponencial con el incremento del producto [146].



**Figura 6.** Representación esquemática del PCR en tiempo real utilizando sondas tipo Taqman. **1.** La sonda Taqman: el círculo rojo representa el extintor (quencher) que apaga la señal observable desde el fluoróforo (círculo verde) cuando está a corta distancia. **2.** La sonda TaqMan y los *primers* se unen al ADN diana, debido a que los *primers* están unidos, la Taq polimerasa ahora puede crear una hebra complementaria. **3.** El reportero fluorescente es liberado del ADN bicatenario por la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa, liberando el extintor o quencher, ahora se puede observar la luz emitida por el reportero fluorescente en un estado excitado.

Vainio y colaboradores [147] compararon cuatro estudios publicados que utilizaron PCR en Tiempo Real [148-151]. Los resultados indicaron que tres de los que utilizaron sondas Taqman detectaron un número similar de muestras NoV-Positivos ( $\geq 88\%$ ) a como lo hizo SYBR Green (86%).

Otro estudio realizado por Feeney y colaboradores comparando dos tecnologías, Taqman y Minor Groove Binder (MGB) encontraron una sensibilidad de 95.1% vs. 79.5% para la detección de NoV [152].

Igualmente Trujillo y colaboradores optimizaron un método de PCR tiempo real de transcripción reversa utilizando TaqMan para la detección rápida y tipificación de cepas de NoV pertenecientes a GI, GII y GIV. Ellos utilizaron *primers* dirigidos contra la región de traslape de ORF1-ORF2, y detectaron un 98% (64/65) de NoV-positivos que ya habían sido analizadas con un RT-PCR convencional [142].

Otro sistema común para la detección de ADN amplificado es el uso de fluoróforos intercalados que emiten fluorescencia cuando se unen al ADN bicatenario. La tecnología de **SYBR® Green I** y **SYBR® GreenER™** utilizan este tipo de método de detección. La fluorescencia del fluoróforo unido al ADN aumenta significativamente cuando se unen al ADN bicatenario. La intensidad de la señal de fluorescencia depende de la cantidad de ADN bicatenario que está presente (Fig.7). Como ADN acumulado, el fluoróforo genera una señal que es proporcional a la concentración de ADN y puede detectarse mediante instrumentos de PCR en tiempo real.

Esta tecnología, muy simple, puede carecer de especificidad porque los fluoróforos pueden unirse indiscriminadamente a todos los ADN bicatenarios formados durante el PCR en tiempo real, y no sólo al ADN diana. Así, artefactos de PCR como dímeros de *primers* y productos falsos pueden detectarse y contribuyen a la señal de fluorescencia global.

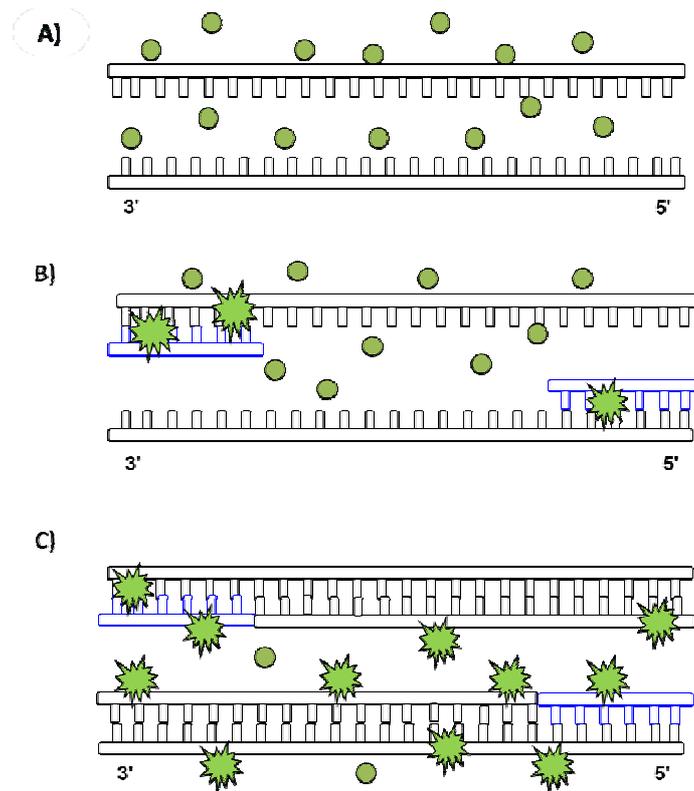
El diseño de *primers* específicos y un sistema de reactivos de calidad son fundamentales para evitar la formación de estos productos no específicos. Una ventaja de muchos fluoróforos de unión al ADN es que permiten evaluar la especificidad utilizando análisis de curva de fusión (Melting Curves). Mediante dicho análisis se identifican fácilmente dímeros de *primers* y artefactos.

Se han desarrollado muchos ensayos que emplean SYBR Green para la detección y cuantificación de NoV [150, 153-156]. Scipioni y colaboradores desarrollaron un ensayo para detectar NoV humanos y bovinos en una sola reacción y mostraron que la sensibilidad del ensayo desarrollado es mayor que el RT-PCR convencional. En este estudio también se reveló que si la muestra es diluida 10 veces se incrementa la eficiencia y reproducibilidad y se elimina el efecto de los inhibidores del RT-PCR [156].

Además de las tecnologías Taqman y SYBR Green, hay otras comercialmente disponibles, como lo son Lux™, Plexor™ y moléculas Beacon, las cuales no utilizan sondas sino que *primers* marcados con fluoróforos [157].

Nordgren y colaboradores desarrollaron el primer ensayo de PCR en tiempo real utilizando la tecnología Light Upon Extension (LUX) para la detección y cuantificación de NoV GI y GII, y observaron un 99% de correlación entre el ensayo PCR en tiempo real LUX y el ensayo en PCR en tiempo real TaqMan [158].

Todos estos métodos tienen ventajas sobre el PCR convencional, tales como mayor especificidad, sensibilidad y reproducibilidad, además de permitir el monitoreo de la reacción en tiempo real; menor cantidad de ARN en reacciones de RT-PCR; y eliminación del manejo de los productos post-PCR, reduciendo así la contaminación [159].



**Figura 7.** Representación esquemática del PCR en tiempo real utilizando SYBR Green. Los círculos verdes representan los fluoróforos intercalados en el ADN que emiten fluorescencia cuando se unen al ADN bicatenario. **A.** Desnaturalización **B.** Fusión de *primers* **C.** Extensión.

**Genotipificación.** Los primeros intentos para tipificar a los NoV fueron basados en la secuenciación del gen de la Polimerasa, pero últimamente se ha demostrado que no es una región adecuada para la genotipificación [160], aunque es usada para la identificación de cepas recombinantes [38]. La genotipificación de NoV se realiza mediante la secuenciación de la cápside completa o del segmento NS de la cápside y análisis filogenéticos.

Actualmente se utiliza la secuenciación automatizada del ADN que no utiliza deoxinucleótidos radiactivos y las cuatro reacciones dideoxi se realizan en un solo tubo. Esto es posible porque cada ddNTPs se etiqueta con un fluoróforo diferente. Por lo tanto el fluoróforo presente en cada fragmento sintetizado corresponde al fluoróforo unido al dideoxinucleótido que se agregó al finalizar la síntesis de ese fragmento en particular. El

contenido del tubo único de la reacción se carga en una electroforesis capilar. Un fluorímetro y una computadora conectados al gel son capaces de detectar y registrar el fluoróforo adjunto a los fragmentos como que fueran extraídos del gel. La secuencia se determina por el orden de los fluoróforos saliendo del gel.

Para NoV la secuenciación de la región NS es la metodología estándar para la evaluación rápida de los genotipos, debido a su amplio rango de detección y su alta resolución [6, 160]. Las diferencias a nivel de nucleótidos en la región NS para GI y GII son  $22.1 \pm 6.3\%$  y  $26.1 \pm 10.5\%$  respectivamente. Estas diferencias fueron estimadas utilizando las secuencias de todos los genotipos conocidos hasta el 2005 [160]. Otras partes del gen de la cápside específicas como el dominio P2 (región D) han sido sugeridas debido a su alta variabilidad [46], pero estos ensayos han tenido un rango de detección menos amplio que los ensayos que utilizan la región NS [6], y son por lo tanto menos aptos para los estudios epidemiológicos. Es decir los *primers* para la región NS reconocen un número mayor de cepas que los *primers* utilizados en la región D.

**Análisis filogenéticos.** La filogenia es el estudio de las relaciones de parentesco entre los distintos grupos de seres vivos. La filogenia molecular, es el estudio de las relaciones entre las secuencias de nucleótidos, se basa en que cualquier variación que se produzca en una secuencia puede ser virtualmente compartida por todos los miembros de la población, dado que hay libertad de intercambio de material genético entre todos ellos. En realidad una especie genéticamente definida debe ser homogénea para tales variaciones.

Los métodos experimentales creados para realizar análisis filogenéticos están basados en que estas secuencias cambian a lo largo del tiempo con velocidad constante; esa velocidad será distinta para cada proteína o ácido nucleico de acuerdo con ciertas características de su papel en la célula, pero sin diferencias entre especies de distintos grupos taxonómicos, siempre que la molécula en cuestión desempeñe el mismo papel en todos ellos.

La velocidad de variación de una macromolécula depende de dos variables: la probabilidad de que ocurra cada variación, y las posibilidades de sea aceptada. Consideremos la primera: lo cierto es que no todos los cambios pueden ocurrir con la misma probabilidad. Por

razones de mecanismos químicos, ciertos cambios ocurren con mayor facilidad. Este problema ha sido estudiado profundamente para el caso de la sustitución de nucleótidos en los ácidos nucleicos.

Un árbol filogenético es un árbol que muestra las relaciones evolutivas entre varias especies o géneros y dentro de cada género o genogrupo. Un árbol filogenético se construye a partir de secuencias alineadas de ADN, ARN o ARNm. Los principales métodos utilizados para la construcción de estos son: Métodos de distancia, Máxima parsimonia y Máxima verosimilitud.

**Métodos de distancia:** Habitualmente la distancia entre dos especies mide el tiempo transcurridos desde la subdivisión de la especie ancestral común en las dos especies o variantes genéticas. Esa distancia no es conocida y hay que estimarla a partir de los datos usando modelos evolutivos. El modelo usado depende, entre otros factores, del tipo de datos que se tiene, del tipo de organismo y del criterio del investigador. El algoritmo de Neighbor-joining ("reunión por vecindad") es utilizado cuando la matriz del árbol no es ultramétrica, es decir, no posee raíz, aquí se emplean técnicas generales de aglomeración de datos para el análisis de secuencias y se sirven de la distancia genética como un medidor de aglomeración.

Para calcular las distancias entre secuencias de nucleótidos se utiliza un modelo probabilístico de evolución de nucleótidos. Existen muchos modelos aplicables, pero los dos más utilizados son, Jukes-Cantor y Kimura con dos parámetros.

El primer método que se usó, denominado *modelo de un parámetro*, fue propuesto por Jukes y Cantor: se supone que todas las variaciones ocurren al azar entre los cuatro nucleótidos con la misma probabilidad, de manera que cualquier sustitución tiene la misma probabilidad de ocurrir. Esta suposición no es realista, ya que los cambios que sólo implican purinas o pirimidinas entre sí, esto es, las *transiciones* (cambios  $A \leftrightarrow G$  o  $C \leftrightarrow T$ ) están mecanísticamente favorecidas frente a las *transversiones* (cambios purina  $\leftrightarrow$  pirimidina  $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow T$ , ó  $G \leftrightarrow C$ ,  $G \leftrightarrow T$ ), ya que las primeras ocurren por el

mecanismo químico simple de tautomerización, mientras que las segundas requieren un mecanismo mucho más complejo.

Con objeto de corregir este problema, Kimura [161] propuso el *modelo de dos parámetros* considerando independientemente *transiciones* (pur ↔ pur, pir ↔ pir) y *transversiones* (pur ↔ pir). Desde su formulación, esta corrección se considera absolutamente necesaria en los estudios de filogenia molecular [162].

## MATERIAL Y METODO

**Tipo de estudio.** Descriptivo de corte transversal.

**Muestras clínicas.** Mediante una vigilancia epidemiológica pasiva se recolectaron prospectivamente un total de 345 muestras fecales de niños  $\leq 5$  años con diarrea aguda en los Hospitales Oscar Danilo Rosales Argüello (HEODRA) y Victoria Mota de León y Jinotega. Dicha vigilancia también se llevo a cabo en los Puestos de Salud Rubén Darío y Antenor Sandino de León durante los años 2009-2010.

**Recolección de la información.** La recolección de la información estuvo a cargo de una enfermera, la cual explicaba los objetivos del estudio a los padres o responsables de los niños y, si estos aceptaban participar en el estudio se firmaba el consentimiento informado y se llenaba un cuestionario el cual contenía datos demográficos, epidemiológicos y clínicos del paciente.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética local para investigaciones biomédicas en el año 2010 (Acta No. 73).

**Valoración clínica.** Todos los niños fueron evaluados clínicamente por pediatras o médicos generales utilizando la estrategia de la OMS sobre el manejo de la diarrea. Esta estrategia es conocida como "*Atención Integrada a las Enfermedades Prevalentes de la Infancia*" (AIEPI). Los datos sobre la inmunización contra Rotavirus utilizados en este estudio fueron recogidos a partir de las tarjetas de vacunación de los niños. Un niño fue considerado "No vacunado" si su tarjeta de vacunación no mostraba ninguna dosis registrada; y se consideró "Desconocido" si no se disponía de la tarjeta de vacunación del niño. El grado de inmunización en este estudio se refiere al número de dosis, considerando inmunización completa las 3 dosis, intermedia 2 dosis, baja 1 dosis, y no inmunizado 0 dosis.

**Recolección de las muestras.** Se recolectó una muestra de heces diarreica en la etapa aguda de la enfermedad, estas fueron colocadas en frascos estériles plásticos y refrigeradas

a 4°C. Posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de la UNAN-León donde se preparó una suspensión de las heces 1:10 con Buffer Salino Fosfatado (PBS) y se almacenaron a -20°C hasta ser analizadas. Las muestras de Jinotega se trasladaban al Laboratorio de Microbiología una vez a la semana en las mismas condiciones.

**Extracción de ARN viral.** El ARN viral fue extraído de la suspensión de heces, utilizando el kit *High Pure ARN isolation* (ROCHE, Mannheim, Alemania) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se tomaron 200 µl de la suspensión y se mezclaron con una solución que contiene sales caotrópicas que favorecen la unión de los ácidos nucleicos a la superficie de las partículas de vidrio (Binding Buffer). Luego se realizaron dos pasos de lavado (Wash Buffer) que permiten remover sales, proteínas y otras impurezas. Finalmente los ácidos nucleicos fueron eluidos con un buffer que contiene agua libre de nucleasas y concentraciones bajas de sal. Un total de 50 µl de ARN aislado fue obtenido y guardado a -20°C hasta su posterior análisis (Ver anexo 1).

**Reverso Transcripción.** Se tomaron 28 µl del ARN purificado previamente y se mezclaron con 5 µl (50 picomol) de un oligonucleótido que puede unirse a cualquier sección del ARN [pd(N)<sub>6</sub>] y se agregó agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 50 µl. La desnaturalización del ARN se realizó a 97°C por 5 min, y rápidamente se colocó en hielo por 2 min, después se agregó una *bead* de RT-PCR (Amersham Biosciences, Reino Unido) y se colocó en el termociclador (Applied Biosystems 2720) a 42°C por 30 min, con el objetivo de producir ADN complementario (ADNc). El ADNc se mantuvo a -20°C hasta la realización del PCR.

**PCR en Tiempo Real basado en SYBR Green.** El método utilizado fue recientemente optimizado por nuestro grupo de investigación [163]. En síntesis se tomaron 2.5 µl de ADNc y se mezclaron con 12.5 µl de FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (ROCHE), 1 µl (10 picomol) de cada uno de los *primers*, ya sea para detectar NoV GI (NVG1flb: CGYTGGATGCGNTTCCATGA, NVG1rlux: CTCCTTAGACGCCATCATC) ó GII (NVGflux2: ATGTTYAGRTGGATGAGRTTYTC, COG2R: TCGACGCCATCTTCATTCACA) [158] y 8 µl de Agua libre de nucleasas para

un volumen final de 25  $\mu$ l para cada reacción. Para el PCR en Tiempo Real se utilizó el equipo 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) y el programa de termociclado fue el siguiente: desnaturalización inicial del ADNc a 95°C por 5 min, luego 40 ciclos de; 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg, y 72°C por 1 min (Ver anexo 2). La lectura de la fluorescencia fue registrada a los 60°C/min. Para investigar la temperatura de disociación ( $T_m$ ) de cada uno de los amplicones, se incrementó la temperatura desde 60°C hasta 95°C, a una velocidad de 0.1°C/s, la fluorescencia fue registrada para elaborar una curva de disociación. El  $T_m$  de cada amplicon corresponde a la lectura más baja de fluorescencia. Según Espinoza y colaboradores una muestra se considera positiva cuando el umbral ( $C_t$ ) de la reacción fue < 40 ciclos (dicho umbral corresponde al ciclo donde la fluorescencia es 10 veces mayor que la fluorescencia basal) y el  $T_m$  del amplicon era de  $76.1 \pm 0.6^\circ\text{C}$  para GI y  $77.1 \pm 0.6^\circ\text{C}$  para GII.

**Cuantificación de la carga viral.** La carga viral de las muestras NoV-positivas ( $n = 57$ ) fue cuantificada por PCR en tiempo real, utilizando una serie de 7 diluciones ( $10^1$  a  $10^7$  copias) de un estándar que contiene  $0.5 \times 10^8$  plásmidos/ $\mu$ l de GI o GII. Se colocó 2.5  $\mu$ l de cada dilución en una reacción de PCR como se describió anteriormente. Una vez que se obtuvieron las lecturas de intensidad de fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) de cada uno de los estándares, se realizó un análisis de regresión lineal simple y se determinó el valor de la pendiente y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). El límite de cuantificación se determinó de acuerdo al modelo de regresión lineal. Las muestras NoV-positivas y las curvas de calibración se realizaron de forma simultánea en una sola placa de PCR en tiempo real.

**Amplificación de la región NS de la cápside (ORF2).** Se realizó un PCR para amplificar la región NS de la cápside, se agregaron 5  $\mu$ l de ADNc a una mezcla que contenía 5  $\mu$ l de 10X high-fidelity PCR buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2  $\mu$ l de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 1  $\mu$ l de una mezcla de deoxinucleosidos trifosfato (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 1  $\mu$ l de cada *primer* específico para GI (NVGI: CGYTGGATGCGNTTCCATGA y G1SKR: CCAACCCARCCATTRTACA) [144, 164] y para GII (NVG2: ATGTTYAGRTGGATGAGRTTYTC y G2SKR: CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT) [144, 158], 1 U de Platinum *Taq* DNA polymerase high-fidelity buffer. El PCR fue

realizado bajo las siguientes condiciones: 94°C por 4 min y 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg y 72°C por 1 min, con un paso de elongación final a 72°C por 7 min. El tamaño del amplimero fue de 381-pb para GI y 390-pb para GII. El producto de PCR fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 2% y con tinción de Bromuro de Etidio.

**Secuenciación de nucleótidos de la región NS.** La secuenciación de nt fue realizada por MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur), con la química BigDye pJET1.2. Los productos de PCR fueron secuenciados en dirección *forward* y *reverse*.

**Genotipificación de NoV mediante análisis filogenéticos.** La alineación de secuencias de los NoV-positivos obtenidos en este estudio y las secuencias de los genotipos de NoV de referencia reportadas por Zheng [5] se realizó mediante el algoritmo ClustalW, versión 2, en el servidor del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI). El Análisis filogenético se realizó mediante el software MEGA 5.0 y el árbol fue construido usando el método de neighbor-joining con los parámetros de Kimura [161, 165]. La significancia de las relaciones entre secuencias desconocidas y referencias fue obtenida mediante análisis bootstrap de 1.000 replicaciones. Las referencias utilizadas se describen a continuación: GII.1: Hawaii\_USA\_94, GII.2: Melksham\_GBR95, GII.3: Toronto\_CAN93, Bristol\_GBR93, GII.4: Mora\_SWE97, GII.4: DOUG4770\_AUS, GII.5: Hillingdon\_GBR90, GII.6: Seacroft\_GBR90, GII.7: Leeds\_GBR90, GII.8: Amsterdam\_98, GII.9: AVBeach-USA01, GII.10: Erfurt\_DEU01, GII.11: Swine918\_JP97, GII.12: Wortley\_GBR\_90, GII.13: Fayetteville\_USA02, GII.14: M7-USA03 GII.15: J23\_USA02, GII.16: Tiffin\_USA03, GII.17: CSE1\_USA03, GII.18: 166NICA2005, GII.Grimbsby: UK95, GII\_Farmington\_US95, GII.4: Hunter4288\_AU04, GII.4: Hunter284E.

**Análisis de los datos.** Los datos clínicos-epidemiológicos obtenidos a partir de la ficha y los resultados moleculares obtenidos en el Laboratorio, fueron introducidos en una base de datos en el programa de computación SPSS para Windows, versión 16.0. Se realizaron cruces de las variables epidemiológicas con las moleculares para estimar el grado de asociación y para calcular la significancia se utilizó el Test exacto de Fisher. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

**Consideraciones éticas.** Los análisis clínicos y epidemiológicos de los niños con RV de Jinotega así como los análisis genómicos de las cepas de referencia encontradas fueron publicados en el artículo “Vaccine-derived NSP2 segment in rotaviruses from vaccinated children with gastroenteritis in Nicaragua”. Infect Genet Evol. 2012 Aug; 12(6):1282-94. Epub 2012 Apr 2.

## RESULTADOS

**Perfil Epidemiológico.** NoV fue detectado en 78 (22%) de las 345 muestras analizadas, afectando casi por igual al género masculino que al femenino (23% vs 22%). La prevalencia de NoV fue mayor en León que en Jinotega (24% vs 20%). El mayor número de NoV-positivos se encontraba en el grupo de niños hospitalizados comparados con los de la comunidad (24% vs 21%). Al comparar la prevalencia de NoV con los grupos de edades, se observó que los niños con edades entre 7 a 12 meses fueron más afectados en comparación con los niños de otras edades (28%) (Tabla 2). La prevalencia de NoV fue mayor en los niños < 2 años con lactancia exclusiva en comparación con los no-lactantes del mismo grupo etareo (33% vs 23%). El 40% de los niños  $\leq$  6 meses que recibieron lactancia materna exclusiva fueron NoV positivos.

**Prevalencia de NoV vs Inmunización.** En relación al grado de inmunización se observó que la prevalencia de NoV fue 31% en niños inmunizados y 13% en los no inmunizados (OR = 0.4,  $p$  = 0.15). No se observaron diferencias significativas entre el número de dosis y la frecuencia de NoV, sin embargo, NoV se encontró en el 33% de los niños que solo tenían una dosis, en comparación con el 23% de los que contaban con la 2da y 3ra dosis (Tabla 2).

**Características clínicas.** De los 78 niños infectados con NoV, la característica clínica más común fue el vómito (67%), seguido de la pérdida del apetito (64%), y fiebre  $\geq$  38°C (59%) (Tabla 3). El 73% de los niños infectados presentaron heces líquidas, pero solo el 18% tuvieron deshidratación grave.

**Distribución genotípica.** El 90% (70) de los NoV encontrados en este estudio fueron del genogrupo GII y el 9% (7) del GI, co-infecciones con ambos genogrupos fueron observadas en un solo caso. La secuenciación nucleotídica de la región NS del gen de la cápside y los análisis filogenéticos de 60 muestras positivas a NoV revelaron los siguientes genotipos:

GII.4 (81%), GII.6 (5%), GII.13 (5%) y GII.9 (2%) en el genogrupo GII. Además, se observaron GI.2 (3%), GI.3 (3%) y GI.4 (2%) en el genogrupo GI.

**Tabla N°2.** Perfil epidemiológico de la diarrea por Norovirus en niños  $\leq 5$  años de León y Jinotega inmunizados con RV (n= 345). Septiembre 2009-Octubre 2010

<b>Parámetros</b>	<b>Total</b>	<b>No. (%) de NoV positivos</b>	<b>OR</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Ciudades</b>					
<i>León</i>	235	56 (24)	1.16	0.66 – 2.03	0.682
<i>Jinotega</i>	110	22 (20)			
<b>Lugar de captación</b>					
<i>Hospital</i>	158	38 (24)	1.16	0.70 – 1.92	0.646
<i>Comunidad</i>	187	40 (21)			
<b>Género</b>					
<i>Masculino</i>	200	46 (23)	0.94	0.56 – 1.58	0.830
<i>Femenino</i>	145	32 (22)			
<b>Grupo de edades (meses)</b>					
$\leq 6$	63	15 (23)	1.08	0.57 – 2.06	0.801
<i>7 – 12</i>	109	31 (28)	1.59	0.94 – 2.70	0.078
<i>13 – 24</i>	103	25 (24)	1.14	0.66 – 1.96	0.629
<i>25 – 60</i>	70	7 (10)	0.31	0.13 – 0.72	0.004
<b>Lactancia materna*</b>					
<i>Exclusiva</i>	21	7 (33)	1.48	0.57 – 3.84	0.575
<i>Mixta</i>	127	35 (28)	1.18	0.68 – 2.03	0.636
<i>No lactante</i>	77	14 (18)	0.50	0.28 – 1.05	0.098
<i>Sin dato</i>	50	15 (30)			
<b>Grado de Inmunización contra RV†</b>					
<i>1 dosis</i>	15	5 (33)	1.75	0.57 – 5.31	0.238
<i>2 dosis</i>	44	10 (23)	0.99	0.46 – 2.13	0.571
<i>3 dosis</i>	211	49 (23)	1.09	0.59 – 2.01	0.435
<i>No inmunizados</i>	24	3 (13)	0.45	0.13 – 1.59	0.158

\* Aplica solo niños  $\leq 2$  años

† No se pudo conocer el grado de inmunización de 51 niños (11 de ellos NoV-positivos).

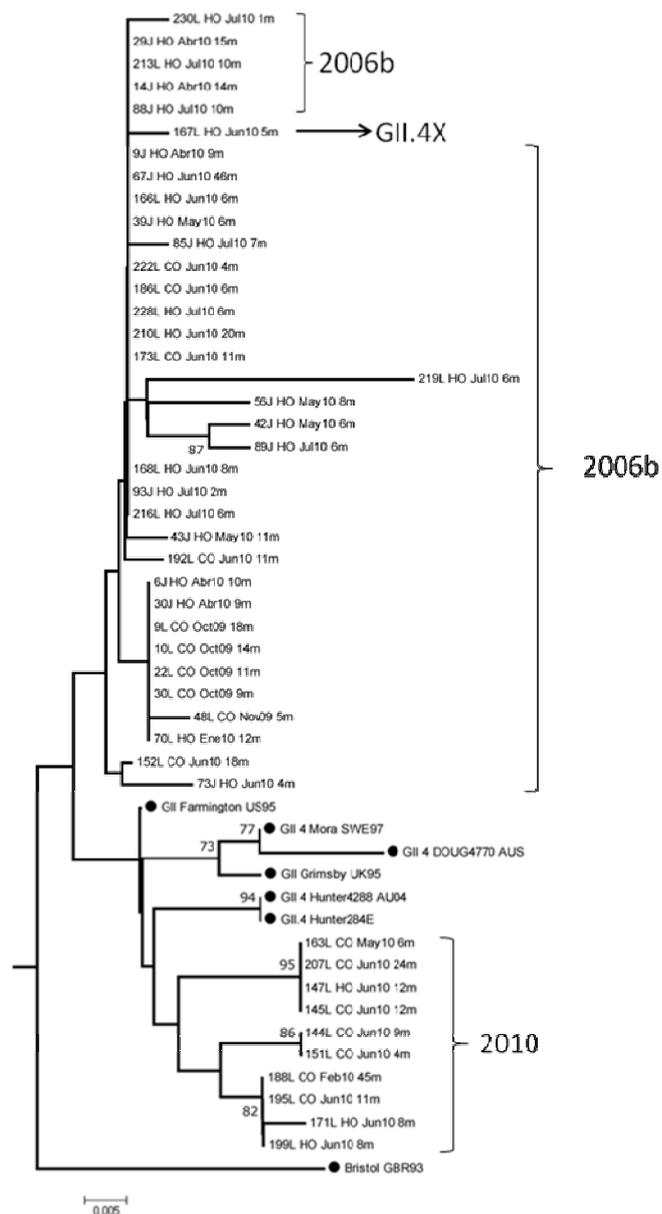
**Tabla N°3.** Comparación entre el perfil clínico de la diarrea por NoV y la diarrea por otras causas en niños  $\leq 5$  años inmunizados contra RV de la ciudad de León y Jinotega (n= 345). Septiembre 2009 - Octubre 2010

Parámetros	NoV- positivos (%) n=78	NoV- negativos (%) n=267	OR	IC (95%)	Valor de <i>p</i>
<b>Fiebre <math>\geq 38^{\circ}\text{C}</math></b>	46 (59)	138(52)	1.34	0.80 – 2.24	0.256
<b>Vómito</b>	52 (67)	146(55)	1.65	0.97 – 2.81	0.059
<b>Náuseas</b>	9 (12)	36(13)	0.83	0.38 – 1.82	0.653
<b>Calambres abdominales</b>	7 (9)	34(13)	0.67	0.28 – 1.58	0.366
<b>Distensión abdominal</b>	14 (18)	68(25)	0.64	0.33 – 1.21	0.169
<b>Pérdida del apetito</b>	50 (64)	157(59)	1.25	0.74 – 2.11	0.400
<b>Características de las heces</b>					
<i>Líquida</i>	57(73)	174(65)	1.45	0.82 – 2.54	0.191
<i>Semiformada</i>	19(24)	92(34)	0.61	0.34 – 1.08	0.093
<i>Sin dato</i>	2(2.5)	1(0.3)			
<b>Estado de deshidratación*</b>					
<i>Deshidratación grave</i>	14(18)	43(16)	1.13	0.58 – 2.21	0.699
<i>Algún grado de deshidratación</i>	25(32)	75(28)	1.39	0.81 – 2.40	0.226
<i>Sin deshidratación</i>	33(42)	132(49)	0.75	0.45 – 1.24	0.267
<i>Sin dato</i>	6(7)	17(6)			

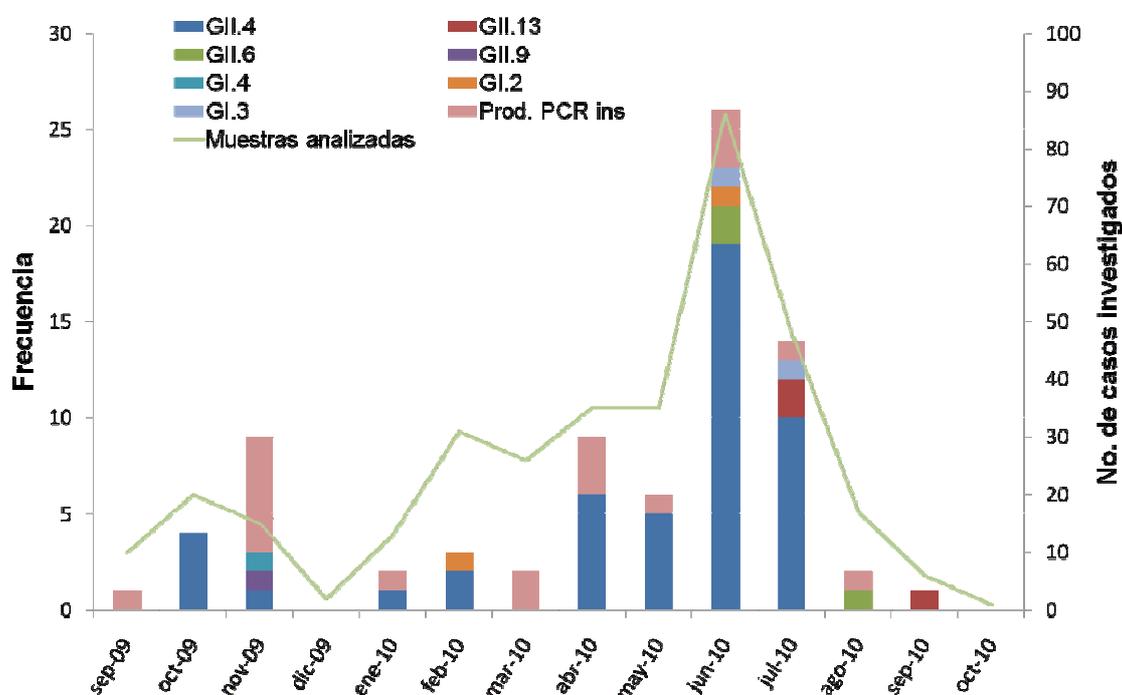
\* Basado en AIEPI

**Diversidad Genética de GII.4.** Para investigar la distribución de variantes genéticas dentro del genotipo GII.4, las secuencias GII.4 encontradas en este estudio fueron comparadas con los prototipos que han circulado en Nicaragua y a nivel global (Fig.8). Las principales variantes encontradas fueron: GII.42006b (79%) denominada Minerva y GII.42010 denominada 2010 (21%) y GII.4X. Un dato relevante es que las cepas denominadas GII.4X en este estudio contienen una mutación (inserción) de Timina en la posición 196, la cual debe ser reexaminada mediante clonación y re-secuenciación.

**Figura 8.** Análisis filogenético de la región NS de la capsida de NoV GII.4 (n=45). El árbol fue construido basado en los parámetros de Kimura y el método de neighbor-joining. Los valores de Bootstrap se muestran en los nodos de rama (no se muestran valores <70%). Los círculos negros representan cepas de referencia. Para cepas Nicaragüenses, el número de la cepa es seguido por el lugar de captación del paciente, hospital HO o comunidad CO, la fecha de captación y la edad del niño (m, meses).



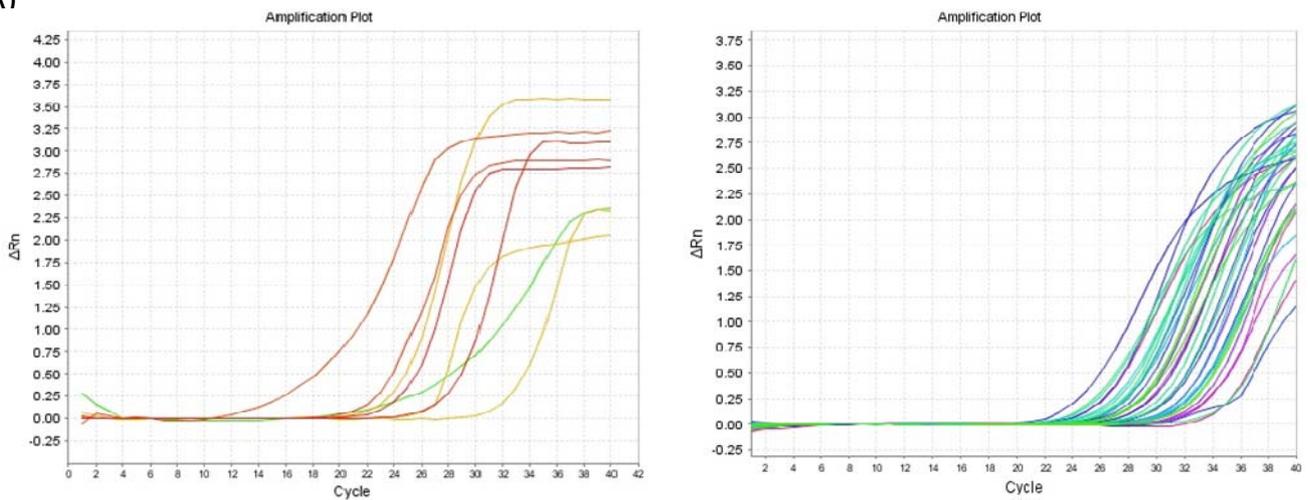
**Temporalidad.** En los meses del verano del 2010 (Enero – Abril) la frecuencia de diarrea por NoV fue baja, pero al inicio del invierno del mismo año, incrementó dramáticamente presentando picos epidémicos en Junio y Julio con 30% y 29% respectivamente. La más alta diversidad genotípica coincide con el mes de Junio, cuando circularon al menos 4 genotipos (GII.4, GII.6, GI.3 y GI.2), siendo predominante el GII.4 en los picos epidémicos y en casi todos los meses del estudio (Fig.9).



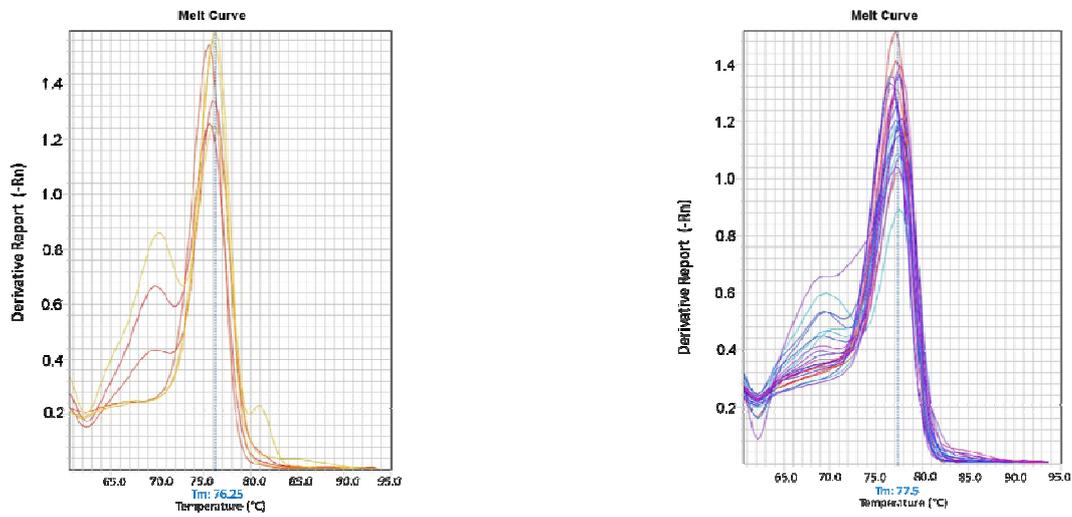
**Figura 9.** Distribución genotípica mensual. Los ejes “Y” a la derecha e izquierda representan las frecuencias de muestras analizadas y muestras Norovirus-positivo, respectivamente. En cada barra se observa la distribución genotípica. La leyenda “Prod. PCR ins” indica que la cantidad de producto de PCR fue insuficiente para realizar secuenciación.

**Determinación de los parámetros de eficiencia del método.** La mayoría de las muestras positivas a los genogrupos GI y GII presentaron valores de  $Ct \leq 35$ , la media de los valores de  $Ct$  de las muestras positivas para GI y GII fue de  $24.2 \pm 5.6$  y  $26.2 \pm 6.1$ , respectivamente. El  $T_m$  promedio en las muestras GI fue de  $76.1 \pm 0.6^\circ C$  y para GII de  $77.1 \pm 0.6^\circ C$  (Fig.10).

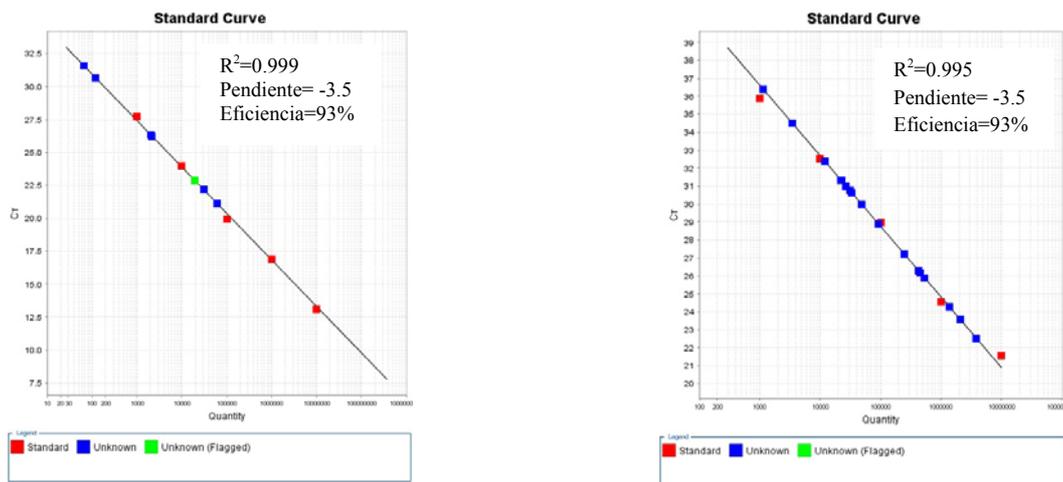
A)



B)



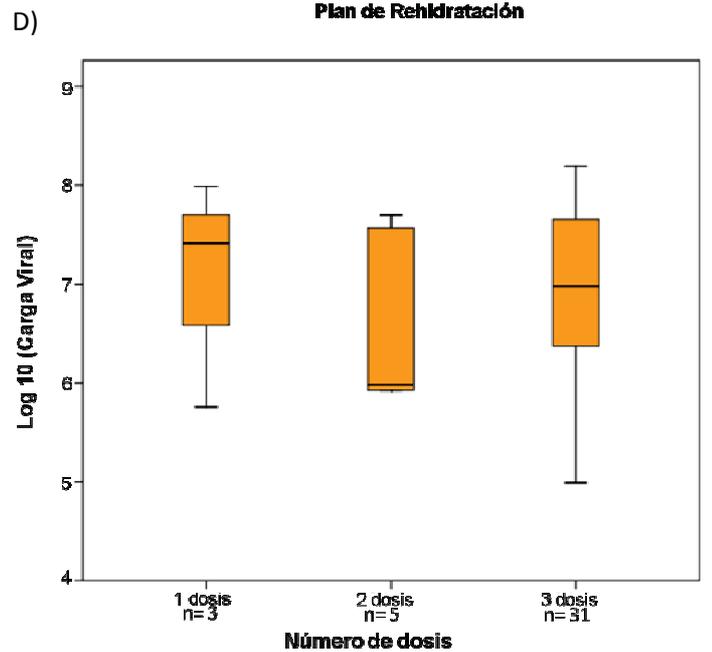
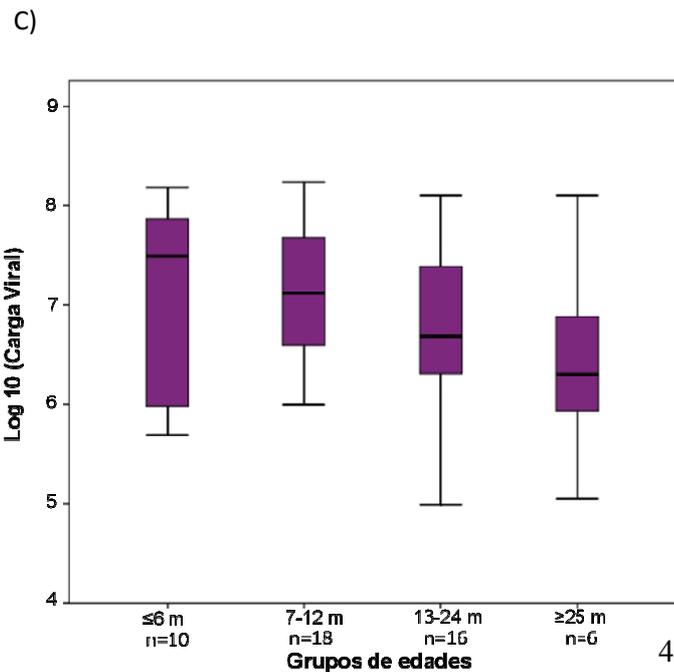
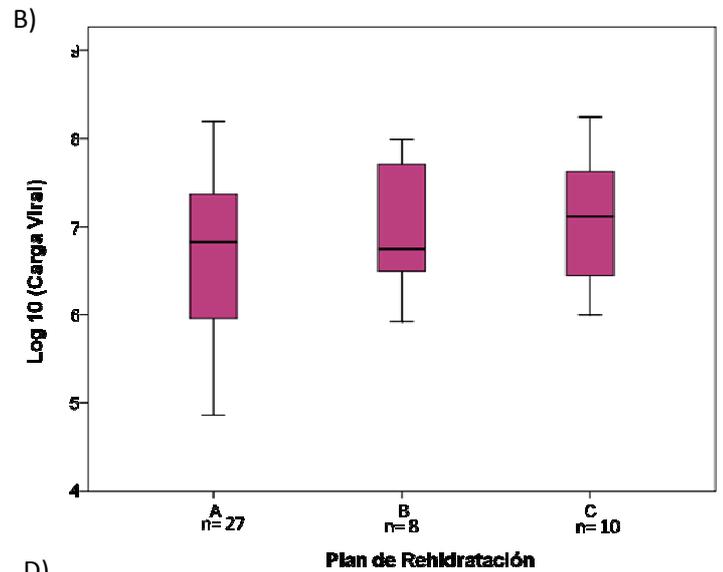
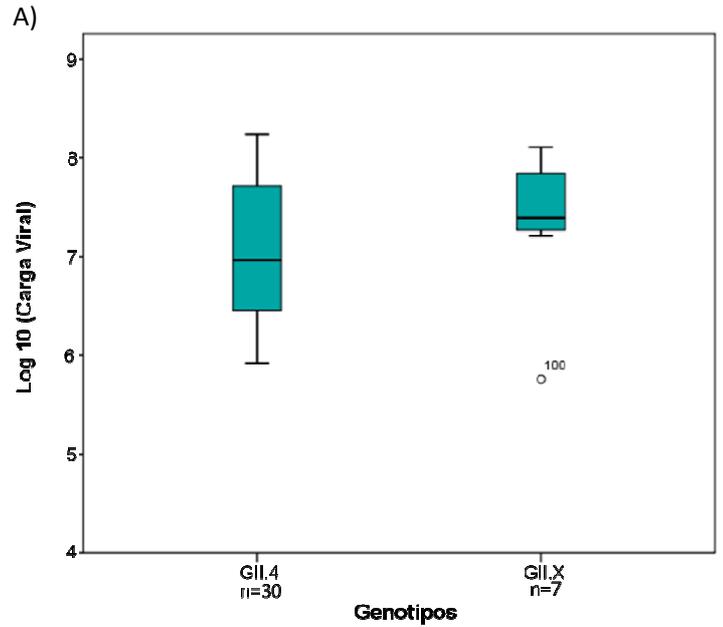
C)



**Figura 10.** A) Izquierda: Amplificación de muestras GI positivas, Derecha: Amplificación de muestras GII positivas. B) Izquierda: Curva de disociación de muestras GI positivas, Derecha: Curva de disociación de muestras GII positivas. C) Izquierda: Curva estándar de muestras GI positivas, Derecha: Curva estándar de muestras GII positivas.

**Cuantificación viral.** Para investigar si existe asociación entre la excreción de partículas virales y genotipos, todas las muestras NoV GII-positivos (León, n = 37) con resultados de secuenciación se cuantificaron por PCR en tiempo real. Las medias geométricas fueron  $1 \times 10^7$  y  $2.2 \times 10^7$  copias/gr. heces para los genotipos GII.4 (GII.42006b, GII.42010, GII.4X) y GII.X (GII.6, GII.9, GII.13) respectivamente, no existen diferencias significativas entre ambos grupos ( $p = 0.652$ ) (Fig.11A). La carga viral también se comparó con el plan de rehidratación, encontrándose que las medias geométricas de los niños sin deshidratación severa (Plan A y B) fueron similares que las de los niños con deshidratación severa (Plan C) ( $p = 0.862$ ) (Fig.11B). Al comparar la excreción de partículas virales con los grupos de edades de los niños NoV-Positivos se encontró que a medida que aumenta la edad disminuye la excreción viral (Fig.11C). También comparamos la carga viral y el número de dosis de la vacuna contra RV, encontrándose que la mayor carga viral estaba en el grupo que tenía una sola dosis de inmunización ( $1.14 \times 10^7$ ) en comparación con los otros dos grupos (2da:  $1.26 \times 10^6$  y 3ra:  $7.96 \times 10^6$ ) (Fig.11D) aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativa ( $p = 0.726$ ).

Figura 10. **A)** Comparación entre la carga viral en niños infectados con GII.4 y niños infectados con otros genotipos del GII. La carga viral es determinada en equivalentes de genoma por gramo de heces. GII.X representa GII.6 (n=3), GII.9 (n=1), GII.13 (n=3). **B)** Comparación de la excreción de partículas virales en niños infectados con GII y que requirieron rehidratación intravenosa (plan C), tratamiento oral activo con rehidratación oral en los centros de salud (plan B), o rehidratación oral en casa (plan A). **C)** Comparación entre la carga viral y los grupos de edades de niños infectados. **D)** Comparación entre la carga viral y el grado de inmunización en niños infectados con GII. En el gráfico los cuadros representan el rango intercuartil que contienen 50% de los valores. Las líneas horizontales a través de los cuadros indican las medianas.



## DISCUSION

Varios ensayos clínicos se han llevado a cabo para demostrar la eficacia y seguridad de la vacuna anti-RV (Rotateq®), dichos estudios han revelado que la vacuna es efectiva contra RV. Una observación interesante revelada por esos estudios es que la vacuna induce un “efecto de protección no específico” sobre la diarrea causada por otros agentes etiológicos, es decir, protege contra el 98% de la diarrea de cualquier causa y 74% contra la diarrea por RV [8]. Para verificar si la vacuna tiene algún efecto sobre NoV se realizó este estudio en niños con diarrea inmunizados con la vacuna Rotateq® en dos ciudades de Nicaragua. Nuestro estudio reveló que dicha vacuna no tiene ningún efecto sobre la diarrea por NoV, es decir, la infección por NoV se produce independientemente del grado de inmunización, como habría de esperarse. De hecho la proporción de NoV fue mayor en los niños inmunizados y la primera dosis parece ser un factor de riesgo. Resultados similares han sido reportados por otros investigadores en Finlandia [166] donde encontraron un 36% de NoV-positivos en el grupo vacunado y 27% en el grupo placebo. Sin embargo otros estudios han sugerido que la vacuna si causa un efecto protector contra otros agentes virales como Sapovirus y Adenovirus [167, 168].

La prevalencia de NoV en este estudio fue del 22%, casi el doble de lo reportado en el 2005 por Bucardo y colaboradores donde la prevalencia fue del 12% [6]. La primera razón que pueda explicar esta diferencia, es que la vacunación masiva contra RV a partir del 2006 redujo el número de casos de infecciones por RV, permitiendo así que NoV se convirtiera en el principal agente causante de gastroenteritis viral en niños  $\leq 5$  años. La teoría de la selección natural explica que un microorganismo o individuo al no poder desarrollarse o reproducirse será desplazado por aquel que tiene la capacidad de herencia, variación y reproducción diferencial, dando como resultado la evolución de este por selección natural, dado que RV era el principal causante de gastroenteritis infantil antes de la implementación de la vacuna, la supresión de este pudo haber inducido la selección natural de otras cepas virales entre ellas NoV. Otra posibilidad es que esta diferencia se deba únicamente al hecho de haber utilizado dos métodos diferentes, ya que las muestras del 2005 fueron analizadas con un ELISA cuya sensibilidad era del 77%, mientras que el PCR en tiempo real utilizado

en este estudio tiene una sensibilidad mayor del 90% [163, 164]. Para verificar esta sugerencia se deberían reanalizar las muestras del 2005 con el PCR en tiempo real utilizado en este estudio, esos análisis también podrían confirmar si el incremento de NoV post-vacuna es real.

Un dato interesante encontrado en el presente estudio es que los niños con una sola dosis de la vacuna anti-RV fueron los más afectados por NoV (31%), lo que podría indicar que la primera inmunización con Rotateq® provoca un marcado efecto inmunológico, inducido por la rápida replicación de las cepas vacunales (G1, G2, G3 y G4) lo que hace más susceptible a estos niños a la infección por NoV u otros microorganismos en los días posteriores a la vacunación. Probablemente en la segunda y tercera dosis dicho efecto es leve porque la replicación es inmunológicamente reprimida (Tabla 1). Cuando analizamos el grado de inmunización y la excreción viral, se pudo notar que el grupo que tenía una sola dosis de la vacuna anti-RV presentó mayor excreción de partículas virales comparado con los otros grupos, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa y los números son pequeños para establecer una conclusión (Fig.10D). También es cierto, que los niños < 6 meses presentaban mayor excreción, lo que sugiere que otros factores como el de la edad influyen la replicación (Fig.10C).

Estudios recientes han mostrado que NoV desempeña un papel etiológico importante en la diarrea esporádica que ocurre en bebés e infantes [1, 169]. En este estudio NoV afectó mayormente a niños < 1 año de edad, lo que concuerda con estudios realizados en Tailandia y Australia [170, 171]. Quizás la menor frecuencia en niños > 2 años de edad podría ser resultado de una inmunidad protectora, inducida por múltiples infecciones en el primer año de vida [76]. Sin embargo estudios experimentales en voluntarios han revelado que NoV no induce protección a larga duración, probablemente por la alta variabilidad genética.

Se ha sugerido que los niños < 1 año podrían estar más protegidos ante las infecciones por NoV y otros agentes virales debido a que cuentan con el efecto protector que les brinda la lactancia materna. La leche materna contiene anticuerpos IgA que podrían jugar un papel importante en la neutralización de NoV reduciendo así las posibilidades de interacción

virus-células. La leche humana es rica en oligosacáridos que se encuentran en formas libres y conjugadas, como glicoproteínas y glicolípidos, estos pueden contener los mismos epítomos de los antígenos de los grupos sanguíneos humanos como las que se encuentran en las células epiteliales del intestino, dichos epítomos se han reconocido como receptores virales. Si estas sustancias están en contacto con NoV podrían también neutralizarlo e inhibir la infección. Dicho efecto de la leche materna no fue observado en este estudio, de hecho el 40% de los niños < 6 meses que recibieron lactancia materna exclusiva fueron NoV positivos, lo que sugiere que, aunque se han encontrado anticuerpos IgA específicos de NoV y oligosacáridos en la leche materna [172], la protección del bebé contra NoV es dependiente también de otros factores [173]. Probablemente las madres de estos niños infectados con NoV son no secretoras, es decir, no expresan los antígenos de los grupos sanguíneos o receptores virales putativos en la leche materna, entonces el virus no pudo ser inactivado y por tanto, producir infección.

Otro de los objetivos de este estudio era investigar la distribución genotípica de NoV en las muestras positivas, y como se pudo observar el Genogrupo II fue identificado con más frecuencia (92%) que NoV GI (8%), lo que concuerda con muchos estudios realizados en Nicaragua y a nivel mundial donde NoV GII se impone como el genogrupo dominante tanto a nivel hospitalario como comunitario [6, 75, 174].

Norovirus tiene una alta diversidad genética lo que pudo ser demostrado en este estudio donde se identificaron al menos 7 genotipos diferentes dentro de los dos genogrupos (GI y GII). NoV GII.4 fue el genotipo más común durante el período de estudio, concordando con estudios realizados en países como Brasil, España, EEUU, Canadá, Australia, China [171, 175-177]. A nivel mundial NoV GII.4 se ha convertido en la cepa más virulenta y predominante, gracias a la acumulación gradual de mutaciones sobre todo en las regiones protuberantes de la superficie de la partícula viral (dominio P2). Este patrón de acumulación de mutaciones resulta de un proceso selectivo, que proporciona ventajas para la supervivencia de nuevas cepas [178]. En Nicaragua se ha observado el desplazamiento de las variantes GII.4 a lo largo de los años, por ejemplo en el año 2005 y 2007 [6, 11] en estudios realizados en una población pediátrica y en aguas residuales, respectivamente, la

variante predominante fue GII.4 Hunter, y en este estudio que abarca los años 2009 y 2010 la variante Hunter fue desplazada completamente y reemplazada por Minerva (GII.4.2006b), dado que NoV GII.42010 aparece en este estudio en menos proporción en el 2010 es razonable sugerir que dicha cepa podría sustituir a Minerva o es actualmente la cepa predominante.

La evolución de NoV GII.4 ha sido muy estudiada, Lindesmith y colaboradores estudiaron el mecanismo molecular que da como resultado la persistencia y la aparición de nuevas cepas [28]. Las variantes emergentes parecen tener una ventaja de transmisibilidad y mayor virulencia, incluso se ha hipotetizado que NoV GII.4 persiste porque es capaz de alterar en el tiempo su antigenicidad y los ligandos que reconocen receptores celulares, lo que permite la generación de cepas que escapan a la inmunidad o adquieren diferentes patrones de interacción con la célula huésped [179].

La mayor variabilidad genotípica en este estudio se observó durante los meses de Junio y Julio 2010, a diferencia de lo observado en el año 2005, donde la mayor variabilidad ocurrió durante el mes de Abril, aunque los dos estudios mostraron la selección de la variante GII.4 que predomina (91%) durante los meses de Junio y Julio (Hunter en 2005, Minerva en 2009). Dado que el pico epidémico de las infecciones por NoV coincide con la temporada lluviosa de Nicaragua, podemos sugerir que la mayor transmisibilidad del virus se produce en invierno, ya que se ha demostrado que NoV se encuentra frecuentemente en aguas contaminadas con heces humanas [180].

## CONCLUSION

- Este estudio sugiere que NoV es la principal causa de gastroenteritis en niños  $\leq 5$  años en Nicaragua. La prevalencia global de Norovirus fue del 22%, y se encontró en el 23% de los niños inmunizados y en el 12% de los no inmunizados. Las manifestaciones clínicas más asociadas a la infección por NoV fueron el vómito (67%) y la fiebre  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  (59%).
- Norovirus fue encontrado en el 40% de los niños  $< 6$  meses de edad que recibieron lactancia materna exclusiva y en el 31% de los niños con una sola dosis de la vacuna anti-RV. Los niños con una sola dosis excretaron la mayor cantidad de partículas virales.
- Los análisis moleculares revelaron que NoV GII (92%) sigue siendo predominante en Nicaragua como ocurre en el resto del mundo. La diversidad genética incluye 7 genotipos (GII.4, GII.6, GII.9, GII.13, GI.2, GI.3 y GI.4) sobresaliendo el genotipo GII.4 (81%). Este estudio revela que la variante Hunter de GII.4 que circuló entre el 2005 y 2007 fue sustituida por Minerva en el 2009 y aparentemente dicha cepa fue sustituida por la variante “2010”.

## RECOMENDACIONES

- Reanalizar todas las muestras con métodos que permitan la identificación de Rotavirus, Sapovirus, Adenovirus y Astrovirus para confirmar si Norovirus es la principal causa de gastroenteritis viral en niños  $\leq 5$  años y además investigar el efecto no específico de la vacuna contra otras infecciones virales.
- Realizar un estudio de cohorte que permita verificar la susceptibilidad a las infecciones por Norovirus después de administrada la primera dosis de la vacuna anti-Rotavirus.
- Realizar estudios que permitan identificar los antígenos de los grupos sanguíneos y su asociación con las infecciones por Norovirus.

## REFERENCIAS

- [1] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1224-31.
- [2] 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. 1972:1075-81.
- [3] Vinje J, Koopmans MP. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol.* 2000 Jul;38(7):2595-601.
- [4] Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, et al. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 2002 Jul 1;186(1):1-7.
- [5] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006 Mar 15;346(2):312-23.
- [6] Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Paniagua M, Lindgren PE, Espinoza F, et al. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol.* 2008 Aug;46(8):2573-80.
- [7] Morillo SG, Timenetsky Mdo C. Norovirus: an overview. *Rev Assoc Med Bras.* Aug;57(4):453-8.
- [8] Vesikari T, Karvonen A, Ferrante SA, Ciarlet M. Efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq(R), in Finnish infants up to 3 years of age: the Finnish Extension Study. *Eur J Pediatr.* Nov;169(11):1379-86.
- [9] Patel M, Pedreira C, De Oliveira LH, Tate J, Orozco M, Mercado J, et al. Association between pentavalent rotavirus vaccine and severe rotavirus diarrhea among children in Nicaragua. *Jama.* 2009 Jun 3;301(21):2243-51.
- [10] Becker-Dreps S, Paniagua M, Dominik R, Cao H, Shah NK, Morgan DR, et al. Changes in childhood diarrhea incidence in Nicaragua following 3 years of universal infant rotavirus immunization. *Pediatr Infect Dis J.* Mar;30(3):243-7.
- [11] 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.* 6(10):e25962.
- [12] AAP. American Academy of Pediatrics. Practice parameter: the management of acute gastroenteritis in young children. *Pediatrics.* 1996;97:424-35.
- [13] Northrup RS, Flanigan TP. Gastroenteritis. 1994:461-71.
- [14] Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D, et al. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200 Suppl 1:S9-S15.
- [15] WHO. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, October 2009 – conclusions and recommendations. *Weekly epidemiological record;* 2009.
- [16] Vesikari T, Itzler R, Karvonen A, Korhonen T, Van Damme P, Behre U, et al. RotaTeq, a pentavalent rotavirus vaccine: efficacy and safety among infants in Europe. *Vaccine.* 2009 Dec 11;28(2):345-51.
- [17] Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2006 Jan 5;354(1):23-33.

- [18] Zaman K, Dang DA, Victor JC, Shin S, Yunus M, Dallas MJ, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. Aug 21;376(9741):615-23.
- [19] Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N Engl J Med*. Jan 28;362(4):289-98.
- [20] Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis*. 2000 May;181 Suppl 2:S322-30.
- [21] Farkas T, Cross RW, Hargitt E, Lerche NW, Morrow AL, Sestak K. Genetic Diversity and Histo-Blood Group Antigen Interactions of Rhesus Enteric Caliciviruses. 8617-25.
- [22] Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM, Bridger JC. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology*. 2006 Jun 20;350(1):240-50.
- [23] Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J Infect Dis*. 2000 May;181 Suppl 2:S295-302.
- [24] Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and Genomic Organization of Norwalk Virus. *Virology*. 1993;195(1):51-61.
- [25] Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*. 1999 Oct 8;286(5438):287-90.
- [26] 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. *J Virol*. 2003 Nov;77(21):11603-15.
- [27] Lindesmith LC, Debbink K, Swanstrom J, Vinje J, Costantini V, Baric RS, et al. Monoclonal antibody-based antigenic mapping of norovirus GII.4-2002. *J Virol*. Jan;86(2):873-83.
- [28] Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, et al. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med*. 2008 Feb;5(2):e31.
- [29] Chen R, Neill JD, Estes MK, Prasad BV. X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 23;103(21):8048-53.
- [30] Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, Zhang Z, et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol*. 2007 Jun;81(11):5949-57.
- [31] Lochridge VP, Jutila KL, Graff JW, Hardy ME. Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J Gen Virol*. 2005 Oct;86(Pt 10):2799-806.
- [32] Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, et al. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol*. 2007 Sep;81(18):9932-41.
- [33] Bull RA, Eden J-S, Rawlinson WD, White PA. Rapid Evolution of Pandemic Noroviruses of the GII.4 Lineage. *PLoS Pathog*. 6(3):e1000831.

- [34] Bok K, Abente EJ, Realpe-Quintero M, Mitra T, Sosnovtsev SV, Kapikian AZ, et al. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J Virol*. 2009 Nov;83(22):11890-901.
- [35] Shanker S, Choi JM, Sankaran B, Atmar RL, Estes MK, Prasad BV. Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: implications for epochal evolution. *J Virol*. Sep;85(17):8635-45.
- [36] Allen DJ, Gray J, Gallimore CI, Xerry J, Iturriza-Gomara M. Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS One*. 2008;3(1):e1485.
- [37] de Rougemont A, Ruvoen-Clouet N, Simon B, Estienney M, Elie-Caille C, Aho S, et al. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J Virol*. May;85(9):4057-70.
- [38] Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol*. 2007 Dec;88(Pt 12):3347-59.
- [39] Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis*. 2005 Dec;11(12):1874-81.
- [40] Oliver SL, Dastjerdi AM, Wong S, El-Attar L, Gallimore C, Brown DW, et al. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol*. 2003 Feb;77(4):2789-98.
- [41] 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. *Vet Microbiol*. 2009 Jan 1;133(1-2):184-9.
- [42] Martella V, Campolo M, Lorusso E, Cavicchio P, Camero M, Bellacicco AL, et al. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis*. 2007 Jul;13(7):1071-3.
- [43] Martella V, Lorusso E, Decaro N, Elia G, Radogna A, D'Abramo M, et al. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug;14(8):1306-8.
- [44] Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HWt. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*. 2003 Mar 7;299(5612):1575-8.
- [45] Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MS, Vinje J. Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg Infect Dis*. Jun;16(6):980-2.
- [46] Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods*. 2004 Mar 15;116(2):109-17.
- [47] Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 2006 Feb;44(2):327-33.
- [48] Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, et al. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol*. 2004 Jul;42(7):2988-95.
- [49] Domingo E. Quasispecies. In: Webster AGRG, ed. *In Encyclopaedia of virology*. Londres: Academic Press 1999:1431 - 6.
- [50] Domingo E, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Martin-Hernandez AM, Saiz JC, Escarmis C. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis*. 1998 Oct-Dec;4(4):521-7.

- [51] Biebricher CK, Eigen M. What is a quasispecies? *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;299:1-31.
- [52] Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. 1982:1577-85.
- [53] Bok K, Parra GI, Mitra T, Abente E, Shaver CK, Boon D, et al. Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 4;108(1):325-30.
- [54] Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A, et al. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol.* 2003 Dec;77(24):13117-24.
- [55] Carlsson B, Lindberg AM, Rodriguez-Diaz J, Hedlund KO, Persson B, Svensson L. Quasispecies dynamics and molecular evolution of human norovirus capsid P region during chronic infection. *J Gen Virol.* 2009 Feb;90(Pt 2):432-41.
- [56] Siebenga JJ, Beersma MF, Vennema H, van Biezen P, Hartwig NJ, Koopmans M. High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness among hospitalized patients: a model for in vivo molecular evolution. *J Infect Dis.* 2008 Oct 1;198(7):994-1001.
- [57] Schorn R, Hohne M, Meerbach A, Bossart W, Wuthrich RP, Schreier E, et al. Chronic norovirus infection after kidney transplantation: molecular evidence for immune-driven viral evolution. *Clin Infect Dis.* Aug 1;51(3):307-14.
- [58] Hoffmann D, Hutzenthaler M, Seebach J, Panning M, Umgelter A, Menzel H, et al. Norovirus GII.4 and GII.7 capsid sequences undergo positive selection in chronically infected patients. *Infect Genet Evol.* Mar;12(2):461-6.
- [59] Boon D, Mahar JE, Abente EJ, Kirkwood CD, Purcell RH, Kapikian AZ, et al. Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *J Virol.* Sep;85(17):8656-66.
- [60] Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, et al. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol.* Aug;84(16):8085-97.
- [61] Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis.* 1999 Jun;179(6):1334-44.
- [62] Vinje J, Altena SA, Koopmans MPG. The Incidence and Genetic Variability of Small Round-Structured Viruses in Outbreaks of Gastroenteritis in The Netherlands. 1997:1374-8.
- [63] 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. *J Infect Dis.* 2004 Jul 1;190(1):27-36.
- [64] Kroneman A, Vennema H, Harris J, Reuter G, von Bonsdorff CH, Hedlund KO, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill.* 2006;11(12):E061214 1.
- [65] Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, et al. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan. *J Med Virol.* 2006 Jul;78(7):971-8.
- [66] Siebenga J, Kroneman A, Vennema H, Duizer E, Koopmans M. Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GII.4 2006b (for US named Minerva-like, for

Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance. *Euro Surveill.* 2008 Jan 10;13(2).

[67] MMWR. Norovirus activity-United States, 2006-2007. *Weekly Report: CDC*; 2007.

[68] Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Williams K, Lee D, Vinje J. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerg Infect Dis.* Aug;17(8):1389-95.

[69] MMWR. Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines. Recommendations and Report: Centers for Disease Control and Prevention; 2011.

[70] Patel MM, Hall AJ, Vinje J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol.* 2009 Jan;44(1):1-8.

[71] Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis.* 2004 Aug 1;39(3):318-24.

[72] Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R, et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med.* 1982 Jun;96(6 Pt 1):756-61.

[73] Phillips G, Tam CC, Conti S, Rodrigues LC, Brown D, Iturriza-Gomara M, et al. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis. *Am J Epidemiol.* May 1;171(9):1014-22.

[74] Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R, et al. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg Infect Dis.* 2005 Jan;11(1):95-102.

[75] de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol.* 2001 Oct 1;154(7):666-74.

[76] Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2002 Aug 1;35(3):246-53.

[77] Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chiba S. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J.* 2001 Sep;20(9):849-53.

[78] Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis.* 1994 Jul;170(1):34-43.

[79] Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Kindberg E, Paniagua M, Mollby R, et al. Asymptomatic norovirus infections in Nicaraguan children and its association with viral properties and histo-blood group antigens. *Pediatr Infect Dis J.* Oct;29(10):934-9.

[80] Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol.* 2008 Aug;80(8):1468-76.

[81] Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 1998 Dec;178(6):1571-8.

[82] Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, et al. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks

- collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol*. 2008 Sep;46(9):2959-65.
- [83] Verhoef L, Depoortere E, Boxman I, Duizer E, van Duynhoven Y, Harris J, et al. Emergence of new norovirus variants on spring cruise ships and prediction of winter epidemics. *Emerg Infect Dis*. 2008 Feb;14(2):238-43.
- [84] Rohayem J. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Jun;15(6):524-7.
- [85] Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect*. 2003 Aug;131(1):727-36.
- [86] Caul EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet*. 1994 May 21;343(8908):1240-2.
- [87] Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis*. 2008 Oct;14(10):1553-7.
- [88] Koopmans M. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Oct;21(5):544-52.
- [89] Onishi N, Hosoya M, Matsumoto A, Imamura T, Katayose M, Kawasaki Y, et al. Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis in Soma, Japan, 2001-2003. *Pediatr Int*. 2008 Feb;50(1):65-9.
- [90] Iturriza Gomara M, Simpson R, Perault AM, Redpath C, Lorgelly P, Joshi D, et al. Structured surveillance of infantile gastroenteritis in East Anglia, UK: incidence of infection with common viral gastroenteric pathogens. *Epidemiol Infect*. 2008 Jan;136(1):23-33.
- [91] Waters A, Dunford L, Tuite G, Connell J, Dooley S, Foley B, et al. Significant prevalence and genetic diversity of norovirus infection in Irish children. *Pediatr Res*. 2008 Sep;64(3):312-6.
- [92] Lee BE, Preiksaitis JK, Chui N, Chui L, Pang XL. Genetic relatedness of noroviruses identified in sporadic gastroenteritis in children and gastroenteritis outbreaks in northern Alberta. *J Med Virol*. 2008 Feb;80(2):330-7.
- [93] Colomba C, Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Ramirez S, Arista S, et al. Norovirus and gastroenteritis in hospitalized children, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2007 Sep;13(9):1389-91.
- [94] Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP, et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espirito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Mar;103(2):201-6.
- [95] Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Mizuguchi M, et al. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol*. 2007 Dec;79(12):1921-6.
- [96] Long KZ, Garcia C, Santos JI, Rosado JL, Hertzmark E, Dupont HL, et al. Vitamin A supplementation has divergent effects on norovirus infections and clinical symptoms among Mexican children. *J Infect Dis*. 2007 Oct 1;196(7):978-85.
- [97] Fabiana A, Donia D, Gabrieli R, Petrinca AR, Cenko F, Bebeci D, et al. Influence of enteric viruses on gastroenteritis in Albania: epidemiological and molecular analysis. *J Med Virol*. 2007 Dec;79(12):1844-9.

- [98] Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khelifi H, de Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Ambert-Balay K, et al. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J Clin Microbiol.* 2008 Apr;46(4):1349-55.
- [99] Nguyen TA, Hoang L, Pham le D, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, et al. Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006. *J Trop Pediatr.* 2008 Apr;54(2):102-13.
- [100] Reither K, Ignatius R, Weitzel T, Seidu-Korkor A, Anyidoho L, Saad E, et al. Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *BMC Infect Dis.* 2007;7:104.
- [101] Monica B, Ramani S, Banerjee I, Primrose B, Iturriza-Gomara M, Gallimore CI, et al. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. *J Med Virol.* 2007 May;79(5):544-51.
- [102] Dey SK, Nguyen TA, Phan TG, Nishio O, Salim AF, Rahman M, et al. Molecular and epidemiological trend of norovirus associated gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *J Clin Virol.* 2007 Nov;40(3):218-23.
- [103] Papaventsis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, et al. Norovirus infection in children with acute gastroenteritis, Madagascar, 2004-2005. *Emerg Infect Dis.* 2007 Jun;13(6):908-11.
- [104] Moyo SJ, Gro N, Kirsti V, Matee MI, Kitundu J, Maselle SY, et al. Prevalence of enteropathogenic viruses and molecular characterization of group A rotavirus among children with diarrhea in Dar es Salaam Tanzania. *BMC Public Health.* 2007;7:359.
- [105] Al-Mashhadani MN, Nakagomi O, Dove W, Ahmed H, Nakagomi T, Hart CA, et al. Norovirus gastroenteritis among children in Iraqi Kurdistan. *J Med Virol.* 2008 Mar;80(3):506-9.
- [106] 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. *Ann Intern Med.* 1973 Jul;79(1):18-25.
- [107] Levy AG, Widerlite L, Schwartz CJ, Dolin R, Blacklow NR, Gardner JD, et al. Jejunal adenylate cyclase activity in human subjects during viral gastroenteritis. *Gastroenterology.* 1976 Mar;70(3):321-5.
- [108] Meeroff JC, Schreiber DS, Trier JS, Blacklow NR. Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann Intern Med.* 1980 Mar;92(3):370-3.
- [109] 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). *J Virol.* 2007 Sep;81(17):9183-92.
- [110] Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol.* 2006 Nov;80(21):10372-81.
- [111] 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. *J Virol.* 2007 Apr;81(7):3535-44.
- [112] Smiley JR, Chang KO, Hayes J, Vinje J, Saif LJ. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J Virol.* 2002 Oct;76(20):10089-98.
- [113] Han MG, Cheetham S, Azevedo M, Thomas C, Saif LJ. Immune responses to bovine norovirus-like particles with various adjuvants and analysis of protection in gnotobiotic calves. *Vaccine.* 2006 Jan 16;24(3):317-26.

- [114] Souza M, Azevedo MS, Jung K, Cheetham S, Saif LJ. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol*. 2008 Feb;82(4):1777-86.
- [115] Taube S, Perry JW, McGreevy E, Yetming K, Perkins C, Henderson K, et al. Murine noroviruses bind glycolipid and glycoprotein attachment receptors in a strain-dependent manner. *J Virol*. May;86(10):5584-93.
- [116] Wobus CE, Thackray LB, Virgin HWt. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol*. 2006 Jun;80(11):5104-12.
- [117] Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol*. 2004 Dec;2(12):e432.
- [118] Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med*. 1977 Jul 14;297(2):86-9.
- [119] Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis*. 1990 Jan;161(1):18-21.
- [120] Frenck R, Bernstein DI, Xia M, Huang P, Zhong W, Parker S, et al. Predicting Susceptibility to Norovirus GII.4 by Use of a Challenge Model Involving Humans. *J Infect Dis*. Sep 7.
- [121] Karlsson KA. Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Mol Microbiol*. 1998 Jul;29(1):1-11.
- [122] Le Pendu J, Ruvoen-Clouet N, Kindberg E, Svensson L. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin Immunol*. 2006 Dec;18(6):375-86.
- [123] Oriol R, Le Pendu J, Mollicone R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang*. 1986;51(3):161-71.
- [124] Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med*. 2003 May;9(5):548-53.
- [125] 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(5):e5593.
- [126] Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, et al. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol*. 2003 Jan;26(1):109-15.
- [127] Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol*. 1992 Nov;66(11):6527-32.
- [128] 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. *J Clin Microbiol*. 1993 Aug;31(8):2185-91.
- [129] Parker S, Cubitt D, Jiang JX, Estes M. Efficacy of a recombinant Norwalk virus protein enzyme immunoassay for the diagnosis of infections with Norwalk virus and other human "candidate" caliciviruses. *J Med Virol*. 1993 Nov;41(3):179-84.
- [130] de Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006 Nov;137(2):259-64.
- [131] Dimitriadis A, Bruggink LD, Marshall JA. Evaluation of the Dako IDEIA norovirus EIA assay for detection of norovirus using faecal specimens from Australian gastroenteritis outbreaks. *Pathology*. 2006 Apr;38(2):157-65.

- [132] 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. *J Clin Microbiol.* 2004 Jun;42(6):2587-95.
- [133] Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, et al. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol.* 2006 Oct;44(10):3784-6.
- [134] 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. *J Virol Methods.* 2009 May;157(2):219-22.
- [135] Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, et al. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *J Virol Methods.* 2008 Feb;147(2):360-3.
- [136] 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. *J Virol Methods.* 2008 Mar;148(1-2):1-8.
- [137] Mutoh K, Hakamata A, Yagi H, Kurokawa K, Miki N, Kurita I. Evaluation of new commercial immunochromatography kit for norovirus in feces. *Pediatr Int.* 2009 Feb;51(1):164-6.
- [138] 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. *J Trop Pediatr.* 2007 Aug;53(4):264-9.
- [139] Khamrin P, Chan-it W, Satou K, Nanba Y, Yamashita Y, Okitsu S, et al. Evaluation of the newly developed immunochromatography test kit for rapid detection and differentiation of norovirus GI and GII. *J Trop Pediatr.* Oct;56(5):368-9.
- [140] Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses. *J Infect Dis.* 2000 May;181 Suppl 2:S336-48.
- [141] Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jan;14(1):15-37.
- [142] Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, et al. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol.* 2006 Apr;44(4):1405-12.
- [143] Schultz AC, Vega E, Dalsgaard A, Christensen LS, Norrung B, Hoorfar J, et al. Development and evaluation of novel one-step TaqMan realtime RT-PCR assays for the detection and direct genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Clin Virol.* Mar;50(3):230-4.
- [144] Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2003 Apr;41(4):1548-57.
- [145] Jor E, Myrmel M, Jonassen CM. SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway. *J Virol Methods.* Oct;169(1):1-7.
- [146] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. 1996:986-94.

- [147] Vainio K, Myrmet M. Molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Norway during 2000 to 2005 and comparison of four norovirus real-time reverse transcriptase PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2006 Oct;44(10):3695-702.
- [148] Hohne M, Schreier E. Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. *J Med Virol.* 2004 Feb;72(2):312-9.
- [149] 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. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Apr;71(4):1870-5.
- [150] 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. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Dec;70(12):7179-84.
- [151] Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J Virol Methods.* 2005 Jan;123(1):1-7.
- [152] Feeney SA, Armstrong VJ, Mitchell SJ, Crawford L, McCaughey C, Coyle PV. Development and clinical validation of multiplex TaqMan(R) assays for rapid diagnosis of viral gastroenteritis. *J Med Virol.* Sep;83(9):1650-6.
- [153] Richards GP, Watson MA, Kingsley DH. A SYBR green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools. *J Virol Methods.* 2004 Mar 1;116(1):63-70.
- [154] Mo X, Gao D. [SYBR green I real-time polymerase chain reaction for detection of Norovirus II in the shellfish]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* Jun;26(6):817-22.
- [155] Park SI, Park DH, Saif LJ, Jeong YJ, Shin DJ, Chun YH, et al. Development of SYBR Green real-time RT-PCR for rapid detection, quantitation and diagnosis of unclassified bovine enteric calicivirus. *J Virol Methods.* 2009 Jul;159(1):64-8.
- [156] Scipioni A, Mauroy A, Ziant D, Saegerman C, Thiry E. A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *Virol J.* 2008;5:94.
- [157] Buh Gasparic M, Cankar K, Zel J, Gruden K. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 2008;8:26.
- [158] Nordgren J, Bucardo F, Svensson L, Lindgren PE. Novel light-upon-extension real-time PCR assay for simultaneous detection, quantification, and genogrouping of group A rotavirus. *J Clin Microbiol.* May;48(5):1859-65.
- [159] Vinje J, Vennema H, Maunula L, von Bonsdorff CH, Hoehne M, Schreier E, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol.* 2003 Apr;41(4):1423-33.
- [160] Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology.* 2002 Aug 1;299(2):225-39.
- [161] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980 Dec;16(2):111-20.
- [162] Huelsenbeck JP, Rannala B. Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science.* 1997 Apr 11;276(5310):227-32.

- [163] Espinoza E. PCR en tiempo real basado en SYBR Green para la detección y cuantificación de los genogrupos GI y GII de Norovirus. León: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. UNAN-León; 2011.
- [164] Nordgren J, Bucardo F, Dienus O, Svensson L, Lindgren PE. Novel light-upon-extension real-time PCR assays for detection and quantification of genogroup I and II noroviruses in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2008 Jan;46(1):164-70.
- [165] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987 Jul;4(4):406-25.
- [166] Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Karvonen A, Vesikari T. Norovirus gastroenteritis in young children receiving human rotavirus vaccine. *Scand J Infect Dis*. Jul;42(6-7):540-4.
- [167] Pang XL, Koskeniemi E, Joensuu J, Vesikari T. Effect of rhesus rotavirus vaccine on enteric adenovirus--associated diarrhea in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999 Sep;29(3):366-9.
- [168] Pang XL, Zeng SQ, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Effect of rotavirus vaccine on Sapporo virus gastroenteritis in Finnish infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2001 Mar;20(3):295-300.
- [169] Ramani S, Kang G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Curr Opin Infect Dis*. 2009 Oct;22(5):477-82.
- [170] Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, et al. Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. 2004:1305-7.
- [171] Mahar JE, Kirkwood CD. Characterization of norovirus strains in Australian children from 2006 to 2008: prevalence of recombinant strains. *J Med Virol*. Dec;83(12):2213-9.
- [172] Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, et al. First detection of IgA against norovirus in breast milk. *Clin Lab*. 2007;53(3-4):125-8.
- [173] Jiang X, Huang P, Zhong W, Tan M, Farkas T, Morrow AL, et al. Human milk contains elements that block binding of noroviruses to human histo-blood group antigens in saliva. *J Infect Dis*. 2004 Nov 15;190(10):1850-9.
- [174] Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jan;9(1):90-6.
- [175] Pang XL, Preiksaitis JK, Wong S, Li V, Lee BE. Influence of novel norovirus GII.4 variants on gastroenteritis outbreak dynamics in Alberta and the Northern Territories, Canada between 2000 and 2008. *PLoS One*.5(7):e11599.
- [176] Gonzalez-Galan V, Sanchez-Fauquier A, Obando I, Montero V, Fernandez M, Torres MJ, et al. High prevalence of community-acquired norovirus gastroenteritis among hospitalized children: a prospective study. *Clin Microbiol Infect*. Dec;17(12):1895-9.
- [177] Zeng M, Gong Z, Zhang Y, Zhu Q, Wang X. Prevalence and genetic diversity of norovirus in outpatient children with acute diarrhea in Shanghai, China. *Jpn J Infect Dis*.64(5):417-22.
- [178] Siebenga JJ, Lemey P, Kosakovsky Pond SL, Rambaut A, Vennema H, Koopmans M. Phylodynamic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathog*. May;6(5):e1000884.

[179] Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev.* 2008 Oct;225:190-211.

[180] Nordgren J, Matussek A, Mattsson A, Svensson L, Lindgren P-E. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Research.* 2009;43(4):1117-25.

## ANEXO #1

### Extracción ARN viral

(ROCHE cat. N° 11 858 882 001)

1. Descongelar las muestras y mantenerlas en hielo.
2. Diluir las muestras 1:10 con PBS 1X y centrifugar brevemente.
3. Mezclar 200 µl de la muestra diluida con 400 µl del Poli (A) en un vial de 1.5 ml estéril e incubar por 10 minutos a T° ambiente.
4. Depositar la mezcla anterior en una columna contenida en un tubo colector. Centrifugar a 8,000 rpm por 15 segundos.
5. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo colector. Agregar 500 µl del Buffer de Inhibición. Centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto.
6. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo colector. Agregar 450 µl de solución de lavado. Centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto.
7. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo colector. Agregar 450 µl de solución de lavado. Centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto.
8. Descartar el filtrado y centrifugar a 13,000 rpm por 15 segundos. Descartar el tubo colector.
9. Colocar la columna en un vial estéril de 1.5 ml, agregar 50 µl del Buffer de elución y centrifugar a 8,000 rpm por 1 minuto.
10. Descartar la columna y rotular el vial que contiene el ARN.
11. Guardar a -30°C hasta su uso.

## ANEXO #2

### Screening de Norovirus GI mediante PCR en Tiempo Real FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)

1. Descongelar los reactivos y el ADNc viral en hielo.
2. Preparar el Master Mix

Componente	[Final] (nM)	Vol (µL)x Rxn
FastStart Universal SYBR Green	1X	12.5
<b>Master (ROX) 2X</b>		
NV-GI-fwd1b (10 µM)	400 nM	1
NV-GI-rev (10 µM)	400 nM	1
Agua libre de nucleasas		8
ADNc		2.5
<b>Total</b>		<b>25 µl</b>

3. Agregar 22.5 µL del Master Mix en cada pozo de la placa a utilizar.
4. Agregue 2.5 µL de viral ADNc o Agua en cada pozo, según se especifica a continuación:

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	NTC	S10 <sup>7</sup>	S10 <sup>6</sup>	S10 <sup>5</sup>	S10 <sup>4</sup>	S10 <sup>3</sup>	S10 <sup>2</sup>	S10 <sup>1</sup>				
C	NTC	S10 <sup>7</sup>	S10 <sup>6</sup>	S10 <sup>5</sup>	S10 <sup>4</sup>	S10 <sup>3</sup>	S10 <sup>2</sup>	S10 <sup>1</sup>				
D	NTC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
E	NTC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
F	NTC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
G	NTC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	NTC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

**NTC: Non Template Control, U: Desconocido, S: Standard**

5. Mezclar y centrifugar a 4000 rpm por 3 min.
6. Sellar los pocillos.

7. Colocar la placa en el equipo para PCR en Tiempo Real (ABI 7500)
8. Correr el siguiente programa:
  - Pre calentamiento a 95°C POR 5 minutos
  - 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos y 72 por 1 minuto

**Especificaciones de los Primer:**

**Genogrupo I**

<i>Primers</i>	Secuencia (5' – 3') <sup>a</sup>	Localización
NVG1f1b	CGY TGG ATG CGN TTC CAT GA	5311–5330
NVG1rlux	C TCC TTA GAC GCC ATC ATC	5397–5379

a. Código de ambigüedad: Y, Pirimidina (C/T); N, A, G, C o T.

## Screening de Norovirus GII mediante PCR en Tiempo Real FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)

1. Descongelar los reactivos y el ADNc viral en hielo.
2. Preparar el Master Mix

Componente	[Final] (nM)	Vol (µL)x Rxn
<b>FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 2X</b>	1X	12.5
<b>NVG2flux1 (10 µM)</b>	400 nM	1
<b>COG2R (10 µM)</b>	400 nM	1
<b>Agua libre de nucleasas</b>		8
<b>ADNc</b>		2.5
<b>Total</b>		25 µl

3. Agregar 22.5 µL del Master Mix en cada pozo de la placa a utilizar.
4. Agregue 2.5 µL de viral ADNc o Agua en cada pozo, según se especifica a continuación:

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	NTC	S10 <sup>7</sup>	S10 <sup>6</sup>	S10 <sup>5</sup>	S10 <sup>4</sup>	S10 <sup>3</sup>	S10 <sup>2</sup>	S10 <sup>1</sup>				
C	NTC	S10 <sup>7</sup>	S10 <sup>6</sup>	S10 <sup>5</sup>	S10 <sup>4</sup>	S10 <sup>3</sup>	S10 <sup>2</sup>	S10 <sup>1</sup>				
D	NTC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
E	NTC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
F	NTC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
G	NTC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
H	NTC	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

**NTC: Non Template Control, U: Desconocido, S: Standard**

5. Mezclar y centrifugar a 4000 rpm por 3 min.
6. Sellar los pocillos.
7. Colocar la placa en el equipo para PCR en Tiempo Real (ABI 7500)
8. Correr el siguiente programa:

- Pre calentamiento a 95°C POR 5 minutos
- 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos y 72 por 1 minuto

**Especificaciones de los Primer:**

**Genogrupo II**

<i>Primers</i>	Secuencia (5' – 3') <sup>a</sup>	Localización
NVG2flux1	ATG TTY AGR TGG ATG AGR TTY TC	5012–5034
COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	5100–5080

a. Código de ambigüedad: **Y**, Pirimidina(C/T); **R**, purina (A/G).