

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
CARRERA DE BIOANÁLISIS CLÍNICO



Tesis para optar al título de:
Licenciado en Bioanálisis Clínico

**Correlación entre la frecuencia de antígenos histo-
sanguíneos y los títulos de IgG anti-norovirus en cerdos
criados artesanalmente en áreas rurales de León.**

AUTORES: Br. Victor Alfonso Ulloa Romero
Br. Omar Lenin Zepeda Alvarado

TUTOR: Dr. Filemón Bucardo
COTUTOR: Msc. Fredman González

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

Octubre 2015

Dedicatoria

A Dios todo poderoso por permitirnos terminar este trabajo y alcanzar un logro más en nuestra vida, a nuestros familiares y amigos que nos han apoyado de una u otra manera y a todos los docentes que han compartido de sus conocimientos con nosotros.

Agradecimientos

Este es el resultado del esfuerzo conjunto de muchas personas sin las cuales no hubiera sido posible este trabajo. Por esto agradecemos a nuestro tutor, Dr. Filemón Bucardo, al Msc. Fredman González, por todo el apoyo y colaboración, a todos nuestros compañeros, quienes a lo largo del camino nos han ayudado de una u otra manera en el desarrollo de este trabajo el cual ha finalizado llenando todas nuestras expectativas. A nuestros padres quienes a lo largo nuestra vida nos han apoyado y motivado. A nuestros profesores a quienes les debemos gran parte de los conocimientos aplicados, agradecemos también a esta prestigiosa universidad la cual nos abrió sus puertas, preparándonos para un futuro competitivo como personas de bien y agradecemos eternamente a Dios por la oportunidad de regalarnos de terminar este trabajo y poder seguir adelante.

Correlación entre la frecuencia de antígenos histo-sanguíneos y los títulos de IgG anti-norovirus en cerdos criados artesanalmente en áreas rurales de León.

Victor Alfonso Ulloa Romero, Omar Lenin Zepeda Alvarado, Filemón Bucardo.

Carrera de Bioanálisis, Clínico, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas.

Resumen

Los Norovirus (NoV) son los agentes causales más frecuentes de gastroenteritis no bacteriana en humanos. Estos virus también infectan porcinos, pero, su rol como agentes patógenos en esta especie es desconocido. Los NoV porcinos (NoVPo) y humanos (NoVHu) están genética y antigénicamente relacionados, lo que sugiere transmisión inter-especies. Los estudios *in vivo e in vitro* de los NoVHu han demostrado que los antígenos de los grupos histo-sanguíneos (HBGA) son reconocidos por los NoVHu y sugieren que los HBGA son posibles receptores virales. En este estudio pretendemos investigar si los cerdos criados de forma artesanal en áreas rurales de Nicaragua expresan los HBGA (Lewis y Secretor) y si existe alguna correlación con la presencia de anticuerpos IgG anti-NoV. El 33% de los 49 cerdos estudiados expresaron el antígeno "A" y el 67% no expresaron ningún otro antígeno del grupo ABO. El 26% expresaron el antígeno de Lewis (LeA = 4% y LeB = 22%). El antígeno H, que define el fenotipo Secretor fue encontrado en 29% de los cerdos. Estos datos revelan la presencia de los HBGA en los cerdos estudiados, de los cuales los antígenos A, H y LeB han definido susceptibilidad a las infecciones por NoV en humanos. Además, este estudio muestra que el 73% de los cerdos estudiados tenían títulos ≥ 40 de IgG anti-NoV, sugiriendo alta seropositividad y alta exposición a los NoV. Sin embargo, los títulos de IgG anti-NoV no se correlacionan con la presencia de los antígenos A, H y LeB, pero los cerdos que expresan el antígeno LeA y/o que carecen del antígeno H presentan altos títulos de IgG anti-NoV. Estos datos sugieren que los cerdos estudiados podrían infectarse con NoV porcinos independientemente de la presencia de los HBGA o utilizar otro tipo de receptor. Es decir, que la transmisión de los Norovirus entre humanos y porcinos es limitada o no se produce.

Índice

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Introducción | 1 |
| 2. | Antecedentes..... | 3 |
| 3. | Justificación | 5 |
| 4. | Problema | 6 |
| 5. | Objetivos..... | 7 |
| 5.1. | Objetivo General:..... | 7 |
| 5.2. | Objetivos Específicos: | 7 |
| 6. | Marco Teórico..... | 8 |
| 6.1. | Historia y Clasificación de Norovirus | 8 |
| 6.2. | Morfología y estructura molecular. | 9 |
| 6.3. | Diversidad genética | 11 |
| 6.4. | Potencial Zoonótico | 11 |
| 6.5. | Transmisión | 12 |
| 6.6. | Características Clínicas..... | 13 |
| 6.7. | Patogénesis y modelos de animales de infección | 13 |
| 6.8. | Inmunología y susceptibilidad genética | 14 |
| 6.8.1. | Inmunidad en cerdos..... | 15 |
| 6.8.2. | Sistema Lewis | 16 |
| 6.8.3. | Sistema ABO..... | 18 |
| 6.9. | Diagnostico..... | 18 |
| 7. | Materiales y Métodos..... | 21 |
| 8. | Resultados..... | 24 |
| 9. | Discusión | 28 |
| 10. | Conclusiones | 31 |

| | |
|--------------------------|----|
| 11. Recomendaciones..... | 32 |
| 12. Bibliografía..... | 33 |
| 13. Anexos..... | 36 |

Abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IgA | Inmunoglobulina A |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| NoV | Norovirus |
| NoVHu | Norovirus Humano |
| NoVPo | Norovirus Porcino |
| MNV | Norovirus Murino |
| HBGA | Antígenos de grupos histo-sanguíneos |
| VLP | Partícula viral sintética |
| LeA | Lewis A |
| LeB | Lewis B |
| Le- | Lewis Negativo |
| MGT | Media geométrica de los títulos |
| ELISA | Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real |
| ORF | Marco de lectura abierta |
| IEM | Inmuno-microscopia electrónica |
| p48 | Trafico Intracelular |
| NTPasa | Nucleótido Trifosfatasa |
| p22 | Trafico de la membrana celular y replicación viral |
| VPg | Iniciación de la traducción del ARN viral |
| PRO | Proteínas Virales |
| POL | Replicación del genoma viral |
| VP1 | Proteínas estructurales (Mayor) |
| VP2 | Proteínas estructurales (Menor) |



1. Introducción

Los norovirus humanos (NoVHu) son los agentes causales más frecuentes de gastroenteritis no bacteriana, dando lugar a más de 260 millones de infecciones a nivel mundial por año ⁽¹⁾. Pueden llegar a causar hasta 200,000 muertes en niños menores de 5 años por año ⁽²⁾. En Nicaragua la prevalencia de norovirus entre 2005 - 2010, fue del 12 al 24% ⁽³⁻⁵⁾. Estos virus se propagan fácilmente por contacto directo de persona a persona a través de la vía fecal-oral, y una de las causas más importantes de gastroenteritis asociada con aguas y alimentos contaminados ⁽⁶⁾.

Los norovirus son virus pequeños de ARN positivo, con un diámetro aproximado entre 27-32 nm, no envueltos e icosaédricos ⁽⁷⁾. Son miembros de la familia *Caliciviridae* y se dividen en siete genogrupos GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI, y GVII ⁽⁸⁾. Los genogrupos GI, GII y GIV provocan diarrea en los seres humanos, los norovirus que infectan porcinos también pertenecen al GII ⁽⁷⁾. También se han identificados norovirus que infectan otras especies animales como caninos, felinos, murinos y bovinos ⁽⁸⁾. La transmisión de norovirus entre las diferentes especies aún no se ha descrito.

Los norovirus porcinos (NoVPo) y humanos están genética y antigénicamente relacionados; pero no se conocen con exactitud las características antigénicas de los NoVPo ^(9, 10). La comprensión de la transmisión zoonótica es limitada, por la falta de un cultivo celular que permita la realización de ensayos de neutralización y de una cepa que pueda infectar ambas especies ^(9, 11).

Dicha limitación ha sido parcialmente superada mediante el desarrollo de partículas virales sintéticas (VLP), a partir de la expresión del gen que codifica para la cápside viral ⁽¹²⁾. Estas VLP recombinantes son actualmente una fuente de antígeno similar a los que contienen las partículas virales humanas ⁽¹²⁾. Las VLPs derivadas de norovirus humanos se han utilizado para evaluar la respuesta inmunológica en humanos y porcinos ^(13, 14). Sin embargo el estudio en animales es limitado por la falta de VLPs derivadas de norovirus animales.

Estudios en la última década han demostrado que los antígenos histo-sanguíneos (HBAGs) son reconocidos por los norovirus humanos, además, dichos



antígenos han sido propuestos como receptores de norovirus humanos ⁽¹⁵⁾. Estos antígenos histo-sanguíneo son un conjunto de antígenos presentes en diferentes células, como, eritrocito y enterocito, además, circulan libremente en fluidos corporales como saliva y leche materna ⁽¹⁶⁾. Dichos antígenos definen los tipos sanguíneos de los sistemas ABO, Lewis y Secretor. En los humanos se ha encontrado, asociación entre susceptibilidad a la infección y los tipos sanguíneo O, Lewis B y Secretor ^(15, 16).

Dada la relación genética y antigénica entre norovirus humanos y porcinos, proponemos que los norovirus porcinos podrían utilizar también a los antígenos histo-sanguíneos como posibles receptores. Sin embargo, la distribución de dichos antígenos sanguíneos se desconoce en los cerdos, con excepción del ABO. En Canadá y Francia se ha encontrado que el tipo sanguíneo A es común en cerdos, pudiendo alcanzar hasta el 62% ^(17, 18). En este estudio pretendemos determinar la frecuencia de antígenos histo-sanguíneos en cerdos y correlacionar su distribución con los títulos de IgG anti-norovirus como medida de susceptibilidad a la infección.



2. Antecedentes

Wang y colaboradores en el 2005 descubrieron que los NoVPo y NoVHu estaban relacionado genética y antigénicamente, en dicho estudio se analizaron 275 muestras fecales cerdos adultos procedentes de granjas estadounidenses detectando tres diferentes genotipos de NoVPo. Además la cepa con el genotipo GII-18 fue genética y antigénicamente más relacionado con el GII NoVHu en comparación con los otros genotipos encontrados (GII.11 y GII. 21). Estos investigadores sugirieron que los cerdos pueden ser reservorios de NoVHu ⁽¹⁹⁾.

Farkas y colaboradores en el 2005, describieron anticuerpos anti-NoV en cerdos procedente de granjas y mataderos, el estudio revelo que el 71% de los cerdos de EEUU y el 36% de los cerdos procedentes de Japón presentaban anticuerpos anti-norovirus contra las cepas porcinas SW918. Además el 63% de los cerdos procedentes de EEUU presentaron anticuerpos contra VLP derivadas de los NoVHu; Norwalk (GI.1) y Hawaii (GII.1). Sugiriendo un posible rol de los cerdos como reservorios de NoVHu ⁽²⁰⁾.

Gonzáles y colaboradores en el 2012 evaluaron la respuesta inmunológica, en cerdos criados en comunidades rurales de León y Chinandega, contra las cepas de norovirus humanos. Dicho estudio revelo que del 58% - 70% de los cerdos estudiados tenían anticuerpos contras las cepas de NoVHu, HS194 (GII.4), Dijon (GII.4) y Kron1 (GII.3). El estudio demostró también que existe una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de anticuerpos IgG Anti-Norovirus y la edad de los cerdos. Además se determinó que las frecuencias de los tipos sanguíneos de los porcinos eran 53% tipo O y 47% tipo A, con ausencia del B ⁽¹³⁾.

Cheetham y colaboradores en el 2006 descubrieron que la cepa de NoVHu HS66 (GII.4) era capaz de infectar cerdos libres de gérmenes (gnotobióticos) bajo condiciones controladas. Estos cerdos desarrollaron diarrea leve, excretaron el virus inoculado y mostraron seroconversión a la cepa infectante. Además se observó mediante inmuno-fluorescencia, la presencia de partículas virales en el duodeno y el yeyuno. Un año después Cheetham, también encontró que un grupo de cerdos libres de gérmenes (n = 38) expresaban los antígenos histo-sanguíneos en



enterocitos, iguales a los que expresan los humanos, los cuales han sido sugeridos por algunos investigadores como posible receptor viral ^(9, 21).



3. Justificación

La estrecha relación genética y antigénica de NoV humanos y porcinos ha planteado la posibilidad que los NoVPo utilicen receptores similares a los de los humanos en su proceso de replicación.

Con este estudio pretendemos correlacionar la presencia de antígenos histo-sanguíneos (posible receptor) y los títulos de IgG anti-norovirus en cerdos de comunidades rurales. Esperando encontrar asociación entre la presencia de ciertos antígenos y susceptibilidad a la infección, como se ha descrito en humanos. Lo cual podría sugerir receptores similares entre ambas especies.

El conocimiento generado ayudara a la comprensión del proceso de infección del norovirus en cerdos y del posible rol de los cerdos como reservorios de Norovirus patógenos para los humanos.



4. Problema

¿Existe alguna relación entre la presencia de antígenos histo-sanguíneos con los títulos de anticuerpos anti-norovirus en cerdos criados artesanalmente?



5. Objetivos

5.1. Objetivo General:

Correlacionar la presencia de anticuerpos anti-norovirus humanos en cerdos con la frecuencia de antígenos histo-sanguíneos específicos.

5.2. Objetivos Específicos:

- Caracterizar las condiciones higiénico sanitarias de la población en estudio.
- Determinar el título de anticuerpos anti-norovirus humanos en los sueros de los cerdos estudiados.
- Describir la frecuencia de los tipos sanguíneos ABO, Lewis y Secretor en las muestras colectadas.



6. Marco Teórico

La infección por norovirus es una de las causas de gastroenteritis más importantes en nuestro país la cual asumió relevancia luego de la introducción de la vacuna de rotavirus en el año 2006.

6.1. Historia y Clasificación de Norovirus

Se ha sospechado de los virus como causa de brotes de gastroenteritis no bacteriana durante más de 75 años. En 1929, Zahorsky propuso el nombre de "Enfermedad de los vómitos de invierno" para describir este tipo de brotes caracterizados por aparición repentina de vómitos y diarrea durante los meses de invierno ⁽²²⁾.

No fue hasta 1972, que Kapikian y colaboradores descubrieron la etiología de este síndrome. Por inmuno-microscopía electrónica (IEM) demostraron la presencia de partículas virales en muestras de heces colectadas durante un brote de gastroenteritis ocurrido en un colegio en Norwalk, Ohio en 1968. El agente identificado fue del género Norovirus (anteriormente denominado como "virus tipo Norwalk"), que pertenece a la familia *Caliciviridae* ⁽⁷⁾.

Otros géneros se describen ahora en la familia *Caliciviridae*: Sapovirus (anteriormente llamado "Virus tipo Sapporo), Lagovirus, Vesivirus, y Nebovirus ^(7, 22).

Históricamente, la clasificación de NoVs se basó en estudios de voluntarios y análisis de reactividad cruzada por inmuno-microscopía electrónica. Estos esquemas de clasificación antigénicos tenían poca precisión y reproducibilidad, que se atribuye a la reactividad cruzada de anticuerpos. La falta de un sistema de cultivo in vitro o modelo animal evita la clasificación en serotipos, por lo que el medio de clasificación primaria es a través de análisis genético ^(22, 23).

La clonación molecular del genoma del virus Norwalk en 1990 llevó al progreso dramático en la comprensión de la virología molecular y epidemiología de Nov, al desarrollo de ensayos de diagnóstico molecular, y la definición de la carga mundial de la enfermedad por NoV. Los NoVs son genética y antigénicamente diversos. La caracterización genética se utiliza en los análisis de epidemiología



molecular de los brotes para tratar de identificar la fuente y los patrones de propagación y la evolución de estos virus (7, 24).

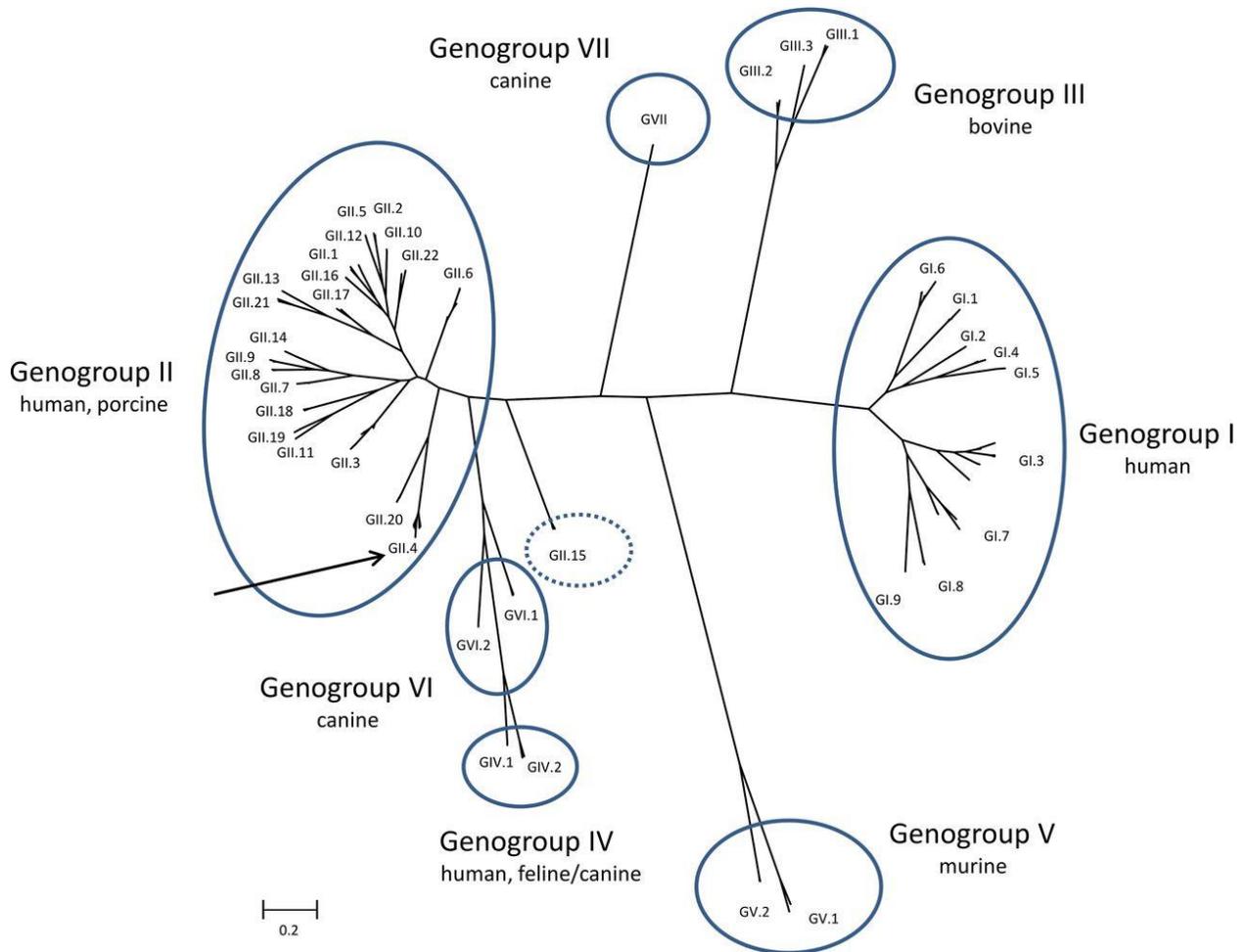


Fig. 1 Clasificación del género Norovirus: La imagen muestra la clasificación de Norovirus en 7 genogrupos (GI al GVII) basado en la diversidad de la secuencia de aminoácidos en la proteína VP1 de la cápside viral (8).

6.2. Morfología y estructura molecular.

Los Norovirus son virus pequeños, con un aproximado entre 27 – 35 nm de diámetro, son virus no envueltos cuya nucleocápside es de simetría icosaédrica. El genoma del norovirus es 7.5 a 7.7 kilobases de longitud y tiene tres marcos de



lectura abierta (ORF) estos codificaran para proteínas estructurales y no estructurales (22, 25).



Fig. 2 Organización Genómica de Norovirus. El norovirus es un virus de ARN de cadena positiva con tres ORF (26).

La primera ORF codifica una poliproteína grande que es escindida después de la síntesis en varias proteínas no estructurales que son importantes para la replicación del virus, pero no se encuentran en las partículas virales, incluyendo un nucleótido trifosfatasa, una proteína viral ligada al genoma (VPg), una proteasa viral, y polimerasa (7, 22).

El segundo ORF codifica la principal proteína estructural VP1; el tercer ORF codifica VP2, una proteína básica que también es una proteína estructural menor. La cápside viral contiene 180 copias de la proteína VP1, e in vitro la expresión de VP1 conduce al ensamblaje espontáneo de VLP. Las VLP son antigénicamente y morfológicamente similares a los viriones nativos. Las VLP son reactivos útiles para producir antisuero para ensayos de diagnóstico y son una vacuna candidata (7, 22, 25).

El número absoluto de proteínas no estructurales maduras y precursores funcionales aún no está clara, pero algunas funciones son conocidas o preestablecidas por la similitud de secuencia de proteínas de otros virus de la familia (27).



Tabla N°1. Función de las proteínas virales de NoV (27-29)

| Proteína | Función |
|----------|--|
| p48 | Trafico Intracelular |
| NTPasa | Nucleótido Trifosfatasa |
| p22 | Trafico de la Membrana Celular y Replicación Viral |
| VPg | Iniciación de la traducción del ARN viral |
| PRO | Proteínas Viral |
| POL | Replicación del Genoma Viral |
| VP1 | Proteínas Estructural (Mayor) |
| VP2 | Proteína Estructural (Menor) |

6.3. Diversidad genética

Los norovirus son un género muy diverso presentando aproximadamente 46% de divergencia en la secuencia de nucleótidos entre genogrupos (GI – GV). La recombinación del ARN es una de las principales fuerzas motrices de la evolución viral y un mecanismo poderoso para crear grandes cambios en el genoma viral. La diversidad entre NoVs se mantiene a través de la acumulación de mutaciones puntuales asociadas con la naturaleza propensa a errores de la replicación del ARN y la recombinación genética que involucra el intercambio de secuencias entre dos virus de ARN relacionados ^(23, 30).

La relación entre cepas de Norovirus puede desarrollar coinfección entre virus humanos y animales, recombinarse y dar lugar a una generación de nuevos virus con potencial patogénico desconocido y tropismo alterado entre especies animales y humanos ⁽³¹⁾.

6.4. Potencial Zoonótico

El potencial zoonótico de Norovirus es incierto, sin embargo, su estudio es relevante ya que algunos animales como el cerdo pueden actuar como reservorios de norovirus humanos. Dentro de la especie porcina existen Norovirus que están



relacionado genéticamente con el genogrupo GII de norovirus humanos, pudiéndose producir recombinación homóloga entre ambos y dar lugar a nuevas variantes con patogenia y características únicas ^(19, 31, 32).

Por ser Norovirus un virus de ARN está sujeto a variaciones genéticas continuas durante la replicación, produciendo mutantes virales estrechamente relacionados que pudieran tener alguna alteración en su tropismo o capacidad de transmisión que despertaría una alta sospecha de posibilidad zoonótica. En resumen se podría decir que en las condiciones apropiadas podrían aparecer Norovirus recombinantes cuya transmisión fuese compatible entre especies, sin embargo no se han encontrado hasta el momento ninguna cepa recombinante entre especies ^(7, 19, 30-32).

6.5. Transmisión

Los norovirus se transmiten principalmente por vía fecal-oral. La contaminación fecal de los alimentos, el agua y fómites, así como la propagación directa de persona a persona, da cuenta de la mayoría de los brotes. La transmisión de la infección por norovirus puede ocurrir como resultado de las dificultades en la erradicación de estos virus de áreas contaminadas debido a su resistencia relativa a muchos desinfectantes. Las múltiples vías de transmisión pueden hacer que sea difícil instituir intervenciones que interrumpen la transmisión con éxito ⁽²²⁾.

La transmisión aérea del norovirus también se produce. El virus está presente en el vómito, y el acto de vomitar genera un aerosol infeccioso. Por lo tanto, la transmisión de norovirus se ha observado en personas que caminaban a través de un servicio de urgencias, donde se está evaluando un paciente con vómitos. Aunque los brotes de casos por NoV son reportados durante todo el año, hay una elevación de casos durante meses con clima frío en zonas con climas templados. Sin embargo, estudios recientes han demostrado brotes en primavera y verano observándose hospitalizaciones por diarrea en niños < 5 años de edad ^(7, 22, 33).



6.6. Características Clínicas

La gastroenteritis aguda asociada a NoV se caracteriza por la aparición repentina de vómitos, diarrea acuosa o ambos síntomas. Síntomas constitucionales adicionales pueden ser: náuseas, calambres abdominales y dolor, malestar general, anorexia, fiebre, escalofríos, dolor de cabeza y mialgias ^(22, 26).

La infección subclínica es común, se informa en hasta un tercio de las personas infectadas después de la exposición experimental. El vómito se ha reportado con mayor frecuencia en infecciones por la cepa GII. 4 que con brotes causados por otras cepas. La enfermedad por lo general es de dos a tres días de duración, pero los síntomas comúnmente persisten más allá de cuatro días en los niños pequeños (menores de 12 años de edad) y en las personas hospitalizadas más de 80 años de edad.

La infección por el NoV suele ser una enfermedad autolimitada, y personas sanas suelen recuperarse sin secuelas. Las complicaciones pueden ocurrir e incluyen depleción de volumen, alteraciones electrolíticas, y la insuficiencia renal. Las personas mayores y con enfermedades crónicas son más propensos a sufrir estas complicaciones y muerte ⁽²²⁾.

Hay poca evidencia de que NoVs puede causar una infección crónica en un huésped normal; Sin embargo, un estudio realizado en niños y adolescentes inmunocomprometidos informó que la enfermedad puede durar al menos 8 meses ⁽²²⁾.

6.7. Patogénesis y modelos de animales de infección

Debido a la falta de modelo animal y recursos para hacer crecer este virus en cultivos celulares, los ensayos de neutralización in vitro no son factibles, y los datos del desarrollo de inmunidad después de la infección por NoV se obtiene a partir de estudios en humanos con voluntarios y la información sobre replicación viral es deducida de la infección en animales ⁽²⁴⁾.



Aunque la mayoría de los norovirus se han asociado con enfermedad gastrointestinal en los seres humanos, también han sido identificados norovirus de ganado, cerdos y ratones. De éstos potenciales modelos experimentales, los norovirus murino (MNV) es el único norovirus que se replica en el cultivo celular y en animales pequeños ⁽³⁴⁾.

El sitio de replicación primaria de NoV en los seres humanos es desconocida, pero la biopsia intestinal de un voluntario que se enfermó tras la administración oral del NoV exhibió lesiones histopatológicas, en las que se hicieron romos las vellosidades del intestino delgado proximal, aunque en recientes estudios se encontró que el norovirus murino 1 (MNV-1) infecta las células como los macrófagos in vivo y se replica en las células dendríticas y macrófagos en cultivo primario ^(34, 35).

Un posible factor genético se planteó como receptor, dicha hipótesis explica la susceptibilidad de un individuo a la infección por el NoV. Ahora se sabe que el NoV se une a antígenos del grupo histo-sanguíneo en células huésped potenciales en el intestino ⁽³⁵⁾.

Los mecanismos que conducen a la infección sintomática son desconocidos. Se asoció la infección sintomática a la disminución de la actividad enzimática en las pequeñas vellosidades intestinales de borde en cepillo y una mala absorción de carbohidratos transitoria y esteatorrea. El vaciado gástrico se retrasa, pero la función secretora del estómago (pepsina, ácido clorhídrico, factor intrínseco) no se altera ^(22, 35).

6.8. Inmunología y susceptibilidad genética

Los datos del desarrollo de inmunidad después de la infección de NoV se obtuvieron a partir de estudios en humanos. Estos indican que aproximadamente el 50% de las personas expuestas al virus adquirió inmunidad homóloga a corto plazo, que se correlaciona con el nivel de anticuerpos en suero. Sin embargo, las personas con altos niveles de anticuerpos preexistentes para el NoV pueden enfermar si se expone al virus. Los estudios sugieren que existe una inmunidad a corto plazo después de la infección (6-14 semanas), y algunos individuos son susceptibles a la



infección sintomática, mientras que otros nunca desarrollan síntomas, incluso después de un contacto directo ^(7, 24).

La investigación reciente sugiere que el genotipo es un factor importante en el desarrollo de la infección por el NoV además que se ha demostrado que la infección depende de la presencia de antígenos de grupo histo-sanguíneos humanos específicos estos funcionan como receptores en el intestino de huéspedes susceptibles. Son oligosacáridos estructuralmente relacionados, e incluyen antígenos ABH y antígenos de Lewis. Los diferentes genotipos de norovirus presentan diferentes patrones de unión a los antígenos histo-sanguíneos. La combinación de la unión de una cepa específica y la expresión variable de los receptores histo-sanguíneos puede explicar la susceptibilidad variable del huésped ^(7, 36).

La especificidad de acogida también puede explicar por qué las personas con niveles más altos de anticuerpos preexistentes a NoV eran más propensos a desarrollar la enfermedad después de la re-estimulación con NoV. Las personas sin anticuerpos contra una cepa particular de NoV pueden carecer de la susceptibilidad genética a la infección ^(7, 36).

6.8.1. Inmunidad en cerdos

El desarrollo de la inmunidad en los cerdos es un proceso que difiere al de los humanos. En los cerdos no hay paso de inmunoglobulinas a través de la placenta por la estructura epitelio-coriónica de la placenta. No obstante el traspaso de inmunidad en esta especie es a través del calostro. Esta es denominada inmunidad pasiva, y está limitada por la cantidad y calidad de inmunoglobulinas que contenga el calostro y por la misma cantidad que el lechón pueda ingerir ⁽³⁷⁾.

La inmunoglobulina predominante es IgG, representa un 65 a 90% del total, la IgA y las otras inmunoglobulinas también están presentes pero casi siempre son componentes menores, a medida que se desarrolla el sistema inmunológico del cerdo los niveles de inmunidad adquirida a través del calostro descienden ⁽³⁷⁾.



Algunos estudios en cerdos libres de gérmenes demuestran también la presencia de antígenos histo-sanguíneos en saliva e intestino, así como la unión de cepas específicas de Norovirus humanos a estos antígenos. Por definición y a través de varios estudios se ha determinado que los cerdos pueden ser tipo A y tipo sanguíneo O utilizando el sistema de tipificación ABO ^(21, 37).

6.8.2. Sistema Lewis

Los antígenos de Lewis fueron descubiertos en los eritrocitos, a pesar de que se sintetizan en el epitelio luego son incorporados en la membrana de los eritrocitos en el plasma. En la saliva las sustancias con especificidad Lewis son glicoproteínas solubles mientras que en el plasma son glicoesfingolípidos, posteriormente se absorben a través de un mecanismo desconocido, por la pared eritrocitaria ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾.

Los antígenos son bioquímicamente relacionados con los antígenos ABH, que se produce a partir de las mismas sustancias precursoras. Lewis [A] y Lewis [B] son los principales antígenos de este sistema ^(38, 40).

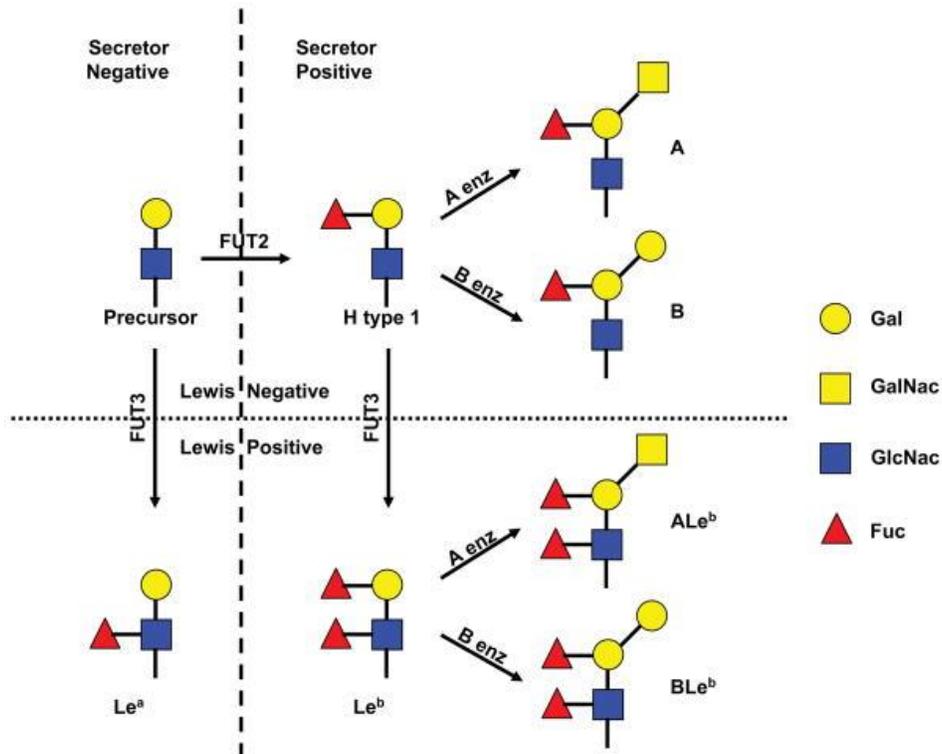


Fig. 3 Vía de síntesis de antígenos de grupo sanguíneo ABO y Lewis. El precursor es modificado por fucosiltransferasa-2 (FUT2) para producir el glicano tipo H1, que puede ser modificado adicionalmente por FUT3 (para producir Lewis-B [Le^b]) y por las enzimas A y B (enz) para producir los antígenos A y B de grupos histo-sanguíneos. Si FUT2 no es funcional, la persona es no secretor, aunque el precursor tipo H1 todavía puede ser modificado para producir Lewis-A (Le^a) en presencia de un FUT3 funcional. Las personas con una enzima FUT2 funcional se llaman secretor positivo porque los antígenos histo-sanguíneos ABH se encuentran en las secreciones y en las superficies mucosas ⁽²⁶⁾.

Por lo que debido a la mayor cantidad de antígeno H en los individuos de fenotipo O, en este grupo aparezca un número de individuos con antígeno Le^b proporcionalmente mayor que entre los de fenotipos A, B y AB ⁽³⁸⁾.

La enzima H regula la expresión del antígeno H principalmente en membranas de eritrocitos y en las células endoteliales vasculares, mientras que la enzima secretor regula la expresión del antígeno H principalmente en el tracto gastrointestinal, células epiteliales y en los fluidos corporales como la saliva. Los genes FUT3 (gen Lewis), FUT2 (gen secretora no está activo en eritroblasto). Estos



genes son heredados de forma independiente y los antígenos presentes en los eritrocitos y de la membrana diversos tejidos considerados antígenos de histocompatibilidad pueden ser soluble en el plasma y saliva ^(41, 42).

6.8.3. Sistema ABO

Hay 16 grupos sanguíneos porcinos reconocidos y el gen S deriva la expresión de los grupo sanguíneo que van desde la A-O. Por lo que hay una designación única para cada grupo sanguíneo (A-P); Sin embargo, las convenciones de nomenclatura más recientes han añadido las letras EA para antígeno eritrocitario. La mayoría de estos antígenos de grupos sanguíneos están limitados en su distribución a los eritrocitos, pero hay evidencia de que los antígenos A, E, G, L y N del grupo se distribuyen en otros eritrocitos o tejidos ⁽⁴³⁾.

Grupos ABO en los cerdos son comúnmente una variable desconocida. La presencia la sustancia de grupo sanguíneo A fue reportada sobre la superficie de los eritrocitos de cerdo. Sin embargo Los cerdos no tienen un antígeno B en este grupo de sangre, por lo que el grupo B no se ha descrito en los cerdos. Los cerdos pueden ser uno de los cuatro fenotipos, A, Aw (débil A), O ó " - " (en blanco). La distinción entre el O y el " - " fenotipo' fue descrito originalmente por el uso de los bovinos contra sueros de los grupos sanguíneos equivalentes (antígenos JS). Reactividad con sueros anti anti-s (equivalente a la sustancia anti-H humana) indica el tipo O, mientras que la falta de reactividad con anticuerpos anti-A o anti-s indicaron la " - " fenotipo ⁽⁴³⁾.

6.9. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por el NoV ha evolucionado a lo largo de las últimas décadas. En los años 1970 y 1980, el principal medio de diagnóstico fue por microscopía electrónica. Este método es mucho menos sensible que los ensayos moleculares actualmente usados. Los ensayos de RT-PCR estuvieron disponibles por primera vez en la década de 1990 y son actualmente los métodos más sensibles para la detección de NoVs en muestras clínicas. Se utilizan ampliamente en los laboratorios comerciales y de investigación pues permiten la detección de virus en



muestras recogidas tarde en la enfermedad, cuando la cantidad de virus se baja (7, 26).

La microscopía electrónica es utilizada por muchos laboratorios para detectar potenciales patógenos virales en las heces. Este método es insensible (< 25%) en comparación con los ensayos de detección molecular. La sensibilidad del ensayo se puede aumentar mediante el uso de antisueros específicos para agregar los virus, lo que les hace más fácil de detectar, pero los antisueros que se utilizan en este ensayo no están ampliamente disponibles además se requiere de un microscopista altamente cualificado y un equipo muy costoso, por lo que los estudios epidemiológicos o clínicos son impracticables (22, 24).

La técnica molecular RT-PCR, desarrollado para identificar el NoV, es sensible y específica, lo que permite estudios epidemiológicos para identificar los brotes de gastroenteritis. Estos ensayos se dirigen a áreas conservadas en el genoma, incluyendo el gen de la polimerasa (zona A), la unión ORF1/ORF2 (zona B), y las áreas en el gen VP1 (regiones C y D). La especificidad de los ensayos se confirma por hibridación de la sonda o la secuenciación de los amplicones. Los datos de la secuencia utilizando el último enfoque se pueden utilizar para el genotipado y en estudios epidemiológicos moleculares (24, 26).

Las técnicas de PCR en tiempo real cuantifican secuencias de ARN específicas en muestras clínicas y la expresión de genes de detección de fluorescencia emitida desde el primer ciclo de amplificación. Estos métodos tienen ventajas sobre PCR regular, tales como una mayor especificidad, sensibilidad y reproducibilidad, además de permitir la supervisión en tiempo real; ciclos más rápidos; cantidad de ARN menor en las reacciones de RT-PCR; y la eliminación de PCR posterior a la manipulación del producto, reduciendo así la contaminación. Esta técnica es útil para la detección rápida del NoV en un gran número de muestras de heces durante una epidemia o gastroenteritis endémica (24, 26).

Ensayos de detección de antígeno son otro enfoque para el diagnóstico de la infección por el NoV. Se han desarrollado Kits utilizando ya sea un formato ELISA o por el método inmunocromatográfico. El método inmunoenzimático (ELISA) para



detectar el antígeno de virus utiliza proteínas de la cápside de norovirus (VLP) expresadas en baculovirus. La expresión de VLP ha sido utilizada para producir antígenos y determinar la respuesta de anticuerpos, estos ensayos son altamente sensibles en comparación con la microscopia electrónica, pero su uso está limitado por la diversidad antigénica, los ELISA son útiles debido a su rapidez y simplicidad para el cribado de gran número de muestras. También se han ensayado pruebas inmunocromatográficas para el diagnóstico rápido que demuestran niveles de sensibilidad cercanos al 100% y una especificidad del 75%, pudiendo diferenciar entre GI y GII recientemente utilizada para la detección de cepas circulantes en brotes epidémicos ^(24, 26, 44, 45).



7. Materiales y Métodos

Tipo de Estudio: Descriptivo de Corte Transversal

Población de Estudio: Está conformada por 49 cerdos de 1 a 6 meses de edad, de diferentes razas y de ambos sexos de comunidades rurales del municipio de León, Lechecuagos (n=11), La Ceiba (n=3), Abangasca Sur (n=10), Goyena (n=14), Chacaraseca (n=2) y el Tololar (n=9).

Muestras: Se analizaron 49 muestras de saliva y sangre que fueron colectadas en el mes de Mayo 2015 mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia.

Recolección de la información: La información requerida se obtuvo a través de la entrevista, la cual se realizó a los dueños de los cerdos utilizando un formato de preguntas donde se registraron los datos de interés epidemiológico.

Obtención y conservación de la muestra:

- **Muestras de sangre:** Se obtuvieron por punción de las venas marginales de la oreja volúmenes de 0.5 a 1 ml, en el laboratorio se centrifugaron a 3,000 RPM por 5 minutos para separar el suero del paquete globular, almacenando el suero en crioviales y haciendo una suspensión de células al 5%.
- **Muestras de Saliva:** Fueron colectadas con pipetas Pasteur plásticas, al introducirlas en la boca del animal y aspirar la mayor cantidad de saliva posible y depositarla en viales de rosca de 2 ml.

Todas las muestras fueron debidamente rotuladas y trasladadas en termos refrigerados entre 4 – 8°C. Después del procesamiento inicial se almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis de IgG.

Consideraciones éticas: Antes de acceder a los domicilios se solicitó permiso y se explicó los objetivos del estudio a los dueños de los domicilios. Los datos aquí recolectados solo serán utilizados únicamente para fines investigativos y educativos. Ningún animal fue sacrificado y se procuró obtener las muestras evitando causar traumas físicos a los sujetos de estudio.



Determinación del tipo sanguíneo de los cerdos: Se procedió a determinar el tipo sanguíneo mediante el método de hemaglutinación en lámina utilizando el kit comercial de Cypress Diagnosis cuyos reactivos son utilizados para determinar los grupos ABO en humanos (REF. 403 LOT. 280311) Se colocaron 3 gotitas de la suspensión de células en las láminas y se mezclaron con anticuerpos anti-A, anti-B y anti-D, respectivamente. La aglutinación franca con un anticuerpo dado indicaba la presencia del antígeno.

Detección de anticuerpos IgG Anti-NoVHu en cerdos: Este procedimiento se realizó mediante el ELISA *in house*, método previamente optimizado en el departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León por González para un estudio anterior⁽¹³⁾. Las placas de ELISA se sensibilizarán con 100µl de VLP (Dijon) 0.5µg/ml diluida en PBS e incubaron a 4°C durante la noche, en cámara húmeda. La placa se lavó una vez con PBS-Tween20 al 0.05% y se bloqueó con PBS-BSA al 3% durante 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Después de 2 lavados con PBS-Tween20 al 0.5%, se agregó 100µl de suero de las muestras y los controles positivos y negativos en las siguientes diluciones: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 y 1:640, la placa se incubó durante 2 horas a 37°C. Después de 4 lavados se agregaron 100µl de conjugado IgG anti-pig-HRP diluido 1:10000 con PBS-BSA-Tween20 al 0.05%, e incubando a 37°C por 1 hora. Se lavó 4 veces, se agregaron 100µl del sustrato de TMB y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción enzimática se detuvo con ácido sulfúrico 2N. Finalmente se leyó en rango de absorbancia a 450nm con un filtro diferencial de 630 nm. El título de cada suero corresponde a la última dilución con densidad óptica ≥ 0.100 . Se usó PBS para controlar el fondo.

Detección de Antígenos Lewis: Las placas de ELISA se sensibilizaron con 100µl de saliva diluida 1:500 en buffer carbonatado; se incubaron a 4°C durante la noche, en cámara húmeda. La placa se lavó dos veces con PBS-Tween20 al 0.05% y se agregó 100µl de anticuerpo anti-lewis A (α -Lewis A seraclone Cypress Diagnosis) diluido 1:5000 con PBS, incubando por 1.5 horas a 37°C. Transcurrido



el tiempo se hicieron 4 lavados con PBS-Tween20 al 0.5%, se agregaron 100µl de conjugado anti-lewis (Goat anti-horse MTC BIORR diluido 1:1000 con PBS y se incubó durante 1.5 horas a 37°C. Después de 4 lavados se agregaron 100µl del sustrato de TMB y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción enzimática se detuvo con ácido sulfúrico 2N. Finalmente se obtuvieron lecturas de absorbancia a 450nm con un filtro diferencial de 630 nm. Las muestra fueron considerada Lewis A si la densidad óptica ≥ 0.100 . En cada placa se usaron saliva Lewis A, Lewis B y Lewis-Negativo como controles y además PBS para controlar el fondo. El procedimiento aquí descrito fue utilizado para determinar Lewis B, con la excepción que se utilizó el monoclonal anti-Lewis B (α -Lewis B seraclone Cypress Diagnosis).

Detección de Fenotipo Secretor: Las placas de ELISA se sensibilizaron con 100µl de saliva diluida 1:500 en PBS y se incubaron a 4°C durante la noche, en cámara húmeda. La placa se lavó dos veces con PBS-Tween20 al 0.05% y se bloqueó con PBS-BSA al 3% durante 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Después de 2 lavados con PBS-Tween20 al 0.5%, se agregaron 100µl de lectinperoxidasa SIGMA-28146-IMG diluido 1:400 con PBS y se incubó durante 1.5 horas a 37°C. Después de 4 lavados se agregaron 100µl del sustrato de TMB y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción enzimática se detuvo con ácido sulfúrico 2N. Finalmente se obtuvieron lecturas de absorbancia a 450 nm con un filtro diferencial de 630 nm. Se usó PBS para controlar el fondo y se agregaron los controles positivos y negativos respectivos. Las muestras fueron consideradas positivas si la densidad óptica ≥ 0.100 .

Análisis de los datos: El análisis de los datos se realizará con el programa estadístico SPSS versión 20 para definir las características demográficas de la población en estudio y calcularemos la frecuencia de los antígenos de los grupos histo-sanguíneos en la población para asociarlo con las medias geométricas de las titulaciones de anticuerpos obtenidas empleando un test de Fisher para comprobar si existe correlación alguna entre estos, apoyándonos de gráficos estadísticos para plasmar la información obtenida.



8. Resultados

Características de la población de estudio. La edad promedio de los cerdos estudiados fue de 2 meses con un rango de 1 a 6 meses; donde la mayoría (72%) estaban entre 1 y 2 meses de edad. El 51% pesaba entre 7 y 12 libras; 39% entre 13 y 18 lb y el 10% restante mayor de 19 libras. El 57% fueron cerdos machos y 43% hembras. El 80% era de raza Criolla y un 20% cruce de razas Landrace y Yorkshire. Según el modo de crianza, se observó que el 63% de los cerdos eran criados en corrales ubicados en el perímetro de las viviendas, mientras que el resto de los cerdos se criaban libremente. En la mayoría de las viviendas (76%) el número de personas fue ≤ 4 , solamente el 8% de las viviendas tenían inodoro y el 22% agua potable (Tabla. 1).

Tabla 1: Correlación entre variables epidemiológicas y las medias geométricas de los títulos (MGT) de IgG anti-Norovirus en cerdos criados de forma artesanal.

| | Frecuencia (%) | MGT | P |
|-------------------------------|----------------|--------|--------------|
| Grupo de Edades | | | |
| 1 a 2 Meses | 35 (72) | 45,05 | |
| 3 a 4 Meses | 8 (16) | 87,24 | P = 0.0001* |
| 5 a 6 Meses | 6 (12) | 640,00 | |
| Procedencia | | | |
| Lechecuagos | 11 (23) | 193,29 | |
| La Ceiba | 3 (6) | 507,97 | |
| El Tololar | 9 (18) | 25,20 | P = 0.0001** |
| Chacaraseca | 2 (4) | 640,00 | |
| Abangasca Sur | 10 (20) | 74,64 | |
| Goyena | 14 (29) | 26,92 | |
| Rango De Habitantes | | | |
| 1 a 4 | 37 (76) | 57,10 | |
| 5 a 8 | 10 (20) | 91,90 | P = 0.009** |
| 9 a más | 2 (4) | 640,00 | |
| Deposición de Excretas | | | |
| Inodoro | 4 (8) | 538,17 | P= 0.001** |
| Letrina | 45 (92) | 57,89 | |
| Fuente de Agua | | | |
| Potable | 11 (22) | 600,92 | P=0.0001** |
| Pozo | 38 (78) | 37,19 | |

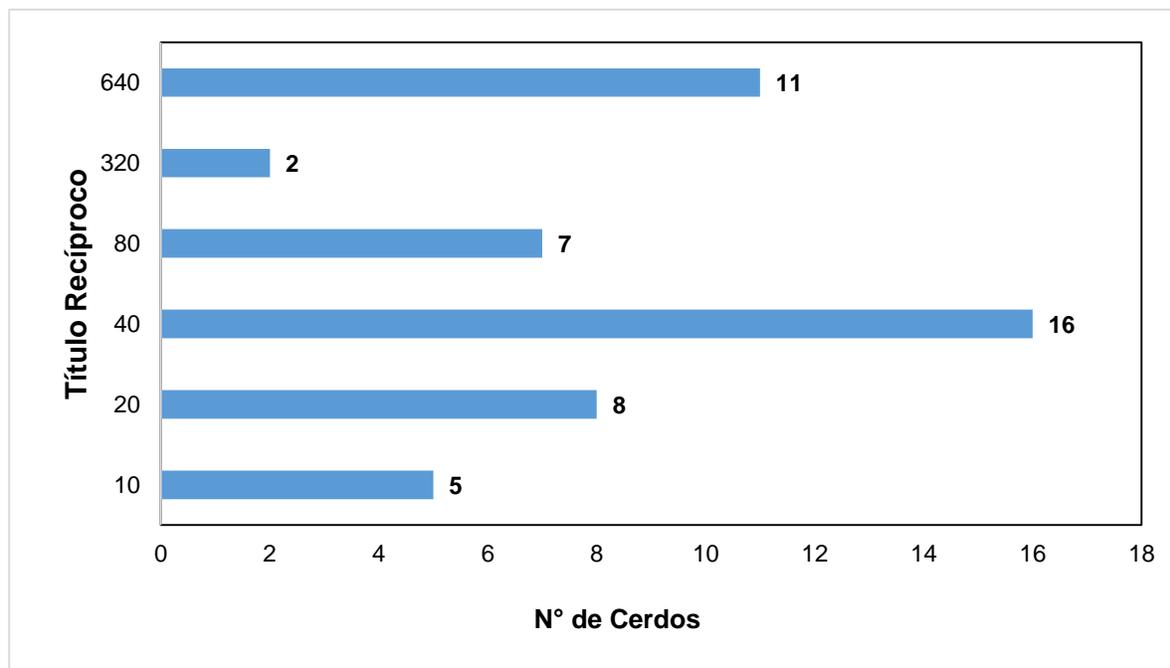
* Kruskal wallis test prueba no paramétrica basada en el rango que se puede utilizar para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre dos o más grupos de una variable independiente.

** Comparación de medias geométricas por ANOVA



La mayoría de los cerdos tenían IgG Anti-Norovirus. El 73% de los cerdos estudiados tenían títulos ≥ 40 y solamente el 10% tenían títulos < 20 . Lo más interesante fue que el 22% tenían títulos ≥ 640 (Fig.1). Se observó una tendencia entre el incremento de la edad y la media geométrica de los títulos (MGT) de IgG anti-NoVHu y se observó un incremento significativo de las MGT en el grupo de 5 a 6 meses ($p=0001$). La MGT también fue analizada en relación al sexo, raza y modo de crianza, pero no se observaron diferencias estadísticas significativas con estas variables. Sin embargo, se encontró que las MGT fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en los cerdos de Chacaraseca, La Ceiba y Lechecuagos, en casas con mayor número de habitantes y las que tenían agua potable e inodoro (Tabla 1).

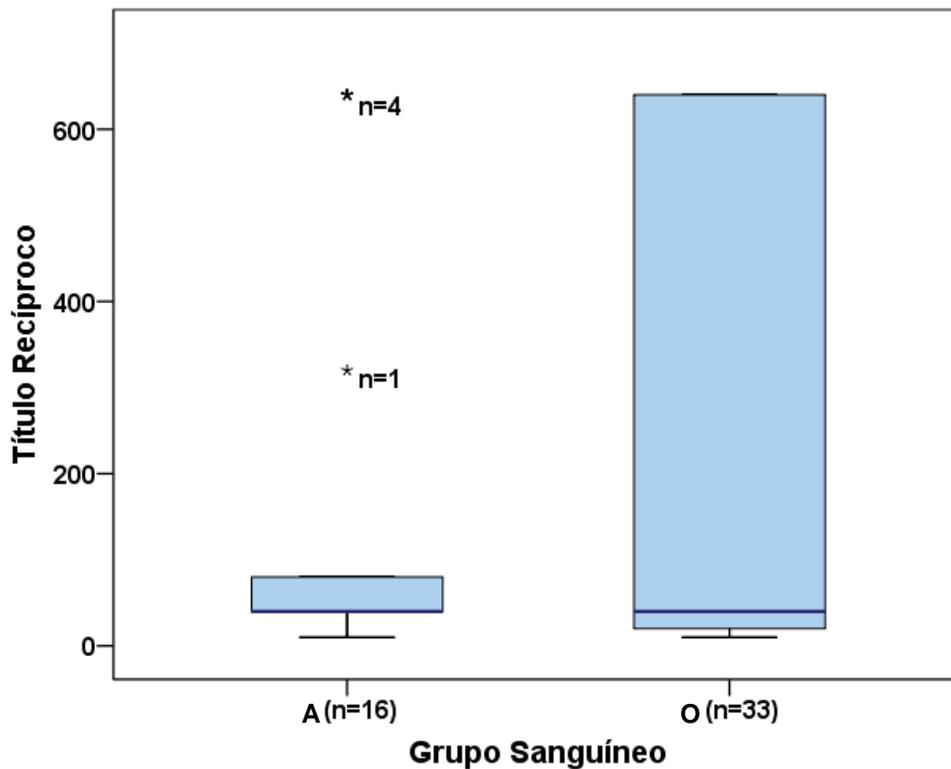
Figura 1: Frecuencia de cerdos con lecturas de absorbancias de IgG anti-NoV ≥ 0.100 en cada una de las diluciones analizadas (título recíproco).





El tipo sanguíneo ABO no afecta los títulos de IgG anti-Norovirus. En relación con la frecuencia de los tipos sanguíneos de los cerdos estudiados se encontró que el 67.3 % de los cerdos eran tipo sanguíneo O y el 32.7 % presentaban tipo sanguíneo A; es importante señalar que no se encontraron tipo sanguíneo B ni AB. Al relacionarlos los títulos de anticuerpos IgG Anti-NoVHu con los tipos sanguíneos ABO no se encontró significancia estadística entre estos ($p = 0.084$).

Figura 2: Correlación entre la presencia de anticuerpos Anti-Norovirus y grupos sanguíneo.

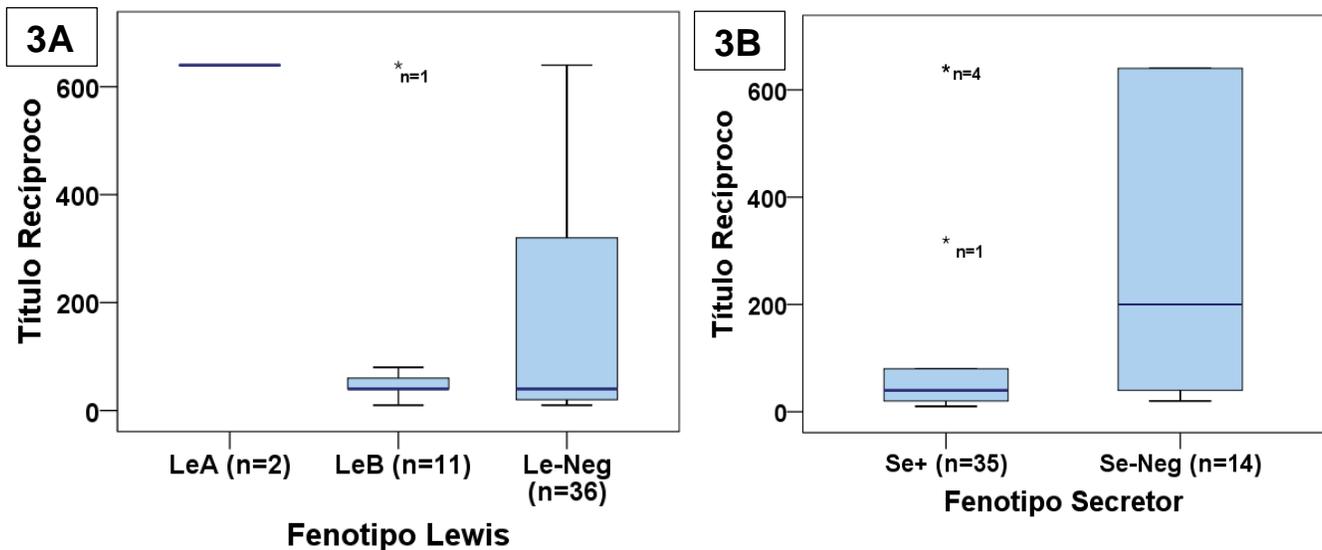




Los títulos de IgG anti-Norovirus fueron mayores en cerdos LeA que en LeB y Le-negativos. El 26.5% de los 49 cerdos estudiados presentaron el antígeno de Lewis, LeA fue encontrado en 4.1% (n = 2) y LeB en 22.4% (n=11), el 73.5% (n=36) de los cerdos estudiados no presentaron el antígeno de Lewis y fueron definidos como Le-negativo. Las MGT de IgG anti-NoV fueron similares en los LeB y Lewis-negativos (45 vs 70), pero incrementaron drásticamente en los LeA (640) ($p=0.02$) (Fig. 3A).

Los títulos de IgG anti-Norovirus fueron mayores en cerdos que no expresan el antígeno H (secretor-negativo): EL 71.4% (n=35) de los cerdos eran Secretores y el 28.6% eran no secretores. Las MGT de IgG anti-NoV fue significativamente mayor en No-Secretores que en Secretores (53 vs 138) ($p = 0.02$) (Fig. 3B).

Figura 3A y 3B: Correlación entre la presencia de anticuerpos anti- NoVHu y la frecuencia del Antígeno Lewis y Estado Secretor.





9. Discusión

Existen algunos estudios que han relacionado genéticamente los Norovirus humanos y porcinos pero la relación antigénica entre los norovirus que infectan dichas especies ha sido poco explorada ^(19, 20, 46). En este estudio hemos examinado la presencia de anticuerpos anti-norovirus en cerdos criados de forma artesanal en áreas rurales del Municipio de León, además, hemos investigado si estos cerdos expresan los antígenos de grupo histo-sanguíneo, los cuales han sido propuestos como receptores virales en humanos.

Los resultados revelan que el 73% de los cerdos tienen títulos de IgG anti-norovirus ≥ 40 , lo que sugiere alta exposición a norovirus y alta susceptibilidad a la infección. Aunque la partícula viral utilizada para examinar la respuesta de IgG es de origen humano, no podemos asegurar que dichos títulos de anticuerpos fueron inducidos por la infección con cepas de Norovirus humanos. Nuestra sugerencia es que los títulos de anticuerpos podrían reflejar reacciones cruzadas y no transmisión inter-especies, es decir, reflejan infección con cepas porcinas. En apoyo a esta sugerencia es la alta homología, a nivel genómico ($nt \leq 80\%$), entre cepas de Norovirus humanos y porcinos. Otra observación que apoya esta sugerencia es que los cerdos de las casas con mejores condiciones higiénicas y probablemente con menor exposición a cepas humanas presentan mayores títulos de anticuerpos, probablemente inducidos por norovirus porcinos. Para confirmar la especificidad de dichos anticuerpos son necesarios los ensayos de neutralización, los cuales no están disponibles, por la falta de líneas celulares que puedan cultivar el norovirus ^(47, 48). Además, se podría realizar un ELISA de inhibición utilizando sueros seropositivos de personas infectadas con Norovirus ⁽⁴⁹⁾.

Aunque este estudio sugiere que la transmisión de norovirus entre especies es restringido, los estudios experimentales en animales de laboratorio, como los cerdos libres de gérmenes, han mostrado infección con norovirus humanos, respuesta inmune en estos cerdos y diarrea ^(9, 13). Para confirmar la restricción de especies es necesario la realización de estudios que permitan detectar y caracterizar los norovirus que circulan en poblaciones de cerdos con alta exposición



a cepas humanas. Estudios con este tipo de diseño se han realizado en USA⁽¹⁹⁾, Brasil⁽⁵⁰⁾, Hungría⁽⁵¹⁾, Italia⁽⁵²⁾ y Bélgica⁽⁵³⁾ y ninguno ha revelado cepas humanas en porcinos.

En la última década algunos estudios han relacionado la infección por Norovirus con los antígenos histo-sanguíneos, sugiriendo que estos actúan como posibles receptores del virus o factores que interviene en la interacción del virus-huésped, estos antígenos son: el antígeno H que define al estado secretor, antígeno A, del sistema ABO y antígeno LeB^(15, 19, 20, 54). También se ha demostrado que los cerdos libres de gérmenes presentan antígenos histo-sanguíneos similares a los humanos, y que los NoVHu se pueden adherir a los estos tejidos que contienen dichos antígenos en los cerdos⁽²¹⁾. Estas observaciones sugieren que los cerdos pueden expresar las estructuras necesarias para la infección con Norovirus humanos⁽⁴⁶⁾. Sin embargo, los resultados de este estudio no concuerdan con dicha sugerencia, ya que los títulos de anticuerpos anti-norovirus fueron mayores en los cerdos que deberían ser resistentes a la infección, según las observaciones en humanos, es decir, cerdos con ausencia del antígeno H y presencia de LeA. Estas observaciones concuerdan con la sugerencia de la restricción de la transmisión entre las especies, los norovirus porcinos podrían utilizar receptores diferentes a los utilizados por los norovirus humanos y la presencia de antígenos histo-sanguíneos en cerdos no predice la infección.

La infección por NoV en humanos es común con prevalencia en Nicaragua de entre 12 y 24%⁽⁴⁾ y está ligada a condiciones higiénico sanitarias deficientes, su principal vía de transmisión es fecal-oral, el virus es estable en el ambiente, propagándose fácilmente por alimentos, agua y fómites; también los individuos enfermos liberan $>1 \times 10^8$ partículas virales por gramos de heces⁽³⁾, estos datos nos indican que los cerdos criados artesanalmente están altamente expuestos a cepas humanas; lo que sugiere que tendríamos altos títulos en aquellas viviendas con esas condiciones, pero los datos obtenidos muestran lo contrario; altos títulos IgG anti-NoVHu en aquellas viviendas donde había agua potable y usaban inodoro,



coincidimos entonces que no hay transmisión inter-especie de los NoV pese a la alta exposición de los cerdos a cepas humanas.



10. Conclusiones

- ✓ La mayoría de los cerdos estudiados 72% tenía entre 1 y 2 meses de edad, pesaban entre 7 y 12 libras 51%, eran machos 71%, de raza criolla 81% y se criaban en corrales 63%. La mayoría de las viviendas donde se tomó muestras habitaban de 1 a 4 personas 76%, tenían pozos 78% y usaban letrinas 92%.

- ✓ Existe correlación entre la presencia de anticuerpos anti-norovirus y la presencia de antígenos histo-sanguíneos a excepción de los antígenos del sistema ABO.

- ✓ La mayoría de los cerdos (73%) presentaron títulos de anticuerpos IgG anti-Norovirus ≥ 40 y solamente el 10% tenían títulos < 20 .

- ✓ Existe una relación estadísticamente significativa entre los títulos de anticuerpos Anti-NoVHu y la edad de los porcinos estudiados ($P=0.001$) aseverando que a medida que los cerdos crecen aumentan los títulos de anticuerpos Anti-NoVHu.

- ✓ Las frecuencias de los antígenos histo-sanguíneos en los cerdos fueron: Sistema ABO (67.3% O, 32.7% A); Antígeno Lewis (4.1% LeA, 22.4% Le B y 73.5% Le-) y Estado Secretor (71.4% Se- y 28.6% Se+).



11. Recomendaciones

- ✓ Ampliar el estudio a más comunidades o inclusive a otras zonas del país aumentando así el número de muestras y comprar de esa manera la seroprevalencia entre diferentes zonas del país.

- ✓ Ensayar las muestras con VLP de NoVPo para ver que si estas reaccionan de la misma manera, descartando que los anticuerpos detectados tengan reactividad cruzada.

- ✓ Realizar un estudio epidemiológico molecular en cerdos para detectar la presencia tanto de NovHu y NovPo, relacionándolo con la respuesta inmunológica anti-NovHu.

- ✓ Realizar ELISA de inhibición utilizando sueros seropositivos de personas infectadas con Norovirus y ensayos de inhibición en cultivos celulares.



12. Bibliografía

1. Ahmed S, Hall A, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2014;14:725-30.
2. Patel M, Widdowson M-A, et al. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1224-31.
3. Bucardo F, Lindgren P, et al. Low Prevalence of Rotavirus and High Prevalence of Norovirus in Hospital and Community Wastewater after Introduction of Rotavirus Vaccine in Nicaragua. *PLoS One.* 2011;6:e25962.
4. Bucardo F, Nordgren J, et al. Pediatric Norovirus Diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2573-80.
5. Bucardo F, Reyes Y, et al. Predominance of Norovirus and Sapovirus in Nicaragua after Implementation of Universal Rotavirus Vaccination. *PLoS One.* 2014;9:e98201.
6. van den Berg H, Lodder W, et al. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res Microbiol.* 2005;156:532-40.
7. Patel M, Hall A, et al. Noroviruses: A comprehensive review. *J Clin Virol.* 2009;44:1-8.
8. Vinjé J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J Clin Microbiol.* 2015;53:373-81.
9. Cheetham S, Souza M, et al. Pathogenesis of a Genogroup II Human Norovirus in Gnotobiotic Pigs. *J Virol.* 2006;80:10372-81.
10. Okello A, Burniston S, et al. Prevalence of Endemic Pig-Associated Zoonoses in Southeast Asia: A Review of Findings from the Lao People's Democratic Republic. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92:1059-66.
11. Cunha J, de Mendonça M, et al. First detection of porcine norovirus GII.18 in Latin America. *Res Vet Sci.* 2010;89:126-9.
12. Green K, Lew J, et al. 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;31:2185-91.
13. Gonzales F. Respuesta inmunologica contra cepa de norovirus humanos en cerdos criados artesanalmente en León y Chinandega 2014. León, Nicaragua: UNAN-LEON 2014.
14. Bucardo F, Kindberg E, et al. Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. *J Med Virol.* 2009;81:728-35.
15. Liu W, Chen Y, et al. A Unique Human Norovirus Lineage with a Distinct HBGA Binding Interface. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1005025.
16. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie.* 2001;83:565-73.
17. Saison R, Ingram D. A report on blood groups in pigs. *Ann N Y Acad Sci.* 1962;97:226-32.
18. Eyquem A, Podliachouk L, et al. Blood groups in chimpanzees, horses, sheep, pigs, and other mammals. *Ann N Y Acad Sci.* 1962;97:320-8.



19. Qiu-Hong W, Myung Guk H, et al. Porcine Noroviruses Related to Human Noroviruses. *Emerging Infectious Disease*. 2005;11:1874.
20. Farkas T, Nakajima S, et al. Seroprevalence of Noroviruses in Swine. *J Clin Microbiol*. 2005;43:657-61.
21. Cheetham S, Souza M, et al. 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;81:3535-44.
22. Atmar R, Estes M. The Epidemiologic and Clinical Importance of Norovirus Infection. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35:275-90.
23. Zheng D-P, Ando T, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 2006;346:312-23.
24. Morillo S, Timenetsky M. Norovirus: uma visão geral. *Rev Assoc Med Bras*. 2011;57:462-7.
25. Murray P. *Microbiología Médica + Student Consult*, 6a ed: Elsevier Science; 2009.
26. Atmar R. Noroviruses – State of the Art. *Food Environ Virol*. 2010;2:117-26.
27. Hardy M. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;253:1-8.
28. Belliot G, Sosnovtsev S, et al. In Vitro Proteolytic Processing of the MD145 Norovirus ORF1 Nonstructural Polyprotein Yields Stable Precursors and Products Similar to Those Detected in Calicivirus-Infected Cells. *J Virol*. 2003;77:10957-74.
29. Goodfellow I. The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses - a multifaceted protein. *Curr Opin Virol*. 2011;1:355-62.
30. Xerry J, Gallimore C, et al. Transmission Events within Outbreaks of Gastroenteritis Determined through Analysis of Nucleotide Sequences of the P2 Domain of Genogroup II Noroviruses. *J Clin Microbiol*. 2008;46:947-53.
31. Bank-Wolf B, König M, et al. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140:204-12.
32. Smith T, Harper A, et al. Emerging Swine Zoonoses. *VectorBorne and Zoonotic Diseases*. 2011;11:1225-34.
33. Bruggink L, Marshall J. The Incidence of Norovirus-Associated Gastroenteritis Outbreaks in Victoria, Australia (2002–2007) and Their Relationship with Rainfall. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7:2822-7.
34. Wobus C, Thackray L, et al. Murine Norovirus: a Model System To Study Norovirus Biology and Pathogenesis. *J Virol*. 2006;80:5104-12.
35. Shirato H. Norovirus Recognition Sites on Histo-Blood Group Antigens. *Front Microbiol*. 2012;3:177.
36. Kubota T, Kumagai A, et al. Structural Basis for the Recognition of Lewis Antigens by Genogroup I Norovirus. *J Virol*. 2012;86:11138-50.
37. Tizard I. *Immunologia Veterinaria*: Elsevier Science Health Science Division; 2009.
38. Varela T. Aspectos genéticos del sistema lewis. *Donostia-San Sebastián Eusko Ikaskuntza*. 1987;4:5.
39. Hanfland P, Graham H, et al. Immunochemistry of the Lewis blood-group system: Investigations on the Lec antigen. *FEBS Lett*. 1982;142:77-80.



40. Corvelo T, Loiola R, et al. The Lewis Histo-Blood Group System: Molecular Analysis of the 59T>G, 508G>A, and 1067T>A Polymorphisms in an Amazonian Population. *PLoS One*. 2013;8:e69908.
41. Patnaik S, Helmberg W, et al. BGMUT Database of Allelic Variants of Genes Encoding Human Blood Group Antigens. *Transfus Med Hemother*. 2014;41:346-51.
42. Hong Y, Hwang S, et al. Significance of Lewis Phenotyping Using Saliva and Gastric Tissue: Comparison with the Lewis Phenotype Inferred from Lewis and Secretor Genotypes. *Biomed Res Int*. 2014;2014:6.
43. Smith D, Newhouse M, et al. Blood groups and transfusions in pigs. *Xenotransplantation*. 2006;13:186-94.
44. Takanashi S, Okame M, et al. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroups I and II. *J Virol Methods*. 2008;148:1-8.
45. Thongprachum A, Khamrin P, et al. Evaluation of an immunochromatography method for rapid detection of noroviruses in clinical specimens in Thailand. *J Med Virol*. 2010;82:2106-9.
46. Mattison K, Shukla A, et al. Human Noroviruses in Swine and Cattle. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1184-8.
47. Takanashi S, Saif L J, et al. Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. *Arch Virol*. 2014;159:257-66.
48. Papafragkou E, Hewitt J, et al. Challenges of Culturing Human Norovirus in Three-Dimensional Organoid Intestinal Cell Culture Models. *PLoS One*. 2013;8:e63485.
49. Lindesmith L C, Ferris M T, et al. Broad Blockade Antibody Responses in Human Volunteers after Immunization with a Multivalent Norovirus VLP Candidate Vaccine: Immunological Analyses from a Phase I Clinical Trial. *PLoS Med*. 2015;12:e1001807.
50. Silva P, Alfieri A, et al. High frequency of porcine norovirus infection in finisher units of Brazilian pig-production systems. *Trop Anim Health Prod*. 2015;47:237-41.
51. Reuter G, Bíró H, et al. Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. *Arch Virol*. 2007;152:611-4.
52. Monini M, Di Bartolo I, et al. Detection and molecular characterization of zoonotic viruses in swine fecal samples in Italian pig herds. *Arch Virol*. 2015;160:2547-56.
53. Mauroy A, Scipioni A, et al. Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Arch Virol*. 2008;153:1927-31.
54. Currier R L, Payne D C, et al. Innate Susceptibility to Norovirus Infections Influenced by FUT2 Genotype in a United States Pediatric Population. *Clin Infect Dis*. 2015;60:1631-8.



13. Anexos

Operacionalización de Variables

| Variable | Concepto | Categoría |
|-------------------------------------|---|---|
| N° de habitantes en el hogar | Grupo de personas que viven en un área o espacio geográfico. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1-2 ▪ 3-4 ▪ 5-6 |
| Deposición de excretas | Lugar donde se arrojan las deposiciones humanas con el fin de almacenarlas y aislarlas para evitar enfermedades. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inodoro ▪ Letrina ▪ Fecalismo |
| Fuente de agua | Lugar de donde se toma agua para el consumo y las actividades humanas. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Potable ▪ Pozo ▪ Río |
| N° de cerdos en la vivienda | Cantidad de cerdos que habitan una finca. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1-7 ▪ 8-14 ▪ 15-21 ▪ 22-28 ▪ 29- 34 |
| N° de cerdos muestreados | Selección de un conjunto de cerdos de una población con el fin de estudiarlos. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1-4 ▪ 4-8 ▪ 9-11 |
| Edad del cerdo | Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un ser cerdo hasta su toma de muestra. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 ▪ 2 ▪ 3 |
| Sexo | Condición de tipo orgánica (biológica) o genética que diferencia al macho de la hembra. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Macho ▪ Hembra |
| Raza | Subdivisión de una especie de la biología que se forma a partir de ciertas características que diferencian a sus individuos de otros mediante los genes que se heredan. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Criollo ▪ Landrece/ Yorkshire |
| Color | Condición fenotípica de un ser vivo que lo difieren de otras especies. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Café ▪ Blanco ▪ Negro ▪ Manchado |
| Peso en Libras | Fuerza que ejerce un determinado cuerpo sobre el punto en que se encuentra apoyado. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ 14-20 ▪ 21-27 ▪ 28-34 ▪ 35 |



| | | |
|---|---|---|
| Presencia de diarrea en los últimos días | Existencia del cambio en las evacuaciones intestinales que causa heces más blandas que lo normal. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Si ▪ No |
| Ubicación del cerdo en sitio de muestreo | Lugar en donde el cerdo crea su habitad y realiza sus acciones biológicas. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Corral ▪ Patio |
| Otros animales | Presencia de animales domésticos que entran en contacto con los cerdos. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Caninos ▪ Felinos ▪ Bovinos ▪ Caprinos ▪ Equinos |
| Tipo Sanguíneo ABO | Estructuras antigénicas carbohidratadas presentes en la membrana de los eritrocitos. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ A ▪ B ▪ AB ▪ O |
| Antígeno Lewis en Saliva | Glicoproteínas solubles con reactividad antigénica. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ LeA ▪ LeB ▪ Le-Negativo |
| Estado secretor | Presencia o ausencia de antígenos sanguíneos libres en los líquidos corporales. | <ul style="list-style-type: none"> • Secretor • No-Secretor |
| Títulos de anticuerpos anti-NoVHu | Titulación de anticuerpos porcinos contra norovirus humanos. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1/20 ▪ 1/40 ▪ 1/80 ▪ 1/160 ▪ 1/320 ▪ 1/640 |



Ficha de Recolección de Datos

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua Facultad de Ciencias Médicas Estudio de Norovirus en Cerdos



Código de Ficha: ____/____/____ Fecha _____

Dirección: _____

Propietario: _____

Nº de Habitantes _____

Datos de la Vivienda _____

Deposición de Excretas: Inodoro () Letrina () Fecalismo ()

Disponibilidad del Agua: Potable () Pozo () Rio ()

Nº de Cerdos en la vivienda: _____ Nº de Cerdos muestreados: _____

Nº de personas que entran en contacto con los cerdos: _____

Datos del cerdo:

Nombre: _____ ID: _____

Edad: _____ Sexo: Macho () Hembra () Raza: _____ Color: _____

Peso: Lb ____ Presencia de Diarrea en los últimos 10 días: Si () No ()

Sintomatología: _____

Ubicación en la vivienda: Corral () Patio ()

Otros animales: Caninos () Felinos () Bovinos () Caprinos () Equinos ()

Datos de Laboratorio:

Lewis secretor: Si () No ()

Lewis A () Lewis B ()

Tipo Sanguíneo: ____

IgG anti-norovirus: _____