

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Detección de Norovirus Mediante Reacción en Cadena de la
Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) y su
Prevalencia en los Pacientes con Gastroenteritis de los
Hospitales de Hermosillo, Sonora**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Alejandro Molina Chavarria

Hermosillo, Sonora

Junio de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



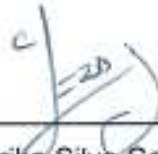
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Alejandro Molina Chavarria, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



Dra. Verónica Mata Haro
Director de tesis



Dra. Erika Silva Campa
Secretario



M. en C. Griselda Macrina Moreno Ibarra
Vocal



Dra. Rosa Marina Arvayo Ortiz
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a CONACyT Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social, proyecto 202318 por financiar la presente investigación.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) por permitirme realizar mi trabajo de investigación en sus instalaciones.

A la Dra. Verónica Mata Haro por darme la oportunidad y confianza de trabajar en su laboratorio, y asesorarme durante la realización de este trabajo.

Al personal de CIAD A.C., sobre todo a Leticia Félix por instruirme con paciencia sobre las diversas actividades a realizar en mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio que siempre estuvieron dispuestos a ayudar.

Al personal médico y de los laboratorios clínicos de los Hospitales HIES, Centro Médico Dr. Ignacio Chávez, Hospital Militar Regional de Hermosillo y Hospital General 2 del IMSS por su colaboración en este proyecto.

DEDICATORIA

*A mis padres y hermano; a mi novia Alexandra
a mi tía Mónica y sus hijas; a mis amigos
que en todo momento me apoyaron
para la realización de este trabajo.*

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
OBJETIVOS.....	iv
1. Objetivo General.....	iv
2. Objetivos Particulares.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
1. Prevalencia de las Principales Enfermedades Intestinales en México y Sonora.....	4
2. Enfermedades Intestinales Definidas.....	4
3. Enfermedades Intestinales No Definidas o Mal Definidas.....	6
4. Características Generales de Norovirus.....	7
5. Genoma de Norovirus.....	8
6. Proteínas Virales.....	9
7. Manifestaciones Clínicas.....	10
8. Transmisión.....	11
9. Métodos para la Identificación y el Diagnóstico de Norovirus.....	11
HIPÓTESIS.....	14
METODOLOGÍA.....	15
1. Recolección de Muestras.....	15
2. Manejo de Muestras.....	16
3. Procesamiento de las Muestras.....	16
4. Extracción de RNA.....	17
5. Amplificación de Material Genético por RT-PCR en Punto Final.....	18
6. Electroforesis.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	20
CONCLUSIONES.....	29
RECOMENDACIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Incidencia de las enfermedades intestinales en México.....	2
2. Incidencia de las enfermedades intestinales en Sonora.....	2
3. Principales infecciones intestinales definidas en México.....	5
4. Principales infecciones intestinales definidas en Sonora.....	7
5. Formato para recolección de datos del paciente.....	15
6. Iniciadores utilizados para RT-PCR en punto final y PCR anidado.....	18
7. Datos de los pacientes.....	21
8. Signos clínicos de los pacientes positivos a norovirus.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la cápside de norovirus.....	8
2. Genoma de norovirus y proteínas que codifica.....	9
3. Conversión de RNA a cDNA por la transcriptasa reversa y posterior PCR.....	13
4. Procesamiento de las muestras.....	17
5. Geles representativos de concentrados y muestras por RT- PCR.....	22
6. Prevalencia de norovirus en porcentaje por género.....	24
7. Prevalencia de norovirus en porcentaje por grupo de edad.....	25
8. Distribución de muestras positivas y negativas a norovirus por grupo de edad.....	26

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Detectar la presencia y determinar la prevalencia de norovirus en heces de pacientes con gastroenteritis de los hospitales de Hermosillo, Sonora durante el período septiembre 2013 a marzo 2014.

2. Objetivos Particulares

1. Implementar la técnica de detección de norovirus por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).
2. Determinar la prevalencia de norovirus en las heces de los pacientes con diagnóstico clínico de gastroenteritis viral de los hospitales de Hermosillo, Sonora.

RESUMEN

Las enfermedades intestinales son uno de los problemas de salud más importantes en los países desarrollados y en vías de desarrollo, se presentan en todos los grupos de edad. En los países en desarrollo como el nuestro, la información con la que se cuenta acerca de los agentes infecciosos causales es escasa. Norovirus es un patógeno al que se le atribuye una gran cantidad de casos de gastroenteritis aguda; por lo que es imprescindible su detección. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) es considerada hoy en día el estándar de oro para la detección de este virus, ya que muestra la mejor sensibilidad y especificidad, comparado con los inmunoensayos enzimáticos y la microscopía electrónica. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia y la prevalencia de norovirus en las heces de pacientes que acuden a los distintos servicios de algunos de los hospitales de Hermosillo, Sonora. Para lo cual se analizaron 100 muestras de heces diarreicas de pacientes diagnosticados mediante su sintomatología con gastroenteritis viral, mediante la técnica de RT-PCR en punto final. Se obtuvieron un total de 77 muestras positivas (prevalencia del 77 %); 50 muestras pertenecieron a menores de edad (0 a 17 años) y 27 muestras positivas a personas adultas (18 años en adelante); demostrando que en nuestra región los menores están siendo los más afectados por este virus. Además pudimos concluir que la prevalencia encontrada es superior a la reportada por países desarrollados.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen uno de los problemas de salud más graves en el mundo, afectando principalmente a niños menores de 4 años y adultos entre 25 y 44 años. En México, solo se han identificado algunos de los agentes causales. La Secretaría de Salud registró 1,102,142 casos en el 2011 cuya etiología fue definida, sin embargo, se reportaron más de 5 millones de casos que fueron agrupados como “infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas” (Tabla 1). Este grupo de enfermedades no definidas fue la segunda causa de morbilidad en 2011 y de acuerdo a los datos de años posteriores, ha aumentado (SUIVE, 2011; SUIVE 2012).

Durante el 2011 en Sonora se registraron 180,328 casos de enfermedades intestinales no definidas, solo 17,062 casos fueron clasificados con etiología conocida (Tabla 2). Lo anterior, nos indica que hay 163,266 casos de enfermedades intestinales que podrían ser atribuibles a otros microorganismos entre ellos virus, y que de estos, una gran cantidad puedan ser causados por norovirus (NoV); (SUIVE, 2011).

Dentro de la clasificación de “infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas”, podemos observar infecciones causadas por bacterias y virus, entre otros microorganismos. De acuerdo a datos internacionales, NoV es uno de los agentes etiológicos más importantes de diarreas en adultos (Hall y col., 2011). Lo anterior se deriva de la prevalencia determinada en países desarrollados. Por ejemplo, NoV es responsable de aproximadamente 21 millones de casos anuales en los Estados Unidos, de los cuales se han registrado 70,000 hospitalizaciones y 800 muertes debidas a este patógeno (<http://www.cdc.gov/spanish/especialesCDC/Norovirus/>). Además, en 2012, se reportó en septiembre un 19% de brotes diarreicos y para diciembre de ese mismo año, este número aumento a 58 %, es decir, hubo un incremento del 39% de los casos. También, en diciembre de 2012, se reportaron en la Unión Europea 750,000 casos en Reino Unido y 10,000 casos en Alemania, a causa de NoV (Monroe, 2011; CDC, 2012). Sin embargo, en México no se tienen datos de la prevalencia de este patógeno ya que no se realiza la detección rutinaria del agente causal. Se presume entonces, que de las estadísticas de infecciones intestinales no clasificadas, un número importante sea a causa de NoV.

Tabla 1. Incidencia de enfermedades intestinales en México al 2011.

Población			
Enfermedad	General	Masculino	Femenino
Definidas	1,102,142	463,728	644,414
No definidas	5,283,896	2,705,498	3,321,449

Fuente: Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, 2011.

Tabla 2. Incidencia de enfermedades intestinales en Sonora al 2011.

Población			
Enfermedad	General	Masculino	Femenino
Definidas	17,062	7,388	9,674
No definidas	180,328	81,885	98,443

Fuente: Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, 2011.

A pesar de la elevada incidencia de NoV, sólo una minoría de los brotes causados por este patógeno llega a confirmarse mediante pruebas de laboratorio. La levedad de la infección y la dificultad para disponer de procedimientos diagnósticos hacen que esta enfermedad se subestime. Para el diagnóstico de brotes se recomienda, idealmente, la obtención rápida de muestras de heces líquidas o semisólidas de pacientes en la fase aguda de la enfermedad (48 - 72 horas tras el inicio) (Bellido y col., 2007).

Existen una variedad de técnicas para detectar NoV en muestras de heces: microscopía electrónica, aglutinación de látex, inmunoensayos enzimáticos y amplificación por PCR. La diferencia entre la prevalencia de NoV encontrada en diferentes estudios, como el de Alvarado en el 2012; podría deberse en primer lugar a la metodología utilizada. Por ejemplo, el inmunoensayo enzimático de los equipos comerciales, es el método más común para el diagnóstico de NoV, ya que ofrece simplicidad y buena especificidad, pero es un método con baja sensibilidad. Un ejemplo de lo anterior, es el método inmunoenzimático ELISA RIDASCREEN (R-Biopharm), que tiene la ventaja de ser fácil, rápido y de muy buena especificidad (97.5 %), pero su sensibilidad es moderada (60 %) cuando se compara con RT-

PCR, ya que este último detecta concentraciones de carga viral de 10^2 - 10^4 partículas virales por mililitro de heces (Dung y col., 2013; Ochoa y Velapatiño, 2012; Sanz y col., 2008.)

Típicamente, la sensibilidad en la detección viral en las muestras biológicas se puede aumentar usando métodos moleculares. Por ejemplo, la implementación de RT-PCR es considerada el estándar de oro para la confirmación de las diarreas causadas por NoV, ya que permite diagnosticar no solo casos clínicos de infecciones por este patógeno, si no también detectar su presencia en muestras ambientales, agua, alimentos y heces (Alvarado y col., 2012; Sanz y col., 2008; Torner, 2008). Sin embargo, es un procedimiento complejo de múltiples pasos, ya que se requieren de hasta dos días solo para la identificación del género de NoV y de la confirmación por electroforesis en gel. Además, se requiere de la secuenciación genómica para prevenir resultados falsos positivos de una amplificación no específica y de la mala interpretación de los patrones de bandas, lo que incrementa costos y poca accesibilidad como método diagnóstico (Pang y col., 2005).

Es por esto que se requiere de la detección continua de NoV mediante una herramienta diagnóstica eficaz y rápida de implementar en los laboratorios, que no comprometa la sensibilidad del análisis. En este sentido, se puede implementar el uso de la tecnología de RT-PCR en punto final.

Debido a la falta de datos acerca de la prevalencia de NoV; con los resultados obtenidos, se pretende contribuir con datos epidemiológicos de NoV en México y Sonora; información que actualmente se desconoce.

ANTECEDENTES

1. Prevalencia de las Principales Enfermedades Intestinales en México y en Sonora

Las infecciones intestinales representaron la segunda causa de morbilidad en el país en 2011. El Instituto Mexicano del Seguro Social y la Secretaría de Salud reportaron en forma conjunta más del 74.4 % de los casos de dichos padecimientos. También, cabe señalar que la incidencia nacional (4,837.85 casos por cada 100,000 habitantes) se incrementó por tercer año consecutivo, aun cuando fue 7 % menor a lo registrado en el año 2000. Todo esto nos indica que la tendencia no parece mostrar cambios significativos en su comportamiento (SUIVE, 2011).

La mala alimentación de los habitantes incide directamente en las enfermedades de tipo gastrointestinal. Además, estas enfermedades ocupan el tercer lugar entre las consultas médicas, teniendo prevalencia más alta en mujeres (Duarte, 2012).

El nivel de pobreza, el crecimiento demográfico y los factores de urbanización continuos, han dado lugar a la aparición dominante de la comida conocida como "alimentos de venta callejera" (Sina y col., 2011). La industria de los alimentos vendidos en la calle ofrece comidas baratas listas para consumir a la población de los países en desarrollo, como México (Estrada y col., 2002). En general poco se sabe de los agentes etiológicos que causan las infecciones gastrointestinales por alimentos.

2. Enfermedades Intestinales Definidas

Se dice que una infección o enfermedad es definida, cuando se conoce clínicamente el agente causal biológico que la produce en el ser humano. El número de casos de estas enfermedades se ha ido recolectando gracias a las vigilancias epidemiológicas en las distintas instituciones del sector salud.

En México, se han identificado pocos agentes causales de las enfermedades intestinales. La Secretaría de Salud registró 1,102,142 casos, cuya etiología fue definida (Tabla 3), (SUIVE, 2011).

Tabla 3. Principales infecciones intestinales definidas de México.						
Población						
	General		Masculina		Femenina	
Enfermedad	Casos	Incidencia*	Casos	Incidencia*	Casos	Incidencia*
<i>Amebiasis intestinal</i>	419,564	384.15	183,224	341.87	236,340	424.88
<i>Otras helmintiasis</i>	311,230	284.96	136,875	255.39	174,355	313.45
<i>Paratifoidea y otras salmonelosis</i>	122,345	112.02	39,535	73.77	82,810	148.87
<i>Otras por protozoarios</i>	78,531	71.90	35,232	65.74	49,299	77.84
<i>Ascariasis</i>	77,950	71.37	35,080	65.45	42,870	77.07
<i>Fiebre tifoidea</i>	48,055	44.0	13,861	25.86	34,194	61.47
<i>Intoxicación alimentaria bacteriana</i>	44,467	40.71	19,921	37.17	24,546	44.13
Total	1,102,142	981.10	463,728	845.36	644,414	1,121.08

*Tasa de incidencia por 100,000 habitantes

Fuente: Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, 2011.

En agosto de 2013, se publicaron registros preliminares en el Boletín Epidemiológico en la edición en línea del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). Estos datos fueron recabados en la semana epidemiológica no. 35 (del 25 de agosto al 1 de septiembre) en el cual se registraron 27,059 casos nuevos de enfermedades infecciosas intestinales en el país. Desde el inicio del año hasta dicha semana, se acumularon 1,067,997 casos de estos padecimientos. En comparación con el año 2012, con 1,004,343 casos acumulados (SINAVE, 2013), esta cifra va en aumento, por lo que es indispensable tomar medidas para el control de las enfermedades intestinales.

Esto nos hace pensar si en realidad existe un aumento en la incidencia de enfermedades intestinales o solo los laboratorios están realizando un mejor papel al momento de diagnosticarlas.

3. Enfermedades Intestinales no Definidas o Mal Definidas

Las enfermedades intestinales clasificadas como mal definidas, son aquellas de etiología desconocida o mal diagnosticadas clínicamente. En estos casos, se desconoce el organismo que produce dicha enfermedad en el ser humano, a pesar de visualizar los síntomas. Incluso le atribuyen la enfermedad a un organismo de manera errónea, y es cuando se hace un mal diagnóstico y por consecuencia se da un mal tratamiento.

En Sonora se registraron 180,328 casos de enfermedades intestinales no definidas, pero sólo 17,062 casos fueron clasificados con etiología conocida (Tabla 4). Lo anterior, nos indica que hay 163,266 casos de enfermedades intestinales que podrían ser atribuibles a virus, y que de éstos, un buen número se deban a NoV. A pesar de ser el agente etiológico causal de gastroenteritis más importante a nivel mundial desafortunadamente no existen registros de la detección de este patógeno en nuestro país (SUIVE, 2011).

Tabla 4. Principales infecciones intestinales definidas en Sonora.

Enfermedad	Población					
	General		Masculina		Femenina	
	Casos	Incidencia*	Casos	Incidencia*	Casos	Incidencia*
<i>Amebiasis intestinal</i>	4,825	188.93	2,158	166.72	2,667	211.75
<i>Otras helmintiasis</i>	8,151	319.16	3,588	277.19	4,563	362.28
<i>Paratifoidea y otras salmonelosis</i>	1,519	59.48	440	33.99	1,079	85.67
<i>Otras por protozoarios</i>	1,646	64.45	804	62.11	842	66.85
<i>Ascariasis</i>	264	10.34	125	9.66	139	11.04
<i>Fiebre tifoidea</i>	381	14.92	146	11.28	235	18.66
<i>Intoxicación alimentaria bacteriana</i>	276	10.81	127	9.81	149	11.83
Total	17,062	640.83	7,388	551.50	9,674	731.28

*Tasa de incidencia por 100,000 habitantes

Fuente: Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, 2011.

4. Características Generales de Norovirus

Norovirus pertenece a la familia *Caliciviridae*; existen 5 géneros de los cuales los representativos de este grupo son *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* y *Norovirus*. Las características principales de los calicivirus es que presentan forma esférica, son de tamaño pequeño de 28 a 35 nm, sin envoltura lipídica, y contienen un genoma de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva (Koopmans y col., 2002). En particular, NoV es reconocido como la causa más importante de gastroenteritis no bacteriana aguda en los seres humanos de todas las edades. Además, es responsable de al menos el 50 % de todos los brotes de gastroenteritis a nivel mundial; sin embargo, la incidencia de este agente es raramente registrado por los laboratorios en los países en desarrollo (Gómez y col., 2012).

NoV se transmite principalmente a través de agua y alimentos contaminados, y su detección es de gran importancia por su alta infectividad ya que se requieren tan solo 10 partículas virales para producir una infección (Yezli y Otter, 2011).

La estructura de los viriones de calicivirus exhibe una simetría icosaédrica. La cápside contiene 90 dímeros de la proteína de cápside que forma la cubierta de la cual salen 90 capsómeros a modo de protuberancias de forma arqueada. Estos capsómeros se encuentran dispuestos de tal manera que forman 32 cavidades que son las que dan la apariencia de cálices en la superficie de la partícula viral (Figura 1) (Torner, 2008).

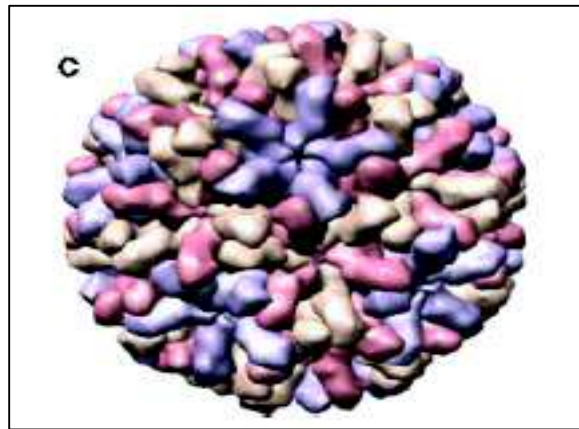


Figura 1. Estructura de la cápside de norovirus.

Fuente: Donaldson y col., 2008

5. Genoma de Norovirus

El genoma de NoV está formado por una cadena sencilla de RNA con polaridad positiva, el tamaño es de entre 7.5 a 7.7 kilobases de longitud y contiene 3 marcos de lectura abiertos (ORFs) (Figura 2). El ORF1 codifica una larga poliproteína que es escindida de manera post-traducciona l en 6 proteínas no estructurales que están involucradas en la replicación viral, incluyendo una proteína N-terminal (designada p48 para NoV), una NTPasa, una proteinasa de tipo 3A (designada p22 para NoV), una proteasa viral y una RNA polimerasa viral dependiente

de RNA. El ORF 2 codifica la principal proteína estructural (VP1) que forma la cápside y el ORF 3 codifica la proteína secundaria estructural de la cápside (VP2) (Atmar, 2010).

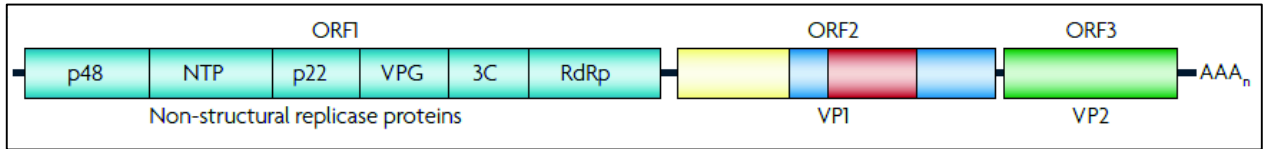


Figura 2. Genoma de norovirus y proteínas que codifica.

Fuente: Donaldson y col., 2010

6. Proteínas Virales

Dentro de las proteínas estructurales en los viriones maduros de calicivirus, se encuentran tres: VP1, VP2 y VPg. La principal proteína estructural es VP1, de aproximadamente 60,000 Da y se encuentra presente en 180 copias (90 dímeros) por virión. La predominancia de VP1 en la formación de la estructura de la cápside vírica es consistente con su papel como determinante del fenotipo antigénico y en las interacciones del virus con las células hospederas (Torner, 2008).

La proteína estructural VP2, de 12,000 a 29,000 Da, es considerada de menor proporción porque sólo está presente en dos copias del virión y su función no está bien definida. Se cree que la presencia de VP2 aumenta la eficiencia de la expresión de VP1 y mejora la estabilidad y maduración de la partícula viral (Torner, 2008).

La VPg está unida por enlaces covalentes al RNA genómico de las células infectadas. Su presencia es minoritaria con una o dos copias en el virión y es probable que su función sea como una proteína no estructural durante la replicación (Torner, 2008).

Dentro de las proteínas no estructurales, se han identificado siete, NS1-NS7, algunas con función desconocida. En el caso de NS3, tiene función de nucleótido-trifosfatasa (NTPasa) que hidroliza al NTP. La función de NS5 es de VPg, presente en viriones y complejos de replicación de membrana unida por enlace covalente a RNA.

La NS6 tiene función de proteinasa e intermediaria entre el anclaje y la liberación de proteínas expresadas en ORF1, así como en el anclaje de la proteína precursora de la cápside (PreVP1). La NS7 con función de polimerasa dependiente de RNA, interacciona con VPg, PreVP1 y VP2 y se encuentra presente en complejos de replicación de membrana con extremo carboxiterminal en un punto con actividad de anclaje (Torner, 2008).

NoV es antigénica y genéticamente diverso; existen 5 genogrupos (GI-V), de los cuales GI, GII y GIV, afectan a los humanos (Koopmans y Duizer, 2004) y sus diferencias radican en la proteína VP1 de la cápside viral (Atmar, 2010). Dado que teóricamente los diversos genotipos se correlacionan con sus respectivos serotipos, el análisis filogenético de estos virus se suele efectuar por técnicas moleculares. La clasificación en genogrupos se realiza por secuenciación del producto obtenido mediante RT-PCR del genoma que codifica la proteína principal de la cápside y de la polimerasa (Bellido y col., 2007).

7. Manifestaciones Clínicas

Las infecciones por NoV ocurren en todo el año aunque es más común en el invierno, es por ello que se le conoce como la “enfermedad de los vómitos invernales”. El período de incubación es corto de 12-48 horas, después de ese tiempo aparecen náuseas, diarrea y vómito explosivo característico. El comienzo de los síntomas puede ser gradual o abrupto. La mayoría de las personas experimenta primero cólicos abdominales, con náuseas o sin ellas. También se observan mialgias, astenia y cefaleas ocasionales. Cerca de la mitad de los casos aparece fiebre de bajo grado (38.3° C a 38.8° C). Las manifestaciones persisten habitualmente entre 48 y 72 horas y remiten sin secuelas (Bellido y col., 2007; Koopmans y Duizer, 2004).

En general, las heces diarreicas son de una cantidad moderada, con 4 a 8 deposiciones durante 24 horas. No contienen sangre ni moco, y pueden ser acuosas; tampoco se observan leucocitos fecales. La enfermedad normalmente es leve y autolimitante, pero puede llegar a debilitar al paciente. (Bellido y col., 2007; Koopmans y Duizer, 2004).

8. Transmisión

El principal mecanismo de transmisión es el fecal-oral, siendo el contacto directo de persona a persona muy eficiente. Es poco probable que este grupo de virus sea transmitido por vía aérea. Sin embargo, se ha implicado al vómito como vía de transmisión de estos virus. En este caso, la transmisión se produciría a través de los aerosoles generados durante la emisión del vómito (Kapikian, 1997; Treanor y Dolin, 2005).

Este grupo de virus ha sido frecuentemente identificado como causa de brotes transmitidos a través del agua y los alimentos contaminados a partir de los aportes de los propios manipuladores. El consumo de productos frescos, como frutas y verduras utilizadas para las ensaladas, las carnes mal cocidas o mariscos crudos, son reconocidos como vehículos de transmisión de NoV (Esseili y Wang, 2012).

La infectividad de NoV se mantiene hasta 3 horas a un pH de 2.7 temperatura ambiente, con tratamiento con éter al 20 % a 4 °C o incubando a 60 °C por 30 minutos. Resiste el tratamiento con hipoclorito de sodio entre 3.75–6.25 g/L, concentración suficiente para inactivar virus entéricos y de forma habitual, en el agua potable para consumo. Sin embargo, se inactiva con 10 mg/L de cloro libre, considerada como la concentración para descontaminar agua no potable. NoV es más resistente a la cloración que rotavirus o poliovirus (Torner, 2008). La resistencia de NoV a un pH ácido por un periodo de tiempo prolongado a temperatura ambiente, explica cómo es que sobrevive al paso por el medio ácido del estómago.

9. Métodos para la Identificación y el Diagnóstico de Norovirus

En general existe una variedad de técnicas para la detección de virus en muestras de heces: microscopía electrónica, aglutinación de látex, inmunoensayos enzimáticos y amplificación por PCR. El inmunoensayo enzimático de las pruebas comerciales, es el método más común para el diagnóstico de norovirus, ya que ofrece simplicidad y buena especificidad, pero es un método con baja sensibilidad. Por ejemplo, el método inmunoenzimático ELISA RIDASCREEN (R-Biopharm), tiene la ventaja de ser fácil, rápido y de muy buena especificidad (97.5 %), pero

su sensibilidad es moderada (60 %) cuando se compara con RT-PCR (Dung y col., 2013; Ochoa y Velapatiño, 2012).

Utilizando métodos moleculares es posible aumentar la sensibilidad en la detección de virus. Por ejemplo, la RT-PCR, detecta concentraciones muy bajas de carga viral (10^2 - 10^4 partículas virales por mililitro de heces) en comparación a los inmunoensayos enzimáticos que requieren al menos de 10^5 partículas virales por mililitro de heces. (Dung y col., 2013; Sanz y col., 2008). Además, la implementación de RT-PCR es considerada el estándar de oro para la confirmación de las diarreas por norovirus, ya que permite diagnosticar no solo casos clínicos de infecciones por NoV, si no también detectar su presencia en muestras ambientales, agua, alimentos y heces (Alvarado y col., 2012; Sanz y col., 2008, Torner, 2008).

Dado que el material genético de NoV es RNA de una sola hebra es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de DNA complementario (cDNA) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología de PCR (Griffin y Griffin, 1994). Los pasos de la RT-PCR son:

1. Transcripción reversa: Unión del iniciador a la secuencia de RNA objetivo.
2. Transcripción reversa: La transcriptasa reversa cataliza la extensión del iniciador mediante la incorporación de nucleótidos complementarios.
3. Fin de transcripción reversa, se digiere el RNA y se obtiene la hebra del cDNA.
4. La Taq polimerasa cataliza la extensión de un iniciador para generar cDNA de doble hebra.
5. PCR (Figura 3).

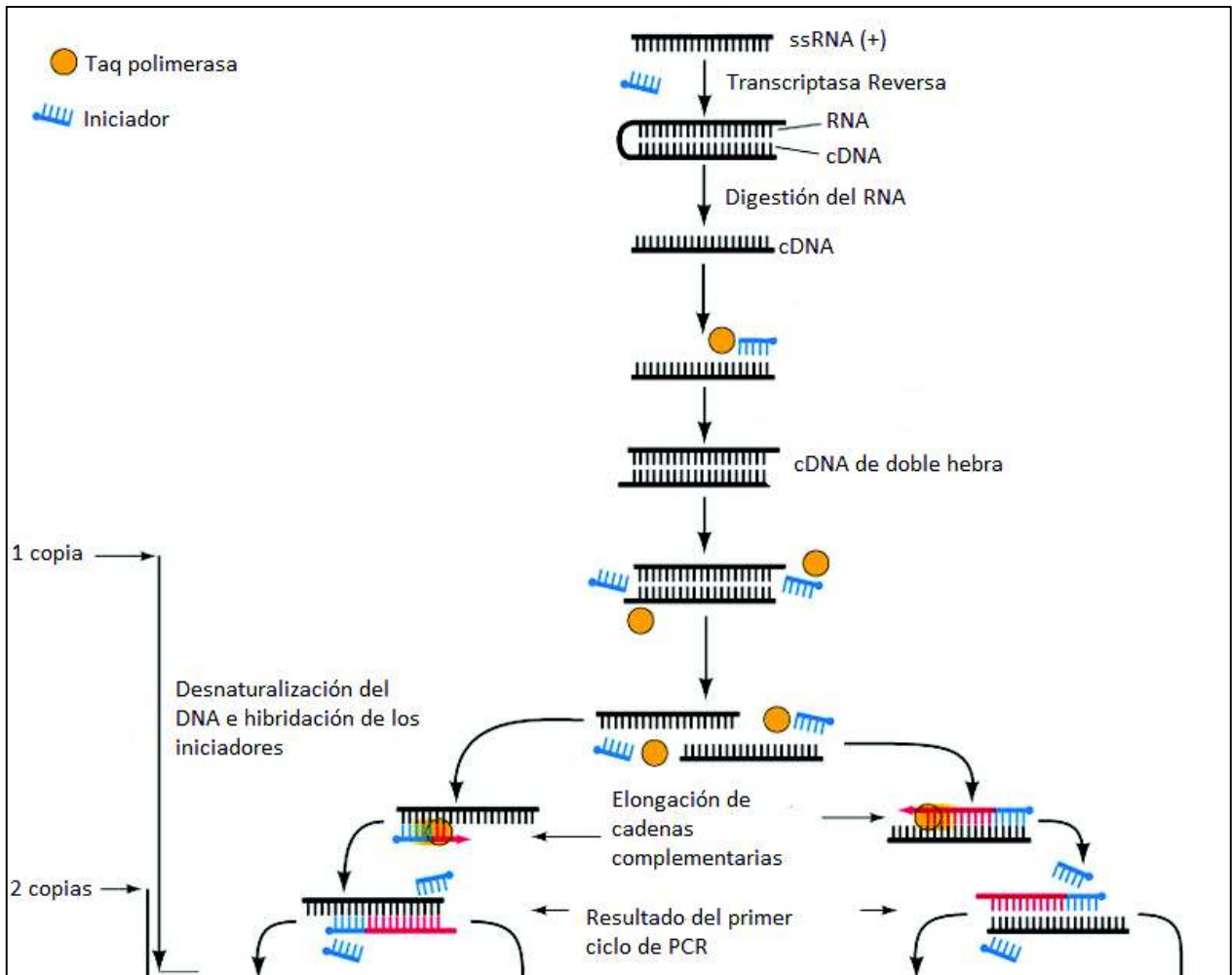


Figura 3. Conversión de RNA a cDNA por la transcriptasa reversa y posterior PCR.

Fuente: Gilbert, 2013.

Para la identificación de NoV por RT-PCR, la mayoría de los cebadores o primers descritos en la literatura amplifican secuencias genómicas cortas con un grado de conservación elevado, como lo es la región de la RNA polimerasa viral, que es de las más conservada del genoma entre los diferentes genogrupos (alrededor de 80 % de homología). (Figura 2). A pesar de varios esfuerzos realizados para desarrollar iniciadores universales o degenerados que pudieran detectar todas las cepas de NoV humanos circulantes, esto aún no se ha logrado (Torner, 2008).

HIPÓTESIS

Los pacientes con gastroenteritis de los hospitales de Hermosillo, Sonora presentan una elevada prevalencia (50 % o superior) de norovirus en sus heces.

METODOLOGÍA

1. Recolección de Muestras

Se recolectaron muestras de heces diarreicas de pacientes, tanto de hombres como mujeres, que asistieron a consulta en los servicios de salud de Hermosillo, Sonora y presentaron diagnóstico clínico de gastroenteritis viral (diarrea explosiva, con o sin vómito; náusea y dolor abdominal) durante el periodo septiembre 2013 – marzo 2014. Un grupo fue de niños entre 0 y 6 años que acudieron al Laboratorio Clínico del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), mientras que otro grupo fue de adultos entre 25 y 44 años que acudieron a consulta al Centro Médico Dr. Ignacio Chávez así como al Hospital Regional Militar de Hermosillo y el Hospital General Zona 2 del Instituto Mexicano del Seguro Social. El tamaño de muestra fue de 100 pacientes, se incluyeron 50 niños y 50 adultos (Mateu y Casal, 2003). Además se le pidió al personal médico recolectar los datos demográficos e historial clínico de cada paciente de forma escrita, utilizando un formato proporcionado para tal fin (Tabla 5).

Tabla 5. Formato para recolección de datos del paciente	
DETECCIÓN DE NOROVIRUS EN HECES DIARREICAS COLABORACIÓN CON CIAD	
Datos del paciente	
Nombre (iniciales del paciente):	
Edad:	
Sexo:	
Datos de salud	
Estado nutricional:	
Vómito (Sí/No):	
Inicio de diarrea (Fecha):	
Inicio de otros síntomas(Fecha):	
Presencia de sangre en heces (Sí/No):	
Presencia de mocos en heces (Sí/No):	
Datos demográficos	
Colonia donde habita:	
Observaciones adicionales	

2. Manejo de Muestras

Las muestras de heces fueron recolectadas en recipientes plásticos estériles. Se tomó aproximadamente 1gr de heces y se resuspendió en 5ml de medio de transporte Hanks SIGMA® (solución de CaCl₂ 0.185 g/L, MgSO₄ 0.09767 g/L, KCl 0.4 g/L, KH₂PO₄ 0.06 g/L, NaHCO₃ 0.35 g/L, NaCl 8.0 g/L, glucosa 1.0 g/L y rojo de fenol 0.011 g/L) adicionado con glicerol y antibióticos (penicilina 200 U/mL, estreptomycin 200 µg/mL y anfotericina 10 µg/mL), ajustado a un rango de pH de 7.2–7.6, para garantizar la viabilidad del virus y reducir el crecimiento bacteriano (Iturriza-Gómara y col., 2004). En caso de pacientes hospitalizados o de infantes donde no fue posible la recolección de heces, se realizó un hisopado rectal mediante un hisopo de dacrón y se almacenó en el medio de transporte Hanks SIGMA®. Todas las muestras obtenidas fueron transportadas en hielo al Laboratorio de Microbiología e Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) donde se llevó a cabo la detección molecular.

3. Procesamiento de las Muestras

Para descartar las muestras negativas a NoV, se hizo un concentrado con 5 muestras de heces de diferentes pacientes. De las muestras tomadas con el hisopo y el medio de transporte, se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante de cada muestra, y se mezclaron para después refrigerarla a 4 °C, para su posterior uso. Para aquellas muestras turbias, se centrifugaron a 4,500 rpm por 30 minutos, para aclarar la suspensión, y obtener un sobrenadante libre de partículas sólidas. De este sobrenadante se tomó 1 mL para su posterior análisis por RT-PCR (descrito más adelante). Si la reacción dio un resultado positivo para NoV, se procedió a la extracción individual de RNA de las muestras, para confirmar aquellas muestras positivas; cuando el resultado fue negativo las muestras se descartaron (Figura 4). El análisis de concentrado de muestras permitió ahorrar reactivo, ya que en una sola reacción se podían probar hasta 5 de ellas.

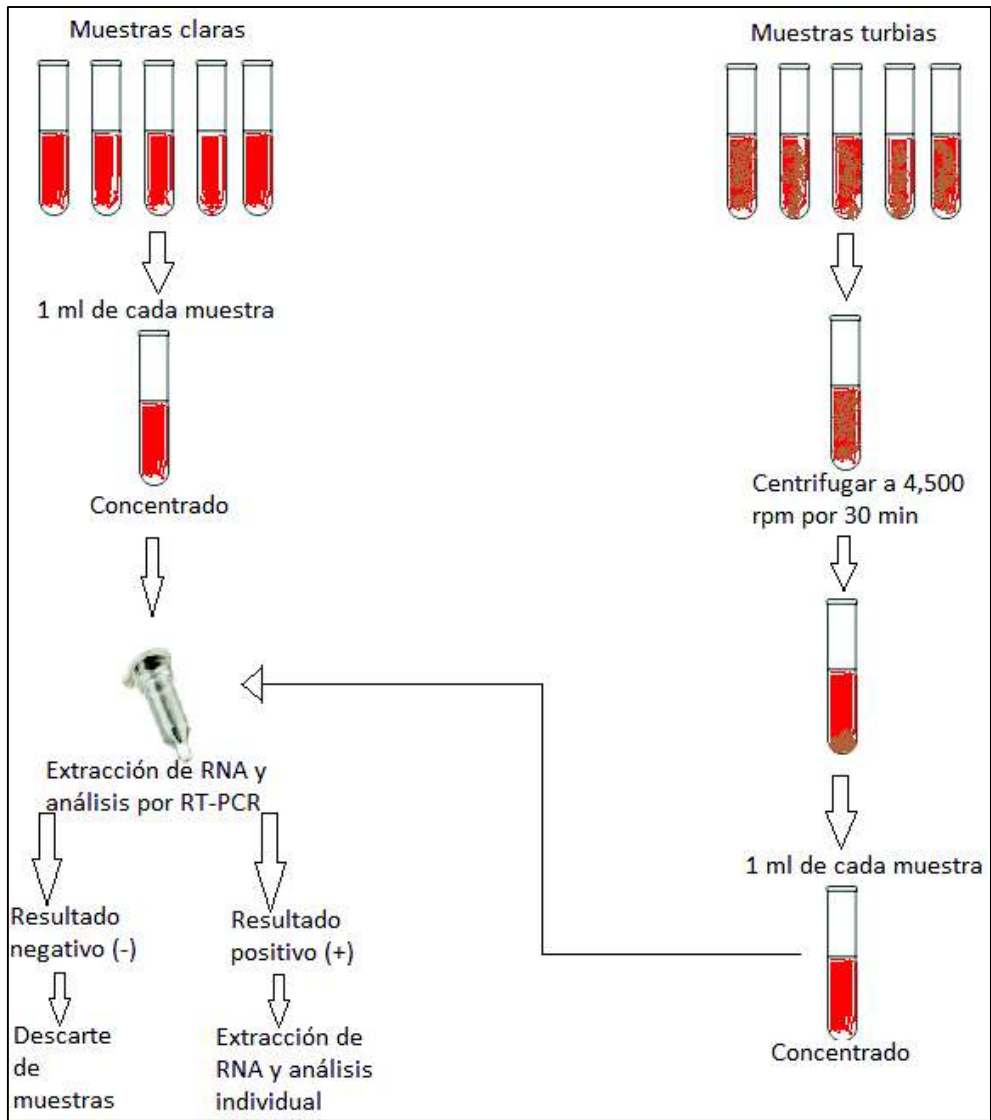


Figura 4. Procesamiento de las muestras.

4. Extracción de RNA

La extracción del RNA viral se realizó utilizando el estuche comercial QIAGEN® QIAamp™ Viral RNA Mini Kit (Zeller y col., 2012), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA fue almacenado a -70 °C hasta su análisis por RT-PCR.

5. Amplificación de Material Genético por RT-PCR en Punto Final y PCR Anidado

Para la amplificación de la región analizada se utilizó el estuche comercial QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (Zeller y col., 2012) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los iniciadores degenerados descritos en la Tabla 6 (Vinjé y col., 2004); que corresponden al gen de RNA polimerasa viral, y produce un amplicón de cDNA de 316 pb.

Iniciador	Secuencia (5' – 3')	Orientación	Posición	Tamaño de producto (pb)
<i>MVJ12</i>	TAYCAYTATGATGCHGAYTA	+	4553-4572	327
<i>RegA</i>	CTCRTCATCICCATARAAIGA	-	4859-4879	
<i>Mp290</i>	GAYTACTCYCSITGGGAYTC	+	4568-4590	316
<i>RegA</i>	CTCRTCATCICCATARAAIGA	-	4859-4879	

R= A/G, Y= C/T, H= A/C/T, S= C/G, y I=Inosina.
Referencia: Vinjé y col., 2004

Las condiciones que se utilizaron en el termociclador, consistieron en un ciclo para la transcripción reversa a 50 °C por 30 min, seguido de un ciclo a 95 °C por 15 min para activar la polimerasa de inicio caliente; 40 ciclos de 30 seg a 94 °C para la desnaturalización, para la alineación 1 min a 45 °C, 1 min a 72 °C para la extensión; y una extensión final por 10 min a 72 °C. Se utilizó un termociclador BIO-RAD® MJ Mini™ Personal ThermalCycler (Bio-Rad, USA).

Para reamplificar el material genético obtenido por RT-PCR, se realizó un PCR anidado, con los iniciadores Mp290 y RegA descritos en la Tabla 6 (Vinjé y col., 2004). Para ello, se tomaron 2 µL del producto obtenido de cada muestra, y se añadieron a la mezcla de reacción de PCR anidado.

Las condiciones que se utilizaron en el termociclador para la PCR anidada consistieron de un ciclo a 95 °C por 3 min para activar la polimerasa; 40 ciclos de 1 min a 94 °C para la desnaturalización; para la alineación 1 min a 45 °C; 1 min a 72 °C para la extensión; y una extensión final de 10 min a 72 °C. El equipo utilizado fue el mismo descrito anteriormente.

Como control positivo se utilizó una muestra positiva para norovirus GII donada por la Dra. Ana Lorena Gutiérrez del Laboratorio de Virología Molecular del CINVESTAV y como control negativo agua como templado. Además se probó la especificidad de los iniciadores con cepas de rotavirus y hepatitis, mismo que resultó negativo (datos no mostrados).

6. Electroforesis

A partir de los productos obtenidos de la PCR anidado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con Gel Red® (Biotium Inc. Hayward, CA) utilizando como solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA 1X (TAE 1X) (Gouvea y col., 1990) y el marcador de peso molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Carlsbad, CA). La corrida se realizó en una cámara BIO-RAD® Mini-Sub Cell GT, durante 60 min a 90 volts. Los geles fueron visualizados utilizando el equipo Gel Doc™ BIO RAD con el programa ImageLab™ 2.0.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Durante el periodo de muestreo, se recolectaron un total de 100 muestras de heces diarreicas; de las cuales 49 muestras provinieron del Hospital Infantil del Estado de Sonora; 16 muestras del Centro Medico "Dr. Ignacio Chávez" (ISSSTESON); 8 muestras del Hospital Militar Regional; y 27 del Hospital General Zona 2 (Tabla 7). Cincuenta muestras fueron obtenidas de pacientes del sexo masculino (50 %), 37 del sexo femenino (37 %), y para 13 muestras (13 %) este dato no fue proporcionado por el hospital. Desafortunadamente solo para el 53 % de los pacientes se llevó a cabo el llenado del formato de datos (Tabla 5), por lo que en un alto número de nuestra muestra no podemos determinar estado nutricional y signos de la enfermedad.

A partir de las muestras se prepararon 22 concentrados; todos resultaron positivos para NoV (Figura 5 A), excepto los denominados 6, 13 y 15 para los cuales se descartaron las muestras que contenían. Posteriormente se realizó la extracción y análisis individual, para la identificación de las muestras positivas (Figura 5 B).

Debido a que algunos de los hospitales con los que se trabajó son considerados como regionales; esto quiere decir que reciben pacientes de distintas áreas del estado, es importante destacar la procedencia de los mismos, haciendo referencia a si provienen de alguna zona rural o urbana del estado, ya que esto se puede relacionar con el nivel socioeconómico del paciente. El 19.48 % del total de muestras positivas a NoV corresponden a 15 muestras de pacientes de procedencia rural. El 19.48 % corresponden a 15 muestras de procedencia urbana y el 61.03 % corresponden a muestras que se desconoce su procedencia (Tabla 7).

Teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos no se pudo determinar el origen de las muestras, el análisis presuntivo indicó que para este estudio no existe relación alguna entre la procedencia del paciente o su nivel socioeconómico y la presencia de la enfermedad ocasionada por NoV, ya que el número de muestras positivas fue igual para pacientes de áreas rurales como para los que residen en zonas urbanas.

Tabla 7. Datos de los pacientes.

	Total de Muestras	Muestras positivas para NoV
Hospital		
HIES	49	33
ISSSTESON	16	13
HMR	8	5
HGZ2	27	26
Sexo		
Masculino	50	36
Femenino	37	30
N/A	13	11
Edad (años)		
<1	23	14
1-4	30	27
5-9	8	6
10-14	3	2
15-19	3	1
20-24	2	2
25-44	11	8
45-49	2	2
50-59	3	2
60-64	2	2
65 y mas	5	5
N/A	8	6
Procedencia		
Agua Prieta	2	0
Caborca	1	1
Carbó	2	1
Esqueda	1	0
Guaymas	1	1
Hermosillo	20	13
Imuris	1	1
Magdalena	1	0
Miguel Alemán	8	6
Navojoa	1	0
Pesqueira	1	1
Suaqui Grande	7	6
N/A	54	47
Total	100	77

HIES= Hospital Infantil del Estado de Sonora; ISSSTESON= Centro Médico "Dr. Ignacio Chávez"; HMR= Hospital Militar Regional; HGZ2= Hospital General Zona 2 del IMSS.

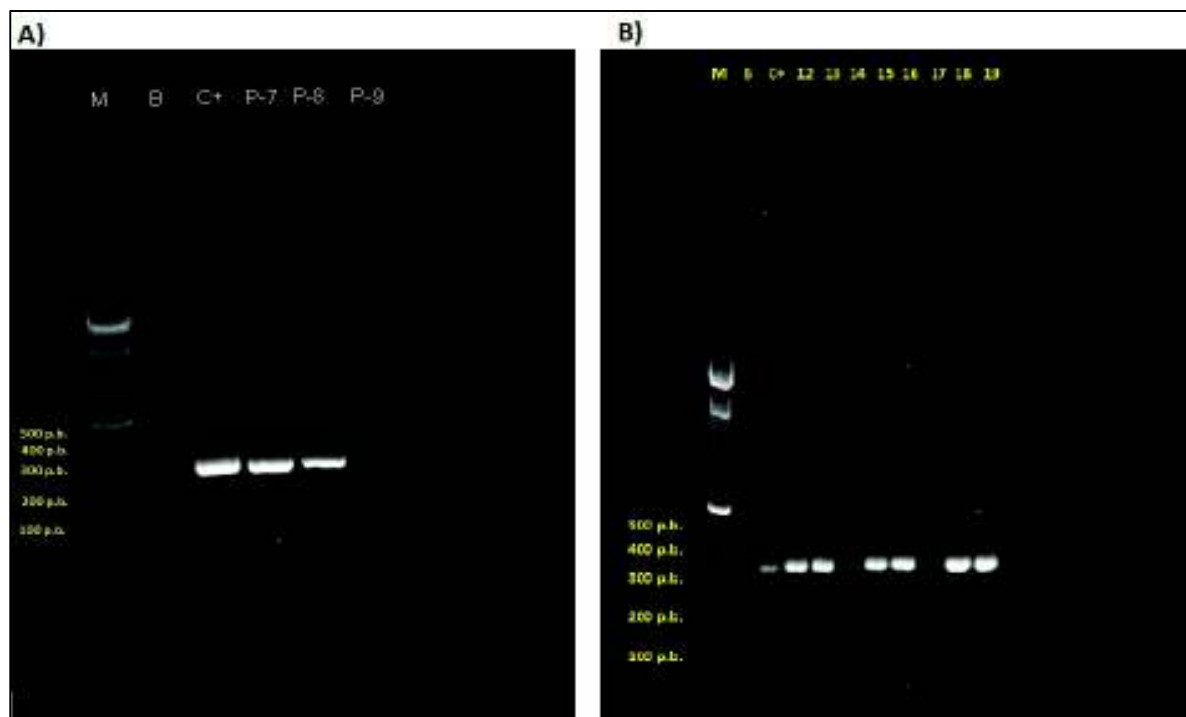


Figura 5. A) Gel representativo de algunos concentrados de muestras por RT-PCR. B) Gel representativo de algunas muestras individuales por RT-PCR.

Es importante destacar que se realizó la detección única de NoV, esto quiere decir que no se buscaron otros patógenos, para descartar síntomas o infecciones múltiples, por lo que existe la posibilidad de co-infección con otros microorganismos, y que el perfil clínico de algunos pacientes que resultaron positivos a este virus no se apegue estrictamente al clásico cuadro de gastroenteritis por NoV.

Del total de muestras analizadas, 77 fueron positivas a NoV (77 %) por RT-PCR (Figura 5 B). Dado que la mayoría del total de las muestras provienen del HIES, aparentemente se observa que los niños son los más afectados por el virus. Tampoco se excluye la idea de que los adultos sean afectados, dado que se observaron muestras positivas al patógeno en adultos (Tabla 7). Además, se encontró que las muestras proporcionadas de pacientes de Suaqui Grande, Sonora, provinieron de un brote diarreico, donde se presume que la fuente del patógeno, fue un alimento contaminado, ya que todos los pacientes asistieron a un convivio en el mismo pueblo, donde se ofreció el mismo platillo preparado, según lo relatado por los padres de los pacientes al ingresar al hospital.

Podemos observar que la prevalencia de casos de gastroenteritis causadas por NoV (77%) en la región de Hermosillo, Sonora es superior a la reportada en países desarrollados de alrededor del 50 % (Monroe, 2011); lo que nos indica que se debe de vigilar de manera más efectiva este tipo de enfermedades, para evitar posibles brotes y casos aislados de infección por NoV; así como su oportuna detección por parte de los laboratorios de análisis clínicos.

Realizando un análisis de los datos proporcionados se observó que del 100 % de los pacientes positivos a NoV (77 muestras), el 28.57 % (22 pacientes) mostraron un estado nutricional adecuado; el 11.68 % (9 pacientes) padecían desnutrición; y para el 59.74 % (46 pacientes) no se obtuvo este dato. Por otra parte, el 12.98 % (10 pacientes) presentaron vómito; el 28.57 % (22 pacientes) no presentaron este signo; y para el 58.44 % (45 pacientes) no se obtuvo este dato. Además el 37.66 % (29 muestras) del total de las muestras de heces positivas a NoV no presentaban sangre; el 11.68 % (9 muestras) se observó la presencia de sangre; y para un 51.49 % (40 muestras) no se obtuvo este dato. Por último el 25.97 % (20 muestras) de las muestras de heces positivas a NoV presentaron moco; el 19.48 % (15 muestras) no presentaron moco; y para el 54.54 % (42 muestras) no se obtuvo este dato. Los datos anteriores se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Signos clínicos de los pacientes positivos a norovirus.

Signo clínico	Total
Desnutrición	9 / 31*
Presencia de vómito	10 / 32*
Sangre en heces	9 / 37*
Moco en heces	20 / 35*

*La relación indica número de pacientes positivos a NoV que presentaron el signo clínico, entre el total de pacientes para los cuales se obtuvo información relacionada con ese signo.

Los datos presentados no fueron totalmente convincentes para determinar la relación entre la enfermedad y la presencia de NoV, esto podría deberse a la alta cantidad de pacientes (cerca del 50 %) para los cuales no se recolectó la información descrita en la Tabla 5; Por lo que no se pudo establecer una correcta relación entre sintomatología y diagnóstico preciso de la enfermedad; aunque la presencia de NoV en las heces de estos pacientes es certera. Además diversos reportes indican pacientes asintomáticos positivos a NoV (Bellido y col., 2007).

Del 100 % de las muestras positivas a NoV (77 muestras), el 46.75 % (36 muestras) corresponden a pacientes del sexo masculino, 38.96 % (30 muestras) a pacientes del sexo femenino y 14.28 % (11 muestras) fueron de pacientes de los cuales no se obtuvo información relacionada con el sexo (Figura 6).

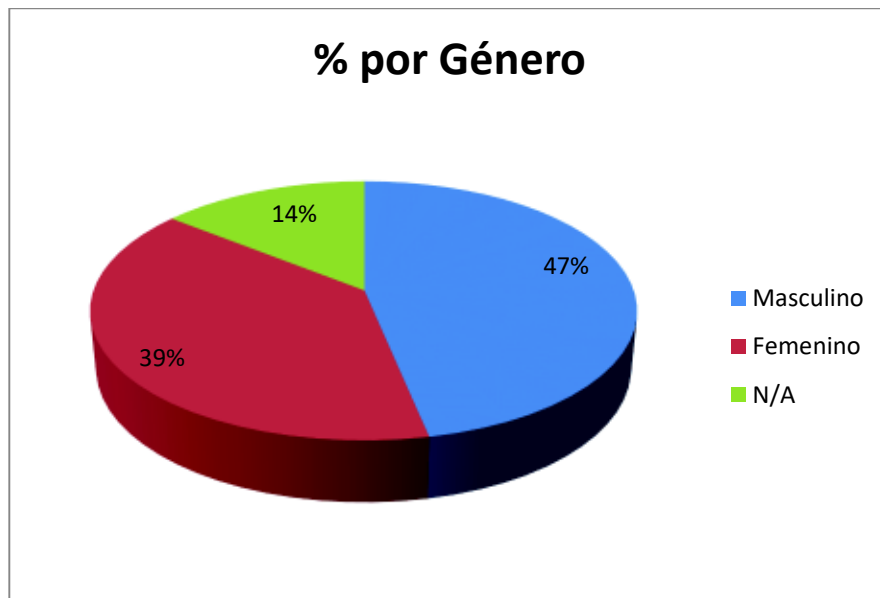


Figura 6. Prevalencia de norovirus en porcentaje por género.

Del 100 % de las muestras positivas a NoV (77 muestras), el 18.18 % (14 muestras) corresponde a pacientes del grupo de edad menores de 1 año; el 35.06 % (27 muestras) a el grupo de edad de 1-4 años; un 7.79 % (6 muestras) al grupo de edad de 5-9 años; por otra parte, el 2.59 % (2 muestras) corresponden al grupo de 10-14 años, al igual que los grupos de 20-24, 45-49, 50-59 y 60-64 años de edad; 1.29 % (1 muestras) corresponden al grupo de 15-19 años; el grupo de pacientes con edad de entre 25-44 años obtuvo un 10.38 % (8 muestras); para el grupo de edad de 65 y más años se obtuvo un 6.49% (5 muestras) y al grupo al cual no se le determinó la edad le corresponde un 7.79 % (6 muestras) (Figura 7).

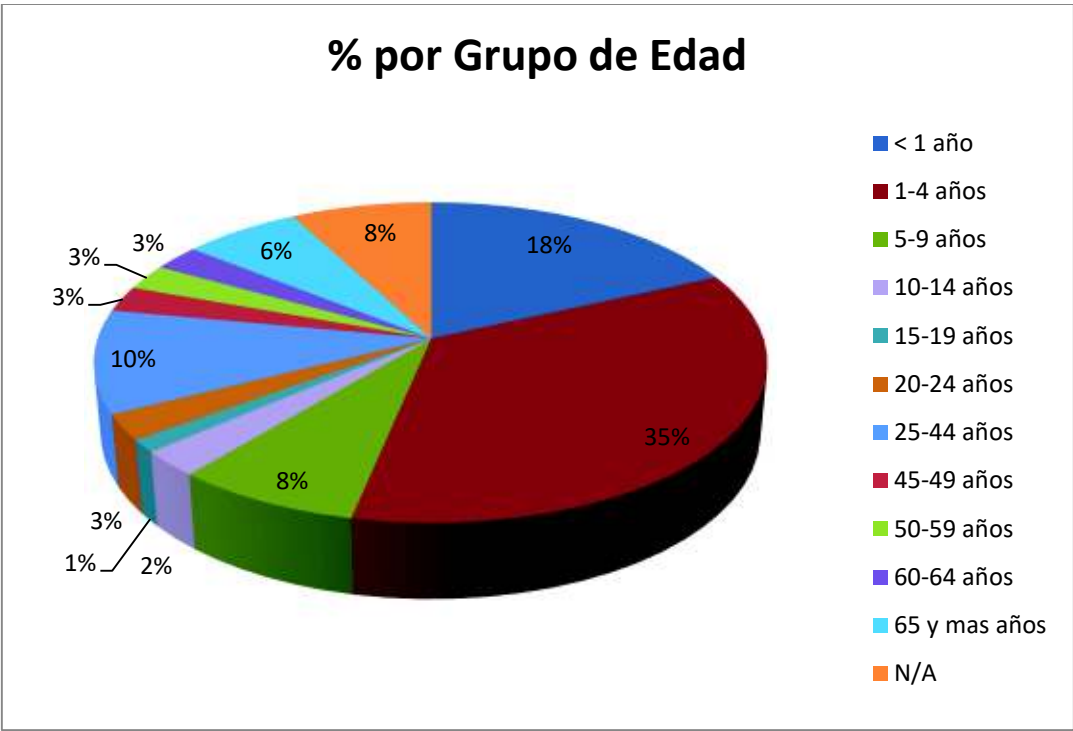


Figura 7. Prevalencia de norovirus en porcentaje por grupo de edad.

A partir de la información que se muestra en las dos figuras anteriores podemos observar que los varones y los infantes de entre 1 y 4 años de edad son los grupos más afectados por NoV.

Adicionalmente se calculó la prevalencia de NoV para adultos entre 25 y 44 años de edad, ya que este es uno de los grupos más afectado por las enfermedades intestinales (SUIVE, 2011). La prevalencia de NoV encontrada en este estudio para este grupo de edad fue del 73%, lo que nos indica que para la región de Hermosillo, Sonora este grupo de pacientes está siendo afectado en gran medida por este patógeno. Posiblemente atribuido al mal régimen de alimentación, y al hecho de que estas personas se alimentan constantemente con alimentos preparados en la calle (Duarte, 2012).

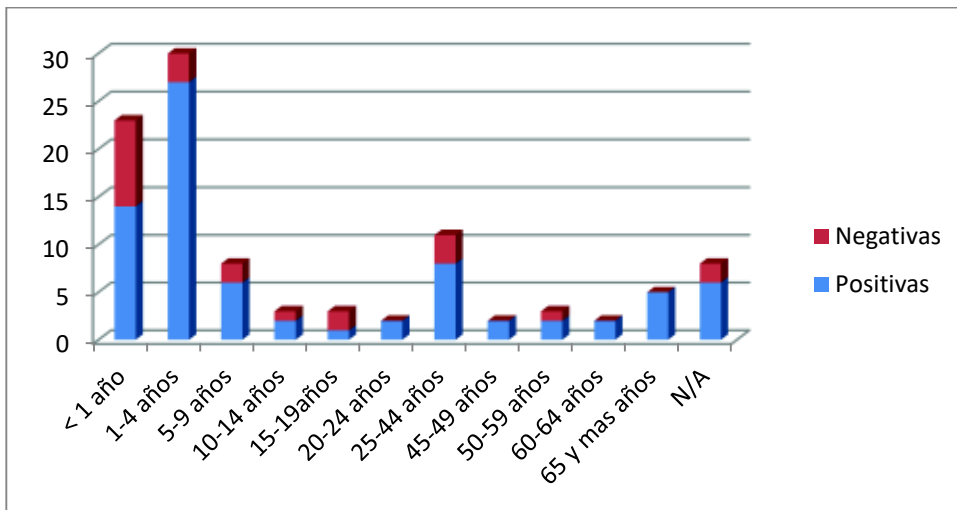


Figura 8. Distribución de muestras positivas y negativas por grupo de edad.

Podemos observar claramente que los menores de edad están siendo mayormente afectados por NoV, con un porcentaje total del 65 % contra el 28 % que presentan las personas adultas; esto posiblemente se deba a que los neonatos y niños pequeños no tienen la capacidad de controlar la higiene en su entorno, y que a esta edad los niños frecuentan lugares confinados como guarderías y escuelas, donde la probabilidad de transmisión del virus es más elevada (Bellido y col., 2007). Por otro lado tenemos que tomar en cuenta que un alto porcentaje (67 %) del total de muestras provienen de pacientes menores de edad, ya que el hospital con mayor participación en este estudio fue el Hospital Infantil del Estado de Sonora.

Existe también la posibilidad de que algún alimento que se consuma tradicionalmente por los niños pequeños sea el vehículo acarreador de este virus; como podrían ser algunos frutos o vegetales mal sanitizados.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, se detectaron partículas virales de NoV genogrupo I en vegetales frescos de empacadoras del norte del estado de Sonora. Los resultados mostraron que los vegetales contenían de 10^2 hasta 10^3 partículas de NoV por gramo de alimento. Esto significa que por medio de las verduras crudas, NoV puede ser transmitido a los consumidores y provocar la enfermedad (Félix y col., 2012).

CONCLUSIONES

La prevalencia de norovirus en los pacientes de los hospitales de Hermosillo, Sonora, resultó ser superior a la esperada. Este tipo de estudio es de los primeros que se realiza en la región, por lo que con los resultados obtenidos, se contribuye a la epidemiología de la enfermedad en Sonora y México.

RECOMENDACIONES

Es necesario el monitoreo constante de los agentes que causan las enfermedades intestinales como lo es NoV y aún mejor la genotipificación de las cepas circulantes, esto con la finalidad de reportar a la Secretaría de Salud, ya que NoV es cambiante y podrían generarse nuevas cepas que ocasionen nuevas epidemias en la región o en el país.

Para lograr lo anterior se requiere que los laboratorios se comprometan en colaborar con un mejor diagnóstico de los agentes etiológicos de las infecciones intestinales; y así poder tomar medidas sanitarias adecuadas para evitar la diseminación de estos patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado Rios L, Castillo Aguilar W. 2012. Gastroenteritis por virus en Lima. *Rev Med Hered* (23): 72.
- Atmar L. 2010. Noroviruses: state of the art. *Food Environ Virol* (2): 117-126.
- Bellido JB, Álvarez MC, García S, Hernández G, Godoy P, Moraga F, Pañella H, Puig J, Rius C, Sánchez A, Sanz JC, Varela MC. 2007. *Epidemiología de las gastroenteritis agudas víricas*. EMISA. Sexta edición. Valencia. 164 p.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/norovirus/reporting/caliciNet/data.html>, accesado Junio 2014.
- Donaldson E, Lindesmith L, Lobue A, Baric R. 2008. Norovirus pathogenesis: mechanism of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* (225): 190-211.
- Donaldson E, Lindesmith L, Lobue A, Baric R. 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol* (8): 231-241.
- Duarte T. 2012. Comer bien evita enfermedades gastrointestinales, *Periódico Expreso* 2353.
- Dung V, VinhPhat T, Vu ThieuNga P, Vu Tra My P, ThanhDuy y col. 2013. The validation and utility of a quantitative one-step multiplex RT real-time PCR targeting rotavirus A and norovirus. *J Virol Methods* (187): 138-143.
- Esseili Q, Wang L. 2012. Binding of human GII.4 norovirus virus-like particles to carbohydrates of romaine lettuce leaf cell wall materials, *Appl Environ Microbiol* (78): 786-794.
- Estrada JF, Cerna MR, Thompson C, López S. 2002. Faecal contamination and enterotoxigenic *Escherichia coli* in street-vended chilli sauces in Mexico and its public health relevance. *Epidemiol Infect* (129): 223-226.
- Félix V, Resendiz M, Burgara A, Hernández J, Mata V. 2012. Quantitative detection of hepatitis A, rotavirus and genogroup I norovirus by RT-qPCR in fresh produce from packinghouse facilities. *J Food Safety* (32): 467-473.
- Gilbert SF. 2013. *Developmental Biology*. Tenth ed. University of Helsinki and Swarthmore College. Sinauer Associates. 719 p.

- Gómez S, Ribas RM, García H. 2012 Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in Mexican children. *Virology* (9).
- Gouvea V, Ho M, Glass R, Woods P, Forrester B, Robinson C, Ashley R, Riepenhoff-Talty M, Clark H, Taniguchi K, Meddix E, McKellar B, Pickering L. 1990. Serotypes and Electropherotypes of Human Rotavirus in the USA: 1987-1989. *J Infect Dis* 162 (2): 362-367.
- Griffin H, Griffin, M. 1994. PCR Technology: current innovations. CRC Press Inc. Estados Unidos.
- Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, Greene SA, Ferguson J, Henao OL, Vinjé J, Lopman BA, Parashar UD, Widdowson MA. 2011. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004–2005. *Emerg Infect Dis* (17): 1381–1388.
- Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. 2004. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* (31): 259-265.
- Kapikian Z. 1997. Viral gastroenteritis, *Viral Infections of humans, epidemiology and control*, 4th edition, New York: Plenum Medical Book Company.
- Koopmans M, von Bonsdor C, Vinjé J, de Medici D, Monroe S. 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev* (26): 187-205.
- Koopmans M, Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem, *Int. Food Microbiol* (90): 23-41.
- Mateu E, Casal J. 2003. Tamaño de la muestra. *Rev Epidem Med Prev* (1): 8-14.
- Ochoa TJ, Velapatiño G. 2012. Gastroenteritis por virus en Lima. *Rev Med Hered* (23): 136.
- Monroe S. 2011. Control and Prevention of Viral Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* (17): 1347-1348.
- Pang L, Preiksaitis K, Lee B. 2005. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol* (33): 168–171.
- Sanz C, Fernández M, Herranz N, Sánchez Fauquier A. 2008. Evaluación de una nueva técnica de ELISA para el diagnóstico de brotes de gastroenteritis causados por norovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* (26): 478-479.
- Sina F, Baba AP, Kayodé PA, Noumavo A, Sezan JD, Hounhouigan SO, Kotchoni G, Prévost L, Baba Moussa. 2011. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from street foods: toxin profile and prevalence of antibiotic resistance. *J Appl Biosci* (46): 3133-3143.

- SINAVE. 2013. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
- SUIVE/DGE/SSA. 2011. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad. Versión Ejecutiva.
- SUIVE/DGE/SSA. 2012. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad. Versión Ejecutiva.
- Torner N. 2008. Estudio epidemiológico de los brotes de gastroenteritis aguda de etiología vírica en Cataluña. Tesis Doctorado. Facultad de Medicina, Departamento de salud pública. Universidad de Barcelona. 1 - 208.
- Treanor JJ, Dolin R. 2005. Norovirus and other caliciviruses, Principles and practice of Infectious diseases, 6th edition, Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone.
- Vinjé J, Raditijo A, Hamidjaja, Sobsey M. 2004. 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* (116): 109–117.
- Yezli S, Otter JA. 2011. Minimum infective dose of the major human respiratory and enteric viruses transmitted through food and the environment, *Food Environ Virol* (3): 1-30.
- Zeller M, Heylen E, De Coster S, Van Ranst M, Matthijnssens J. 2012. Full genome characterization of a porcine-like human G9P rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *J Clin Microbiol* 50(3): 966.