

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



“Identificación de factores del hospedero y del agente relacionados con susceptibilidad y severidad en infección entérica por *Norovirus* en niños 1 año de la Región Metropolitana.”

YALDA CECILIA LUCERO ALVAREZ

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

Director Clínico de Tesis: Dra. María Elena Santolaya de P.

Director Básico de Tesis: Dr. Miguel O’Ryan G.

2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

**INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato

YALDA CECILIA LUCERO ALVAREZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Médicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día de de 2011.

Prof. Dr. Miguel O´Ryan G.
Director Básico de Tesis
Laboratorio de virus entéricos
Programa de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Dra María Elena Santolaya de P.
Director Clínico de Tesis
Departamento de Pediatría y Cirugía infantil
Hospital Luis Calvo Mackenna
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr(a).

Prof. Dr(a).

Prof. Dr(a).

Prof. Dr(a).
Presidente Comisión de Examen

**... dedico el resultado de este trabajo a mis padres,
a Ignacio y a Norita que me acompañaron amorosa y pacientemente
en este camino, y a todas las familias de los niños que tuvieron
la generosidad de participar en este estudio.**

Esperando que esto sea sólo el amanecer de mi camino en la investigación...

“Hincho mi corazón para que entre
como cascada ardiente el Universo.

El nuevo día llega y su llegada
me deja sin aliento.

Canto como la gruta que es colmada
canto mi día nuevo”.

Gabriela Mistral.

Agradecimientos.

Quiero comenzar agradeciendo a mis padres por su confianza y apoyo incondicional desde siempre, lo que me ha permitido llegar a estas instancias.

Quiero agradecer también la guía de mis tutores, Dra. María Elena Santolaya y Dr. Miguel O’Ryan que fueron durante todo este tiempo ejemplos a seguir.

Agradezco afectuosa y muy especialmente a Ignacio Cortés y Nora Mamani, por su apoyo en lo personal y su ayuda en lo técnico.

Agradezco a las Dras. Valeria Prado, Marcela Rabello, Yanahara Solis, Daniela Berríos, Ana Fritis y la Sra. Elizabeth Cerón, que participaron en el reclutamiento y seguimiento de pacientes, siendo esta la base del estudio aquí presentado. Gracias también a Carolina Silva, Valeria Espinoza, Cristian García y Claudia Arce porque su trabajo logístico y administrativo ha contribuido al mejor funcionamiento de nuestro laboratorio.

Gracias a los Dres. Mary Estes, de Baylor College of Medicine, Houston y Jason Jiang, del Cincinnati Children’s Hospital, Cincinnati, por haberme recibido generosamente en sus laboratorios y permitido aprender las técnicas necesarias para desarrollar esta tesis. Gracias también a Peng Huang, Ming Xia, Weiming Zhong, Margarita Lay, Sampong Vongpungsawad y Jae-Mun Choi por compartir sus conocimientos técnicos y su agradable compañía estando lejos de casa.

Agradezco también por su colaboración a los funcionarios de los Centros de Salud Carol Urzúa y Colina. No puedo dejar de mencionar y agradecer profundamente a los niños y madres que participaron desinteresadamente y con entusiasmo en este estudio.

Finalmente agradezco a la Escuela de Postgrado que confió en mí para obtener el grado de PhD y me entregó las herramientas para iniciar mi camino en la investigación.

Índice.

I.- Glosario de abreviaturas.....	6
II.- Resumen.....	7
III.- Abstract.....	11
IV.- Introducción.....	14
V.- Problema Planteado	18
VI.- Hipótesis.....	18
VII.- Objetivos.....	19
VIII.- Metodología.....	20
IX.- Resultados.....	27
X.- Discusión	55
XI.- Conclusiones.....	63
XII.- Contraste de hipótesis y Proyecciones	64
XIII.- Proyecciones.....	65
XIV.- Bibliografía.....	66
XV. Anexo 1: Acta de aprobación Comité de ética.....	73

I.- Glosario de abreviaturas.

Ast:	Asintomático
ELISA:	Inmunoensayo enzimático (del inglés enzyme-linked immunosorbent assay)
FUT2:	Fucosiltransferasa 2
FUT3:	Fucosiltransferasa 3
GI:	Genogrupo I
GII:	Genogrupo II
GE:	Gastroenteritis
IE:	Infección entérica
LM:	Leche materna
RM:	Región Metropolitana
RT-PCR:	Reacción de polimerasa en cadena asociada a transcripción reversa (del inglés reverse transcription-polymerase chain reaction)
Nv:	Norovirus.
SNPs:	Polimorfismos de nucleótido único (del inglés single nucleotide polymorphism)
SSP-PCR:	Reacción de polimerasa en cadena con partidores específicos de secuencia (del inglés sequence specific primer-polymerase chain reaction)
VLP:	Partículas tipo virus (del inglés virus like particles)

II.- Resumen

Introducción: Norovirus (*Nv*) es causa importante de gastroenteritis (GE) endémica infantil. Estudios recientes sugieren que su frecuencia podría llegar a 20-25% de las GE en <5 años en algunas regiones de nuestro país. Las infecciones entéricas (IE) por este agente tienen un amplio rango de severidad, desde la excreción asintomática hasta GE con deshidratación severa. Estudios con voluntarios adultos y en situación de brotes sugieren que algunos individuos serían resistentes a la infección. No está totalmente dilucidada la razón por la que existen diferencias de susceptibilidad y severidad en los cuadros clínicos.

Estudios *in vitro* con saliva humana y oligosacáridos sintéticos han demostrado la interacción de proteínas de la cápside de *Nv* con antígenos tipo grupo histosanguíneo ABO-Lewis, que se encuentran presentes en secreciones, epitelios de mucosas y glóbulos rojos, y cuya expresión depende de la actividad de las enzimas FUT2, FUT3 y ABO. Si bien la unión *in vitro* se ha demostrado para todos los genogrupos de *Nv*, su efecto *in vivo* ha sido menos consistente. Se ha descrito, en particular para el genogrupo I (GI) de *Nv*, que individuos “secretores” grupo O, que poseen antígeno H y Lewis b en secreciones y carecen de antígenos A y B, serían más susceptibles, mientras que los sujetos “no secretores” (sin antígeno H ni Lewis b en secreciones) serían “naturalmente resistentes” a la infección. No está claro si estos antígenos tienen alguna relevancia en la susceptibilidad frente a la IE por *Nv* en niños y si es válida para GII que es el predominante a nivel mundial.

La variedad de expresión clínica sugiere que además de la sola presencia o ausencia de receptores debe haber otros factores relacionados con severidad. Estos factores podrían incluir el sistema inmune innato (polimorfismos de FUT2, FUT3 y ABO que modificarían su actividad y por ende la síntesis de antígenos histosanguíneos), la inmunidad adquirida (anticuerpos de mucosas) y/o variantes del agente que pudieran ser más virulentas.

Las **hipótesis** planteadas fueron: 1) Los lactantes con fenotipo “Secretor”, particularmente aquellos con grupo histosanguíneo O, A y AB tendrían mayor probabilidad de adquirir una infección por *Nv* durante su primer año de vida que los individuos grupo B (susceptibilidad) y los “No Secretores”. 2) La severidad del cuadro clínico en este grupo de estudio estaría determinada fundamentalmente por factores del hospedero relacionados con variantes de las enzimas involucradas en la síntesis de antígenos histosanguíneos ABO-Lewis y/o con

inmunidad adquirida humoral de mucosas (tanto la transmitida a través de la leche materna (LM) como la producida por el propio lactante) y no dependería de la variante viral involucrada.

Los **objetivos** de este trabajo fueron: 1) Determinar la relación entre susceptibilidad frente a IE por *Nv* en niños < 1 año de la Región Metropolitana (RM) y factores del hospedero (fenotipo/genotipo Secretor); 2) Establecer la relación entre severidad del cuadro clínico y factores del hospedero: a) inmunidad innata (fenotipo ABO, polimorfismos FUT2, FUT3 y ABO en lactantes y fenotipo histosanguíneo en LM); b) inmunidad adquirida (presencia de IgA anti-*Nv* previo al episodio) y factores del virus: a) genotipo viral; b) tipos de residuos ubicados en la porción más expuesta de la cápside viral.

Metodología: Se implementó un modelo de cohorte de lactantes atendidos en 2 consultorios de la RM. Se realizaron controles de salud mensuales hasta los 12 meses y durante los episodios de GE. En los controles sanos se consultó acerca de síntomas gastrointestinales durante el último mes y en los episodios de diarrea se evaluó la severidad del cuadro con *score* clínico validado. En cada control se tomaron muestras de deposición en busca de *Nv* (ELISA y RT-PCR). Durante el seguimiento se tomaron muestra de saliva y LM (en aquellos que recibieron lactancia materna hasta al menos los 6 meses). En las muestras de deposición *Nv* (+) se estudiaron: 1) el genotipo de acuerdo a la secuencia de una región conservada del gen de la cápside; 2) los aminoácidos de la región más expuesta de la cápside mediante el “Método de huella evolutiva” buscando residuos potencialmente relevantes en la interacción con sus receptores. En los pacientes *Nv* (+) se estudiaron: 1) fenotipo histosanguíneo en saliva (ELISA), 2) genotipo FUT2, FUT3 y ABO, y 3) presencia de IgA anti-*Nv* (ELISA). En las madres se determinó: 1) fenotipo histosanguíneo en saliva y LM (ELISA) y 2) presencia de IgA en LM (ELISA). Para el análisis de factores de severidad, en los casos en que no se contó con número suficiente de GE por este modelo, se incluyeron lactantes < 12 meses con GE por *Nv* reclutados por el mismo grupo de investigadores en un estudio paralelo de diarrea endémica realizado en 2 hospitales de la RM y de Valparaíso respectivamente.

Resultados: Se reclutaron 246 niños, de los cuales 166 (67%) fueron incluidos en el análisis final (tuvieron al menos 8 muestras durante el año de seguimiento). Se detectaron 154 infecciones asintomáticas (98 lactantes) y 24 gastroenteritis (22 lactantes) por *Nv*, siendo este agente la primera causa de diarrea en esta cohorte (23,3% de los GE). En 39 lactantes se

detectó *Nv* asintomático en >1 oportunidad. Se realizó estudio de fenotipo/genotipo Secretor en 121/166 lactantes, incluyendo 73/98 niños con infección asintomática y 16/22 con GE por *Nv*. La frecuencia de fenotipo/genotipo “Secretor” fue significativamente mayor en los lactantes con infección por *Nv* comparado con los no infectados, constituyendo un factor de susceptibilidad (7/81 y 10/40 lactantes respectivamente; $p=0,03$). No se encontraron diferencias en susceptibilidad entre los grupos ABO. Respecto a severidad, se encontró una menor proporción de GE en lactantes *Nv*(+) que recibieron leche de madres “Secretoras” (*versus* madres “No Secretoras”) y LM con IgA anti virus México ($p=0,036$ y $0,04$ respectivamente). Se encontró una tendencia hacia una mayor proporción de lactantes heterocigotos para polimorfismos del gen FUT3 y menor proporción de individuos con IgA previa al episodio en lactantes con GE por *Nv* *versus* asintomáticos, diferencias que no alcanzaron significancia estadística ($p=0,11$ y $0,25$ respectivamente). No se encontraron diferencias entre pacientes con distinta presentación clínica en cuanto a la distribución de fenotipo ABO ni SNPs de FUT2. GII.4 fue por lejos la variante viral predominante, siendo significativamente más frecuente en GE respecto a infección asintomática ($p=0,035$). La mayoría (87%) de las secuencias de GE pertenecientes a GII.4 tuvieron 100% de identidad con la variante de referencia GII.4 2006b, predominante a nivel mundial al momento de realización del estudio, mientras que sólo 50% de las secuencias asintomáticas clasificadas como GII.4 se agruparon en este cluster ($p=0,02$). Mediante herramientas de bioinformática se pudieron encontrar diferencias aminoacídicas a nivel del sitio de unión a grupo histosanguíneo entre las secuencias de cápside de *Nv* locales respecto a secuencias de referencia.

Discusión y conclusiones: *Nv* fue la principal causa de GE en esta cohorte y se encontró una alta proporción de lactantes con infecciones asintomáticas, mayor a lo descrito previamente en la literatura. El fenotipo “No Secretor” fue un factor protector significativo, lo que concuerda con lo descrito previamente en adultos, sin embargo, esta protección no fue completa, lo que resulta novedoso y sugiere la posibilidad de receptores alternativos a los antígenos histosanguíneos. La severidad de los cuadros clínicos estuvo determinada por factores del hospedero y del agente. La LM de madres secretoras, resultó ser un factor protector, lo que sugiere que los antígenos histosanguíneos solubles podrían interferir en la interacción del virus con su receptor de mucosa. Esto resulta relevante por la posibilidad de diseñar fármacos antivirales que pudieran actuar por este mecanismo. La presencia de anticuerpos en LM frente

a algunos genotipos virales también fue protector frente a cuadros sintomáticos. Considerando el eventual uso de vacunas contra *Nv* en un futuro próximo, sería deseable continuar los estudios en esta línea, explorando más profundamente el efecto de la presencia de anticuerpos en severidad y evaluando específicamente la presencia de anticuerpos anti-GII.4 (no evaluado en este estudio), que fue el tipo viral más frecuente y los títulos de anticuerpos que pudieran asociarse a protección. GII.4 fue la variante viral predominante, similar a lo descrito en otras latitudes. La mayor proporción de GII.4 en individuos con GE *versus* asintomáticos y la agrupación diferenciada dentro del genotipo GII.4 de los virus que produjeron infección con y sin síntomas, sugiere la existencia de variantes más virulentas, lo que resulta novedoso en este campo de estudio. Las variaciones encontradas mediante herramientas de bioinformática a nivel del sitio de unión de la cápside viral a antígenos de grupo histosanguíneo podrían explicar al menos en parte la capacidad de la variante local de afectar también a individuos “No Secretores”. Finalmente, estudios de este tipo, que intenten integrar factores del hospedero y del agente al momento de explicar el resultado de esta interacción (cuadro clínico), permitirían comprender de un modo más dinámico y real los mecanismos de enfermedad en enfermedades infecciosas.

Financiamiento: FONDECYT 1061079, beca para financiamiento de Tesis Conicyt 24091055.

III.- Abstract.

Introduction: Norovirus (Nv) are important cause of endemic gastroenteritis (GE) in children, representing up to 25 % of the GE in children <5 years in some regions of our country. Studies with adult volunteers and outbreaks settings suggest that some individuals would be resistant to this infection. Enteric infections by this agent have a wide spectrum of clinical presentation (from asymptomatic to GE with severe dehydration). Reasons for these differences on susceptibility and severity have not been completely elucidated.

In vitro and *in vivo* studies have suggest that histoblood group antigen oligosaccharides (ABO-Lewis) are the host receptor for Nv. Adult volunteer studies suggest that individuals lacking this antigens in secretions, named “Non Secretor”, are resistant to at least some genogroups of Nv. By the other hand, “Secretor”-group O individuals seems to be more susceptible to genogroup I (GI) Nv. It is not clear if these antigens are relevant for susceptibility against Nv infection in children and if it is valid for GII, the predominant genogroup worldwide.

The wide spectrum of clinical presentation suggests that other factors besides presence or absence of host receptors would be participating. These severity factors might involve innate immune system (polimorphisms of the enzymes that participate in histoblood group antigen synthesis), acquired immunity (specific IgA) and/or potentially more virulent Nv strains.

We hypothesized: 1) Infants with “Secretor” phenotype, particularly those group O, A and AB are more susceptible to Nv infection than individuals group B and “Non Secretores”. 2)

Severity is determined mainly by host factors (haplotypes of enzymes involved in histoblood group antigens sintesis and/or IgA presence in infant sera or breast milk) and it is not related to viral strain.

The aims of this research were: 1) To determine the relationship between susceptibility against Nv infection in infants of the Metropolitan Region (MR) and host factors (Secretor phenotype/genotype); 2) To establish the relationship between severity, host factors: a) innate immunity (ABO phenotype, FUT2, FUT3 and ABO polymorphisms in infants and Secretor phenotype in breast milk); b) acquired immunity (pre-infection anti-Nv IgA presence) and viral factors: a) viral genotype; b) types of residues located in the most exposed portion of the viral cápside.

Methodology: a cohort model was implemented in 2 primary health care facilities of the MR. Newborns were recruited and followed monthly up to 12 months of age. Additional checkups

were scheduled in GE episodes when severity was determined by a clinical score. In every healthy or GE checkup stool samples were taken for *Nv* detection (by ELISA and/or RT-PCR). Saliva (in all infants) and breast milk (only in those fed with breast milk at least up to 6 months) were also requested during the follow up. In *Nv* (+) samples there were determined: 1) viral genotype; 2) amino acid composition of the most exposed region of the capsid by using the evolutionary trace method, looking for residues potentially relevant for host receptor interaction. Infants were studied for: 1) histoblood phenotype in saliva (by ELISA), 2) FUT2, FUT3 and ABO polymorphisms (by PCR), and 3) presence of anti-*Nv* IgA (ELISA). Histoblood phenotype and anti-*Nv* IgA was also determined in breast milk. In the cases where the number of GE episodes were less than those necessary for statistics analysis on severity factors, infants with *Nv* infection recruited in a parallel study of endemic GE developed by the same group of researchers were included.

Results: 246 newborns were recruited and followed up to 12 months, of which 166 (67 %) were included in the final analysis (because they have at least 8 samples during the follow-up). There were detected 154 asymptomatic infections (98 infants) and 24 GE (22 infants) by *Nv*, being this agent the first cause of GE in this cohort (23,3 % of episodes). *Nv* was detected in >1 asymptomatic samples in 39 infants. Secretor phenotype/genotype was performed in 121/166 infants, including 73/98 children with asymptomatic infection and 16/22 with GE by *Nv*. “Secretor” phenotype/genotype was significantly more frequent in infants with *Nv* infection than in non infected children (7/81 and 10/40 infants respectively; $p=0,03$). There was no difference in susceptibility for ABO phenotype. With regard to severity, symptomatic cases were less frequent in infants fed by breast milk from “Secretor” mothers (*versus* “Non Secretor” mothers) and breast milk with anti-Mexico virus IgA ($p=0,036$ and $0,04$ respectively). There was a trend to a higher frequency of symptomatic cases in infants heterozygous for FUT3 SNPs and absence of seric anti-*Nv* IgA, however, these differences were non statistically significant ($p=0,11$ and $0,25$ respectively). There were no significant differences in clinical presentation according to ABO or FUT2 genotype. GII.4 was for far the predominant *Nv* genotype, being significantly more frequent in GE than in asymptomatic episodes ($p=0,035$). Most of GII.4 GE sequences (87 %) showed 100 % identity with the reference sequence GII.4 2006b, that was predominant worldwide during the period study, while only 50% of the GII.4 asymptomatic sequences were classified in this genetic cluster

(2006b) ($p=0,02$). There were identified potentially relevant residues of *Nv* capsid protein, located close to the interaction pocket with histoblood antigens, through bioinformatics tools. Discussion and conclusions: *Nv* was the main cause of GE in this cohort and the frequency of asymptomatic infection was higher than previously described. “Non Secretor” phenotype was a significant protective factor against *Nv* infection, similar as was previously described in adults. However, this protection was not complete and it suggests the possibility of alternative host receptors. With regard to severity, breastfeeding from “Secretor” mothers and the presence of anti-*Nv* IgA in breast milk were protective factors against symptomatic infection. These findings suggest that soluble histoblood group antigens and IgA might interfere the interaction between *Nv* and its host receptor, opening the possibility towards the development of antiviral drugs and/or vaccines acting through this mechanism. There was only a trend towards protection from symptoms in children with seric anti-*Nv* IgA, without statistical significance. It would be desirable to continue the study in this area, specially the determination of anti-GII.4 IgA (the predominant viral strain), considering the current development of vaccines against this agent. GII.4 was the predominant genotype similar to that described in other latitudes. It was remarkably and new the higher proportion of GII.4 in symptomatic individuals (*versus* asymptomatic) and the clustering of sequences associated to more severe cases in a different group from asymptomatic sequences, suggests different biological behavior inside the same genotype and the existence of potentially more virulent strains. Differences in aminoacidic composition of the capsid of local sequences, especially near to the binding pocket, comparing to reference sequences, might explain at least partly the ability of the local strains to infect also “Non Secretor” individuals. The results of these thesis underline the interplay of host and viral factors that finally determine susceptibility and severity of infections in an individual.

Funding: FONDECYT 1061079, beca para financiamiento de Tesis Conicyt 24091055.

IV.- Introducción.

A nivel mundial, las gastroenteritis (GE) son una causa significativa de morbilidad y mortalidad, especialmente en menores de 5 años (<5a) de países en desarrollo (1). En los últimos 30 años, una serie de factores (educación, optimización del manejo hidroelectrolítico, mejora del estado nutricional de la población infantil, entre otros), han disminuido la letalidad de esta patología en <5a. Sin embargo su incidencia sigue siendo elevada, estimándose en promedio 3,2 episodios de GE/año en niños menores de 5 años de países en vías de desarrollo (1-3), con los consiguientes costos económicos y sociales. Los menores de 1 año son los que presentan mayor incidencia y letalidad, reportándose tasas de mortalidad promedio de 8,5 por 1.000 recién nacidos vivos en países en desarrollo (3). De ahí la importancia de investigar en esta área.

Aún cuando en Chile ha disminuido en forma importante la mortalidad por GE en la infancia (en el año 2008 murieron por esta causa sólo 3 lactantes < 1 año) (4), ésta continúa siendo causa importante de morbilidad. Se estima que un niño <5a puede sufrir 2-3 episodios de GE al año (5,6) y en niños < 3 años esta patología causa 114.000 visitas médicas y 12.500 hospitalizaciones anuales (7).

Las GE pueden ser causadas por virus, bacterias o parásitos. Se ha relacionado el nivel de desarrollo sanitario del país con la frecuencia de infección por distintos tipos de agentes, describiéndose una mayor proporción de agentes virales en países con mejores condiciones sanitarias (1). En Chile se ha reportado una proporción significativa de casos de GE de etiología viral. Se estima que al menos el 50% de los episodios endémicos de GE no disintérico en <5a son de causa viral (8, 9 y O´Ryan y cols, datos no publicados). Entre los virus, destacan rotavirus, norovirus (*Nv*), astrovirus y adenovirus entéricos (10).

Los *Nv* pertenecen a la familia *Caliciviridae*, grupo de virus RNA, de estructura muy simple y altamente infectantes (11). Ellos representan actualmente la principal causa de GE a nivel mundial (12), especialmente como causa de brotes en países desarrollados (13-16). En los últimos 15 años se ha identificado su relevancia en cuadros de GE endémica, fundamentalmente en la infancia, reportándose como causa de alrededor del 20% de los

episodios en lactantes y disputando en algunos estudios el primer lugar en frecuencia con rotavirus (8, 11, 17-21).

Se ha descrito un amplio espectro de manifestaciones clínicas en la infección por *Nv*, desde excreción asintomática (22, 23) hasta cuadros de GE severos que requieren hospitalización (24) y diarrea crónica (25). Se desconocen los factores que determinan la presentación clínica del cuadro.

Por otra parte se ha descrito una susceptibilidad variable asociada a factores de la inmunidad innata, específicamente la presencia de antígenos histosanguíneos en mucosas, lo que podría determinar que individuos no sufran infección por un determinado *Nv* aún exponiéndose a altas dosis infectantes y en ausencia de anticuerpos previos (11, 26). Los antígenos de grupo histosanguíneo son oligosacáridos que se encuentran en forma libre en secreciones (saliva, leche materna, sangre, contenido intestinal) o asociados a membranas en la superficie de glóbulos rojos y epitelio de mucosas (tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario). En la Figura 1 se esquematiza la síntesis de estos oligosacáridos.

A partir de un precursor disacárido, se adicionan monosacáridos a través de una serie de glicosiltransferasas (principalmente fucosiltransferasas, FUT) (27). La enzima FUT2 es la responsable de sintetizar el antígeno H en mucosas y determina la expresión del fenotipo “Secretor”. Su mutación inactivante condiciona el fenotipo “No Secretor”. La enzima FUT3 puede actuar sobre el precursor en individuos “No secretores”, sintetizando el antígeno Lewis a o puede actuar sobre los antígenos H, A y B en individuos “Secretores”, produciendo el antígeno Lewis b. La enzima ABO tiene 3 variantes, 2 de ella funcionales que sintetizan los antígenos A y B respectivamente y una no funcional que deja el antígeno H sin modificación, produciéndose el fenotipo O (ver Figura 1) (27).

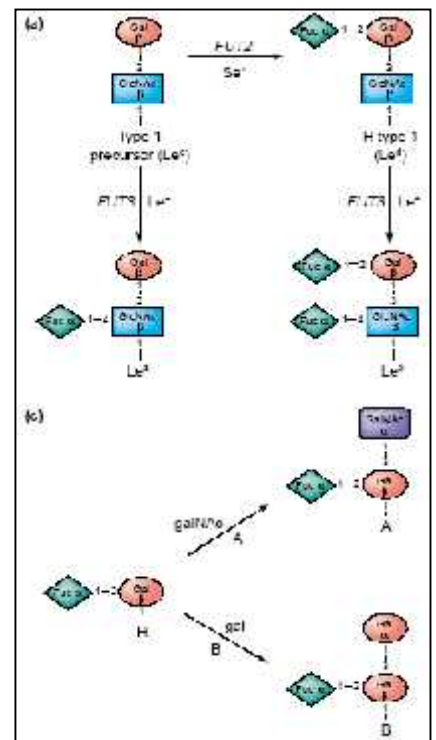


Figura 1.- Esquema de la síntesis de antígenos de grupo histosanguíneo. FUT2: fucosiltransferasa 2; FUT3: fucosiltransferasa 3; Se+: Secretor; Le+: Lewis positivo.

Se ha podido demostrar que *Nv* se une sólo a células que expresan estos oligosacáridos en superficie (28, 29). En estudios con voluntarios sanos se ha descrito que individuos “No Secretores” no se infectan luego de exponerse a ciertas cepas de *Nv* pertenecientes a genogrupo I (GI) (28). Thorven y cols. demostraron en muestras de individuos expuestos a *Nv* genogrupo II (GII) en brotes, que aquellos con la mutación inactivante 428G>A de FUT2 (“No Secretores”) no presentaron cuadros sintomáticos (29). En cuanto a los “Secretores”, se ha visto que individuos del grupo O tienen un mayor riesgo de infección por virus Norwalk (GI) e individuos grupo B tienen menor riesgo de infección por esta cepa o su infección tiende a ser asintomática (22, 28, 30). Respecto a la GE endémica en niños, Bucardo y cols también reportaron recientemente un efecto protector del fenotipo “No Secretor” (31). Contrastando con lo descrito previamente, Lindesmith y cols describieron una falta de asociación entre fenotipo histosanguíneo y la susceptibilidad frente a infección por la variante Snow Mountain, representante del GII (32). En suma, aún no está totalmente dilucidado el rol del fenotipo histosanguíneo en susceptibilidad frente a infección por *Nv* y particularmente en lactantes, que es un grupo de mayor riesgo, existe muy poca información.

En la leche materna (LM) existe una serie de compuestos que contribuyen a la defensa del lactante frente a agentes infecciosos, incluyendo antígenos de grupo histosanguíneo y anticuerpos. Los primeros, podrían actuar como receptores solubles para patógenos, inhibiendo su adhesión a la mucosa gastrointestinal del lactante. Datos epidemiológicos demuestran que mayores concentraciones de estos glicanos en LM se asocian a protección contra diarrea por *Campylobacter*, Calicivirus, ETEC y diarrea moderada a severa por todas las causas (33). Estudios *in vitro* muestran que componentes de la leche humana son capaces de inhibir la unión de cepas de *Nv* a saliva (34).

El estudio de los antígenos de grupo histosanguíneo y su relación con susceptibilidad y severidad del cuadro clínico en infección por *Nv* en niños abre la posibilidad de identificar blancos para el eventual desarrollo de agentes antivirales que prevengan la infección en grupos de mayor riesgo, actuando a nivel de la interacción del virus con su receptor.

Por otra parte, si bien, existe una amplia diversidad genética y antigénica de *Nv*, en los últimos 30 años se ha visto un franco predominio de una de las variantes virales, la genogrupa II-genotipo 4 (GII.4). Estudios de evolución genética, utilizando herramientas de bioinformática para la comparación de secuencias de esta variante GII.4, han identificado residuos posiblemente seleccionados por la presión positiva del ambiente (anticuerpos e interacción con receptores) y que tendrían relevancia funcional en la actualidad, explicando el predominio de este genotipo (35, 36). Hasta el inicio de esta tesis no existían estudios que hubieran explorado la relación entre variantes virales y severidad del cuadro clínico (virulencia) ni la posibilidad de identificar diferencias en la composición aminoacídica de las variantes virales asociadas a distinta severidad.

El presente estudio pretende definir el efecto del fenotipo histosanguíneo en susceptibilidad frente a infección por *Nv* en lactantes. Además se busca determinar el efecto de factores de inmunidad innata y adquirida del hospedero y factores del agente (variantes virales) sobre severidad del cuadro clínico.

V.- Problema planteado:

¿Existe relación entre fenotipo histosanguíneo ABO-Lewis y susceptibilidad frente a IE por *Nv* en lactantes chilenos 1 año de la Región Metropolitana (RM) con infección natural por distintas cepas de *Nv*? ¿Se cumple esto para todas las variantes genéticas o sólo para aquellas del genogrupo I?

La severidad de IE por *Nv* en este mismo grupo ¿se explica predominantemente por factores virales, es decir, variantes más virulentas? ¿o también participa el fenotipo histosanguíneo ABO-Lewis? ¿o es la inmunidad adquirida humoral el factor más importante? ¿o la respuesta está en la relación agente-hospedero?

VI.- Hipótesis.

En el grupo de estudio, los lactantes con fenotipo “Secretor”, particularmente aquellos con grupo histosanguíneo O, A y AB tendrían mayor probabilidad de adquirir una infección por *Nv* durante su primer año de vida (susceptibilidad).

La severidad del cuadro clínico en IE por *Nv* en este grupo de estudio estaría determinada fundamentalmente por factores del hospedero relacionados con variantes de las enzimas involucradas en la síntesis de antígenos histosanguíneos ABO-Lewis y/o con inmunidad adquirida humoral de mucosas (tanto la transmitida a través de la leche materna como la producida por el propio lactante) y no dependería de la variante viral involucrada.

VII.- Objetivos.

Objetivo General

Determinar la relación entre fenotipo histo-sanguíneo ABO-Lewis y susceptibilidad frente a IE por *Nv* en una cohorte de lactantes chilenos 1 año de la RM. Determinar la relación entre severidad del cuadro clínico y fenotipo histosanguíneo ABO-Lewis, inmunidad humoral y variantes de la cápside del virus en este mismo modelo de infección natural.

Objetivos Específicos

1. Identificar, a partir de una cohorte de lactantes chilenos 1 año de la RM, aquellos con IE por *Nv*. Determinar el grado de severidad de los episodios a través de un *score* clínico validado y clasificarlos en asintomáticos, GE leve y moderado-severo.
2. En los episodios de IE por *Nv* determinar factores del hospedero potencialmente relacionados con susceptibilidad de contraer la infección: fenotipo histosanguíneo y polimorfismos FUT2.
3. En los episodios de IE por *Nv* determinar factores del hospedero posiblemente relacionados con severidad del cuadro clínico: fenotipo ABO, polimorfismos de enzimas FUT2, FUT3 y ABO, niveles basales de IgA anti-*Nv* del lactante, fenotipo histosanguíneo y niveles de IgA anti-*Nv* en leche materna.
4. En los episodios de IE por *Nv* determinar los genotipos virales asociados a cuadros con distinta severidad y estudiar los residuos de la cápside viral de estas variantes locales que podrían influir en la interacción con antígenos histosanguíneos.
5. Determinar si existe relación entre fenotipo histosanguíneo, genotipo FUT2 y susceptibilidad frente a IE por distintas variantes de *Nv*. Determinar si uno o más de los factores del agente y/o del hospedero se relacionan en forma independiente con severidad del cuadro clínico causado por distintas cepas de *Nv*.

VIII. Metodología.

VIII-a. Modelo de estudio: cohorte, prospectivo.

Se implementaron 2 cohortes, una en el sector Oriente de Santiago (Centro de Salud Carol Urzúa de Peñalolén) y otra en Colina (Centro de Salud Colina). El protocolo de estudio fue aprobado por los Comités de Ética de Investigación de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Servicio de Salud Metropolitano Oriente.

VIII-b. Pacientes: Se reclutaron, previa firma de consentimiento informado por sus padres, 246 recién nacidos que fueron controlados mensualmente hasta los 12 meses. Se completó el seguimiento en 198 niños, de los cuales 166 lactantes (67% de la cohorte inicial) fueron considerados en el análisis final, debido a que tuvieron al menos 8 muestras de deposición (en ellos se realizaron más de 1500 controles de salud). Adicionalmente, se incluyeron lactantes menores de 12 meses que cursaron con GE por *Nv* reclutados en un estudio paralelo de diarrea endémica, realizado por el mismo grupo de investigadores en 2 hospitales, Sótero del Río de Santiago y Van Buren de Valparaíso (19). Lo anterior permitió aumentar el número de lactantes sintomáticos requerido para analizar factores posiblemente asociados a severidad de la infección. Los niños del estudio de diarrea endémica tuvieron el mismo rango de edad y nivel socioeconómico de los pacientes de la cohorte, por lo que su inclusión se consideró metodológicamente válida.

En cada control de salud se preguntó sobre síntomas gastrointestinales, contacto con pacientes con GE durante el último mes y se tomó muestra de deposición para estudio de *Nv*.

Se realizaron controles adicionales en caso de GE, definido como 3 deposiciones de consistencia menor que la habitual o <3 deposiciones alteradas asociado a 1 episodio de vómitos en un período de 24 horas. En dichos controles se realizó evaluación de severidad de acuerdo a score clínico previamente validado (Score de Ruuska-Vesikari) (37) y se tomó muestra de deposición para detección de *Nv*, rotavirus y bacterias enteropatógenas.

VIII-c. Estudios de laboratorio.

En la Tabla 1 se mencionan los ensayos realizados para identificar y caracterizar al virus y al hospedero.

Tabla 1. Estudio de laboratorio realizado en cada paciente según situación clínica.

Tipo de muestra	Objetivo	Ensayo	Periodicidad	Situación clínica	
				Controles sanos [‡]	Episodios de GE
Deposición	Identificación de <i>Nv</i>	RT-PCR pol y/o ELISA	En cada control/episodio	(+) [‡]	(+)
	Identificación de otros agentes	ELISA rotavirus, coprocultivo	En cada episodio	(-) [¶]	(+)
	Genotipificación <i>Nv</i>	RT-PCR dominio S de cápside/ secuenciación/ análisis de secuencias	En infección por <i>Nv</i>	(+)	(+)
	Estudio de secuencia cápside	RT-PCR dominio P de cápside/ secuenciación/ análisis de secuencias	En infección por <i>Nv</i>	(+)	(+)
Saliva	Fenotipo Secretor / ABH / Lewis	ELISA	Una vez durante el seguimiento	(+)	(-)
Saliva / Sangre (DNA genómico)	Genotipo FUT2 / ABO / FUT3	Ensayo de discriminación alélica por PCR en tiempo real / SSP-PCR	Una vez durante el seguimiento	(+)	(-)
Sangre (Suero)	IgA anti <i>Nv</i>	ELISA	En infección por <i>Nv</i>	(+)	(+)
Leche materna	Fenotipo Secretor	ELISA	Una vez durante el seguimiento	(+)	(-)
	IgA anti <i>Nv</i>	ELISA		(+)	(-)

[‡]: controles asintomáticos; se incluyen los ensayos que fueron realizados en todos los pacientes, independiente de su estado de infección. [‡]: (+): se realizó el ensayo en este grupo. [¶]: (-): No se realizó el ensayo en este grupo.

VIII-c-i.- Estudio etiológico en deposición (*Nv*, rotavirus, bacterias enteropatógenas) y caracterización de *Nv*:

Estudio etiológico en deposición: Se buscó *Nv* por reacción de polimerasa en cadena asociada a transcripción reversa (RT-PCR) específica para un segmento de la polimerasa viral

(14) y/o ELISA-9 valente (38) como ha sido descrito previamente. Rotavirus se determinó por ELISA (kit IDEIA rotavirus®, Oxoid, UK) y se buscaron bacterias enteropatógenas mediante coprocultivo corriente.

Genotipificación de *Nv*: Se extrajo RNA de deposiciones diluidas al 20% en PBS mediante QIAamp viral RNA mini kit® (QIAGEN, USA), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Luego se amplificó por RT-PCR un segmento del extremo 5' del gen de la cápside (dominio S) que es la zona más conservada de dicho gen y permite comparar con secuencias de referencia para realizar clasificación taxonómica. Para la amplificación se utilizó el kit Access-Quick de Promega que permite realizar RT y PCR en un solo paso, y partidores genogrupo específicos (G1SKF-G1SKR para genogrupo I y G2SKF-G2SKR para genogrupo II) descritos por Kojima y cols (39). Luego los productos de amplificación fueron purificados y enviados a secuenciar. Las secuencias fueron editadas y traducidas mediante el programa OMIGA 2.0 (Oxford Molecular, Madison, WI, USA). Las secuencias traducidas fueron alineadas junto con secuencias prototipo obtenidas a partir de la base de datos GenBank, se determinó la distancia genética entre las distintas variantes y se construyó un dendrograma utilizando el programa MEGA4 (40). Las secuencias con >50% de diferencias se consideraron como parte de distintos genogrupos, mientras que diferencias entre 20% y 50% definieron distintos genotipos (41). En algunas muestras en que no se pudo amplificar el segmento de la cápside, se envió a secuenciar el segmento de polimerasa obtenido mediante la RT-PCR de detección. La genotipificación en estos casos, se realizó comparando con secuencias de referencia para ese segmento, utilizando la misma metodología descrita más arriba para cápside.

Identificación de residuos potencialmente relevantes en la función de la proteína de la cápside de *Nv*: Se obtuvo RNA viral a partir de muestras de deposición del mismo modo como se describió en el punto anterior. Se realizó RT-PCR mediante distintos protocolos intentando amplificar el gen completo de la cápside viral. La amplificación del gen completo de la cápside (1,6kb) resultó técnicamente difícil, tal como se había descrito previamente por otros grupos (42). Para resolver este imprevisto se realizó un adiestramiento de 3 meses en

los laboratorios de los Dres. Jason Jiang, Cincinnati y Mary Estes, en Baylor College of Medicine, Houston.

En el laboratorio de la Dra. Estes, aprendí además a utilizar herramientas de bioinformática y el método de huella evolutiva para la identificación de residuos potencialmente relevantes desde el punto de vista estructural (residuos absolutamente conservados) y funcional (residuos específicos de clase) (43).

Para el análisis de secuencias locales, el primer paso fue realizar un alineamiento múltiple de las secuencias del dominio P de VP1 locales y otras de referencia, representativas de los distintos clusters genéticos conocidos actualmente, utilizando la herramienta ClustalW del programa MEGA4. El alineamiento en formato fasta y las coordenadas de la estructura cristalográfica de la variante VA387 de *Nv*, representativa del cluster genético GII.4 en formato PDB, fueron ingresados en el servidor “Evolutionary Trace Server” de la Universidad de Cambridge. Luego el servidor realizó alineamientos múltiples secuenciales de modo de comparar cada vez las secuencias con las genéticamente más cercanas. Se generó una secuencia de consenso representativa de cada “clase” genética (rama independiente generada en un dendrograma luego de una secuencia de alineamientos) y se comparó esta con las coordenadas cristalográficas de *Nv* VA387 de modo de identificar los residuos expuestos y ocultos en la estructura.

Finalmente se evaluaron en cuanto a sus propiedades físico-químicas los residuos que eran diferentes en las secuencias locales respecto de las secuencias de referencia y se ubicaron estos residuos en un modelo de la proteína de referencia VA387 mediante el software VMD 1.8.7 para visualizar su posible relación espacial con el bolsillo de unión a antígenos de grupo histosanguíneo y otros dominios de interés funcional.

VIII-c-ii.- Determinación fenotipo/genotipo Secretor, ABO y Lewis en lactantes y leche materna:

Fenotipo “Secretor”: las muestras de saliva y LM fueron centrifugadas a 10.000g por 10 minutos, incubadas a 100°C por 10 minutos y almacenadas a -70°C hasta su procesamiento. El entrenamiento en esta técnica y parte del procesamiento de estas muestras fue realizado en el laboratorio del Dr. Jason Jiang en Cincinnati, USA. Las muestras fueron descongeladas,

centrifugadas nuevamente a 10.000g por 5 minutos, se rescató el sobrenadante y se preparó dilución 1:1.000 en PBS. Para la detección de antígenos histosanguíneos, se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-H1/H2, -Le^a, -Le^b como se ha descrito previamente (28). Se consideró significativo un valor de OD₄₅₀ >0,2. Se definió fenotipo “No Secretor” como aquel en que se pudo evidenciar expresión de antígeno Lewis a, pero que carecía de antígeno H y Lewis b.

Genotipo FUT2: Como una forma de validar la técnica de ELISA para determinación de fenotipo y para evaluar el posible efecto sobre severidad del haplotipo de FUT2 (homocigoto *versus* heterocigoto), se realizó genotipificación en un subgrupo de lactantes. Las muestras de sangre o saliva fueron almacenadas sin procesamiento previo a -70°C hasta su transporte al laboratorio de la Dra. Mary Estes, Houston, USA. Se estudiaron 2 polimorfismos de nucleótido único (SNP) que han sido descritos como predominantes a nivel mundial. En uno de ellos, que es el más frecuente en población Caucásica, se sustituye una guanina por adenina en la posición 428, lo que condiciona la inactivación de la enzima fucosiltransferasa-2 (FUT2). En el segundo SNP, se sustituye una adenina por timina en la posición 385, lo que produce una disminución importante de actividad de la enzima; este último SNP predomina en población asiática.

Luego de extraer DNA genómico a partir de saliva o sangre total mediante QIAamp DNA minikit® (QIAGEN, CA, USA), se amplificó un segmento del gen FUT2 utilizando el par de partidores 5'-CCCATCTTCAGAATCACCCCTGCCGGTGCTG-3' y 5'-ATGGACCCCTACAAAGGTGCCCGGCCGGCT-3' y la enzima AmpliTaq (Applied Biosystem, CA, USA). Para determinar la presencia de los SNPs se tomaron 2µl de la reacción de PCR y se sometieron a ensayo de discriminación alélica por PCR en tiempo real con el sistema TaqMan SNP Genotyping® (Applied Biosystem, CA, USA) utilizando el protocolo sugerido por los proveedores y descrito previamente (44). Los individuos fueron clasificados de acuerdo a su haplotipo en: homocigotos *wild type* (wt), heterocigotos y homocigotos mutantes

Fenotipo Lewis/ABO: se evaluaron muestras de saliva mediante una técnica de ELISA similar a la descrita en el primer punto de esta sección, pero utilizando anticuerpos

monoclonales anti-Lewis a, Lewis b, -H1/H2, -A y -B, como se ha descrito previamente (28). Se consideró positivo un valor de OD₄₅₀ >0,2.

Genotipo FUT3 y ABO: con el objeto de validar la determinación de fenotipo y para evaluar el posible efecto de los haplotipos de FUT3 y ABO sobre severidad, se estudiaron las variantes más frecuentes de estos genes. Se extrajo DNA genómico obtenido de muestras de sangre y/o saliva mediante kit QIAamp DNA blood mini kit® (QIAGEN, USA).

Se realizó SSP-PCR (PCR con primers secuencia-específicos) buscando 5 tipos de SNPs para FUT3 (nt 59, 202, 314, 508 y 1067) de acuerdo al protocolo descrito por Grahn y cols (45). Para efectos de análisis los individuos fueron categorizados en 3 grupos: 1) aquellos homocigotos wt en todos los alelos (que potencialmente pueden expresar la enzima con su máxima actividad); 2) aquellos heterocigotos en al menos 1 de los alelos (que potencialmente expresarían una enzima con menor actividad); 3) aquellos homocigotos mutantes para al menos 1 de los alelos (su enzima sería inactiva).

Para el gen ABO, se buscaron 7 SNPs mediante SSP-PCR, que permitirían diferenciar las variantes O¹, O², A¹, A² y B, de acuerdo al protocolo señalado por Procter y cols (46).

En ambos ensayos se utilizaron como primers de control para determinación de presencia de DNA los partidores de hormona de crecimiento (sense: 5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TT-3' y antisense: 5'-TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C-3'). En las Tablas 2 y 3 se muestran los alelos estudiados y los partidores utilizados para FUT3 y ABO respectivamente.

Tabla 2. Primers utilizados en SSP-PCR para determinación de polimorfismos de enzima FUT3.

Alelo	Primer sense	Primer antisense
59 T wt	CGT TGT CTG GCC GCA CT	TTC TGG AGG GGA GAG GCT.
59 T>G	GTT GTC TGG CCG CAC GG	TTC TGG AGG GGA GAG GCT
202 T wt	CCC TCC TGA TCC TGC TAT G	TTC TGG AGG GGA GAG GCT
202 T>C	ACC CTC CTG ATC CTG CTA C	TTC TGG AGG GGA GAG GCT
314 C wt	GTA CCC ACA GGC AGA CAC G	TTC TGG AGG GGA GAG GCT
314 C>T	TGT ACC CAC AGG CAG ACA	TTC TGG AGG GGA GAG GCT
508 G wt	GAC ATC TTC ACG CCC TAC G	TTC TGG AGG GGA GAG GCT
508 G>A	GAC ATC TTC ACG CCC TAC A	TTC TGG AGG GGA GAG GCT
1067 T wt	CCA GAC GGT GCG CAG CAT	TTC TGG AGG GGA GAG GCT
1067 T>A	CCA GAC GGT GCG CAG CAA	TTC TGG AGG GGA GAG GCT

Tabla 3. Primers utilizados en SSP-PCR para determinación de polimorfismos de enzima ABO.

Locus	Primer sense	Posición	Primer antisense	Posición
O ¹	GGA AGG ATG TCC TCG TGG TA	nt 242-262	GGG CAC CGC AGT GAA CCT	nt 1018-1035
O ²	CGA TTT CTA CTA CCT GGG GA	nt 783-802	GGG CAC CGC AGT GAA CCT	nt 1018-1035
A ¹ , B, O ¹ , O ²	ATG TCT TCA CCG ACC AGC C	nt 449-467	GGG CAC CGC AGT GAA CCT	nt 1018-1035
A ² , A ¹⁽²⁾	TAT GTC TTC ACC GAC CAG CT	nt 448-467	GGG CAC CGC AGT GAA CCT	nt 1018-1035
A ²	TAT GTC TTC ACC GAC CAG CT	nt 448-467	CGG TTC CGG ACC GCC TG	nt 1045-1062
B	GAT TTC TAC TAC ATG GGG GC	nt 784-803	GGG CAC CGC AGT GAA CCT	nt 1018-1035
A ¹ , A ² , B, O ²	GAA GGA TGT CCT CGT GGT G	nt 243-261	CCA GCG CTT GTA GGC GCG	nt 526-543

VIII-c-iii.- Determinación de IgA anti-Nv: De acuerdo a estudios previos en voluntarios adultos expuestos a virus Norwalk (GI.1) y virus Snow Mountain (GII.2) el aumento de títulos de anticuerpos (específicamente IgA) frente a infección se produciría a partir del 10-14° día post exposición aproximadamente (32, 47). Por esta razón, y con el objeto de obtener una muestra que pudiéramos considerar representativa de la condición “pre-infección”, se evaluaron muestras de suero tomadas 7 días y 13 días desde la toma de muestra de deposición. Existen muy pocos estudios respecto a la presencia de IgA en LM y estos no han relacionado la presencia de inmunoglobulinas con infección. Por esta razón y de manera exploratoria, se tomaron muestras de LM luego de completados al menos 6 meses de lactancia materna predominante.

Se estudiaron mediante ELISA muestras de suero y LM diluidas 1:100 en leche descremada al 1% diluida en PBS. Se utilizaron como antígenos de captura 3 variantes de VLPs de Nv representativas de distintos genogrupos (Norwalk-GI.I, virus Mexico-GII.3 y VA207-GII.9) que fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Jason Jiang, Cincinnati, USA. Para la detección, se utilizaron anticuerpos de cabra anti-IgA humana conjugados con HRP diluidos 1:5.000. Se consideró positivo un valor de OD₄₅₀ >0,2 (48).

VIII-d.- Análisis estadístico: las variables fueron ingresadas en una base de datos mediante programa Excel. Para el análisis estadístico se utilizaron los programas Epiinfo 3.5.1 (CDC, Atlanta, USA) y el programa Stata 10.0 (StataCorp, Texas, USA). Las diferencias de mediana de las variables continuas fueron comparadas mediante test ANOVA. Para las variables discontinuas se calculó Chi cuadrado o Fisher, cuando el número de observaciones por categoría fuera menor de 5. Se consideró significativo un valor de p <0,05.

IX. Resultados.

IX-a. Identificación de *Nv* en paciente asintomáticos y con GE.

Se detectaron un total de 154 infecciones asintomáticas en 98 niños. Cincuenta y nueve pacientes tuvieron una infección asintomática y 39 tuvieron 2-5 episodios.

De un total de 159 episodios de GE, se obtuvo información epidemiológica, clínica y muestra de deposición en 103 casos, en 24 de los cuales (23,3%) se detectó *Nv*. En un episodio de GE se identificó co-infección de *Nv* y *Campylobacter sp.* *Nv* fue el agente etiológico más frecuentemente aislado, seguido por rotavirus (14 episodios) y *Yersinia enterocolitica* (4 episodios).

En la Tabla 4 se muestra la distribución de frecuencia de los casos de infección asintomática y GE por *Nv* en esta cohorte y en la Tabla 5 se muestran las características epidemiológicas de dichos episodios.

En 12/22 lactantes con GE por *Nv*, se identificaron uno o más episodios de infección asintomática en algún momento del seguimiento, de los cuales 3 tuvieron una GE seguido de infección asintomática y 9 tuvieron infección asintomática seguida de una GE (Tabla 4).

Los individuos con infección asintomática + GE por *Nv* tuvieron una edad significativamente menor al momento de su primer episodio, y esta asociación se vio predominantemente en varones comparado con los sujetos que cursaron sólo con infecciones asintomáticas o sólo con GE, independiente de que hayan tenido más de un episodio de infección (Tabla 5). Al comparar los grupos que presentaron GE con (N=9) y sin (N= 13) infección asintomática previa al episodio, no se encontraron diferencias significativas en las medianas de edad de la GE (8 y 10 meses respectivamente, $p=0,44$).

Se obtuvo información completa para generar score de severidad en 20/24 episodios de GE por *Nv*. La mediana de score de severidad fue 7 puntos (rango 3-17 puntos), con 11/20 (55%) casos leves y 9/20 (45%) casos moderados-severos.

Tabla 4. Frecuencia de infección por *Nv* en lactantes de 12 meses en una cohorte de la RM.

Tipo de infección	Nº de episodios	Nº de pacientes
Sólo episodios asintomáticos	1	55
	2	25
	3	5
	4	2
Sólo gastroenteritis	1	9
	2	1
Gastroenteritis/Asintomático	1/1	2
	2/1	1
Asintomático/Gastroenteritis	1/1	3
	2/1	4
	4/1	2

Tabla 5. Características de los lactantes en los que se demostró infección entérica por *Nv* durante un año de seguimiento.

	Infección Asintomática	Gastroenteritis	Infección asintomática + gastroenteritis
Nº de lactantes	86	10	12
Edad del 1º episodio (mediana)	6m	10m	4m [†]
Género (% varones)	55,5%	20,0%	90,9% [‡]
Nº individuos con 1 episodio	53	9	0
Nº individuos con >1 episodio	33	1	12
Nº episodios/individuo (mediana)	1	1	3
Máximo Nº episodios por individuo	4	2	5

[†]: diferencia significativa respecto a mediana de edad gastroenteritis; p=0,005.

[‡]: diferencia significativa respecto a grupo infección asintomática y gastroenteritis; p=0,005.

IX-b. Factores del hospedero potencialmente relacionados con susceptibilidad frente a infección por *Nv*. Estudio de fenotipo/genotipo “Secretor” y ABO.

Se contó con muestra de saliva para estudio fenotipo/genotipo Secretor en 121/166 lactantes, incluyendo 17 de los 22 que presentaron GE por *Nv*. El 14% de los individuos estudiados tuvo fenotipo/genotipo “No Secretor”, similar a lo descrito previamente en la literatura (27).

Como una forma de validar la técnica de ELISA para determinación de fenotipo y para conocer el haplotipo frente a los SNPs más frecuentes de la enzima FUT2, se realizó genotipificación en un subgrupo de lactantes (67 individuos de la cohorte y 17 lactantes del estudio paralelo de GE endémica). Hubo un 100% de correlación entre la determinación de fenotipo (ELISA) y genotipo (PCR en tiempo real) en los individuos “Secretores” y en sólo 1/9 individuos “No Secretores” hubo discrepancia (fenotipo “No Secretor” y genotipo heterocigoto para el alelo 428 y homocigoto wt para el alelo 385, individuo no infectado por *Nv*). Este último caso podría explicarse por la presencia de otro SNP de FUT2 que produjera la inactivación de la enzima (“No Secretor”) o una mala calidad de la muestra de saliva, que no hubiera permitido la detección de antígenos por ELISA.

En la Tabla 6 se muestra la distribución de fenotipo “Secretor” en pacientes con distinto status de infección por *Nv*. La proporción de individuos “Secretores” fue significativamente mayor en los lactantes con infección por *Nv* comparado con aquellos en que no se detectó infección por este agente durante el seguimiento (91% *versus* 75% respectivamente; $p=0,03$; RR 3,52, IC 95%: 1,1-11,5). La proporción de lactantes con fenotipo “Secretor” presentó una tendencia, aunque sin alcanzar significancia estadística, a ser mayor entre los sujetos con GE por *Nv* *versus* no infectados (94% *versus* 75% respectivamente; $p=0,14$, RR 3,83, IC 95%: 0,57-25,84).

Todos los individuos en que se estudió genotipo FUT2 fueron homocigotos wt para el alelo 385 del gen. El 38% de los lactantes fue homocigoto wt para el alelo 428, 52% fueron heterocigotos y 10% fueron homocigotos mutantes (genotipo “No Secretor”). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al riesgo de infección entre los distintos haplotipos del alelo 428 (Tabla 6).

En 90/104 individuos “Secretores”, se estudió fenotipo ABO mediante ELISA y en un subgrupo de estos lactantes se estudió también genotipo ABO. En general se encontró una buena correlación entre fenotipo y genotipo ABO. Sólo 4 individuos grupo O por fenotipo (3 asintomáticos y 1 no infectado) debieron ser reclasificados a grupo A, debido a que su genotipo era heterocigoto A2O1, portando un alelo de baja actividad para la enzima A (A2) y un alelo inactivo (O1), lo que podría explicar la ausencia de detección de antígeno A por ELISA. La distribución de fenotipo ABO fue similar en individuos con y sin infección por *Nv* durante el seguimiento ($p > 0,05$, Tabla 6).

Tabla 6.- Frecuencia de fenotipo secretor, haplotipo alelo 428 de FUT2 y fenotipo/genotipo ABO en una cohorte de lactantes de la Región Metropolitana según status de infección por *Nv*.

Característica del hospedero		Total estudiados	No infectados	Infectados	RR (IC95%)	p
Fenotipo Secretor	Secretor (%)	104	30 (29)	74 (71)	3,52 (1,1-11,5)	0,03
	No secretor (%)	17	10 (59)	7 (41)		
	Total estudiados	121	40	81		
Haplotipo FUT2 alelo 428	SeSe (GG) (%)*	32	6 (19)	26 (81)	0,94 (0,77-1,15) [†]	0,77
	Sese (GA) (%)**	44	6 (14)	38 (86)	0,75 (0,18-3,40) [‡]	0,65
	sese (AA) (%)***	8	2 (25)	6 (75)	0,55 (0,13-2,25) [§]	0,59
	Total estudiados	84	14	70		
	Fenotipo/Genotipo ABO	A (%)	39	12 (31)	27 (69)	1 (0,74-1,34) [¶]
	B (%)	11	3 (27)	8 (73)	1,08 (0,71-1,64) [±]	1
	AB (%)	1	0	1		
	O (%)	39	12 (31)	27 (69)		
	Total estudiados	90	27	63		

*: homocigoto wt. **: heterocigoto. ***: homocigoto mutante. †: comparación SeSe *versus* Sese. ‡: comparación SeSe *versus* sese. §: comparación Sese *versus* sese. ¶: comparación A *versus* O. ±: comparación B *versus* O.

IX-c. Factores potencialmente relacionados con severidad del cuadro clínico en infección por *Nv*:

IX-c-i. Fenotipo Secretor: Se determinó fenotipo Secretor mediante ELISA en 81 lactantes de la cohorte y 29 lactantes del estudio de diarrea endémica con infección por *Nv*. En la Tabla

7 se muestra la distribución de fenotipos según presentación clínica. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de fenotipo “Secretor” al comparar GE por *Nv* *versus* infección asintomática ni GE moderada-severa *versus* GE leve (Tabla 7).

IX-c-ii. Genotipo FUT2: Se realizó genotipificación de FUT2 en 53 muestras de lactantes de la cohorte que cursaron con infección por *Nv* durante el seguimiento, buscando SNPs de los nucleótidos 385 y 428. De las 53 muestras analizadas, sólo 12 fueron de lactantes con GE por *Nv*, lo que resultó insuficiente para realizar una evaluación del posible efecto de estos SNPs en la severidad del cuadro clínico. Por esta razón y como se explicó previamente, se incluyeron 17 lactantes del estudio paralelo de GE endémica por *Nv* (19).

Todos los lactantes evaluados resultaron ser homocigotos para el alelo wt en la posición 385. La distribución de genotipos para el alelo 428 de dichos pacientes se muestra en la Tabla 7. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de haplotipos al comparar lactantes con y sin síntomas. Se encontró una menor frecuencia de heterocigotos en el grupo con diarrea moderada-severa respecto a asintomáticos y diarrea leve, sin embargo no alcanzó significancia estadística ($p=0,48$ y $0,45$ respectivamente)

IX-c-iii. Fenotipo/Genotipo ABO: Se contó con muestra de saliva para estudio de fenotipo ABO en 63/74 lactantes con fenotipo “Secretor” y que cursaron con infección por *Nv* durante el seguimiento, incluidos 49 niños con infección asintomática y 14 con GE. Para aumentar el poder estadístico, se incluyeron en el análisis 24 lactantes con GE del estudio paralelo previamente mencionado (19). Un subgrupo de estos pacientes fueron estudiados para genotipo ABO, confirmándose el resultado de fenotipo, excepto los 3 casos asintomáticos mencionados más arriba, que fueron reclasificados.

No se encontraron diferencias significativas en la distribución de dichos fenotipos entre los lactantes con infección asintomática y aquellos con GE por *Nv*, ni en la comparación de los individuos con GE moderada-severa *versus* GE leve ($p > 0,05$, Tabla 7).

Tabla 7.- Frecuencia de fenotipo secretor, haplotipo alelo 428 de FUT2 y fenotipo/genotipo ABO en una cohorte de lactantes de la Región Metropolitana según sintomatología de infección por *Nv*.

Característica del hospedero		Infectados				RR (IC 95%)	p
		Total	Asintomáticos	GE leve	GE moderada-severa		
Fenotipo Secretor	Secretor (%)	100	54 (54)	19 (19)	27 (27)	1,53 (0,58-4,05) [†]	0,5
	No secretor (%)	10	7 (70)	1 (10)	2 (20)	0,88 (0,38-2,03) [‡]	1
	Total estudiados	110	61	20	29		
Haplotipo FUT2 alelo 428	SeSe (GG) (%) [*]	26	14 (54)	6 (23)	6 (23)	1,68 (0,59-4,75) ^Ω	0,48
	Sese (GA) (%) ^{**}	38	23(61)	10 (26)	5 (13)	1,27 (0,72-2,22) [§]	0,58
	sese (AA) (%) ^{***}	6	4 (67)	1 (16)	1 (16)	1,50 (0,60-3,74) [¶]	0,45
	Total estudiados	70	41	17	12		
Fenotipo/genotipo ABO	A (%)	41	23 (56)	6 (15)	12(29)	0,96 (0,58-1,58) [±]	0,94
	B (%)	10	6 (60)	3 (30)	1 (10)	1,07 (0,65-1,76)	0,91
	AB (%)	1	1	0	0	0,88 (0,38-2,03)	1
	O (%)	35	19 (54)	6 (17)	10 (29)	0,40 (0,07-2,28)	0,28
	Total estudiados	87	49	15	23	1,08 (0,67-1,75)	0,92
					1,06 (0,63-1,77) [⊖]	0,90	

*: homocigoto wt. **: heterocigoto. ***: homocigoto mutante. †: comparación GE total *versus* asintomáticos. ‡: comparación GE moderada-severa *versus* GE leve. Ω: comparación SeSe y Sese en GE moderada-severa *versus* asintomáticos. §: comparación SeSe y Sese en GE total *versus* asintomáticos. ¶: comparación SeSe y Sese en GE moderada-severa *versus* GE leve. ±: comparación A *versus* O en GE total *versus* asintomáticos. : comparación A *versus* O en GE moderada-severa *versus* GE leve. : comparación B *versus* O en GE total *versus* asintomáticos. Comparación B *versus* O en GE moderada-severa *versus* GE leve. : comparación O *versus* no-O en GE total *versus* asintomáticos. ⊖: comparación O *versus* no-O en GE moderada-severa *versus* GE leve.

IX-c-vi. Genotipo FUT3: Se analizaron 30 muestras de la cohorte (6 niños con GE por *Nv* y 24 asintomáticos) y 15 muestras de pacientes con GE por *Nv* del estudio de diarrea endémica mencionado previamente (19).

La Tabla 8 muestra la distribución de haplotipos para FUT3 de los pacientes según severidad del cuadro clínico.

Tabla 8. Distribución de genotipos de FUT3 identificados en una cohorte de lactantes chilenos de acuerdo a sintomatología de infección por *Nv*.

	Total	Asintomático	GE leve	GE mod-severa	RR (IC 95%) homocigoto wt <i>versus</i> heterocigoto	p
Total lactantes evaluados	45	24	8	13		
Homocigoto wt para todos los alelos	12	9 (75)	1 (8)	2 (17)	0,42 (0,11-1,59) [‡]	0,25
Heterocigoto al menos en 1 alelo	30	13 (43)	7 (23)	10 (33)	1,13 (0,46-2,77) [‡]	1
Homocigoto mutante en al menos 1 alelo	3	2 (67)	0	1 (33)		

[‡]: comparación GE moderada-severa *versus* asintomáticos. [‡]: comparación GE moderada-severa *versus* GE leve.

Si bien, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la distribución de haplotipos según presentación de síntomas, se observó una tendencia al comparar el grupo de asintomáticos con GE total, siendo más frecuente los heterocigotos para al menos 1 alelo en este último grupo (p=0,12, Figura 2).

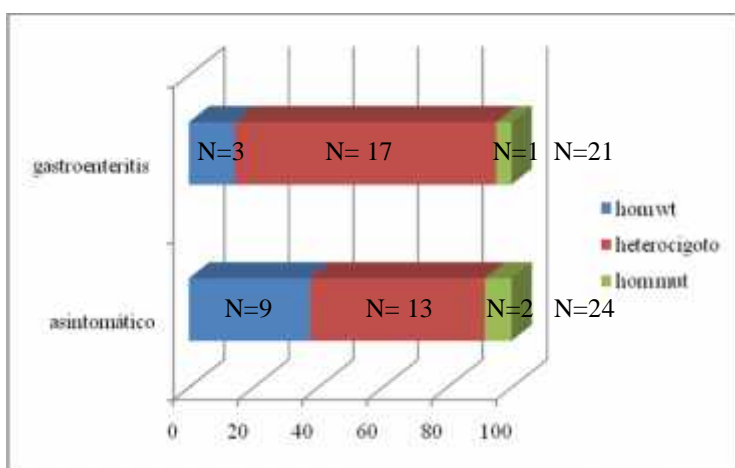


Figura 2.- Distribución de genotipo FUT3 en lactantes con infección asintomática y gastroenteritis por *Nv*.

IX-c.v. Niveles basales de IgA anti-*Nv*:

Sólo en 16 y 41 episodios de infección por *Nv* (de un total de 178) se obtuvo muestra de sangre antes de completar 1 y 2 semanas desde la toma de muestra de deposición respectivamente. Para aumentar el número de pacientes con GE, se incluyeron 19 pacientes del estudio de diarrea endémica (19). En la Tabla 9 se muestra la distribución de muestras con y sin detección de IgA anti-*Nv* basal.

Tabla 9. Proporción de muestras séricas con y sin anticuerpos anti-VLPs de *Nv* representativas de distintos genogrupos virales.

	VLP utilizada	Total		Asintomático		GE leve		GE moderada-severa	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
IgA anti <i>Nv</i> pre-infección (7 días)	<i>Nv</i> GI.1 (%) [†]	0	35	0	13 (37)	0	14 (40)	0	8 (23)
	<i>Nv</i> GII.3 (%)	6	29	2 (33)	11 (38)	3 (50)	11 (38)	1 (17)	7 (24)
	<i>Nv</i> GII.9 (%)	8	27	4 (50)	9 (33)	3 (38)	11 (41)	1 (12)	7 (26)
IgA anti <i>Nv</i> pre-infección (13 días)	<i>Nv</i> GI.1 (%)	0	60	0	33 (55)	0	18 (30)	0	9 (15)
	<i>Nv</i> GII.3 (%)	7	53	3 (43)	30 (57)	3 (43)	15 (28)	1 (14)	8 (15)
	<i>Nv</i> GII.9 (%)	17	43	12 (71)	21 (49)	3 (18)	15 (35)	2 (12)	7 (16)

[†]: % respecto a total de muestras (+) o (-).

Se encontró una tendencia hacia menor proporción de GE total y GE moderada-severa en el grupo de pacientes con presencia de IgA *versus* aquellos en que no se detectó IgA anti-*Nv* (especialmente anti GII.9), sin embargo esta diferencia no alcanzó significancia estadística (Tabla 9) (IgA 7 días: RR 0,7; IC95% 0,36-1,58; p=0,43 al comparar GE total *versus* asintomáticos y RR 0,46; IC95% 0,07-2,88; p=0,6 al comparar GE moderada-severa *versus* asintomáticos) (IgA 13 días: RR 0,57; IC95% 0,26-1,27; p=0,21 al comparar GE total *versus* asintomáticos y RR 0,57; IC 95% 0,14-2,40; p=0,69 al comparar GE moderada-severa *versus* asintomáticos).

IX-c-vi. Estudio de fenotipo histosanguíneo e IgA en leche materna:

El 79% de los niños recibieron lactancia materna (LM) hasta al menos los 6 meses de vida. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de infección por *Nv* ni en la presentación de síntomas en lactantes con y sin LM por al menos 6 meses (p=0,83 y 0,35 respectivamente; Figuras 3 y 4).

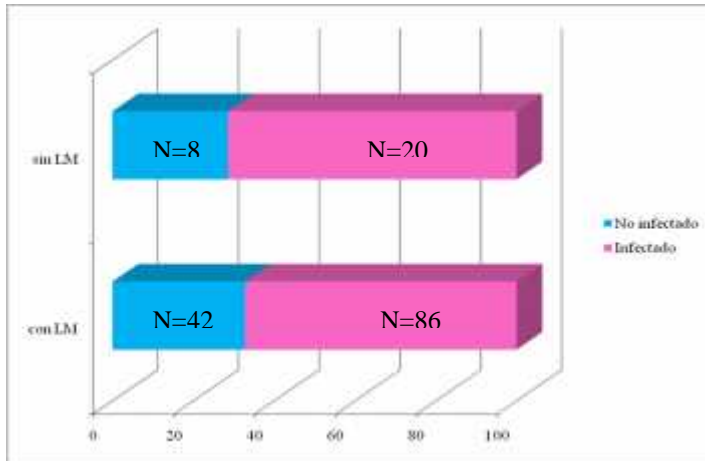


Figura 3.- Proporción de lactantes infectados y no infectados de acuerdo a tipo de alimentación.

(sin LM= no recibió lactancia materna por al menos 6 meses; con LM= recibió lactancia materna por al menos 6 meses).

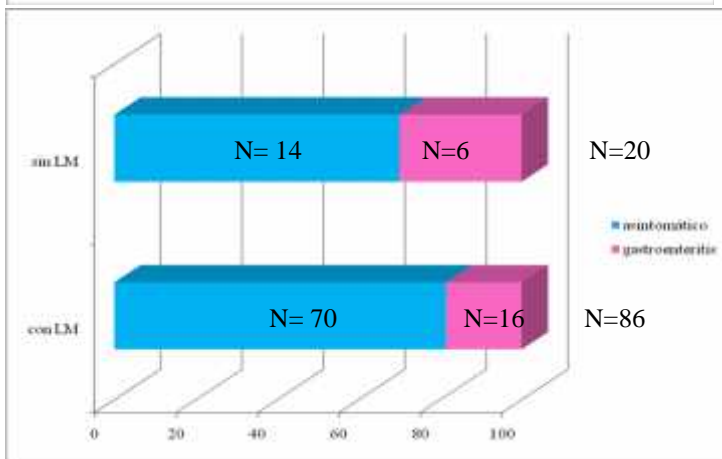


Figura 4.- Proporción de lactantes infectados por Nv con y sin síntomas de acuerdo a tipo de alimentación

(sin LM= no recibió lactancia materna por al menos 6 meses; con LM= recibió lactancia materna por al menos 6 meses).

Se determinó fenotipo secretor en 97 muestras de saliva de madres de la cohorte, incluyendo 19 muestras de madres que no dieron lactancia por el tiempo previamente señalado y 78 madres que sí lo hicieron. Adicionalmente se evaluó fenotipo secretor mediante ELISA en LM de madres que hubieran dado lactancia por al menos 6 meses. Se encontró un 100% de correlación entre la determinación de fenotipo secretor en saliva y LM.

El 89% de las madres que no dieron LM por al menos 6 meses tuvieron fenotipo “Secretor”, comparado con 76% de las madres que dieron LM prolongada ($p=0,23$).

Al considerar sólo al grupo de lactantes que recibieron LM por al menos 6 meses, se encontró una frecuencia similar de infección por Nv en hijos de madres “Secretoras” y “No Secretoras” ($p=0,96$; Figura 5).

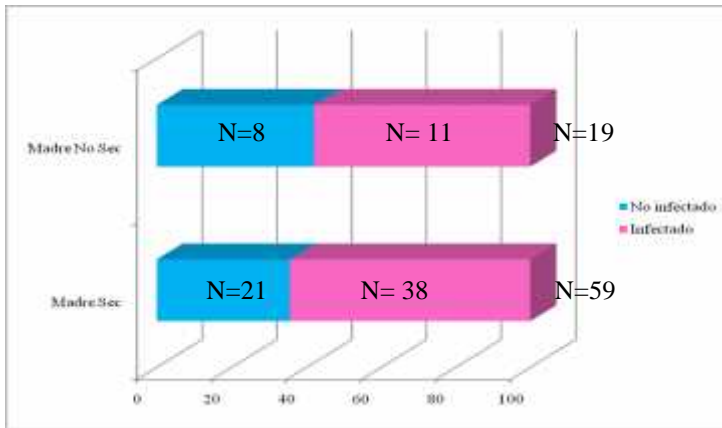


Figura 5.- Distribución porcentual de lactantes con y sin infección por *Nv* según fenotipo Secretor de la madre (N: número de lactantes por grupo).

Al comparar la presentación clínica de lactantes hijos de madres “Secretoras” y “No Secretoras”, se evidenció una proporción significativamente mayor de infección asintomática por *Nv* en el grupo que recibió LM de madres “Secretoras” ($p=0,036$; Figura 6).

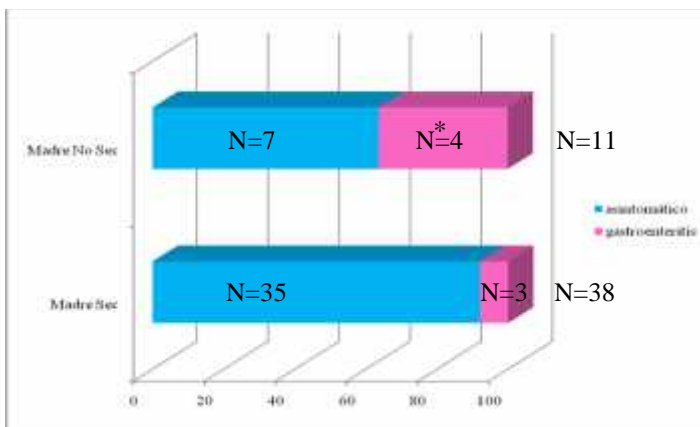


Figura 6.- Distribución porcentual de lactantes infectados por *Nv* con y sin síntomas según fenotipo Secretor de la madre (N: número de lactantes por grupo) (*: $p=0,036$).

Se determinó presencia de IgA anti *Nv* en 85 muestras de LM, de las cuales 82 fueron positivas para al menos 1 anticuerpo. En la Tabla 10 se muestra la distribución de muestras positivas para IgA anti-VLPs de los virus Norwalk, México y VA207 según estado de infección por *Nv* y presentación clínica.

La proporción de muestras de LM con IgA específica contra virus representativos del genogrupo II (México y VA207), fue significativamente mayor que aquella con IgA anti-Norwalk (genogrupo I) ($p<0,05$, Tabla 10). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al riesgo de infección entre pacientes alimentados con LM con y sin IgA detectable por nuestro método.

La proporción de pacientes con cuadro sintomático fue significativamente menor en aquellos alimentados con LM con IgA anti-virus México (RR: 0,21; IC95%: 0,06-0,74; p=0,04). No se encontraron diferencias en la frecuencia de cuadros sintomáticos ni severidad para los otros anticuerpos.

Tabla 10.- Distribución de muestras de LM con presencia de IgA contra 3 tipos de *Nv* según presentación clínica.

Tipo de anticuerpo	Total	N° de lactantes con IgA indicada			
		No Infectados	Infectado		
			Total	Asintomático	GE total
Total de muestras analizadas	85	33	52	45	7
IgA anti-Norwalk (GI.1) (%)	53 ^{†,‡}	17 (32)	36 (68)	32 (60)	4 (8)
IgA anti-México (GII.3) (%) [¶]	74	29 (39)	45 (61)	41 (55)	4 (6)
IgA anti-VA207 (GII.9) (%)	78	30 (38)	48 (62)	42 (54)	6 (8)

[†]: p=0,00004; comparación presencia IgA anti virus Norwalk *versus* virus México. [‡]: p=0,0001; comparación presencia IgA anti virus Norwalk *versus* virus VA207. [¶]: p=0,04; comparación asintomáticos *versus* GE total.

Luego se realizó un análisis cruzado de fenotipo secretor y presencia de anticuerpos en leche materna que se muestra en las Tabla 11. Una proporción importante tanto de las madres secretoras como de las no secretoras presentaron IgA específica en su leche, lo que sugiere que las madres no secretoras pudieran haber sido infectadas por *Nv* previamente. No se encontraron diferencias en el riesgo de enfermar ni presentación clínica entre los niños alimentados con leche de madres secretoras y no secretoras con y sin IgA (datos no mostrados).

Tabla 11. Presencia de IgA anti-*Nv* (dirigida contra 3 variantes virales) en leche de madres secretoras y no secretoras.

	N° (%) de madres con presencia de IgA		P
	Secretora	No Secretora	
Total	56	16	
IgA anti-Norwalk (GI.1)	36 (64)	8 (50)	0,45
IgA anti-México (GII.3)	51 (91)	12 (75)	0,10
IgA anti-VA207 (GII.9)	49 (88)	16 (100)	0,33

IX-c-vi. Relación entre genotipo viral y severidad del cuadro clínico:

Se amplificaron y secuenciaron exitosamente 35 muestras de infecciones asintomáticas y 9 de episodios de GE de la cohorte. Se incluyeron además en el análisis 25 secuencias obtenidas de GE en lactantes 1 año del estudio de infección endémica por *Nv* (19). En la Tabla 12 se muestra la distribución de genotipos virales según presentación clínica (se excluyó 1 secuencia de paciente asintomático por tener >99% de identidad con la secuencia detectada el mes previo en el mismo niño y considerarse por ello una probable excreción prolongada).

Tabla 12. Genotipos de *Nv* aislados de lactantes chilenos con IE con distinto grado de severidad.

Genogrupo	Total secuencias (%)	Asintomático (%)	Gastroenteritis		
			Total (%)	Leve (%)	Moderada-Severa (%)
Total	68	34	34	12	22
GI.1	2 (3)	2 (6)	0	0	0
GI.3	1 (1)	0	1 (3)	1 (8)	0
GI.5	2 (3)	1 (3)	1 (3)	1 (8)	0
GII.2	3 (4)	3 (9)	0	0	0
GII.4	54 (79)	23 (68)	31 (92)	10 (83)	21 (95)
GII.6	1 (1)	1 (3)	0	0	0
GII.9	1 (1)	1 (3)	0	0	0
GII.13	2 (3)	2 (6)	0	0	0
GII.14	2 (3)	1 (3)	1 (3)	0	1 (5)

Se evidenció una mayor diversidad de genotipos en pacientes asintomáticos que en GE (Tabla 12). GII.4 fue por lejos el genotipo predominante, siendo mayor su frecuencia en pacientes con GE que en casos asintomáticos (91% y 68% respectivamente; $p=0,035$; Tabla 12, Figura 7). Solo 3/35 secuencias de pacientes asintomáticos y 2/34 de episodios de GE correspondieron a genogrupo I.

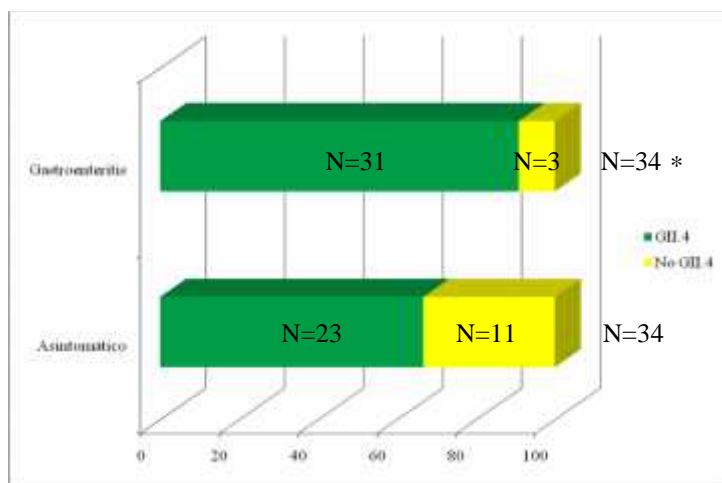


Figura 7. Proporción de lactantes infectados por *Nv* GII.4 versus otros genogrupos según presentación clínica ($p=0,035$).

Si bien, se observó una mayor proporción de variantes GII.4 en los pacientes con GE de mayor severidad al compararlos con los cuadros leves, esta diferencia no alcanzó significancia estadística ($p=0,27$; Figura 8).

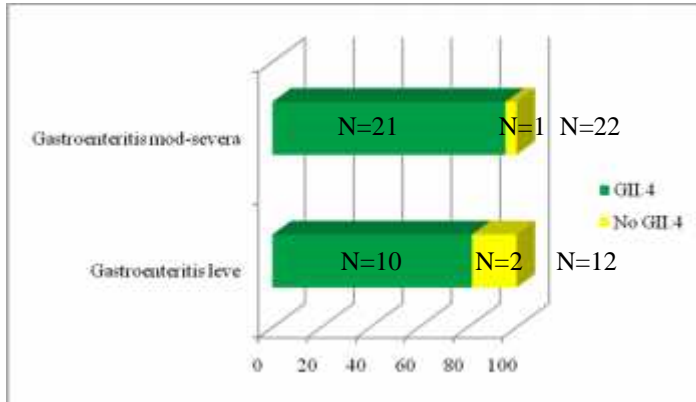
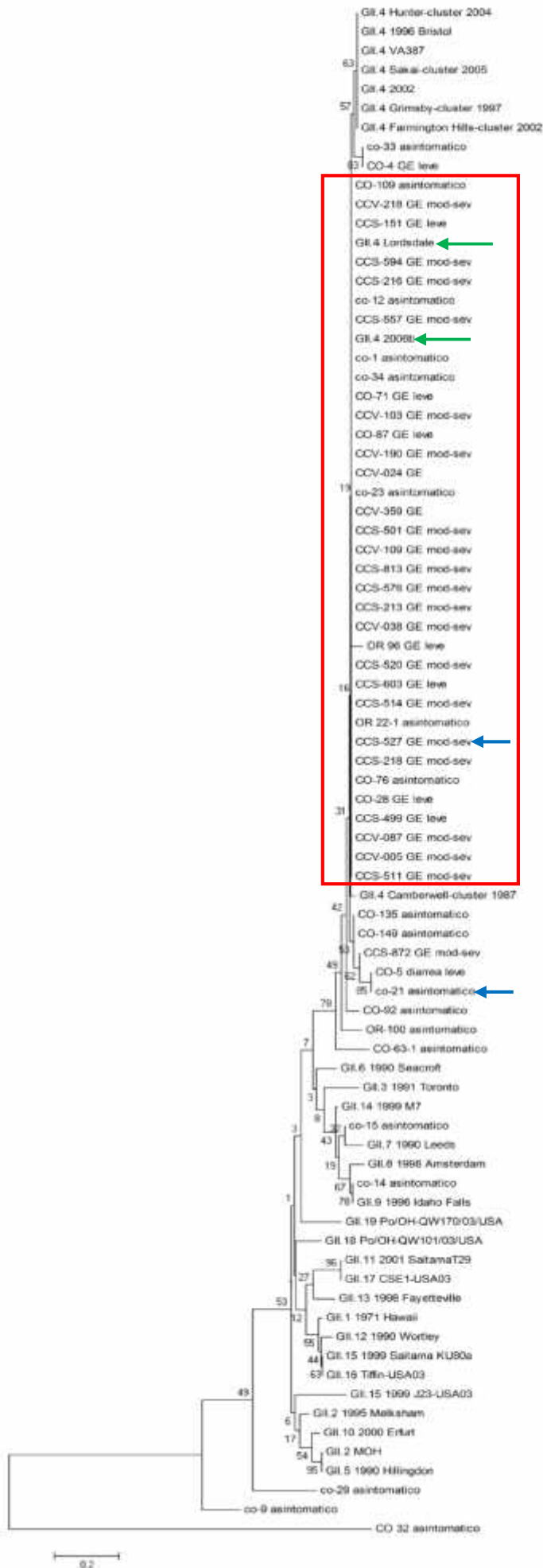


Figura 8.- Proporción de pacientes afectados por variante GII.4 *versus* otras variantes según severidad del cuadro.

Considerando que la mayoría de las variantes locales pertenecieron al genogrupo II, se realizó una comparación más exhaustiva de este grupo. En la Figura 9 se muestra un dendrograma que incluye secuencias de referencia de los 19 genotipos descritos hasta ahora en el genogrupo II y secuencias locales. Como se puede apreciar en la figura, y se mencionó anteriormente, la mayor parte de las secuencias locales se agruparon en el genotipo GII.4. La mayoría (70%) de las secuencias locales clasificadas como GII.4, mostraron 100% de identidad en el segmento analizado (dominio S de la cápside) con las secuencias de referencia GII.4 Lordsdale, que se describió como predominante en la década de los 80' y GII.4 2006b que fue la predominante a nivel mundial durante el período de estudio (2007-2008) (36). Sólo el 20% de las secuencias agrupadas en este cluster genético fueron aisladas de lactantes asintomáticos, 26% fueron de pacientes con GE leve y 54% de pacientes con GE moderada-severa, mientras que de las secuencias que se clasificaron fuera de este cluster el 80% fueron de pacientes asintomáticos, 13% de GE leve y 7% de GE moderada-severa ($p=0,0002$ para la comparación GE total *versus* asintomáticos y $p=0,00009$ para Chi cuadrado de tendencia comparando GE moderada-severa *versus* GE leve y asintomáticos).



Dos secuencias obtenidas de individuos “No Secretores” (uno asintomático y uno con GE) también se agruparon en GII.4. Una de ellas, identificada en un niño con GE (SU527), tuvo un 100% de identidad con las variantes Lordsdale y 2006b, siendo que clásicamente estas han sido descritas solo en individuos “Secretores”. La otra secuencia, aislada de un lactante con infección asintomática (CO-21), tuvo una identidad de 93% con las secuencias de referencia antes mencionadas (Figura 9).

Figura 9. Dendrograma que muestra las distancias genéticas entre variantes locales y secuencias de referencia representativas de los 19 genotipos descritos hasta ahora en el genogrupo II. Enmarcado en rojo se destacan las secuencias locales con 100% de identidad con los *Nv* de referencia GII.4 Lordsdale y GII.4 2006b (marcados con flecha verde). Con flecha azul, se marcan las secuencias locales identificadas en individuos “No secretores”. Junto al código de cada secuencia local se explicita si fue aislada de individuo asintomático, con GE leve o GE moderada-severa (GE mod-sev).

Con el objetivo de determinar si los pacientes que tuvieron varias detecciones de *Nv* durante el seguimiento sufrieron reinfecciones o se trataba de excreción viral prolongada, y si estas variantes virales eran de genotipos diferentes a las de pacientes con infección única, se analizaron las secuencias de aisladas de 6 lactantes con más de una detección viral. En la Tabla 13 se muestran las variantes virales encontradas. En 2 pacientes, uno de ellos con fenotipo “No Secretor” (Colina-21 y Colina-37) se identificaron virus de genotipo diferente lo que sugiere una reinfección; en 2 pacientes (colina-63 y Colina-126) se identificaron virus del mismo genotipo y con identidad genética alrededor de 99%, lo que sugiere una excreción prolongada; en 1 paciente (Colina-32) se identificaron 2 variantes virales con >99% de identidad genética separadas por varias muestras negativas, lo que podría ser explicado por una excreción prolongada con períodos de carga viral menor al umbral de detección de la RT-PCR utilizada en este estudio (aproximadamente 10^4 copias virales) o una re-infección por una variante similar a la previa; finalmente en 1 paciente (Colina-119) se identificaron 4 variantes virales, todas pertenecientes al mismo genotipo (GII.4), pero con una distancia entre ellas >10% lo que sugiere una re-infección.

Tabla 13.- Genotipos virales encontrados en lactantes con >1 detección de *Nv* en deposición durante el seguimiento.

N° de paciente	Genotipo viral									% identidad [†]	Tipo probable de infección por <i>Nv</i>
Colina-21	GII.4	GII.2								42	Reinfección ast (No Secretor)
Colina-32	GII.4	(-)	(-)	(-)	(-)	GII.4				99,5	Reinfección ast? <i>versus</i> infección persistente?
Colina-37	GII.2	(-)	(-)	(-)	(-)	GII.4				67	Reinfección ast
Colina-63	GII.4	GII.4								99	Infección ast con excreción prolongada
Colina-119	GII.4	(-)	(+)	(-)	GII.4	GII.4	(+)	(-)	GII.4	81, 75,76	Reinfecciones
Colina-126	GI.5	GI.5 [‡]								100	Infección ast con excreción prolongada + GE de otra etiología

N° mes desde primera detección

[†]: porcentaje de identidad genética respecto a la variante identificada inicialmente. [‡]: 11 días de diferencia entre las 2 muestras.

 : infección asintomática. : gastroenteritis.

IX-c-vii. Resumen de factores potencialmente relacionados con susceptibilidad y severidad del cuadro clínico (análisis integrado):

En las Tabla 14 y 15 se muestra un resumen de los riesgos relativos de los factores del hospedero y del agente posiblemente relacionados con susceptibilidad y presencia de síntomas (severidad) respectivamente. Se presentan los riesgos relativos para el grupo total de pacientes infectados y para aquellos con infección por la variante GII.4. Se marcan en negrita aquellos factores que alcanzaron significancia estadística.

Tabla 14. Riesgo relativo para infección por *Nv* de los distintos factores evaluados en este estudio para el total de lactantes y para aquellos infectados por GII.4.

	RR (IC 95%) grupo total	p	RR (IC 95%) grupo infectado por variante GII.4	p
Fenotipo Secretor [†]	3,52 (1,10-11,5)	0,003	2,36 (0,86-6,53)	0,07
Homocigoto wt 428 gen FUT2 [‡]	0,94 (0,77-1,15)	0,77	1,2 (0,53-2,76)	1
Fenotipo O [¶]	0,98 (0,75-1,29)	0,92	1,02 (0,64-1,65)	0,88
Alimentación con LM [*]	0,94 (0,72-1,22)	0,83	0,95 (0,40-2,29)	1
Fenotipo Secretor en LM ^{**}	1,11 (0,73-1,71)	0,81	0,98 (0,37-2,60)	1
Presencia de IgA anti GII.3 en LM ^{***}	0,96 (0,59-1,55)	1	ND	0,55
Presencia de IgA anti GII.9 en LM ^{***}	1,08 (0,55-2,09)	1	ND	1

†: comparado con No Secretor. ‡: comparado con heterocigoto 428 gen FUT2. ¶: comparado con fenotipo no O. *: comparado con ausencia de alimentación con LM por al menos 6 meses. **: comparado con alimentación con LM de madres No Secretoras. ***: comparado con ausencia de anticuerpos en LM contra esa variante viral. ND: RR no determinado porque uno de los valores de la Tabla para cálculo de Chi cuadrado/Fisher fue = 0.

Tabla 15. Riesgo relativo para cuadro sintomático (GE total *versus* asintomáticos) de los distintos factores evaluados en este estudio para el total de lactantes y para aquellos infectados por GII.4.

	RR (IC 95%) grupo total	p	RR (IC 95%) grupo infectado por variante GII.4	p
Fenotipo Secretor [†]	1,66 (0,23-9,78)	1	2,03 (0,40-10,23)	0,27
Homocigoto wt 428 gen FUT2 [‡]	1,17 (0,66-2,07)	0,78	1,5 (0,35-6,41)	1
Fenotipo O [¶]	1,08 (0,67-1,75)	0,92	0,56 (0,34-0,91)	0,05
Homocigotos wt FUT3	0,44 (0,16-1,23)	0,12	ND	
Presencia de IgA anti GII.3*	1,07 (0,57-2,02)	1	ND	
Presencia de IgA anti GII.9*	0,7 (0,34-1,45)	0,45	0,75 (0,27-2,05)	0,68
Alimentación con LM**	0,62 (0,28-1,38)	0,35	0,7 (0,22-2,21)	0,61
Fenotipo Secretor en LM***	0,22 (0,06-0,83)	0,036	0,42 (0,09-1,94)	0,32
Presencia de IgA anti GII.3 en LM	0,21 (0,06-0,74)	0,04	ND	
Presencia de IgA anti GII.9 en LM	0,5 (0,08-3,2)	0,44	ND	
Infección por <i>Nv</i> GII.4	2,78 (0,98-7,86)	0,031	--	--

†: comparado con No Secretor. ‡: comparado con heterocigoto 428 gen FUT2. ¶: comparado con fenotipo no O. : comparado con heterocigotos gen FUT3. *: comparado con ausencia de la IgA específica, detección 7 días. **: comparado con ausencia de alimentación con LM por al menos 6 meses. ***: comparado con alimentación con LM de madres No Secretoras. : comparado con ausencia de IgA específica en LM. : comparado con infección por variantes virales no GII.4. ND: RR no determinado porque uno de los valores de la Tabla para cálculo de Chi cuadrado/Fisher fue = 0.

IX-d.- Estudio de residuos potencialmente relevantes del dominio P de la proteína VP1 (cápside viral):

La cápside viral está formada por la proteína VP1 que contiene 2 dominios principales, el dominio S (Shell) que forma la cubierta propiamente tal y el dominio P (Protruding), que protruye desde la superficie viral hacia el exterior. El dominio P, se divide a su vez en subdominio P1 que forma el tallo de la espiga del dominio P, que se ha propuesto tendría relevancia antigénica y el subdominio P2 que se encuentra en el extremo del dominio P y contiene el bolsillo de interacción con los antígenos ABH-Lewis (Figura 10) (43, 49, 50).

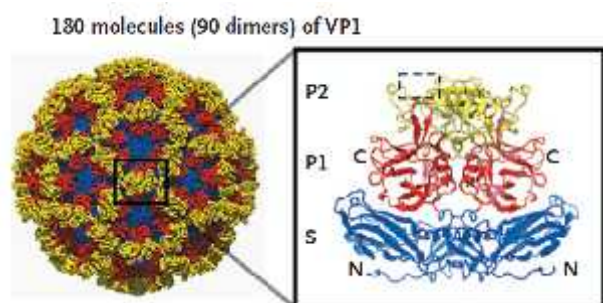
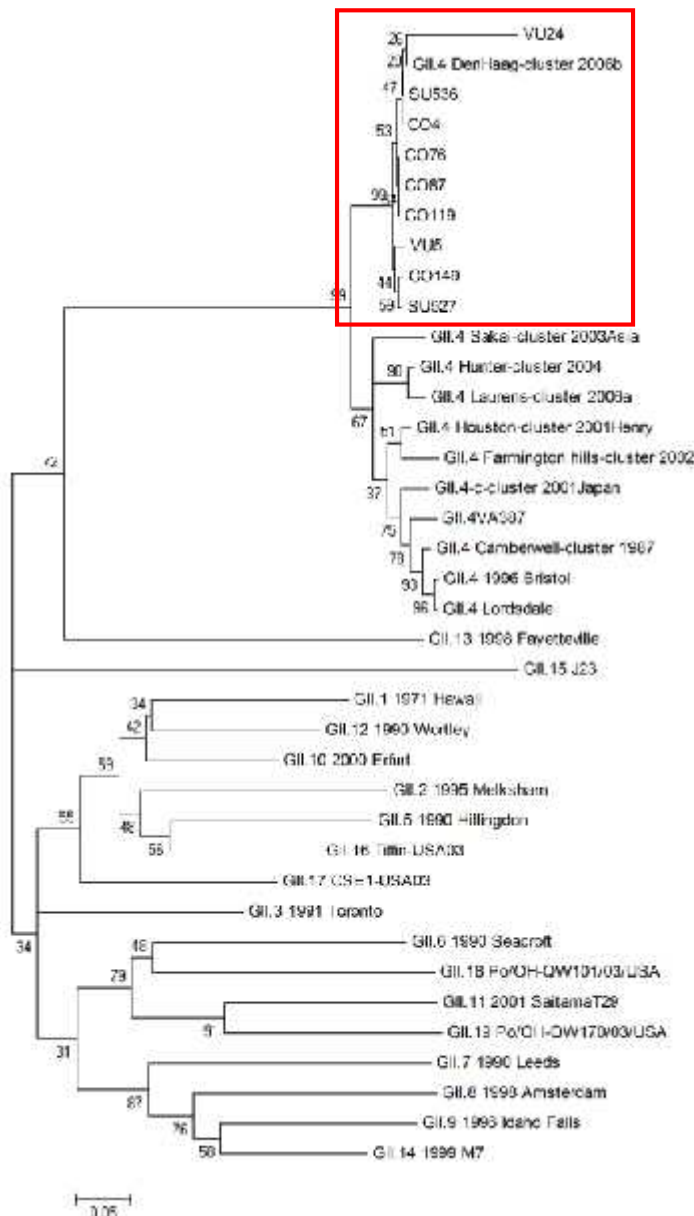


Figura 10. Esquema de la cápside de *Nv* (a la izquierda) que está formada por 90 dímeros de la proteína VP1. A la derecha se muestra un esquema de la estructura 3° de un dímero de VP1, señalándose en azul el dominio S que forma la cubierta viral, en rojo el subdominio P1 que forma el tallo de la espiga y el subdominio P2 que es la parte más expuesta de la proteína y contiene el bolsillo de interacción con los antígenos ABH-Lewis (50).

En este estudio se analizaron secuencias del dominio P, con especial énfasis en el subdominio P2 de la proteína VP1 con el objeto de identificar residuos potencialmente relevantes en la interacción del virus con los antígenos ABH-Lewis que pudieran explicar diferencias en la severidad del cuadro clínico y/o su capacidad de infectar a individuos con distinto fenotipo secretor.

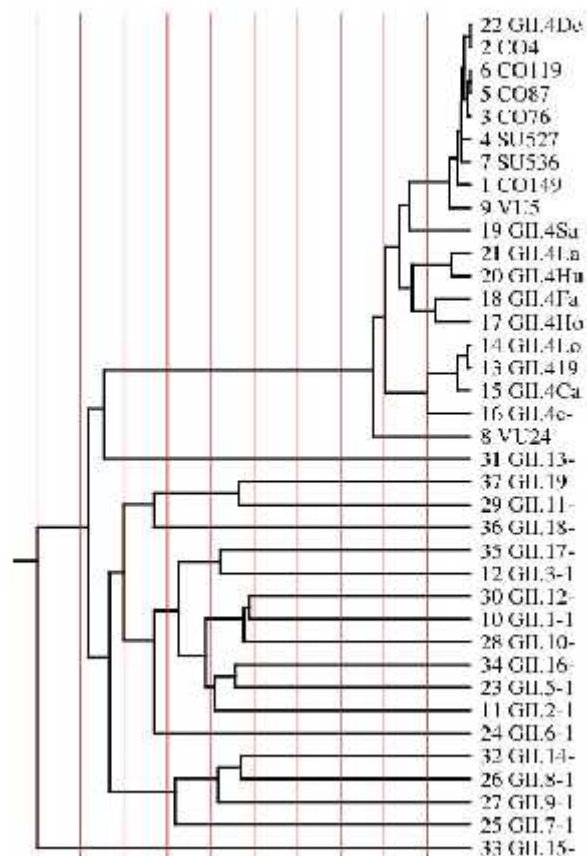
Como se explicó en la parte de metodología, la amplificación de este segmento fue dificultosa, aún luego de realizar un adiestramiento en el laboratorio de uno de nuestros colaboradores en USA. Se lograron obtener las secuencias de 9 pacientes (2 asintomáticos, 2 GE leves, 4 GE moderada-severa y 1 GE en la cual no se contó con todos los parámetros para determinar severidad). Una de las secuencias de GE moderada-severa fue obtenida de un individuo “No Secretor”.



El análisis se inició con la genotipificación de las secuencias obtenidas, todas las cuales fueron clasificadas en el genotipo GII.4. En la Figura 11 se muestra el dendrograma obtenido luego de un alineamiento múltiple con secuencias de referencia representativas de los 19 genotipos del genogrupo II descritos hasta ahora, incluidas las secuencias de los 8 clusters genéticos descritos dentro de GII.4 (35, 36) y la secuencia VA387, cuya estructura cristalográfica es conocida (49). Se puede apreciar que todas las secuencias locales se agruparon cercanas (91-100% de identidad) a la variante de referencia GII.4 cluster 2006-b, lo que concuerda con lo obtenido en el análisis de secuencias del dominio S (ver punto IX-c-vi).

Figura 11. Dendrograma que muestra las distancias genéticas entre secuencias del dominio P de la proteína VP1 locales y de referencia, pertenecientes al genogrupo II de Nv. Enmarcadas en rojo se encuentran las secuencias locales y la de referencia más cercana (GII.4 cluster 2006b).

A continuación se analizaron las secuencias del dominio P de la proteína VP1, previamente alineadas, mediante el método de huella evolutiva. En la Figura 12 se muestra el dendrograma obtenido mediante el método de huella evolutiva, donde cada línea vertical roja representa una división y un alineamiento múltiple, que da una idea de la distancia evolutiva entre las secuencias



que quedan en nodos diferentes. Las secuencias que quedan dentro de una misma rama, son comparadas nuevamente sólo entre ellas en el siguiente alineamiento (pertenecen a una misma “clase”).

Figura 12.- Dendrograma de las secuencias del dominio P de la proteína VP1 de la cápside viral, obtenido mediante el método de huella evolutiva. Las secuencias 1-9 son locales y las secuencias 10-37 son referencias. Las ramas generadas luego de una línea vertical roja (alineamiento) corresponden a “clases” genéticas.

Concordante con lo obtenido en el alineamiento múltiple por método tradicional (Figura 11), todas las secuencias locales, incluida la obtenida de un individuo “No Secretor” (SU527) e independiente de la severidad del cuadro clínico, se mantuvieron agrupadas y muy cercanas a las secuencias representativas de GII.4, hasta la 8° división. En la 8° división se formó un nodo que separó la secuencia local VU 24 del resto de las secuencias GII.4. Luego, en la 10° división, las restantes secuencias locales se mantuvieron agrupadas junto con la secuencia de referencia GII.4De (GII.4 cluster 2006b) y en una clase diferente del resto de las secuencias GII.4 (Figura 12). Esto sugiere una alta similitud entre las secuencias obtenidas en este estudio, incluyendo la secuencia de cápside obtenida de un individuo “No Secretor”.

En la Figura 13 se muestran las secuencias de consenso obtenidas de los alineamientos sucesivos realizados mediante el método de huella evolutiva. La columna de números de la izquierda (01-10) representa cada una de las divisiones de los alineamientos sucesivos (líneas rojas en la Figura 13) y

la fila que acompaña a estos números es la secuencia de consenso generada luego de ese alineamiento (43).

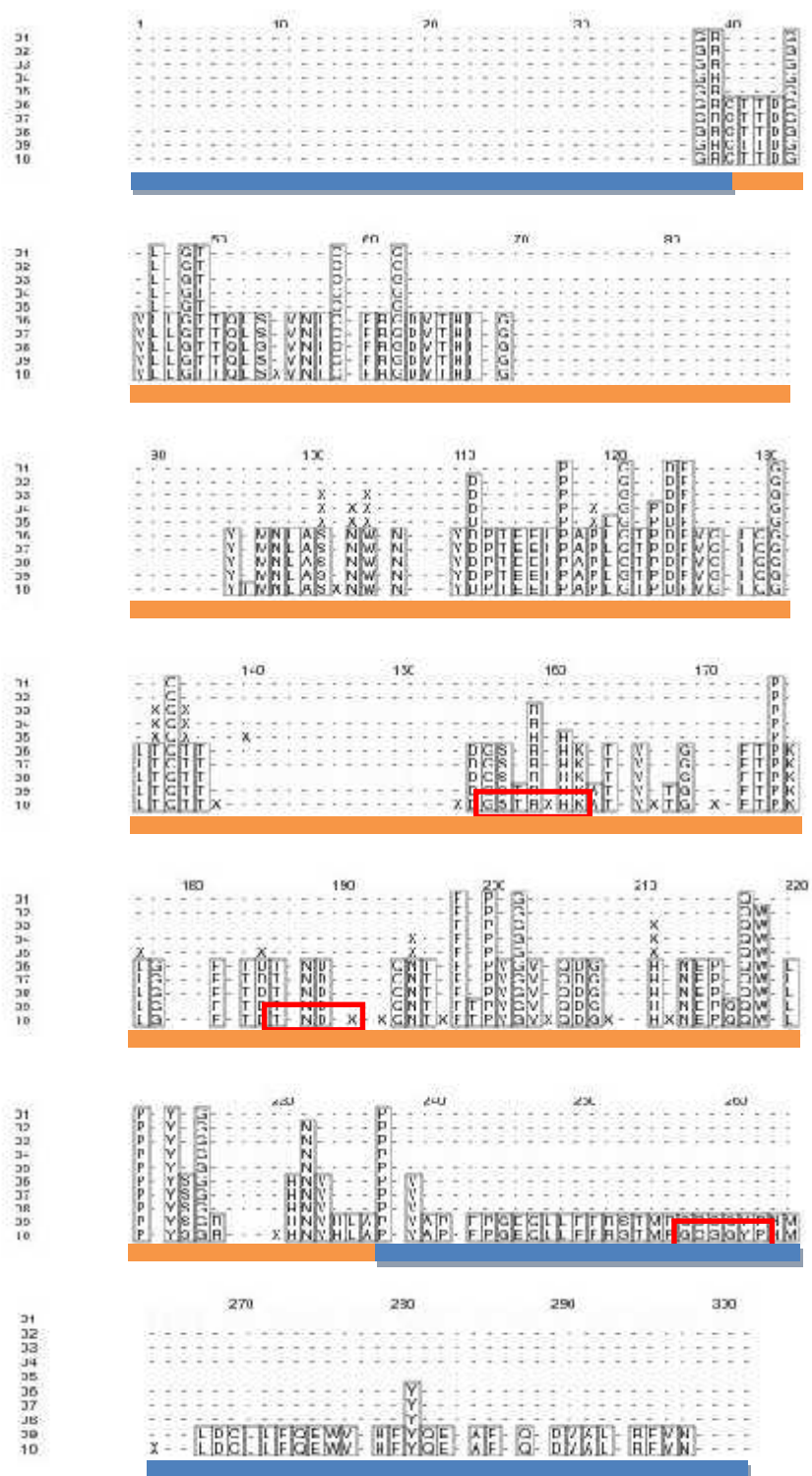


Figura 13.- Secuencias de consenso del dominio P de la cápside de *Nv*, obtenidas mediante el método de huella evolutiva a partir de secuencias locales y de referencia del genogrupo II. Se identifican con “-” los residuos variables para cada secuencia, que se consideran evolutivamente neutrales. Con “x” se identifican los residuos específicos de clase, que podrían tener relevancia funcional. Con letras mayúsculas se denotan los residuos absolutamente conservados, que tendrían potencial importancia estructural. Enmarcados con rectángulos grises se señalan los residuos que estarían ocultos en la estructura de la proteína. Con rectángulo azul bajo las secuencias se demarca la región que corresponde al subdominio P1 y con naranja se marca el subdominio P2 de la cápside. Enmarcados en rojo se destacan los residuos que forman el bolsillo de interacción con antígenos ABH-Lewis de acuerdo a la literatura (43,49).

Como se puede apreciar en la Figura 13, la mayor parte de los residuos específicos de clase (señalados con “X” en la figura), se encuentran en el subdominio P2, que es el más expuesto al ambiente (sufriendo por lo tanto mayor presión evolutiva), y es el que contiene el bolsillo de

interacción con los antígenos ABH-Lewis, pudiendo determinar la especificidad de unión a receptor (35, 49). Esto se grafica de manera más objetiva en la Figura 14, donde se muestra la proporción de residuos absolutamente conservados y específicos de clase de los dominios P1 y P2 de la cápside. 14/15 residuos específicos de clase se ubicaron en el subdominio P2 y 1/15 en P1, diferencia que resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,03$).

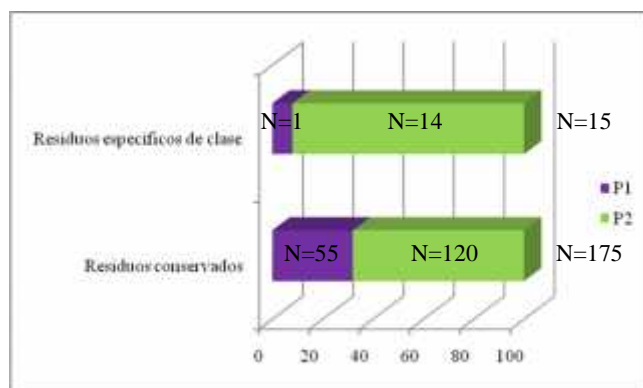


Figura 14.- Proporción de residuos absolutamente conservados y específicos de clase según dominio de ubicación ($p=0,03$).

Todos los residuos específicos de clase identificados por el método de huella evolutiva se ubicaron entre regiones formadas por residuos absolutamente conservados (enmarcado en rectángulos grises en la Figura 13), lo que implica que variaciones en estos residuos podrían modificar la estructura de la proteína.

Para complementar los residuos específicos de clase identificados por el método de huella evolutiva, se revisó la literatura en busca de estudios similares que hubieran identificado residuos potencialmente relevantes desde el punto de vista funcional. Lindesmith y cols publicaron el año 2008 un análisis exhaustivo de un número significativo de secuencias de cápside de variantes GII.4 (176 secuencias) obtenidas en distintas regiones del mundo durante los últimos 30 años. Su objetivo fue inferir la evolución molecular de estas variantes GII.4 en el tiempo y proponer mecanismos que pudieran explicar la emergencia de este genotipo como variante predominante a nivel mundial en las últimas décadas. Ellos identificaron 37 residuos del subdominio P2 potencialmente relevantes (35). Las variantes en estas posiciones podrían haber resultado de la presión evolutiva al interactuar con el ambiente (anticuerpos, receptores virales) y podrían explicar el comportamiento diferencial de los distintos clusters genéticos de GII.4 en cuanto a epidemiología, antigenicidad y unión a antígenos ABH-Lewis (35).

En la Figura 15 se muestra un alineamiento de las secuencias del subdominio P2 locales, VA387 y las referencias de los 8 clusters genéticos de GII.4. En ella se muestra la ubicación de los residuos específicos de clase identificados en este estudio y aquellos descritos como evolutivamente relevantes por Lindesmith y cols. 11/15 residuos específicos de clase identificados por el método de huella evolutiva coincidieron con los descritos por Lindesmith y cols, mientras que los restantes 4 fueron vecinos muy cercanos de los aminoácidos potencialmente relevantes (Figura 15).

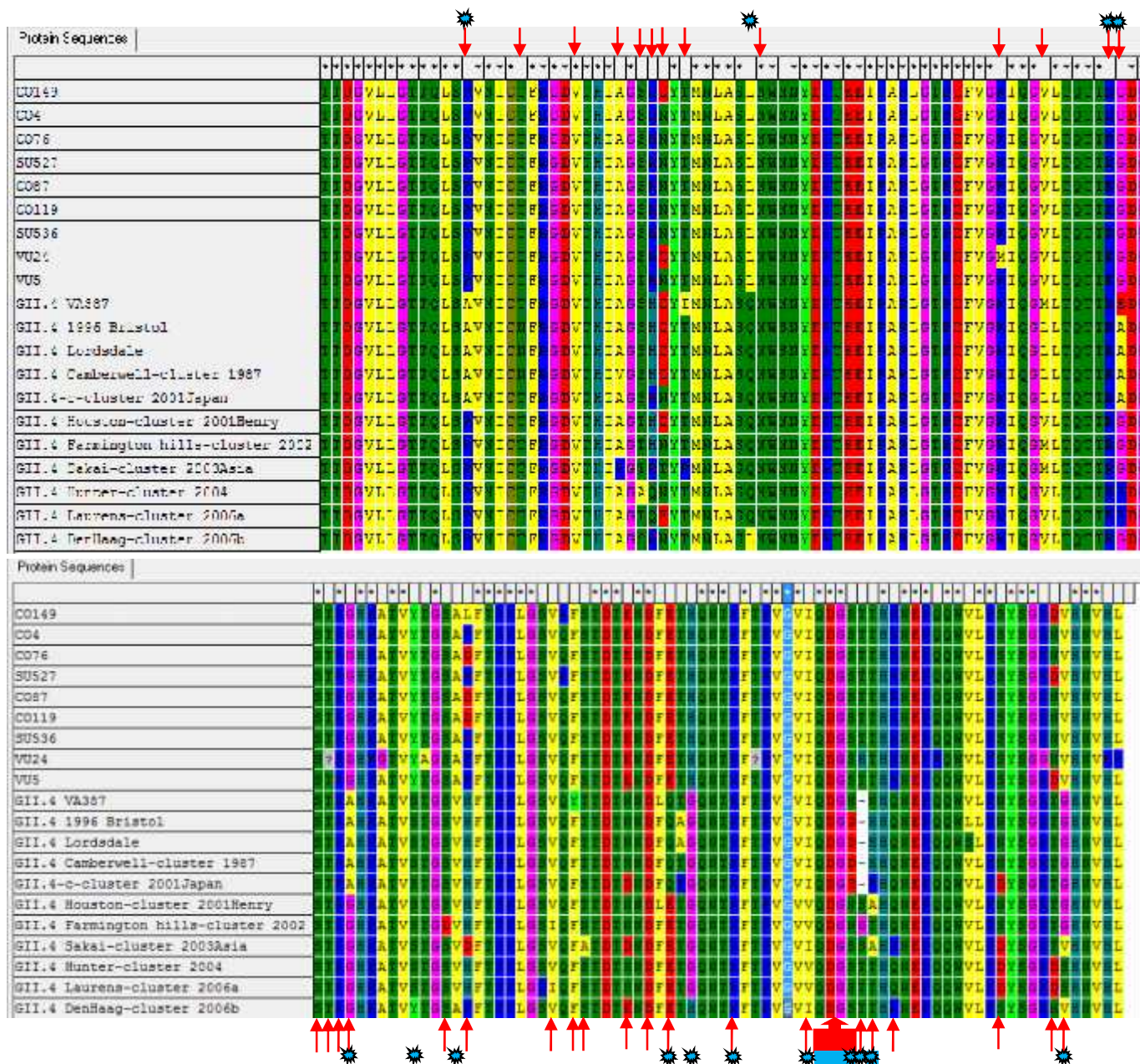


Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias subdominio P2 de variantes locales y referencias representativas de los distintos clusters genéticos de GII.4. Con flecha roja se marcan los residuos identificados por Lindesmith y cols como potencialmente relevantes en la evolución de la cápside del genotipo GII.4 y pueden haber contribuido a su predominancia actual (35). Con estrellas azules se marcan los residuos específicos de clase identificados mediante el método de huella evolutiva en este estudio. Con flecha gruesa roja se marca el sitio 2 del bolsillo de unión a carbohidratos que podría conferir especificidad a la interacción (35).

Para evaluar el potencial efecto de las diferencias en los residuos específicos de clase y los evolutivamente relevantes identificados por el grupo de Lindesmith, sobre la estructura del dominio P2, se compararon las secuencias locales con la secuencia de referencia VA387, de estructura conocida. La Tabla 15 muestra los residuos presentes en las posiciones potencialmente relevantes antes mencionadas (Figura 15) de las variantes locales y VA387, y sus características fisicoquímicas, según severidad del cuadro clínico. Se describen 4 residuos identificados sólo en este estudio, 11 comunes a este estudio y el de Lindesmith y cols. y 26 residuos descritos únicamente por este último grupo. Se pudo observar que 17/41 residuos fueron iguales en las secuencias locales y VA387, 12/41 tuvieron diferencias que fueron neutras desde el punto de vista fisicoquímico, 11/41 tuvieron cambios relevantes, fundamentalmente de carga eléctrica, lo que podría influir en la estructura de la proteína y 1/41 fue una inserción, pues no se encontró residuo equivalente en VA387 (Tabla 15).

Solo 4 residuos de los señalados mostraron diferencias entre las variantes locales con distinta severidad (aminoácidos 30, 32, 91 y 146), en 3 de los cuales hubo diferencias de carga eléctrica, sin embargo estos cambios no se asociaron consistentemente a una categoría de severidad.

Tabla 15.- Comparación de los residuos específicos de clase del subdominio P2 de variantes locales *versus* la secuencia VA387, representativa de GII.4 (Marcados con amarillo los residuos con diferencias fisicoquímicas potencialmente relevantes).

	Estudio en que se identificó el residuo	Variante local asintomática	Propiedad fisicoquímica	Variante local GE leve	Propiedad fisicoquímica	Variante local GE mod-sev	Propiedad fisicoquímica	VA387	Propiedad fisicoquímica	Situación respecto a VA387
AA14	Este estudio y Lindesmith	P	Hidrófobo	P	Hidrófobo	P	Hidrófobo	A	Hidrófobo	Diferente, misma carga
AA19	Lindesmith	T	hidrófilo	T	Hidrófilo	T	Hidrófilo	T	Hidrófilo	Igual
AA24	Lindesmith	V	hidrófobo	V	Hidrófobo	V	hidrófobo	V	Hidrófobo	Igual
AA28	Lindesmith	A	hidrófobo	A	Hidrófobo	A	hidrófobo	A	Hidrófobo	Igual
AA30	Lindesmith	S	hidrófilo	S	Hidrófilo	S/T	Hidrófilo	S	Hidrófilo	Igual
AA31	Lindesmith	R	positivo	R	Positivo	R	Positivo	H	Positivo	Diferente, misma carga
AA32	Lindesmith	N/D	Hidrófilo/negativo	N	Hidrófilo	N/D	Hidrófilo/negativo	D	Negativo	Diferente carga/igual
AA34	Lindesmith	T	hidrófilo	T	Hidrófilo	T	Hidrófilo	I	hidrófobo	Diferente carga
AA40	Este estudio	L	hidrófobo	L	Hidrófobo	L	hidrófobo	Q	Hidrófilo	Diferente carga
AA41	Lindesmith	N	hidrófilo	N	Hidrófilo	N	Hidrófilo	N	Hidrófilo	Igual
AA63	Lindesmith	K	positivo	K	Positivo	K	Positivo	K	Positivo	Igual
AA67	Lindesmith	V	hidrófobo	V	Hidrófobo	V	hidrófobo	M	Hidrófobo	Diferente, misma carga
AA73	Este estudio y Lindesmith	K	positivo	K	Positivo	K	Positivo	R	Positivo	Diferente, misma carga
AA74**	Este estudio y Lindesmith	G	Hidrófobo	G	Hidrófobo	G	hidrófobo	E	Negativo	Diferente carga
AA77*	Lindesmith	S	Hidrófilo	S	Hidrófilo	S	Hidrófilo	S	Hidrófilo	Igual
AA78*	Lindesmith	T	Hidrófilo	T	Hidrófilo	T	Hidrófilo	T	Hidrófilo	Igual
AA79*	Lindesmith	R	Positivo	R	Positivo	R	Positivo	R	Positivo	Igual
AA80	Este estudio y Lindesmith	G	Hidrófobo	G	Hidrófobo	G	hidrófobo	A	Hidrófobo	Diferente, misma carga
AA86	Este estudio	Y	Hidrófilo	Y	Hidrófilo	Y	Hidrófilo	S	Hidrófilo	Diferente, misma carga
AA89	Lindesmith	S	Hidrófilo	S	Hidrófilo	S	Hidrófilo	S	Hidrófilo	Igual
AA90	Este estudio	A	Hidrófobo	A	Hidrófobo	A	hidrófobo	V	Hidrófobo	Diferente, misma carga
AA91	Lindesmith	L/D	Hidrófobo/negativo	P/D	Hidrófobo/negativo	P/D	Hidrófobo/negativo	H	Positivo	Diferente carga
AA 99	Lindesmith	V	Hidrófobo	V	Hidrófobo	V	hidrófobo	V	Hidrófobo	Igual

AA101	Lindesmith	F	hidrófobo	F	Hidrófobo	F	hidrófobo	Y	Hidrófilo	Diferente carga
AA102	Lindesmith	S	hidrófilo	S	Hidrófilo	S	Hidrófilo	T	Hidrófilo	Diferente, misma carga
AA106**	Lindesmith	E	negativo	E	Negativo	E	negativo	N	Hidrófilo	Diferente carga
AA108*	Lindesmith	D	negativo	D	Negativo	D	negativo	D	Negativo	Igual
AA110**	Este estudio y Lindesmith	E	negativo	E	Negativo	E	negativo	Q	Hidrófilo	Diferente carga
AA112**	Este estudio	H	positivo	H	Positivo	H	positivo	G	Hidrófobo	Diferente carga
AA116	Este estudio y Lindesmith	K	positivo	K	Positivo	K	positivo	K	Positivo	Igual
AA123	Este estudio y Lindesmith	I	hidrófobo	I	Hidrófobo	I	Hidrófobo	I	Hidrófobo	Igual
AA124*	Este estudio y Lindesmith	Q	hidrófilo	Q	Hidrófilo	Q	Hidrófilo	Q	Hidrófilo	Igual
AA125*	Este estudio y Lindesmith	D	negativo	D	Negativo	D	Negativo	D	Negativo	Igual
AA 126*	Este estudio y Lindesmith	G	hidrófobo	G	Hidrófobo	G	Hidrófobo	G	Hidrófobo	Igual
AA127*	Este estudio y Lindesmith	S	hidrófilo	S	Hidrófilo	S	Hidrófilo	N	Hidrófilo	Diferente, misma carga
AA 128**	Este estudio y Lindesmith	T	hidrófilo	T	Hidrófilo	T	Hidrófilo	(-)	Ausente	Inserción
AA 129	Este estudio y Lindesmith	T	hidrófilo	T	hidrófilo	T	Hidrófilo	N	Hidrófilo	Diferente, misma carga
AA 131	Lindesmith	R	positivo	R	positivo	R	Positivo	Q	Hidrófilo	Diferente carga
AA 141	Lindesmith	S	hidrófilo	S	hidrófilo	S	hidrófilo	N	Hidrófilo	Diferente, misma carga
AA146	Lindesmith	N/D	Hidrófilo/ negativo	N	Hidrófilo	N/D	Hidrófilo/ negativo	T	Hidrófilo	Diferente carga
AA147	Este estudio y Lindesmith	V	Hidrófobo	V	hidrófobo	V	hidrófobo	G	Hidrófobo	Diferente, misma carga

*: residuos que forman el bolsillo de interacción con antígenos de grupo histosanguíneo. **: residuos con potencial efecto relevante sobre el bolsillo de interacción.

Los aminoácidos que, de acuerdo a la literatura forman parte del bolsillo de unión a antígenos histosanguíneos (49), resultaron ser idénticos en las variantes locales y VA387 (aminoácidos 77, 78, 79 y 108 del subdominio P2 en la Figura 15). Sin embargo hubo algunas diferencias en los aminoácidos circundantes. Los residuos 74, 106, 110 y 112, muy cercanos al bolsillo, tuvieron carga

diferente, lo que podría condicionar un cambio en la estructura de esta superficie de interacción y explicar la capacidad de esta variante de producir enfermedad en un individuo “No Secretor”. Por otra parte, se ha descrito un bolsillo secundario de interacción con carbohidratos, que produciría uniones más débiles (puentes de hidrógeno) y contribuiría a la especificidad de la interacción con antígenos de grupo histosanguíneo (35). Este bolsillo secundario estaría formado por los aminoácidos 124, 125, 126 y 127 de P2. Los 3 primeros fueron idénticos en las secuencias locales y VA387, y el último fue diferente, pero mantuvo la carga eléctrica. Llama la atención que en la posición 128, adyacente a este bolsillo hubo una inserción de un aminoácido, lo que podría afectar la estructura de esta superficie y secundariamente la especificidad de unión a antígenos histosanguíneos, pudiendo explicar también la capacidad de las variantes locales de infectar a “No Secretores” (probablemente a través de la unión a antígeno Lewis a)

Finalmente, se compararon las secuencias locales directamente con la estructura de la variante VA387, representativa de GII.4, mediante el programa VMD 1.8.7, haciéndose más manifiesto el posible efecto de los cambios de carga previamente explicados en la estructura de P2, particularmente en el bolsillo de interacción con antígenos de grupo histosanguíneo. Como se puede apreciar en la Figura 16, el bolsillo primario está formado por 2 loops muy cercanos y sus hojas beta asociadas. Si bien los aminoácidos del bolsillo propiamente tal están conservados en las secuencias comparadas, hay diferencias en posiciones cercanas (residuos 74, 106, 110 y 112). El residuo 74 se encuentra en el extremo distal de un loop y los aminoácidos 106, 110 y 112 forman el loop adyacente que conforma el bolsillo (marcado en amarillo en la Figura 16). De la figura se entiende que cambios de carga en estos residuos podrían afectar el tamaño del bolsillo y/o su afinidad por carbohidratos.

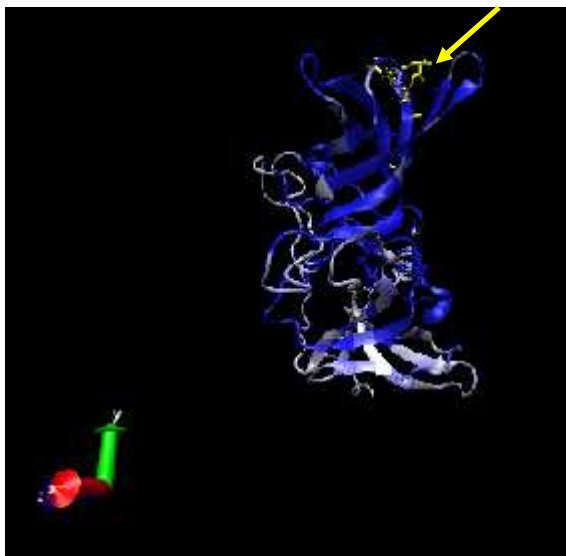


Figura 16.- Modelamiento del dominio P de la variante VA387, obtenida mediante el programa VMD 1.8.7. En azul se ven los residuos idénticos respecto a las variante virales locales y en gradiente hacia el rojo aquellos que divergen según sus propiedades fisicoquímica. Con flecha amarilla se señala el bolsillo de interacción con los antígenos de grupo histosanguíneo.

En la Figura 17 se muestra la ubicación del residuo extra encontrado en las secuencias locales al compararlo con VA387 (aminoácido 128 en la Tabla 15). Se aprecia que la inserción de este residuo podría elongar el loop donde se ubica (marcado en amarillo en la Figura 17) y modificar de ese modo la capacidad de este bolsillo secundario de formar puentes de hidrógeno con carbohidratos.

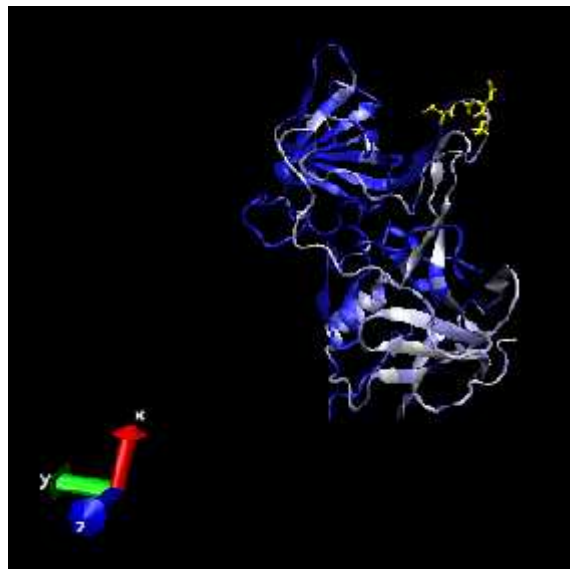


Figura 17.- Modelamiento de dominio P de VA387 obtenido mediante programa VMD 1.8.7. En amarillo se muestra el loop donde se evidenció una inserción en las secuencias locales.

X.- Discusión.

Nv fue identificado como causa de IE en una proporción importante de lactantes de esta cohorte. El 59% de los lactantes estudiados presentaron infección asintomática durante el seguimiento, proporción que fue mayor a lo reportado previamente en la literatura. Bucardo y cols. describieron en un estudio transversal en niños de Nicaragua un 14% de infección asintomática en menores de 1 año (90 niños estudiados) (23), mientras que García y cols. (63 pacientes estudiados) y Philips y cols. (178 individuos estudiados) encontraron un 49% y 32% de lactantes asintomáticos con muestras positivas para *Nv* en estudios retrospectivos (51, 52). Un motivo para esta mayor frecuencia de detección podría ser la duración y periodicidad de nuestro seguimiento, ya que los otros estudios consideraron un escaso número de muestras por individuo.

Nv fue la primera causa de GE en esta cohorte, superando en frecuencia a rotavirus (23% y 13% respectivamente). Estudios realizados en países desarrollados han reportado una frecuencia de 10-20% de infecciones por *Nv* en niños con GE, tanto de manejo ambulatorio, como hospitalizados, siendo en general el segundo agente en frecuencia luego de rotavirus (53, 54). En Latinoamérica, se han encontrado cifras similares; Bucardo y cols. comunicaron un 12% de GE por *Nv* en lactantes de Nicaragua y O’Ryan y cols. reportaron un 18% de GE por este mismo agente en niños chilenos (comparado con un 26% de rotavirus) (18, 19). Estos estudios incluyeron fundamentalmente pacientes evaluados en Servicios de Urgencia y hospitalizados, mientras que nosotros utilizamos un modelo de cohorte que permite pesquisar cuadros más leves, lo que podría explicar la mayor frecuencia de *Nv* y su predominancia por sobre rotavirus, que causaría episodios de mayor severidad (53). En concordancia con nuestros resultados, Zeng y cols. encontraron recientemente en una cohorte de lactantes reclutados para un estudio de vacuna de rotavirus una frecuencia de 32% para *Nv* como causa de GE (incluido episodios leves), siendo este el primer agente de diarrea, con una frecuencia similar en pacientes vacunados y no vacunados contra rotavirus (55).

En el presente estudio se evaluaron factores del hospedero posiblemente relacionados con susceptibilidad frente a la infección por *Nv* en lactantes, con la idea de validar variables previamente descritas en este sentido en adultos. La identificación de grupos de riesgo permitiría orientar de manera más racional estrategias de prevención, y dentro de estas, el eventual uso de vacunas. El fenotipo “No Secretor” resultó ser un factor protector frente a infección por *Nv* en esta cohorte. Dicha protección había sido descrita previamente en estudios clásicos con adultos voluntarios

expuestos bajo condiciones controladas a variantes de *Nv* genogrupo I (28, 30, 42, 56), en estudios de brotes causados por variantes del genogrupo II (29, 57) y más recientemente (posterior al inicio del presente estudio), en GE endémica en niños (31). Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados y a diferencia de lo descrito en los estudios antes señalados, esta protección no sería completa, pues encontramos 6 individuos “No Secretores” con infección asintomática y 2 con GE por *Nv* (1 de la cohorte y 1 del estudio de diarrea endémica). Se lograron identificar 3 variantes virales de infección asintomática en individuos “No Secretores” (2 GII.4 y 1 GII.2) y 1 de GE (GII.4), todas de genogrupo II. Lindesmith y cols. reportaron en un estudio con un número limitado de voluntarios adultos expuestos al virus Snow Mountain, representante del genotipo GII.2, un riesgo similar de infección en individuos “Secretores” y “No Secretores” (32). Ellos estudiaron 15 individuos, 12 “Secretores”, de los cuales 8 sufrieron infección y 3 “No secretores”, de los cuales 1 desarrolló la infección (32). Por otra parte, Carlsson y cols. describieron recientemente en un brote de GE ocurrido en un hogar de ancianos y causado por *Nv* GII.4, que 1/34 individuos sintomáticos fue “No Secretor”, sin embargo no se logró aislar el virus en deposiciones de este sujeto (58). Finalmente, Larsson y cols. reportaron en un estudio de seroprevalencia de anticuerpos anti-*Nv* GII.4 en donantes de sangre, que 19/21 individuos “No Secretores” evaluados fueron seropositivos, lo que sugiere infección previa por este agente, sin embargo, los títulos de anticuerpos encontrados fueron muy bajos y significativamente menores que los de individuos “Secretores” (59). Nuestros resultados apoyan lo sugerido por los grupos de Lindesmith, Carlsson y Larsson, en un contexto más amplio de infección natural por distintos genotipos. De acuerdo a esto, si bien el fenotipo “No Secretor” protegería frente a *Nv*, este efecto no sería absoluto, lo que resulta novedoso en el campo de estudio de este agente y esboza la posibilidad de que al menos una fracción de estos virus pudieran interactuar con receptores alternativos del hospedero.

En relación con los fenotipos ABO, en el presente estudio no se encontró asociación entre estos y susceptibilidad. Si bien, Hutson y cols. describieron en voluntarios adultos expuestos a virus Norwalk (GI.1), una mayor susceptibilidad de los individuos grupo O (56), y Rockx y cols. encontraron un menor riesgo en individuos grupo B en un estudio de brote causado por *Nv* GI.3 (30), otros grupos no han podido reproducir estos hallazgos al evaluar variantes del genogrupo II. Larsson y cols. en estudios de seroprevalencia en adultos, no encontraron diferencias en la presencia ni títulos de anticuerpos contra *Nv* GII.4 entre sujetos con distinto fenotipo ABO (59). Por otra parte, Bucardo y cols. investigando en GE endémica en niños de Nicaragua, tampoco encontraron diferencias en el riesgo de infección por distintas variantes de *Nv* entre grupos ABO (31). En

contexto de brotes, Halperin y cols. no encontraron diferencia en susceptibilidad en individuos con distinto fenotipo ABO con GE por *Nv* GII.4, si bien la metodología de este estudio ha sido cuestionada por varios autores (60). En resumen, la evidencia actual sugiere que existirían diferencias según el fenotipo ABO en la susceptibilidad frente a infección por *Nv* del genogrupo I, mientras que esto no modificaría el riesgo de infección por variantes del genogrupo II. Nuestros hallazgos confirman fundamentalmente esto último, pues la mayoría (93%) de las secuencias obtenidas pertenecieron a genogrupo II, específicamente GII.4 variante 2006b, que en ensayos *in vitro* de unión a saliva ha demostrado un amplio rango de unión a carbohidratos (unión a antígeno A, B y H) (61).

Respecto a severidad, al analizar al grupo total se encontró una menor proporción de cuadros sintomáticos en lactantes que recibieron leche de madres “Secretoras” (*versus* madres “No Secretoras”) y LM con IgA anti virus México, constituyendo estos, factores protectores. Al analizar por separado a los lactantes infectados por la variante GII.4, el fenotipo O se asoció con menor frecuencia a cuadros sintomáticos, constituyendo también factor protector; este último punto no había sido descrito previamente en la literatura.

El efecto de los oligosacáridos de la LM en infección por *Nv* había sido abordado previamente sólo por un par de grupos de investigadores. Morrow y cols. describieron en un estudio retrospectivo en 93 lactantes, una menor incidencia de GE por calicivirus (familia que incluye a *Nv*) en niños alimentados con LM con alto contenido de oligosacáridos fucosilados (tipo fenotipo “Secretor”) (33). Este grupo no exploró la proporción de pacientes con infección asintomática, por lo que nuestros datos concordarían con sus hallazgos, en que la presencia de oligosacáridos fucosilados en la LM no protegería de infección, sino que de la presentación de un cuadro sintomático. Por otra parte Jiang y cols. determinaron en estudios *in vitro* que la leche de madres “Secretoras” podía bloquear la unión de ciertas variantes de *Nv* a muestras de saliva de individuos “Secretores” (34). Considerando nuestros resultados y los hallazgos de los grupos de Morrow y Jiang, se puede plantear que los oligosacáridos presentes en forma soluble en la LM actuarían bloqueando los sitios de unión de *Nv* a sus receptores celulares, disminuyendo de esta forma su posibilidad de causar enfermedad, lo que abre las puertas para el potencial uso de oligosacáridos solubles como antivirales.

La presencia de anticuerpos anti *Nv* en LM ha sido hasta ahora un tema aún menos explorado. Jiang y cols evaluaron en 60 muestras de LM, la presencia de IgA frente a 4 variantes de *Nv*. Ellos

describieron un 24-43% de muestras positivas dependiendo de la variante viral evaluada (34). Solo 1/6 madres “No Secretoras” presentó IgA en su leche y dirigida solamente contra 1 de las 4 variantes virales analizadas, lo que sugería cierta resistencia de estas madres a la infección. Por otra parte Makita y cols. encontraron un 13% de muestras de LM positivas para IgA anti-*Nv* (62). Ninguno de estos grupos exploró el efecto de estos anticuerpos sobre el riesgo de infección ni la presencia de síntomas. De ahí que nuestros hallazgos resulten un aporte novedoso en este ámbito. De acuerdo a nuestros resultados, la presencia de IgA en LM contra las variantes virales estudiadas no demostró proteger frente a infección, sin embargo, la presencia específicamente de IgA anti-virus México (GII.3) se asoció a menor riesgo de presentar cuadro sintomático. Esto resulta relevante pues, por una parte refuerza la importancia de la lactancia materna en la prevención de enfermedades severas, y por otra parte sugiere la utilidad de contar con IgA en el tracto gastrointestinal como factor protector de infección sintomática. Considerando la eventual utilidad de una vacuna, es necesario seguir explorando esta área y probar en estas mismas muestras de LM, la presencia de IgA contra variantes GII.4, que fueron las más frecuentes en este grupo.

Llama la atención que la proporción de muestras de LM con IgA anti-*Nv* en esta cohorte fue significativamente mayor que la reportada en los estudios anteriores. La metodología utilizada en este estudio fue similar a la descrita por los grupos de Jiang y Makita, por lo que el factor técnico no debería haber influido mayormente en los resultados. Una explicación posible podría ser una mayor seroprevalencia de mujeres en edad fértil en nuestro país respecto a la de los grupos estudiados por Jiang (México y USA) y Makita (Japón); para confirmar esto sería necesario medir anticuerpos séricos en estas madres. También destacó que una proporción importante de madres “No Secretoras” tuvo IgA anti-*Nv* en su leche (50% contra la variante de genogrupo I y hasta 100% contra las variantes de genogrupo II), lo que sugiere una infección previa en ellas y refuerza la hipótesis de protección parcial de este fenotipo frente a *Nv*.

La heterocigosidad en el gen FUT3 y ausencia de anticuerpos séricos previo a la infección por *Nv* presentaron una tendencia a ser factores de riesgo de cuadro sintomático, aunque sin alcanzar significancia estadística. Considerando que *Nv* tiene la capacidad de unirse a antígenos tipo ABH y también tipo Lewis de manera independiente (63) y que la actividad de las enzimas de grupo histosanguíneo depende del número de alelos funcionantes que tenga el individuo (64), se planteó en este estudio el posible efecto de polimorfismos de FUT3 sobre severidad del cuadro clínico, lo que no había sido propuesto previamente. Estudios anteriores en brotes (58) y de seroprevalencia (59) no

habían encontrado asociación entre genotipo FUT3 y susceptibilidad frente a infección por *Nv*, sin embargo ellos no consideraron la posible relación de esta variable con presentación clínica. Sería deseable complementar el presente estudio, con un mayor número de pacientes para definir el posible rol del genotipo FUT3 sobre severidad en infección por *Nv*.

En relación con el posible efecto protector de IgA sérica esbozado en nuestros resultados, los hallazgos descritos en la literatura han sido contradictorios. Numerosos estudios con voluntarios han demostrado seroconversión luego de una infección por *Nv*, confiriendo estos anticuerpos protección a corto plazo (28, 46, 65-67). Sin embargo, no se ha podido demostrar inmunidad protectora de largo plazo y se ha descrito, de hecho, un mayor riesgo de enfermar en voluntarios con anticuerpos anti-*Nv* previo a la exposición (66). Parrino y cols. reportaron en un grupo de voluntarios adultos, que al ser re-expuestos a virus Norwalk (GI.1) 27-42 meses después de la exposición inicial, ellos volvían a enfermar (67). No es sorprendente por lo tanto que no se haya encontrado en esta cohorte un claro efecto protector por parte de la IgA sérica, sin embargo, en este estudio no se evaluó la presencia de IgA anti-GII.4, que fue la variante viral más frecuente. Sería deseable continuar en esta línea y una vez se tengan disponibles las VLPs correspondientes a GII.4, evaluar la presencia de IgA contra este genotipo viral en este mismo grupo de pacientes.

Estos resultados han sido analizados a la luz de la detección de IgA específica total contra un determinado tipo viral, sin considerar la presencia de anticuerpos neutralizantes. Debido a que hasta el momento no existe una línea celular en la cual se pueda cultivar con éxito *Nv*, no ha sido posible la implementación de ensayos de neutralización. Sin embargo, Reeck y cols. describieron recientemente en voluntarios, una buena correlación entre presencia de anticuerpos bloqueantes (análogos a neutralizantes) y protección frente a GE por virus Norwalk, utilizando un novedoso modelo de inhibición de unión de VLPs a oligosacáridos sintéticos (68). Sería interesante replicar en un futuro esta metodología en nuestro grupo de pacientes, pues permitiría refinar el análisis del efecto de los anticuerpos sobre severidad del cuadro clínico lo que podría proyectarse a la eventual utilidad de una vacuna en niños.

La variante GII.4 predominó por lejos en esta cohorte, similar a lo descrito previamente en la literatura en otras latitudes (50). Este predominio fue más marcado en cuadros sintomáticos y de mayor severidad, lo que sugiere una mayor virulencia de la variante GII.4 respecto al resto. Este hallazgo es bastante novedoso en el ámbito de estudio de *Nv* y ha sido abordado sólo en los últimos

años (posterior al inicio de este protocolo) por un número reducido de investigadores. Los resultados publicados recientemente por Bucardo y cols. en Nicaragua y Barreira y cols en Brasil sugieren algo similar. El grupo de Bucardo describió GII.4 en 1/15 secuencias de episodios asintomáticos y 11/27 secuencias de GE (23, 31), mientras que Barreira y cols reportaron GII.4 en 0/7 secuencias de pacientes asintomáticos y 9/13 niños con síntomas (69). Por otra parte, Huhti y cols encontraron en un estudio retrospectivo en niños con GE, una leve diferencia, aunque significativa, en la severidad de los cuadros causados por GII.4 *versus* otras variantes virales, encontrándose en los primeros una mayor duración de los síntomas (diarrea y vómitos), mayor número de episodios de diarrea por día y mayor score de severidad (70). En conjunto estos datos sugieren fuertemente una mayor virulencia de GII.4. Una explicación alternativa podría ser la ausencia de inmunidad adquirida protectora, pues se ha sugerido que uno de los mecanismos para el predominio de GII.4 a nivel mundial en los últimos 20 años es su capacidad de generar cambios antigénicos mayores sin perder su patogenicidad (“antigenic drifts”), similar a lo descrito para el virus influenza (71). Por otra parte, llama la atención que en este estudio se encontraron diferencias en la presentación clínicas de distintas variantes dentro del genotipo GII.4. Los cuadros con mayor sintomatología tendieron a agruparse en un mismo cluster genético, con 100% de identidad con la variante GII.4 2006b, predominante a nivel mundial al momento del estudio, mientras que las variantes aisladas de individuos asintomáticos y con cuadros leves se encontraron en general fuera de este cluster, con algo más de diversidad genética, aún perteneciendo a GII.4. Esto sugiere que dentro de un mismo genotipo existe diversidad de clusters que podrían tener un comportamiento biológico diferente. En estudios *in vitro* de unión de VLPs a oligosacáridos, se habían descrito distintos patrones de interacción, con preferencia de ciertas variantes GII.4 por un carbohidrato por sobre otros (61). Sin embargo, hasta dónde tenemos conocimiento, este comportamiento biológico diferente no había sido descrito previamente *in vivo*. Frente a la eventual aplicación de una vacuna anti *Nv*, sería necesario considerar las variantes asociadas a cuadros de mayor severidad, que corresponderían en general al genotipo GII.4 y en particular a ciertos clusters genéticos. Sería interesante realizar en el futuro una vigilancia de los genotipos de *Nv* circulantes que permitiera evidenciar si el cluster genético identificado como asociado a mayor severidad, sigue causando mayor morbilidad o con el tiempo se atenúa su presentación clínica, apareciendo una nueva variante más virulenta.

La variante GII.4 fue encontrada tanto en individuos “Secretores” como en los escasos casos identificados en “No Secretores”, lo que no habría sido documentado fehacientemente hasta ahora (como se explicó más arriba). Carlsson y cols. encontraron en un brote causado por GII.4, 1

individuo “No Secretor” sintomático, pero no pudieron identificar al agente en deposiciones de este sujeto. Ellos realizaron ensayos de unión de saliva de 1 individuo “No Secretor” con VLPs de la variante viral involucrada en el brote y demostraron unión *in vitro*. Al realizar una comparación de la secuencia del dominio P2 de la cápside del virus del brote con la secuencia de referencia más cercana genéticamente (variante Dijon), encontraron diferencias en los residuos descritos como parte del bolsillo de interacción con carbohidratos (58). Al comparar la secuencia identificada en un individuo “No Secretor” del presente estudio con aquella del artículo de Carlsson, se pudo evidenciar que los residuos descritos como parte del bolsillo de interacción primario y secundario con antígenos histosanguíneos fueron idénticos, lo que sustenta aún más la posibilidad de que esta variante local tenga capacidad de infectar a individuos “Secretores” y “No Secretores”. La capacidad de esta variante de infectar a individuos “No Secretores” sugiere por una parte que esta podría tener un espectro mayor de unión a antígenos de grupo histosanguíneo (a través de Lewis a) y/o que podrían existir receptores celulares alternativos. Se requieren más estudios para dilucidar este último punto.

En el estudio de secuencias aisladas de pacientes con más de 1 detección viral, se identificaron 2 individuos con probable infección asintomática con excreción prolongada (al menos 1 mes), una causada por la variante GII.4 y la otra por GI.5. En infección natural se había descrito previamente excreción hasta por 3 semanas post infección (22). Sin embargo, en un estudio con adultos voluntarios expuestos a virus Norwalk, Atmar y cols, detectaron excreción viral hasta 7 semanas luego de la infección inicial (72), lo que sustenta nuestro hallazgo. Se desconoce hasta el momento el rol epidemiológico que podrían jugar estos lactantes asintomáticos con excreción viral prolongada, pero es posible especular que podrían actuar como reservorio y eventual fuente de contagio para otros individuos.

Mediante el método de huella evolutiva y comparación de secuencias del subdominio P2 de la cápside, se pudo evidenciar que las variantes locales fueron bastante homogéneas (independiente de la presentación clínica), especialmente en los residuos descritos previamente como relevantes para la unión con antígenos histosanguíneos. Al compararlos con la variante de referencia VA387, de estructura conocida y que clásicamente ha sido identificada sólo en individuos “Secretores”, se encontraron diferencias en algunos de los residuos de la región del bolsillo de interacción con antígenos histosanguíneos. Las diferencias encontradas en el sitio de unión podrían explicar, al menos en parte, la capacidad de la variante local para infectar a individuos “No Secretores”. Para

confirmar esto serían necesarios ensayos de unión *in vitro* del virus local a saliva de individuos “No Secretores” y eventualmente la exposición de dichos individuos *in vivo* al virus para confirmar su capacidad infectante. Los resultados aquí presentados demuestran cómo el uso de herramientas de bioinformática permite aproximarse al conocimiento de este virus, su epidemiología molecular y posible mecanismo de interacción con el hospedero.

Finalmente es preciso rescatar que en esta tesis se evidenció la complejidad de las interacciones agente-hospedero *in vivo*. Como se pudo apreciar en los resultados, ninguno de los factores pudo explicar por sí solo, sino que tomados en conjunto, el efecto final sobre la severidad del cuadro clínico. Estudios de este tipo, que intenten integrar factores del hospedero y del agente al momento de explicar el resultado de esta interacción (cuadro clínico), permitirían comprender de un modo más dinámico y real los mecanismos de enfermedad en enfermedades infecciosas.

XI.- Conclusiones.

-) Epidemiología: *Nv* fue la principal causa de GE en esta cohorte y se encontró una alta frecuencia de infecciones asintomáticas, mayor a lo descrito previamente en la literatura.
-) Susceptibilidad: El fenotipo “No Secretor” fue un factor protector significativo, aunque no completo frente a infección por *Nv*.
-) Severidad:
 - o La lactancia por parte de madres “Secretoras” y la presencia de ciertos tipos de IgA anti-*Nv* en LM disminuyeron la probabilidad de presentar síntomas en niños infectados. No se encontró asociación entre presentación clínica y los demás factores del hospedero evaluados.
 - o GII.4 fue la variante viral predominante, similar a lo descrito en otras latitudes. GII.4 fue significativamente más frecuente en individuos con cuadro sintomático, lo que sugiere una mayor virulencia de esta variante. Dentro del genotipo GII.4 se encontró una variante viral asociada a la mayoría de los cuadros de mayor severidad, lo que sugiere la existencia de sub-clusters genéticos más virulentos. La diversidad genética fue mayor en los virus aislados de cuadros asintomáticos.
-) Las diferencias encontradas mediante herramientas de bioinformática entre variantes locales y las de referencia, a nivel del sitio de unión de la cápside viral a antígenos de grupo histosanguíneo, podrían explicar al menos en parte la capacidad de la variante local de afectar también a individuos “No Secretores”.
-) Se requieren nuevos estudios en esta línea, particularmente para clarificar el efecto de los anticuerpos previos en la protección de infección sintomática, que podrían arrojar luces sobre la utilidad de una eventual vacuna anti-*Nv*.

XII.- Contraste de las hipótesis iniciales.

- 1) En el grupo de estudio, los lactantes con fenotipo “Secretor”, particularmente aquellos con grupo histosanguíneo O, A y AB tendrían mayor probabilidad de adquirir una infección por *Nv* durante su primer año de vida (**susceptibilidad**): la hipótesis se confirmó parcialmente, pues el fenotipo “Secretor” resultó ser factor protector, pero no absoluto y no se encontraron diferencias en el riesgo de infección entre los distintos fenotipos ABO.
- 2) La **severidad** del cuadro clínico en IE por *Nv* en este grupo de estudio estaría determinada fundamentalmente por factores del hospedero relacionados con variantes de las enzimas involucradas en la síntesis de antígenos histosanguíneos ABO-Lewis y/o con inmunidad adquirida humoral de mucosas (tanto la transmitida a través de la leche materna como la producida por el propio lactante) y no dependería de la variante viral involucrada: la hipótesis fue refutada, pues la variante viral involucrada en el cuadro resultó ser un factor determinante de severidad, siendo GII.4 el genotipo asociado a cuadros más severos. Dentro de los factores del hospedero, la composición de la leche materna resultó ser un factor relevante en disminuir el riesgo de cuadros más sintomáticos en el grupo total de infectados y el fenotipo ABO mostró diferencias de severidad para individuos infectados por la variante GII.4 (el fenotipo O se asoció a menor sintomatología).

XII.- Proyecciones.

El presente estudio confirmó algunas de las observaciones desprendidas de estudios con adultos, pero más importante aún, se confirmó la posibilidad de algunas variantes virales de infectar individuos “No Secretores” y se encontraron variables del hospedero relacionadas con mayor severidad que no habían sido descrito previamente en la literatura (fenotipo secretor LM, IgA específica en LM, fenotipo O en el paciente).

Las conclusiones de estos estudios relacionados con antígenos de grupo histosanguíneos (receptores virales) y anticuerpos podrían ser de utilidad para el diseño de eventuales vacunas y fármacos antivirales contra este agente.

Con este estudio se abrieron una serie de preguntas interesantes en las cuales sería deseable continuar investigando como son: ¿cuál es el efecto sobre severidad de la presencia de IgA anti-GII.4 en suero y LM? ¿el cluster genético GII.4 asociado a cuadros más severos se mantendrá en el tiempo, o será reemplazado en el futuro por otra variante viral? ¿qué factores impidieron la amplificación de un número mayor de secuencias de la cápside completa de *Nv*, particularmente aquellas que no pertenecieron al cluster genético GII.4 2006b? ¿Tiene esto implicancias en el comportamiento biológico del virus? Ahondar en esto podría contribuir al mejor conocimiento de este virus de reconocida importancia epidemiológica y cuyo estudio ha sido dificultoso por la falta de líneas de cultivo celular y modelos animales.

Por otra parte, la valiosa experiencia adquirida por nuestro equipo durante el desarrollo de este modelo de cohorte servirá para la eventual realización de protocolos similares aplicados al estudio de la epidemiología y patogenia de otros agentes infecciosos.

XIV.- Bibliografía.

1. O’Ryan, M.; Prado, V. and Pickering L. “A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world”. *Semin Pediatr Infect Dis.* 16: 125-136, 2005.
2. Parashar, U.; Bresee, J. and Glass, R. “The global burden of diarrhoeal disease in children”. *Bull W Heal Org.* 81: 236, 2003.
3. Kosek, M.; Bern, C. and Guerrant, R. “The global burden of diarrheal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000”. *Bull W Healt Org.* 81: 197-204, 2003.
4. Departamento de Estadísticas en información en salud. “Estadísticas de natalidad y mortalidad, Chile 2008, Minsal”. url: <http://deis.minsal.cl/deis/vitales/indexenm2008.asp> (accesado el 20/01/11)
5. Prado, V. and O’Ryan, M. “Acute gastroenteritis in Latin America”. *Infect Dis Clin North Am.* 8: 77-106, 1994.
6. Ferreccio, C.; Prado, V.; Ojeda, A.; Cayyazo, M.; Abrego, P.; Guers, L. and Levine, M. “Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile”. *Am J Epidemiol.* 134: 614-662, 1991.
7. O’Ryan, M.; Perez-Schael, I.; Mamani, N.; Peña, A.; Salinas, B.; González, G.; González, F.; and Gómez, J. “Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals”. *Pediatr Infect Dis J.* 20: 685-693, 2001.
8. O’Ryan, M.; Mamani, N.; Gaggero, A.; Avendaño, L.; Prieto, S.; Peña, A.; Jiang, X. and Matson, D. Human caliciviruses are a significant pathogen of acute sporadic diarrhea in children of Santiago, Chile. *J Infect Dis.* 182: 1519-1522, 2000.
9. Gaggero, A.; O’Ryan, M.; Noel, J.; Glass, R.; Monroe, S.; Mamani, N.; Prado, V. and Avendaño, L. “Prevalence of Astrovirus Infection among Chilean Children with Acute Gastroenteritis”. *J Clin Microbiol.* 36: 3691–3693, 1998.
10. O’Ryan, M.; Matson, D. and Pickering, L. “Rotavirus, enteric Adenovirus, Norwalk virus and gastroenteritis tract viruses”. In: Espector S, Lancz G. “Clinical virology manual”. Elsevier science publishing co. New York, 361-375, 1992.
11. Atmar, R. and Estes, M. “The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection”. *Gastroenterol Clin North Am.* 35: 275-290, 2006.
12. Koo, H.; Ajami, N.; Atmar, R. and DuPont, H. “Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide”. *Discov Med.* 10: 61-70, 2010.

13. Fankhauser, R.; Monroe, S.; Noel, J.; Humphrey, C.; Bresee, J.; Parashar, U.; Ando, T. and Glass, R. "Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States". *J Infect Dis.* 186: 1-7, 2002.
14. Vidal, R.; Solari, V.; Mamani, N.; Jiang, X.; Vollaire, J.; Roessler, P.; Prado, V.; Matson, D. and O'Ryan, M. "Caliciviruses and Foodborne gastroenteritis, Chile". *Emerg Infect Dis.* 11: 1134-1136, 2005.
15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for foodborne disease outbreaks --- United States, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 59: 973-9, 2010.
16. Westrell, T.; Dusch, V.; Ethelberg, S.; Harris, J.; Hjertqvist, M.; Jourdan-da Silva, N.; Koller, A.; Lenglet, A.; Lisby, M. and Vold, L. "Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010". *Euro Surveill.* 15: 19524, 2010.
17. Farkas, T.; Jiang, X.; Guerrero, M.; Zhong, W.; Wilton, N.; Berke, T.; Matson, D.; Pickering, L. and Ruiz-Palacios, G. «Prevalence and genetic diversity of human caliciviruses (HuCvs) in Mexican children". *J Med Virol.* 62: 217-223, 2000.
18. Bucardo, F.; Nordgren, J.; Carlsson, B.; Paniagua, M.; Lindgren, P.; Espinoza, F. and Svensson, L. "Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua". *J Clin Microbiol.* 46: 2573-2580, 2008.
19. O'Ryan, M.; Peña, A.; Vergara, R.; Díaz, J.; Mamani, N.; Cortés, H.; Lucero, Y.; Vidal, R.; Osorio, G.; Santolaya, M.; Hermosilla, G. and Prado, V. "Prospective characterization of norovirus compared with rotavirus acute diarrhea episodes in Chilean children". *Pediatr Infect Dis J.* 29: 855-859, 2010.
20. Pang, X.; Joensuu, J. and Vesikari, T. "Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial". *Ped Infect Dis J.* 18: 420-426, 1999.
21. Marshall, J.; Hellard, M.; Sinclair, M.; Fairley, C.; Cox, B.; Catton, M.; Kelly, H. and Wright P. "Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis". *J Med Virol.* 69: 568-578, 2003.
22. Rockx, B.; de Witt, M.; Vennema, H.; Vinjé, J.; De Bruin, E.; Van Duynhoven, Y. and Koopmans, M. «Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study". *Clin Infect Dis.* 35: 246-253, 2002.

23. Bucardo, F.; Nordgren, J.; Carlsson, B.; Kindberg, E.; Paniagua, M.; Möllby, R. and Svensson, L. "Asymptomatic norovirus infections in Nicaraguan children and its association with viral properties and histo-blood group antigens". *Pediatr Infect Dis J.* 29: 934-939, 2010.
24. Gotz, H.; Ekdahl, K.; Lindback, J.; de Jong, B.; Hedlund, K. and Giesecke, J. "Clinical spectrum and transmission characteristics of infection with Norwalk-like virus: findings from a large community outbreak in Sweden". *Clin Infect Dis.* 33: 622-628, 2001.
25. Nilsson, M.; Hendlund, K.; Thorhagen, M.; Larson, G.; Johansen, K.; Ekspong, A. and Svensson, L. "Evolution of Human Calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype". *J Virol.* 77: 13117-13124, 2003.
26. Matsui, S. and Greenberg, H. "Immunity to Calicivirus Infection". *J Infect Dis.* 181: S331-335, 2000.
27. Marionneau, S.; Cailleau-Thomas, A.; Rocher, J.; Le Moullac-Vaidye, B.; Ruvoën, N.; Clément, M. and LePendou, J. «ABH and Lewis histo-blood antigens.; a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world". *Biochim.* 83: 565-573, 2001.
28. Lindesmith, L.; Moe, C.; Marionneau, S.; Ruvoen, N.; Jiang, X.; Lindblad, L.; Stewart, P.; LePendou, J. and Baric, R. «Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection". *Nat Med.* 9: 548-553, 2003.
29. Thorven, M.; Grahn, A.; Hedlund, K.; Johansson, H.; Wahlfrid, C.; Larson, G. and Svensson, L. "A homozygous nonsense mutation (428G>A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic Norovirus (GGII) infections". *J Virol.* 79: 15351-15355, 2005.
30. Rockx, B.; Vennema, H.; Hoebe, C.; Duizer, E. and Koopmans, M. «Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections". *J Infect Dis.* 191: 749-754, 2005.
31. Bucardo, F.; Kindberg, E.; Paniagua, M.; Grahn, A.; Larson, G.; Vildevall, M. and Svensson, L. "Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua". *J Med Virol.* 81: 728-735, 2009.

32. Lindesmith, L.; Moe, C.; LePendou, J.; Frelinger, J.; Treanor, J. and Baric, R. »Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge”. *J Virol.* 79: 2900-2909, 2005.
33. Morrow, A.; Ruiz-Palacios, G.; Jiang, X. and Newburg, D. “Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants”. *J Pediatr.* 145: 297-303, 2004.
34. Jiang, X.; Huang, P.; Zhong, W.; Tan, M.; Farkas, T.; Morrow, A.; Newburg, D.; Ruiz-Palacios, G. and Pickering, L. «Human milk contains elements that block binding of noroviruses to histo-blood group antigens in saliva”. *Adv Exp Med Biol.* 554: 447-450, 2004.
35. Lindesmith, L.; Donaldson, E.; LoBue, A.; Cannon, J.; Zheng, D.; Vinje, J. and Baric, R. “Mechanisms of GII.4 Norovirus persistence in human populations”. *PlosMed.* 5: 269-290, 2008.
36. Siebenga, J.; Vennema, H.; Zheng, D.; Vinjé, J.; Lee, B.; Pang, X.; Ho, E.; Lim, W.; Choudekar, A.; Broor, S.; Halperin, T.; Rasool, N.; Hewitt, J.; Greening, G.; Jin, M.; Duan, Z.; Lucero, Y.; O’Ryan, M.; Hoehne, M.; Schreier, E.; Ratcliff RM.; White PA.; Iritani N.; Reuter, G. and Koopmans, M.” Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants.; 2001-2007”. *J Infect Dis.* 200: 802-812, 2009.
37. Ruuska, T. and Vesikari, T. “Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes”. *Scand J Infect Dis.* 22: 259–267, 1990.
38. Jiang, X.; Wilton, N.; Zhong, W.; Farkas, T.; Huang, P.; Barrett, E.; Guerrero, M.; Ruiz-Palacios, G.; Green, K.; Green, J.; Hale, A.; Estes, M.; Pickering, L. and Matson, D. “Diagnosis of human Caliciviruses by use of enzyme immunoassays”. *J Infect Dis.* 181: S349-359, 2000.
39. Kojima, S.; Kageyama, T.; Fukushi, S.; Hoshino, FB.; Shinohara, M.; Uchida, K.; Natori, K.; Takeda, N. and Katayama, K. “Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses”. *J Virol Methods.* 100: 107-114, 2002.
40. Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. and Kumar, S. “MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0”. *Mol Biol Evol.* 24: 1596-1599, 2007.
41. Ando, T.; Noel, J. and Fankhauser, R. “Genetic classification of Norwalk-like viruses”. *J Infect Dis.* 181: S336-348, 2000.
42. Ando, T.; Monroe, S.; Noel, J. and Glass, R. « A One-tube method of reverse transcription-PCR to efficiently amplify a 3-kilobase region from the RNA polymerase gene to the

- poly(A) tail of small round-structured viruses (Norwalk-like viruses)". *J Clin Microbiol.* 35: 570-577, 1997.
43. Chakravarty, S.; Hutson, A.; Estes, M. and Prasad, B. "Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity". *J Virol.* 79: 554-568, 2005.
 44. Hutson, A.; Airaud, F.; LePendu, J.; Estes, M. and Atmar, R. "Norwalk Virus Infection Associates With Secretor Status Genotyped From Sera". *J Med Virol.* 77: 116–120, 2005.
 45. Grahn, A.; Elmgren, A.; Aberg, L.; Svensson, L.; Jansson, P.; Lönnroth, P. and Larsson, G. "Determination of Lewis FUT3 gene mutations by PCR using Sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples". *Human Mutation.* 18: 358-366, 2001.
 46. Procter, J.; Crawford, M.; Bunce, M. and Welsh, K. "A rapid molecular method (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) to genotype for ABO blood group and secretor status and its potential for organ transplants". *Tissue Antigens.* 50: 475-483, 1997.
 47. Gray, J.; Cunliffe, C.; Ball, J.; Graham, D.; Desselberger, U. and Estes, M. "Detection of Immunoglobulin M (IgM); IgA; and IgG Norwalk Virus-Specific Antibodies by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Baculovirus-Expressed Norwalk Virus Capsid Antigen in Adult Volunteers Challenged with Norwalk Virus". *J Clin Microbiol.* 32: 3059-3063, 1994.
 48. O’Ryan, M.; Vial, P.; Mamani, N.; Jiang, X.; Estes, M.; Ferrecio, C.; Lakkis, H. and Matson, D. "Seroprevalence of Norwalk virus and Mexico virus in Chilean individuals: assessment of independent risk factors for antibody acquisition". *Clin Infect Dis.* 27: 789-795, 1998.
 49. Cao, S.; Lou, Z.; Tan, M.; Chen, Y.; Liu, Y.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Jiang, X.; Li, X. and Rao, Z. "Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus". *J Virol.* 81: 5949-5957, 2007.
 50. Glass, R.; Parashar, U. and Estes, M. "Norovirus gastroenteritis". *N Engl J Med.* 36:1776-1785, 2007.
 51. García, C.; DuPont, H.; Long, K.; Santos, J. and Ko, G. "Asymptomatic norovirus infection in Mexican children". *J Clin Microbiol.* 44: 2997-3000, 2006.
 52. Phillips, G.; Tam, C.; Rodrigues, C. and Lopman, B. "Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England". *Epidemiol Infect.* 138: 1454–1458, 2010.

53. Tran, A.; Talmud, D.; Lejeune, B.; Jovenin, N.; Renois, F.; Payan, C.; Leveque, N. and Andreoletti, L. "Prevalence of rotavirus.; adenovirus.; norovirus.; and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in northern France". *J Clin Microbiol.* 48: 1943-1946, 2010.
54. Gutierrez, C.; de Baranda, C.; Mialdea, O.; Serrano, E. and Sánchez-Fauquier, A. "Prevalence and clinical characteristics of norovirus gastroenteritis among hospitalized children in Spain". *Pediatr Infect Dis J.* 28: 604-607, 2009.
55. Zeng, S.; Halkosalo, A.; Salminen, M.; Szakal, E.; Karvonen, A. and Vesikari, T. "Norovirus gastroenteritis in young children receiving human rotavirus vaccine". *Scand J Infect Dis.* 42: 540-544, 2010.
56. Hutson, A.; Atmar, R. and Graham, D. "Norwalk virus infection and disease is associated with ABO Histo-blood group type". *J Infect Dis.* 185: 1335-1337, 2002.
57. Kindberg, E.; Akerlind, B.; Johnsen, C.; Knudsen, J.; Heltberg, O.; Larson, G.; Böttiger, B. and Svensson, L. "Host genetic resistance to symptomatic norovirus (GGII.4) infections in Denmark". *J Clin Microbiol.* 45: 2720-2722, 2007.
58. Carlsson, B.; Kindberg, E.; Buesa, J.; Rydell, G.; Lidón, M.; Montava, R.; Abu Mallouh, R.; Grahn, A.; Rodríguez-Díaz, J.; Bellido, J.; Arnedo, A.; Larson, G. and Svensson, L. "The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 Norovirus infection". *PLoS One.* 4: e5593, 2009.
59. Larsson, M.; Rydell, G.; Grahn, A.; Rodriguez-Diaz, J.; Akerlind, B.; Hutson, A.; Estes, M.; Larson, G. and Svensson, L. "Antibody Prevalence and Titer to Norovirus (Genogroup II) Correlate with Secretor (*FUT2*) but Not with ABO Phenotype or Lewis (*FUT3*) Genotype". *J Infect Dis.* 194: 1422-1427, 2006.
60. Halperin, T.; Vennema, H.; Koopmans, M.; Kahila Bar-Gal, G.; Kayouf, R.; Sela, T.; Ambar, R. and Klement, E." No association between Histo-blood group antigens and susceptibility to clinical infections with genogroup II Norovirus". *J Infect Dis.* 197: 63-65, 2008.
61. Yang, Y.; Xia, M.; Tan, M.; Huang, P.; Zhong, W.; Pang, X.; Lee, B.; Meller, J.; Wang, T. and Jiang, X. "Genetic and Phenotypic Characterization of GII.4 Noroviruses that circulated during 1987 to 2008". *J Virol.* 84: 9595-9607, 2010.
62. Makita, K.; Hayakawa, Y.; Okame, M.; Homma, K.; Phan, T.; Okitsu, S. and Ushijima, H. "First detection of IgA against norovirus in breast milk". *Clin Lab.* 53: 125-128, 2007.

63. Huang, P.; Farkas, T.; Zhong, W.; Tan, M.; Thornton, S.; Morrow, A. and Jiang, X. "Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns". *J Virol.* 79: 6714-6722, 2005.
64. Wolpin BM.; Kraft P.; Xu M.; Steplowski E.; Olsson ML.; Arslan AA.; Bueno-de-Mesquita HB.; Gross M.; Helzlsouer K.; Jacobs EJ.; LaCroix A.; Petersen G.; Stolzenberg-Solomon RZ.; Zheng W.; Albanes D.; Allen NE.; Amundadottir L.; Austin MA.; Boutron-Ruault MC.; Buring JE.; Canzian F.; Chanock SJ.; Gaziano JM.; Giovannucci EL.; Hallmans G.; Hankinson SE.; Hoover RN.; Hunter DJ.; Hutchinson A.; Jacobs KB.; Kooperberg C.; Mendelsohn JB.; Michaud DS.; Overvad K.; Patel AV.; Sánchez MJ.; Sansbury L.; Shu XO.; Slimani N.; Tobias GS.; Trichopoulos D.; Vineis P.; Visvanathan K.; Virtamo J.; Wactawski-Wende J.; Watters J.; Yu K.; Zeleniuch-Jacquotte A.; Hartge P. and Fuchs CS. "Variant ABO blood group alleles.; secretor status.; and risk of pancreatic cancer: results from the pancreatic cancer cohort consortium". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19: 3140-3149, 2010.
65. Johnson, P.; Mathewson, J.; DuPont, H. and Greenberg, H. "Multiple challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults". *J Infect Dis.* 161:18-21, 1990.
66. Blacklow, N.; Cukor, R.; Bedigian, M.; Echeverria, P.; Greenberg, H.; Schreiber, D. and Trier, J. "Immune response and prevalence of antibody to Norwalk enteritis virus as determined by radioimmunoassay". *J Clin Microbiol.* 10: 903-909, 1979.
67. Parrino, T.; Schreiber, D.; Trier, J.; Kapikian, A. and Blacklow, N. "Clinical Immunity in Acute Gastroenteritis Caused by Norwalk Agent". *N Engl J Med.* 297:86-89, 1977.
68. Reeck, A.; Kavanagh, O.; Estes, M.; Opekun, A.; Gilger, M.; Graham, D. and Atmar, R. "Serological correlate of protection against norovirus-induced gastroenteritis". *J Infect Dis.* 202: 1212-1218, 2010.
69. Barreira, D.; Ferreira, M.; Fumian, T.; Checon, R.; de Sadovsky, A.; Leite, J.; Miagostovich, M. and Spano, L. "Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil". *J Clin Virol.* 47: 60-64, 2010.
70. Huhti, L.; Szakal, ED.; Puustinen, L.; Salminen, M.; Huhtala, H.; Valve, O.; Blazevic, V. and Vesikari, T. "Norovirus GII-4 Causes a More Severe Gastroenteritis Than Other Noroviruses in Young Children". *J Infect Dis.* 203; 1442-1444, 2011.
71. Donaldson, E.; Lindesmith, L.; LoBue, A. and Baric, R. "Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system". *Nature Rev Microbiol.* 8: 231-241, 2010.
72. Atmar, R.; Opekun, A.; Gilger, M.; Estes, M.; Crawford, S.; Neill, F. and Graham, D. "Norwalk virus shedding after experimental human infection". *Em Infect Dis.* 14: 1553-1557, 2008.

XV. Anexo 1. Acta de aprobación de Comité de Ética.



2060

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

FECHA: 16 OCT. 2007

PROYECTO: "IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DEL HOSPEDERO Y DEL AGENTE RELACIONADOS CON SUSCEPTIBILIDAD Y SEVERIDAD EN INFECCIÓN ENTÉRICA POR NOROVIRUS EN NIÑOS ≤ 1 AÑO DE LA REGION METROPOLITANA"

INVESTIGADOR RESPONSABLE: DRA. YALDA LUCERO O.

INSTITUCIÓN: DOCTORADO CS. MEDICAS ASOCIADOS A ESPECIALISTA CLINICA, PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA , FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

Con fecha 9 de Octubre 2007 , el proyecto ha sido analizado a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de la Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que involucra sujetos humanos CIOMS 1992, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto del proyecto el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de consentimiento informado en su versión original con fecha 16 de Agosto de 2007. Se adjunta aprobación del consentimiento informado.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.