

15
Zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

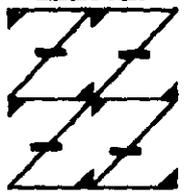
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

ESTUDIO DE LA SEROPREVALENCIA Y
CARACTERISTICAS SOCIODEMOGRAFICAS DE LA
INFECCION POR VIRUS NORWALK EN NIÑOS
DE LA REPUBLICA MEXICANA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIA DE LA LUZ GALVAN SANCHEZ

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO RAUL VELAZQUEZ CASTILLO
ASESOR: Q.F.B. ANTONINO SAENZ PRIETO

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

271050



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A DIOS

Porque en los momentos difíciles de mi vida nunca me ha abandonado.

A MIS PADRES

Por el apoyo, paciencia, cariño y comprensión que me han brindado toda la vida y por impulsarme a la superación, que me ha hecho alcanzar una de mis más grandes metas.

A MIS HERMANAS

Lety, Rita y Gris: Por la ayuda y cariño que siempre he recibido de ellas.

A MI ESPOSO

Felipe:

Por ser el hombre de quien he recibido cariño, amor y apoyo durante toda mi carrera.

A las personas y amistades que de alguna forma u otra colaboraron en la realización de este trabajo, cuya ayuda es invaluable muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente al Dr. Federico Raúl Velázquez Castillo por la oportunidad que me brindó para realizar la tesis en uno de sus proyectos y por la confianza que depositó en mí como director de tesis para iniciarme en la vida profesional.

A la Q.F.B. María Elena Bustamante Calvillo por el apoyo que me otorgó en la realización de este trabajo y por los consejos proporcionados en las medidas justas y correctas que me serán de gran utilidad en la vida.

Al Q.F.B. Antonino Saenz Prieto por haber aceptado ser mi asesor interno y por la amistad que siempre me ha brindado.

AGRADEZCO AL:

Presidente Q.F.B. *María de las Mercedes Zamudio D.*

Vocal DR. *F. Raúl Velázquez Castillo.*

Secretario Q.F.B. *Antonino Saenz Prieto.*

Suplente Q.F.B. *Angel García Sánchez.*

Suplente Q.F.B. *Víctor Hugo Becerra López.*

Por formar parte del jurado.

TÍTULO:

ESTUDIO DE LA SEROPREVALENCIA Y CARACTERÍSTICAS

SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK

EN NIÑOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN:

EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA.

DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y PARASITARIAS,

HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI,

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
OBJETIVOS	22
HIPÓTESIS	23
MÉTODOS	24
DISEÑO DEL ESTUDIO	24
CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	25
COLECCIÓN DE MUESTRAS.....	26
TAMAÑO DE MUESTRA	26
VARIABLES ESTUDIADAS	28
METODOLOGÍA DE LABORATORIO	31
MATERIAL EMPLEADO.....	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
RESULTADOS.....	44
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	67
SUGERENCIAS	68
ANEXOS	69
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	71
BIBLIOGRAFÍA	72

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El virus Norwalk pertenece a la familia *Caliciviridae*, después de haber sido observado por Kapikian y colaboradores en 1972 a través de microscopía inmunoelectrónica, se ha asociado como agente causal de gastroenteritis infecciosa. En México se cuenta con muy poca información acerca de la infección por virus Norwalk.

OBJETIVO: En el presente estudio se determinó la seroprevalencia y características sociodemográficas asociadas a la infección por virus Norwalk, en niños menores de 10 años de edad en la República Mexicana.

MÉTODOS: Se realizó la búsqueda de anticuerpos IgA e IgG específicos contra virus Norwalk en una muestra de 2,988 sueros de niños menores de 10 años de edad, representativos de dicho grupo de edad a nivel nacional, los cuales fueron proporcionados por el banco de sueros del INDRE y que fueron obtenidos de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica, realizada de marzo de 1987 a mayo de 1988. Los anticuerpos séricos específicos contra virus Norwalk fueron determinados a través de la técnica de ELISA, empleando un antígeno recombinante de la cápside viral expresado en un sistema de baculovirus.

RESULTADOS: La prevalencia de infección por virus Norwalk en toda la República Mexicana fue 96.2 %, al año de edad se presentó 74.5 % de seropositividad y en niños de 8 años de edad llegó a 98.1 % de seroprevalencia ($P < 0.001$). Con respecto al sexo es indistinta la infección por virus Norwalk. Los títulos de anticuerpos de IgA e IgG específicos contra virus Norwalk se incrementaron conforme aumentó la edad. La infección por virus Norwalk ocurrió con mayor frecuencia en el área rural ($P = 0.003$), entre familias extensas ($P = 0.01$) y hacinadas ($P = 0.0005$), quienes habitan viviendas en malas condiciones de saneamiento e higiene ($P = 0.02$) y que conviven en un bajo nivel socioeconómico ($P = 0.0003$).

CONCLUSIONES: De acuerdo a estos resultados los niños mexicanos se infectan por virus Norwalk de manera frecuente y desde muy temprana edad, sobre todo durante los tres años primeros de vida, y posiblemente después sufren reinfecciones que indican incremento paulatino en los títulos de anticuerpos conforme aumenta la edad. Así también, se observa la influencia que tienen las malas condiciones de la vivienda, hacinamiento y el bajo nivel socioeconómico para la adquisición de infección por virus Norwalk.

INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS

Los virus son microorganismos intracelulares estrictos, desde el punto de vista metabólico los virus no poseen enzimas de vías metabólicas generadoras de energía, no poseen la capacidad de llevar a cabo la formación de metabolitos del metabolismo intermediario y no poseen ribosomas celulares para los procesos de traducción de sus ARN mensajeros. Los virus son capaces de modificar el metabolismo celular controlándolo, obligando a la maquinaria molecular de la célula infectada a seguir las instrucciones dictadas por el genoma viral, los virus se multiplican por síntesis independiente de sus constituyentes los cuales posteriormente son ensamblados para constituir nuevas partículas vírales (1).

Los virus se diferencian de otros microorganismos por sus reducidas dimensiones, no son retenidos por los filtros bacterianos por lo que se utilizan filtros ultracentrifugables, no pueden verse con el microscopio óptico solo por el microscopio electrónico y no sedimentan con las centrifugas de uso común sino a través de ultracentrifugas (2).

ESTRUCTURA

Los virus están compuestos fundamentalmente de ácido nucleico y proteínas, sin embargo algunos tipos vírales pueden ser sumamente complejos tanto en su composición como en la estructura de sus partículas infectantes (1).

En cuanto a su material genético, los virus poseen un solo tipo de ácido nucleico (ADN ó ARN) que puede presentarse como moléculas únicas, o como fragmentos, por una o dos cadenas complementarias entre sí y que constituyen unidades autónomas de replicación y expresión (replicones), algunos virus son capaces de integrar su ácido de manera más o menos reversible al ADN de la célula huésped y eventualmente son capaces de llevar a cabo infecciones latentes o persistentes y afectar los mecanismos de control produciendo transformaciones celulares (1).

Las proteínas virales poseen distintas funciones, siendo la más general la de formar parte de la cápside en forma de unidades estructurales capaces de interaccionar entre sí para formar envolturas proteicas estables, geoméricamente definidas. Las cápsides pueden poseer una geometría helicoidal o icosaédrica dependiendo del tipo de unidad a partir de la cual se constituyen en la forma en que estas unidades estructurales interaccionan entre sí. Las cápsides helicoidales están compuestas por una subunidad autoagregativa protéica (protómero) la cual es mantenida tanto por interacciones mutuas entre los protómeros como entre estos y el ácido nucleico que se encuentra en el interior de la cápside, el diámetro esta determinado por las características estructurales del protómero y la longitud

de la cápside está dada por la longitud del ácido nucléico; las cápsides helicoidales desnudas normalmente son rígidas a diferencia de las cápsides envueltas que presentan diversos grados de flexibilidad (1).

Muchos virus con aspecto esférico son en realidad poliedros (simetría cúbica): La forma poliédrica preferida es el icosaedro con 20 caras triangulares y 12 vértices (2). Los virus con simetría icosaédrica siguen principios simples de organización geométrica, en estos virus por lo general el ácido nucleico está en forma condensada y es geoméricamente independiente de la estructura circundante (3).

Los virus pueden ser desnudos o envueltos dependiendo de la presencia o ausencia de una membrana de origen celular que cubre a la nucleocápside, esta membrana viral puede ser derivada de la membrana nuclear o de la membrana citoplasmática, manteniendo en ambos casos la estructura de bicapa lipídica, asimétrica, hidrofóbica en sus porciones centrales e hidrofílica en las superficies externas e internas y reflejando en su composición el sitio celular y el tipo de células de su origen. La membrana que cubre a los virus envueltos está compuesta de fosfolípidos sustituidos, producidos por la célula huésped y los cuales son característicos de ésta en su funcionalidad y composición (1).

Desde el punto de vista funcional las proteínas vírales participan como receptores vírales que permiten la interacción específica virus-célula, como antígenos de superficie tanto en caso de virus desnudos y en los virus envueltos, como en el caso de células infectadas.

REPLICACIÓN

A diferencia de lo que ocurre con las células, el tamaño de los virus no aumenta, ni su división es de tipo celular, ya que poseen en su cubierta pocas o ninguna de las enzimas biosintéticas necesarias para su replicación. Por esta razón, los virus se multiplican por síntesis y luego por reunión de sus componentes, así el ácido nucléico vírico, después de desprenderse de sus cubiertas, entra en contacto con la maquinaria celular apropiada, donde es específica la síntesis de las proteínas requeridas para la reproducción vírica. El ácido nucléico vírico se duplica entonces por sí mismo a través del uso de enzimas víricas y celulares, se forman los componentes de la capa vírica y estos componentes finalmente se unen. En algunos viriones la duplicación es iniciada por las enzimas presentes en los viriones (4).

Desde el punto de vista de la relación huésped parásito, los virus se replican solo en cultivos de células o en organismos vivos, poseen gran especificidad con respecto a la célula o tipos celulares a los cuales pueden infectar para llevar a cabo su proceso de replicación viral, poseen distintos tipos de estrategias que les permiten controlar el metabolismo celular (virulencia multifactorial), finalmente los virus son parásitos moleculares eficientes asociados de manera diversa a las células del huésped (1,4). Así los virus están vivos cuando se duplican en las células, mientras que fuera de las células las partículas víricas son metabólicamente inertes y no están más vivas que los

fragmentos de ADN. Los virus al multiplicarse en células huéspedes pueden provocar su muerte y atacar a continuación a células vecinas sanas y de este modo destruyen complejos celulares completos (2).

Los virus están subdivididos en 3 clases principales como son: virus animales, virus bacterianos (bacteriófagos) y virus vegetales. En cada clase, cada virus es capaz de infectar solamente a ciertos tipos de células. Los tipos de huéspedes están determinados por la especificidad de adhesión a las células, lo que depende tanto de las propiedades de la capa del virión como de los receptores específicos situados en la superficie celular (4).

FORMA DE CONSERVACIÓN

Los virus resisten el congelamiento en hielo seco o en refrigeración a -75°C en perfectas condiciones.

La resistencia de los virus al calor es muy semejante a la de las bacterias no esporuladas, muchas especies son inactivadas o muertas en término de 30 minutos a 53 ó 56°C .

Algunos virus, como el de la poliomielitis, tienen resistencia importante a sustancias como el fenol, cresol y éter; soportan amplios límites de pH y sobreviven indefinidamente en glicerina al 50 %. El virus de la hepatitis sobrevive aproximadamente tres veces más en la concentración de cloro necesaria para matar a las bacterias intestinales patógenas (5).

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

ENFERMEDADES DIARREICAS

Las enfermedades diarreicas han sido consideradas desde hace mucho tiempo como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en países en desarrollo (6). Esfuerzos internacionales para combatir este problema han sido encabezados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) con el inicio del programa de control de enfermedades diarreicas, cuyos objetivos son reducir la morbi-mortalidad debida a diarrea (7).

La enfermedad diarreica también se ha denominado gastroenteritis infecciosa, siendo ésta una inflamación ó disfunción gastrointestinal que en la mayoría de las ocasiones es de origen infeccioso, producida por algún germen o sus toxinas. Se caracteriza por un síndrome diarreico acompañado o no de vómitos, fiebre y dolor abdominal, presentándose con mayor frecuencia en niños que en adultos (8). Es más frecuente en los niños menores de 5 años de edad, la enfermedad en algunos casos cede en forma espontánea y la mortalidad se relaciona con las complicaciones, de las cuales la más frecuente es la deshidratación (8,9).

Se calcula que en el mundo cada año mueren por diarrea alrededor de cuatro millones de niños menores de 5 años. La enfermedad diarreica constituye uno de los principales problemas de salud en casi todos los países de América Latina. En México, diversas encuestas realizadas en los últimos años también han estimado una frecuencia anual de 4 episodios diarreicos por niño en áreas urbanas y de 4 a 9 en áreas rurales. Dentro del grupo de menores de 5 años de edad, la tasa más alta se encuentra en los niños de 6 a 11 meses de edad y está muy relacionada con la declinación de los anticuerpos maternos, la falta de inmunidad activa, la suspensión del seno materno y la introducción de alimentos contaminados con enteropatógenos. La inmunidad parcial que producen las infecciones previas, probablemente explique la disminución de la frecuencia en los niños mayores y en los adultos (10).

En nuestro país las enfermedades diarreicas se consideran un grave problema de salud a pesar de las campañas intensivas de prevención que se llevan a cabo desde hace ya varios años, uno de cada 20 fallecimientos de todas las edades es por esta causa y en los niños menores de 5 años una de cada 6 defunciones corresponden a este padecimiento. En México se ha observado que el agente etiológico que individualmente es la causa más frecuente de diarrea en niños menores de 2 años es el virus conocido como Rotavirus (10).

El tratamiento actualmente establecido, se basa en el uso de la hidratación oral, la continuación de la dieta habitual y la educación de los pacientes y sus familiares sobre el reconocimiento temprano de los signos de deshidratación y otros signos de alarma (10).

En los últimos años se ha tenido gran avance en la identificación de un gran número de gérmenes que causan gastroenteritis, así encontramos las producidas por agentes bacterianos como: *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia Coli* toxigénica (ETEC) y *Yersinia enterocolitica*. En nuestro medio no se han identificado o se encuentran con poca frecuencia, otras bacterias relacionadas con diarrea, como *Escherichia coli* enteroinvasora, *Escherichia coli* enteroagregativa, *Echerichia coli* enterohemorrágica y *Edwarsiella tarda* (8,10).

En cuanto al grupo de los parásitos como causa de diarrea aguda son mucho menos frecuentes de lo que se piensa, entre los parásitos más frecuentes se encuentran *Entamoeba histolytica*, *G. lamblia*, *Balantidium coli*, *Criptosporidium* sp. (8,9,10).

Los virus también son responsables de gastroenteritis aguda en la infancia, dentro de los cuales se encuentran, Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus y virus Norwalk (8,10).

Los casos de gastroenteritis causados por hongos, principalmente por *Cándida albicans*, son muy raros y generalmente ocurren en sujetos inmunodeprimidos o tratados con múltiples antibióticos.

Se han realizado más estudios, así como también existe mayor información acerca de la gastroenteritis infecciosa causada por agentes bacterianos ó parasitarios, en comparación a la gastroenteritis infecciosa causada por virus, las cuales a partir de las dos últimas décadas se han empezado a estudiar. La importancia que se les había dado en general era menor en comparación a la otorgada a bacterias y parásitos causantes de gastroenteritis.

La gastroenteritis viral es una enfermedad que afecta a todos los grupos de edad, puede aparecer en forma epidémica y endémica, si bien la enfermedad suele ser autolimitada, puede ser letal en los niños de corta edad, en ancianos y en los pacientes debilitados o desnutridos (11).

En el presente trabajo se realizó un estudio de la seroprevalencia de la infección por virus Norwalk, el cual es un agente causal de gastroenteritis tanto en niños como en adultos, en nuestro país se sabe muy poco de la presencia de este virus, así como también la información que en el ámbito mundial existe de este virus es limitada.

VIRUS NORWALK

VIROLOGÍA

Anterior al inicio de la década de 1970 ningún agente viral había sido implicado como causa de diarrea, hasta que en 1972 el virus Norwalk fue visualizado por Kapikian y colaboradores con el uso de la microscopía inmunoeléctrica (MIE), a partir de muestras obtenidas de heces diarreicas de enfermos de un brote original que ocurrió en 1968 en Norwalk, Ohio. El virus Norwalk es una partícula viral de 27 nanómetros (nm) de diámetro, que parecía tener características de parvovirus, de acuerdo a lo que se encontró en el filtrado de evacuaciones libres de bacterias de voluntarios retados con el virus Norwalk del brote original de Norwalk, Ohio (12,13).

Aunque este virus se descubrió hace más de 20 años, su estudio se ha limitado por no contar con información acerca, de sus características moleculares, ya que este virus no se ha podido cultivar *in vitro*, en ningún tejido celular, ni tampoco cuenta con un modelo animal (14,15); únicamente en el chimpancé es capaz de causar infección pero no enfermedad, el chimpancé desarrolla respuesta de anticuerpos que se detectan por MIE ó radioinmunoensayo (RIA). Por lo que la única fuente de obtención de antígeno de virus Norwalk eran las evacuaciones de humanos retados voluntariamente, de las cuales se tenía muy baja concentración del virus (15,16).

Jiang y colaboradores realizaron la clonación del genoma del virus Norwalk con las características biofísicas preliminares que se tenían y que indicaban que el virión contenía una partícula polipeptídica, lo que permitió el diagnóstico y caracterización molecular del virus a partir de la obtención de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) libre, derivado de las extracciones de los ácidos nucleicos de los viriones purificados del virus Norwalk, obtenidos a partir de muestras de evacuaciones de adultos voluntarios a los que se les administró oralmente el virus Norwalk purificado y cuyas muestras después de la infección se examinaron por RIA y MIE; dos muestras de voluntarios que contenían una buena cantidad de antígeno de virus Norwalk fueron las que se utilizaron como fuente para la clonación del genoma del virus (15).

El virus Norwalk se purificó con métodos usados previamente, considerando que la evacuación contenía principalmente virus Norwalk, esta se trató con (1,1-2 tricloro-1,2-2 trifluoroetano) para remover lípidos y materiales insolubles en agua, el virus se centrifugó en fase acuosa y el botón fue suspendido, sonificado y cargado en un gradiente de CsCl, obteniendo así partículas del virus altamente purificadas; de allí se obtuvieron los ácidos nucleicos por un tratamiento con proteínasa K, seguido de fenol-cloroformo y extraídos a través de una precipitación con etanol; de ahí se procedió a realizar la clonación a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hasta obtener las clonas que indicaban que el virus Norwalk contenía un genoma de RNA de cadena sencilla de sentido positivo, con un tamaño de menos de 7.5 kilobases (kb) y una secuencia de

aminoácidos típicamente viral, la proteína mostraba inicialmente una alta similitud con la polimerasa de la familia de los picornavirus (15,17).

Después de realizar la secuenciación y organización del genoma de este virus fue posible agruparlo como miembro de la familia de los calicivirus (15), por las características que tiene de ser una partícula relativamente pequeña, poseer solo una cápside de proteína viral con un peso molecular de 59 kb y una proteína soluble de 30 kb (16,18), distinguiéndose con estas características de los picornavirus (17). Además, después de haber comparado la secuencia del genoma completo de éste virus con el de otros dos calicivirus, el calicivirus felino (FCV), el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) y un picornavirus (poliovirus), se observó la impresionante similitud de la organización genómica entre el virus Norwalk y los otros dos calicivirus, por lo que todas estas características hicieron posible clasificar al virus Norwalk como miembro de la familia *Caliciviridae* (17,18,19).

Después de la clonación y secuenciación del genoma del virus Norwalk, se identificaron tres fragmentos de lectura abiertos (ORF) de los cuales se encontró que el segundo fragmento tiene un peso molecular de 56 kb y codifica a la proteína de la cápside de un peso molecular de 58 kb, similar a la del virus Norwalk (17), que se expresa a través del sistema de baculovirus, esta proteína se autoensambla en cápsides que asemejan al virus nativo desde el punto de vista morfológico e inmunológico, creando así un antígeno altamente específico que supera la limitante que ofrece el cultivo *in vitro* de éste virus (15,18). La obtención de éste antígeno específico ha llevado al desarrollo y estandarización de un ensayo inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos específicos contra el virus Norwalk y el desarrollo de grandes estudios epidemiológicos (19, 20).

Este antígeno recombinante de virus Norwalk es estable por lo menos 6 meses si es almacenado de +4 a -20°C. Además de ser estable a la liofilización y resistir el tratamiento con ácido a un pH de 3 por 10 minutos, pero no es estable a un pH de 10 por un tiempo de 10 minutos (15). Al comparar la partícula del virus Norwalk recombinante (rVN) con el virus Norwalk nativo (VN), se observa que morfológicamente es muy similar, excepto que la cápside que se encuentra vacía en el virus Norwalk y en el rVN se presenta una doble cápside. Esta diferencia se pudo observar por medio de MIE, y por ELISA y RIA se pudo observar la similitud en la especificidad y sensibilidad inmunológica de ambos (19),

El método de ELISA desarrollado con el rVN es más eficiente para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra virus Norwalk en suero comparado con que los ensayos realizados por radio inmunoensayo bloqueado (RIA-BL) que emplea el antígeno nativo de VN, ya que los valores obtenidos con el método de ELISA son de 16 a 40 veces más altos que los obtenidos por RIA-BL (19).

Se han realizado varios estudios con el antígeno rVN en los que se ha probado su sensibilidad y especificidad. Su sensibilidad fue comparada con MIE, en el suero de 8 voluntarios retados con VN, 6 mostraron respuesta serológica por el método de ELISA y solo 4 mostraron respuesta por MIE por lo que se observa que el método de ELISA con rVN es más sensible para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra virus Norwalk que la MIE (19). En cuanto a la especificidad, se probaron sueros de individuos que habían desarrollado gastroenteritis atribuida a otros agentes vírales como el Henryton II, Morgantown, agente W(Wollan), agente Hawaii y agente Montgomery County, y solamente el suero de un individuo quien había tenido enfermedad por el agente Montgomery County, mostró evidencia de infección previa por VN por MIE y ELISA, todos los demás individuos fueron negativos para virus Norwalk, lo cual muestra una gran especificidad del método de ELISA con rVN para detectar anticuerpos contra virus Norwalk (20).

En otro estudio realizado para probar la especificidad del método de ELISA con rVN se evaluaron 44 especímenes de evacuaciones que contenían diferentes virus y solo 3 muestras colectadas de heces contenían VN por RIA y MIE, fueron positivas también por ELISA para virus Norwalk y ninguna muestra de pacientes con Rotavirus del grupo A, adenovirus entéricos u otros calicivirus humanos como el sapporo (HuCV-Sa) fueron positivas por virus Norwalk, con lo que se vuelve a mostrar la alta especificidad del método de ELISA que emplea rVN expresado en el sistema de baculovirus. Así mismo, se encontró que la sensibilidad del método ELISA que utiliza este antígeno recombinante es muy alta (21).

Aunque en los estudios anotados previamente se observa una alta especificidad de la ELISA con rVN, en un estudio reciente, se observa que la ELISA realizada con rVN para detectar respuesta de anticuerpos en voluntarios infectados con el virus Norwalk, el agente Snow Mountain (SMA) ó el agente Hawaii, existe una reactividad cruzada, que indica la presencia de epitopos comunes en la cápside proteica viral entre estas cepas (22).

La ELISA desarrollada con el empleo de rVN para detectar la presencia del antígeno en heces es mucho más específica. Para el desarrollo de este método de ELISA, se inmunizaron conejos con rVN, para obtener un suero hiperinmune, que se emplea como anticuerpo policlonal de captura y que es útil para detectar antígenos homólogos pero no heterólogos de virus Norwalk (22).

En el análisis de secuencia de los calicivirus humanos (HuCVs) por RT-PCR se encontró que el virus Norwalk forma parte de uno de los tres genogrupos de los HuCVs genéticamente diversos; además, los otros 2 genogrupos son el grupo del agente Snow Mountain y del virus sapporo (22).

TRANSMISIÓN

El virus Norwalk se ha identificado como un agente etiológico de gastroenteritis epidémica aguda; en humanos existe asociación con brotes en niños en edad escolar, adultos y contactos familiares. Ocurre en ambientes variados incluyendo escuelas, barcos, cruceros, hospitales y áreas de recreación. En países en desarrollo la adquisición de anticuerpos contra virus Norwalk se presenta en niños a más temprana edad que en países desarrollados, *en donde se presenta por lo regular hasta que los niños empiezan a asistir a la escuela o en adultos jóvenes (23-25)*

Este virus se transmite por la ruta fecal-oral, a través de alimentos y agua contaminados, por consumo de mariscos, como calamar, ostras y de persona a persona dispersándose rápidamente. Los brotes diarreicos ocurren a lo largo del año sin un máximo estacional (11,24).

CUADRO CLÍNICO

Los rasgos clínicos y patogénicos de la gastroenteritis por virus Norwalk se han estudiado provocando la enfermedad en voluntarios sanos que ingirieron filtrados de heces que contenían el virus. La enfermedad inducida experimentalmente no se distingue de la enfermedad natural, teniendo un periodo de incubación de 10 a 51 horas con una media de 24 horas y la duración usual de los síntomas es de 24 horas. (11,20,26).

La infección por virus Norwalk se puede presentar en dos formas, asintomática o sintomática. Cuando se presenta en forma sintomática, el cuadro clínico de la enfermedad causada por virus Norwalk no es grave pero si se han reportado casos de hospitalización por deshidratación (24). Para poder seguir los síntomas de la enfermedad, Graham y colaboradores (20), retaron a un grupo de adultos voluntarios entre julio de 1985 y enero de 1990, encontraron que el período de incubación y principio de los síntomas es de 24 a 38 horas aproximadamente, así como el tiempo de duración de la enfermedad tiene un rango de 2 a 3 días; además las primeras evacuaciones diarreicas con excreción del virus pueden ocurrir a partir de 15 horas después de la inoculación y persistir hasta 55 horas después del reto con el virus Norwalk.

La excreción del antígeno de VN en heces fecales es mayor en sujetos que presentan una infección sintomática, que en aquellos que tienen una infección asintomática; el pico más alto de excreción de antígeno en heces se observa entre 25 a 72 horas después de la inoculación del virus.

Además de diarrea se presentan otros síntomas, como calambres abdominales, cefalea, mialgia, fiebre de grado bajo y náusea (20). En otro estudio, los voluntarios presentaron vómitos de leves a graves, sin diarrea y otros presentaron diarrea de leve a grave sin vómitos (20,27).

Anteriormente se pensaba que la infección por virus Norwalk solamente se asociaba con brotes epidémicos de gastroenteritis, pero actualmente se observa que este tipo de infección es muy frecuente. La edad de infección por virus Norwalk varía de acuerdo al nivel socioeconómico del país, ya que en países desarrollados como Japón la mayor parte de los niños se infectan cuando empiezan a asistir a la escuela, incrementando las infecciones con la edad, mientras que en países en desarrollo los niños empiezan a presentar infecciones desde los 6 meses de edad (21,28,29).

PATOLOGÍA Y PATOGENIA

En un estudio que incluyó a 12 voluntarios sanos del sexo masculino, de 30 a 47 años de edad, a quienes se les tomó una biopsia de intestino delgado antes de ofrecer el inóculo de virus Norwalk se encontró que las biopsias se encontraban en condiciones normales. Después de 48 horas de ingerir el inóculo, se tomaron biopsias subsecuentes en las cuales se encontraron vellosidades anormales con vacuolización en el citoplasma, decreciendo la altura de la vellosidad intestinal, mostrando inflamación e infiltrado de células, incluyendo polimorfonucleares, con infiltración de la lamina propia, además se observó una lesión reversible característica en el intestino delgado en la región proximal de yeyuno, con trastornos funcionales como deterioro transitorio en la absorción de grasas y carbohidratos, D-xylosa, lactosa y trehalosa, así como una disminución significativa de las concentraciones de enzimas del borde de cepillo del intestino delgado como es el caso de las enzimas fosfatasa alcalina, sin aumento en la actividad de la adenilatociclasa en el yeyuno (30). La desaceleración del vaciado gástrico puede originar la náusea y el vómito, los cambios que se presentan en la mucosa intestinal revierten, volviendo a la normalidad dentro de las 2 semanas posteriores al inicio de la enfermedad. La eliminación del virus en las heces fecales se presenta después de 15 horas de haber estado en contacto con el virus y no suele durar más de 3-4 días (11,20,26,30,31).

EPIDEMIOLOGÍA

La adquisición de anticuerpos específicos debidos a infección por el virus Norwalk con respecto al sexo es indistinta, ya que las diferencias encontradas entre hombres y mujeres no son significativas, según reporte de un estudio realizado con el recombinante de virus Norwalk (rVN) por ELISA en 5 distritos de Japón(21).

La edad de adquisición de anticuerpos en contra de la infección por virus Norwalk varía de acuerdo al nivel socioeconómico del país, ya que en países desarrollados como por ejemplo en Japón, los niños al nacer presentan títulos de anticuerpos altos en un 71 %, decreciendo a un 50 % a los 4 meses de edad, debido a que estos son anticuerpos de origen materno; de 4 meses a 6 años de edad presentan una prevalencia de anticuerpos muy bajos del 6 al 11 %, volviéndose a incrementar a los 7 años cuando los niños empiezan a asistir a la escuela y continuando un incremento de anticuerpos debidos o

infección por virus Norwalk paulatino conforme aumenta la edad, llegando a presentar una prevalencia de 98 % a los 50 años de edad (21). Algo similar sucede en otros países desarrollados como Inglaterra, donde la infección rara vez ocurre en los dos primeros años de vida, los anticuerpos encontrados en niños menores de 6 meses de edad son de tipo IgG, por lo que se consideran anticuerpos de origen materno; los picos más altos en la prevalencia de anticuerpos por infección por virus Norwalk en Inglaterra se observaron a los 6 a 9 años de edad, lo cual coincide con la edad en la que los niños empiezan a asistir a la escuela, y a los 20 a 29 años, ya que en la mayoría de los casos a esta edad se vuelve a tener mayor contacto con niños y se presentan reinfecciones (25).

En cambio otras comunidades con menor nivel socioeconómico como los aborígenes de Australia, muestran una seropositividad para virus Norwalk a muy temprana edad, observándose algo parecido en países como Bangladesh India, lo cual es debido probablemente al bajo nivel de higiene, la calidad de agua suministrada, etc. (29), En otros estudios realizados en países en desarrollo como: Taiwan la prevalencia de 80% a los 2 años de edad y en Panamá es de 98 % a los 5 años de edad (32).

En nuestro país existe muy poca información acerca de la infección por virus Norwalk: En un estudio longitudinal realizado en estudiantes americanos que asistían a una Escuela de Medicina en México, se determinó una incidencia de infección por virus Norwalk de 0.36 episodios por estudiante al año, siendo asintomáticos el 45 % de los episodios (33).

En un estudio longitudinal realizado en 200 niños monitoreados desde recién nacidos hasta los 2 años de vida, en San Pedro Mártir, una comunidad al suroeste de la Ciudad de México, en el cual se obtuvieron muestras de sangre cada 4 meses colectando un total de 1,011 muestras de suero, en las cuales se determinó por el método de ELISA y utilizando el antígeno rVN, la presencia de anticuerpos de tipo IgG en contra del virus Norwalk. Se observó una alta prevalencia de anticuerpos IgG específicos contra virus Norwalk, de 88%, durante la primera semana de vida, que declinó hasta 53 % entre los 7 y 8 meses de edad, volviéndose a incrementar en 85 % a los dos años de edad, los resultados de este estudio pueden estar relacionados al bajo nivel socioeconómico de la población (34). Este estudio de seroprevalencia es muy importante, ya que es la única información existente en nuestro país, que se tiene como antecedente para el presente estudio de seroprevalencia de la infección por virus Norwalk en niños de toda la República Mexicana.

INMUNOLOGÍA

En cuanto a la inmunidad que confiere la infección por virus Norwalk, se observa que aunque se adquieren anticuerpos IgA e IgG por tiempo indefinido, hay susceptibilidad para volver a padecer otras reinfecciones (27,30,31,35-38).

De acuerdo a estudios realizados en sueros de voluntarios sanos retados con virus Norwalk, los anticuerpos que se detectan después de una infección por virus Norwalk son de tipo IgM, IgA e IgG; se ha podido observar que al inicio de la infección predominan los anticuerpos de tipo IgM, que no ofrecen protección en contra de otras reinfecciones ó

la posibilidad de enfermar, a la vez que estos anticuerpos se elevan más cuando existe enfermedad que cuando solo hay infección (27,30,35).

Los anticuerpos de tipo IgM no aparecen antes de una primo infección, empiezan a aparecer aproximadamente 5 días después de la primera inoculación con virus Norwalk a voluntarios, mostrando un pequeño pico de máxima concentración entre los días 10 y 13, decayendo rápidamente (27,37) y desapareciendo alrededor de 24.7 semanas después del primer reto y en un segundo reto los anticuerpos vuelven a aparecer alcanzando títulos más elevados que en la primera infección y por último en un tercer reto ya no decaen totalmente de modo que los anticuerpos IgM se detectan durante la fase aguda de la infección o enfermedad (36-38).

Los anticuerpos IgA aparecen a los pocos días después del reto con VN, y se pueden cuantificar a los 5 días después de la infección, entre los 10 y 13 días alcanzan un nivel máximo, que empieza a disminuir posteriormente hasta llegar a detectarse en niveles bajos pero sin llegar a desaparecer después de una infección (27,36)

En cuanto a los anticuerpos IgG, generalmente se encuentran presentes en los voluntarios antes del reto con virus Norwalk, posiblemente porque ya han estado en contacto con el virus, dichos anticuerpos se incrementan lentamente alcanzando un máximo aproximadamente 23 a 24 días después de la infección por VN (27) y por ser anticuerpos de memoria permanecen en suero por tiempo indefinido (35).

En un estudio realizado con el rVN en el que se detectaron anticuerpos IgM, IgA e IgG, en voluntarios retados con VN se detectaron anticuerpos IgM, y en un número mayor de voluntarios fue posible detectar IgG e IgA en suero de fase convaleciente, además de que las muestras de suero para fase convaleciente se pueden obtener hasta el día 13 después del principio de la enfermedad para detectar anticuerpos específicos para virus Norwalk IgA, IgG (38,39).

INMUNOGLOBULINAS

Las inmunoglobulinas forman un conjunto de proteínas que se presentan como moléculas efectoras del segmento humoral de la inmunidad. Estas proteínas comparten muchas similitudes antigénicas, estructurales y biológicas, pero al mismo tiempo presentan importantes diferencias en cuanto a su composición primaria en ácidos aminados, lo que permite que su función de anticuerpos y su actividad biológica resulten muy específicas, así como el papel que cumplen en la defensa del organismo. Las inmunoglobulinas no solo son capaces de combinarse con los antígenos, sino además se trata de proteínas muy complejas y con características sumamente especializadas (40).

Existen 5 clases de inmunoglobulinas, las cuales se designan con las letras G, A, M, D y E después de la abreviatura Ig que indica su función de inmunoglobulina.

Las inmunoglobulinas IgG son las más abundantes de todas, con una concentración alta, tanto dentro como fuera de los vasos sanguíneos, es producida en mayor cantidad durante la respuesta secundaria que durante la primaria (3), atraviesa la placenta, ésta inmunoglobulina parece encargarse de la inmunidad contra muchos agentes infecciosos que se esparcen por vía sanguínea como son: Bacterias, virus, parásitos y ciertos hongos (40). Puede activar al complemento, unirse con fagocitos profesionales a través de la parte de su fracción cristalizante (FC), y participar en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (3).

La inmunoglobulina IgA ocupa el segundo lugar en cuanto a su abundancia en sangre, su papel fundamental en las funciones inmunitarias del individuo corresponde al sistema secretor externo, proporciona el mecanismo de defensa primaria contra infección local debido a su abundancia en secreciones: de saliva, lágrimas, bronquiales, vaginales, mucosa nasal, líquido prostático, mucosas de intestino; estas secreciones están combinadas con una proteína llamada componente secretor, que parece proteger hasta cierto punto la molécula contra enzimas proteolíticas que suelen encontrarse en estas zonas. Aunque la IgA no atraviesa la placenta, contribuye a la defensa inmunitaria del recién nacido por su alta concentración en el calostro a través de la leche materna durante la lactancia (3,40-42).

Los anticuerpos IgM son los terceros en cuanto a su concentración en sangre. Su estructura polimérica les confiere gran capacidad neutralizante de toxinas y aglutinante de microorganismos, es la inmunoglobulina predominante en las etapas tempranas de la respuesta inmune primaria (41).

Las inmunoglobulinas IgE son menos abundantes que las anteriores, son las más importantes en las reacciones alérgicas, estos anticuerpos tienen un fragmento Fc que tiene alta afinidad por las superficies de las células cebadas. Cuando los anticuerpos se fijan a éstas células, interactúan con el material antigénico (alergeno), disparando una serie de señales que hacen que estas liberen su contenido granular. Estos gránulos están repletos de aminas vasoactivas, y son estas las responsables de los síntomas de las enfermedades alérgicas (41).

Las inmunoglobulinas IgD están presentes en sangre solo en pequeñísimas cantidades, son relativamente lábiles a la degradación por calor y enzimas proteolíticas; existen reportes aislados de IgD con activación de anticuerpos hacia ciertos antígenos abarcando insulina, penicilina, proteínas de la leche, toxoide diftérico, antígenos nucleares y antígenos de la tiroides. Es la inmunoglobulina predominante en la superficie de los linfocitos B inmaduros y quizás tenga un papel en los procesos de diferenciación y maduración de estas células (41,42).

DIAGNÓSTICO

No se puede elaborar un diagnóstico específico de infección por virus Norwalk basándose únicamente en las observaciones clínicas, siempre se debe de fundamentar con datos del laboratorio, y aunque el diagnóstico definitivo de infección ó enfermedad diarreica debida al virus Norwalk se realiza solamente con fines de investigación ó de vigilancia epidemiológica, entre las pruebas más específicas que existen para la detección en heces de virus Norwalk se encuentran la microscopía inmunoeléctronica (MIE) durante la fase aguda de la enfermedad, y para la determinación de anticuerpos específicos contra virus Norwalk, se encuentra el radio inmunoensayo (RIA), inmunoensayo con biotina avidina y recientemente con el que se obtienen resultados más confiables es con el método de ELISA que emplea el antígeno rVN (21,38,43,44,45).

PREVENCIÓN

No se cuenta con métodos específicos para la prevención de la infección ó enfermedad por virus Norwalk, una forma de prevenir ambas condiciones son algunas de las medidas de higiene ya conocidas, como son: el lavado de manos, desecho correcto de heces, materiales contaminados, la preparación higiénica de los alimentos, evitar el consumo de mariscos crudos, y reducir la contaminación del agua potable; estas medidas pueden limitar la frecuencia de la infección y enfermedad por virus Norwalk (31).

Actualmente se están probando las partículas de virus Norwalk recombinante (rVN) expresadas en el sistema de baculovirus, como candidato para el desarrollo de una vacuna; se ha observado que el antígeno recombinante de virus Norwalk presenta respuesta inmunogénica tanto en ratones como en voluntarios sanos retados oralmente (46).

TRATAMIENTO

Dado que éste virus provoca habitualmente una gastroenteritis leve, que generalmente cede espontáneamente, la reposición de la pérdida hidroelectrolítica con solución isotónica o suero oral por vía oral suele ser suficiente, sin embargo, cuando hay vómito o diarrea graves es factible que se requiera la fluidoterapia parenteral. La administración oral de subsalicilato de bismuto reduce de manera significativa la gravedad de los cólicos abdominales, con disminución media de los síntomas gastrointestinales en 14 a 20 horas. Sin embargo, el número, peso y contenido de agua de las evacuaciones y la concentración del virus excretado no se modifica de modo significativo (26,31).

GENERALIDADES DEL MÉTODO DE ELISA (Ensayo inmuno-enzimático).

Esta técnica es un inmunoensayo que permite determinar la concentración de un antígeno o un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación de complejos antígeno-anticuerpo mediante un trazador enzimático (47).

Por medio de esta técnica de ELISA se pueden determinar niveles de antígeno con el método directo o niveles de anticuerpo por el método indirecto y ambos métodos pueden ser competitivos o no competitivos.

El método de ELISA ofrece ventajas sobre la prueba de radioinmunoensayo (RIA), porque no requiere el uso de material radiactivo y equipos de recuento de gammarradiaciones; un espectrofotómetro es capaz de manejar rápidamente pequeños volúmenes de muestra empleados en ELISA, además, los reactivos de ELISA son estables durante su almacenamiento a diferencia de los anticuerpos marcados que se usan en RIA.

Las diferentes etapas de la ELISA son:

A) La unión del antígeno o anticuerpo a una fase sólida.

Se da a través de una adsorción física directa; usando en estas fases sólidas el poliestireno, cloruro de polivinilo (PVC), nylon, propileno, nitrocelulosa, celulosa, goma de silicona y vidrio, estas en forma de tubos, esferas, varillas, o sobre todo como placas de microcultivo de 96 pozos de aproximadamente 250 μ l de capacidad cada uno.

B) Reacción de los inmunoreactivos en solución y en fase sólida.

Después de que el antígeno se ha pegado a la fase sólida, se adiciona la muestra a analizar, la cual contiene el anticuerpo llevándose de esta manera una reacción antígeno-anticuerpo que debe realizarse en condiciones óptimas y definidas de pH, temperatura y concentración salina similar a los valores fisiológicos (pH 7.2, 37 °C y concentración salina equivalente a 0.15M NaCl). Existe el riesgo de que algunas moléculas de inmunoreactivos en solución se adsorban inespecíficamente a la fase sólida en lugar de hacerlo por intermedio de una reacción antígeno-anticuerpo, obteniéndose un resultado falso positivo de la ELISA, observándose por lo tanto un exceso de actividad enzimática con respecto a la que correspondería a la concentración real del inmunorreactivo específico en la muestra; para evitar al máximo esta fuente de error en el ensayo, se suele agregar al medio de reacción un exceso de una proteína inerte, lo que se conoce como bloqueo de la placa, la proteína compite efectivamente con las moléculas de inmunorreactivo específico de la muestra, se une y bloquea los sitios o receptores libres.

En la fase sólida estas proteínas pueden ser seroalbúmina bovina, caseína, suero entero, gelatina u otras, estas proteínas se usan como bloqueantes de los sitios activos de la fase sólida que no fueron ocupados por el inmunorreactivo.

En cada cambio de reactivos que se realiza se lava la placa; en la ELISA los lavados son de gran importancia, ya que si no se realizan correctamente pueden disminuir la especificidad y reproducibilidad de la técnica, o si no son suficientes pueden aparecer resultados elevados por inmunoreactivos no específicos que pudieran quedar unidos a la fase sólida por adsorción, y por otro lado si son excesivos dan lugar al arrastre tanto del reactivo unido específicamente, como incluso del complejo antígeno-anticuerpo, para ello es recomendable usar un detergente no iónico (usualmente Tween 20 al 0.05 %) en buffer de pH 7.2. Siempre es recomendable usar métodos de lavados bien estandarizados (47).

C) Reacción con el conjugado enzimático.

El conjugado enzimático se prepara por unión covalente de una enzima con un anticuerpo o antígeno, es necesario que la enzima tenga actividad elevada, sea económica, obtenible en forma pura y que posea una reacción con el sustrato fácilmente medible. Las enzimas consideradas hasta ahora más satisfactorias son la peroxidasa de rábano picante, glucosa-oxidasa, β -galactosidasa y fosfatasa alcalina, estas son fijadas usualmente a anticuerpos o antígenos por medio de glutaraldehído o peryodato, los conjugados obtenidos de esta manera han demostrado ser estables durante muchos meses e incluso años.

D) La adición del sustrato.

Los sustratos deben de ser estables, solubles antes y después de la degradación, los sustratos cromogénicos deben ser incoloros inicialmente y fuertemente coloreados después de la degradación. Para los conjugados de fosfatasa alcalina es adecuado el p-nitrofenilfosfato (PNFF), para los conjugados con peroxidasa es adecuada la ortofenilendiamina (OFD), sustratos fluorogénicos que producen un compuesto fluorescente pueden ser ventajosos para análisis de alta sensibilidad (48).

E) Lectura de la densidad óptica.

La lectura de densidad óptica para la determinación de anticuerpos ó antígenos cuando se emplea como sustrato PNFF se realiza a 405 nm, y la lectura para determinar anticuerpos ó antígenos cuando se emplea como sustrato OFD se realiza a 450 nm, ya que a estas densidades ópticas se da la máxima lectura para cada sustrato correspondiente.

APLICACIONES DE LA ELISA:

- Es útil para el análisis de cualquier anticuerpo; si el antígeno es adecuado y se puede inmovilizar convenientemente en una fase sólida.
- Se emplea especialmente en el campo de las enfermedades infecciosas.
- Para inmunodiagnóstico de enfermedades virales, la serología es dependiente de la técnica de ELISA.
- Se puede emplear para evaluación de enfermedades epidémicas virales.
- Determinación de enfermedades parasitarias.
- Para el estudio del complejo TORCH, es útil para la detección simultánea de anticuerpos contra *toxoplasma*, *virus de rubéola*, *cítomegalovirus* y *herpes virus* en recién nacidos y embarazadas.

ENCUESTA NACIONAL SEROEPIDEMIOLÓGICA.

Para realizar el estudio de la infección por seroprevalencia de virus Norwalk, se tomó una muestra de la colección de sueros obtenidos durante la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE).

A partir de 1985, México cuenta con un Sistema de Encuestas Nacionales de Salud (SENS), establecido por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud. El SENS está constituido por un conjunto de encuestas que tienen diferentes objetivos, sin embargo, todas ellas se basan en la Encuesta Nacional de Salud (ENS), la cual proporciona información sobre condiciones de salud, factores de riesgo, demanda y uso de servicios, como son variables socioeconómicas y sociodemográficas.

La Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE) proporciona información sobre la actividad pasada o presente de las enfermedades infecciosas; asimismo, ofrece una base para conocer y evaluar la seroprevalencia de diversos padecimientos subclínicos, crónicos e incluso sobre intoxicaciones.

Los diversos aspectos metodológicos de la ENSE incluyen las características del Marco Muestral Maestro (MMM) que es la base muestral de viviendas para las encuestas que conforman el SENS. El MMM está constituido por casi medio millón de viviendas representativas del país.

En 1986 se puso en marcha el diseño conceptual y operativo de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE), que se inició en marzo de 1987 y finalizó en mayo de 1988, abarcó a los 32 estados de la República Mexicana, se visitaron 32,200 viviendas y se colectaron más de 7,000 muestras de sangre (49).

La cantidad de especímenes, el número de estudios programados y la ubicación de los laboratorios participantes hicieron necesaria la integración de un banco de sueros, en donde se centralizaron todas las muestras obtenidas para ser documentadas, separadas, catalogadas, conservadas en condiciones óptimas y posteriormente ser distribuidas a laboratorios para su procesamiento; de esta forma se estructuró el Banco de Sueros, el cual se define como una colección de sueros obtenidos de una muestra representativa de la población del país que se ha conservado en condiciones idóneas para preservar sus características, bioquímicas e inmunológicas. El Banco de sueros está ubicado en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) de la Dirección General de Epidemiología, siendo su objetivo conservar las muestras en condiciones controladas para preservar sus componentes y distribuir las a los laboratorios encargados de realizar las investigaciones para cumplir los objetivos de la encuesta (50).

De acuerdo a la organización Mundial de la Salud (OMS), los bancos de suero se definen como una colección de muestras obtenidas idealmente al azar, en el que cada espécimen está documentado adecuadamente y almacenado en condiciones que permitirán conservarlo durante muchos años antes de ser procesado y conservar información no solo

referente a cada muestra sino también a los resultados de todas las pruebas que se hayan efectuado con ellas. Por lo que de acuerdo a la OMS el Banco de Sueros provee muestras a corto, mediano y largo plazo y estudios retrospectivos basados en conocimientos nuevos sobre la etiología de algunos padecimientos de aparición reciente (50).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades diarreicas han sido consideradas desde hace mucho tiempo una de las principales causas de muerte en niños, principalmente en países en desarrollo como México. Se calcula que en el mundo cada año mueren por diarrea alrededor de cuatro millones de niños menores de 5 años. La enfermedad diarreica constituye uno de los principales problemas de salud en casi todos los países de América Latina, sobre todo en los niños menores de 5 años de edad. En México, se ha estimado una frecuencia anual de 2 a 4 episodios diarreicos por niño en áreas urbanas y de 4 a 9 en áreas rurales (10).

Las enfermedades gastrointestinales nos indican el grado de avance de un país. Son diversos los agentes etiológicos que causan gastroenteritis, entre ellos se encuentran los parásitos como *E. histolytica*, *G. lamblia*, bacterias como *Salmonella sp* y *Shigella sp*, de los cuales se conoce su mecanismo de patogenicidad y se tiene la suficiente información documentada con respecto a estos microorganismos.

Dentro de los virus podemos citar a los Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus y al virus Norwalk (VN), este último es un agente causal de gastroenteritis epidémica aguda, que ataca principalmente a niños. A pesar de la importancia del virus Norwalk como agente causal de gastroenteritis, en México existe muy poca información acerca de él.

Por lo que en el presente estudio se plantean las siguientes preguntas:

¿Cuál es la seroprevalencia de la infección por virus Norwalk a nivel nacional, en niños de la República Mexicana?.

¿Cuáles son las características sociodemográficas asociadas a la adquisición de la infección por virus Norwalk en niños menores de 10 años de nuestro país?.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la seroprevalencia y características sociodemográficas asociadas a la infección por virus Norwalk, en niños menores de 10 años de edad de la República Mexicana.

ESPECÍFICOS

- **Determinar la seroprevalencia nacional de anticuerpos IgA e IgG específicos contra virus Norwalk, en niños menores de 10 años de edad de la República Mexicana.**
- **Identificar las características sociodemográficas asociadas como factores de riesgo para adquirir la infección por virus Norwalk, en niños menores de 10 años de edad de la República Mexicana**

HIPÓTESIS

De acuerdo a estudios realizados previamente, en particular un estudio realizado en niños mexicanos menores de 2 años de edad, que mostró una prevalencia de 85 % de infección por virus Norwalk, se espera que la seroprevalencia de infección por virus Norwalk en niños menores de 10 años de edad de la República Mexicana será mayor al 50 %,

Por otro lado las deficientes condiciones del nivel de hacinamiento, las características de la vivienda y el nivel socioeconómico, son factores asociados a la adquisición de la infección por virus Norwalk en niños menores de 10 años de edad de la República Mexicana.

MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio transversal, prolectivo y analítico.

POBLACIÓN EN ESTUDIO:

La Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud estableció en 1985 el Sistema de Encuestas Nacionales de Salud (SENS), dentro del cual se realizó la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE) que incluyó muestras de suero de personas de toda la República Mexicana. Las muestras fueron colectadas de marzo de 1987 a mayo de 1988.

El Censo General de Población y Vivienda de 1980 y el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática aportó información cartográfica y demográfica para la creación del Marco Muestral Maestro (MMM), que es la base muestral de viviendas para las encuestas que conforman el SENS. El MMM está constituido por viviendas representativas del país, de todos los estratos sociales y zonas geográficas incluyendo el área rural y urbana. En cada entidad federativa se seleccionó un número variable de Unidades Primarias de Muestreo (UPM) con base en la cantidad de habitantes, se concedió a todas ellas una probabilidad conocida de selección, que otorga mayor probabilidad a las más pobladas.

El universo de estudio de la ENSE fueron todos los habitantes del país. El tamaño de muestra calculado para la ENSE se determinó tomando en cuenta diversos factores: La frecuencia del fenómeno a estudiar, el nivel de precisión deseado, el promedio de personas por vivienda y la tasa de no-respuesta, definida como el número de individuos de los que no se pudo obtener la muestra de sangre. De esta manera la muestra nacional calculada se determinó en 32 entidades federativas, 638 municipios, 32,200 viviendas y 70,488 individuos (49).

De esta manera para este estudio en particular, se seleccionó de manera aleatoria y probabilística una muestra de niños menores de 10 años de edad de la ENSE, representativos de dicho grupo de edad a nivel nacional.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Niños de 1 a 10 años de edad.
- Niños de ambos sexos.
- Niños de las 32 entidades federativas del país.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

- Niños menores de un año de edad, por la dificultad técnica para obtener una muestra de sangre, considerando que el procedimiento se debía de realizar en las viviendas.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Niños con información incompleta para efectuar el análisis de factores asociados a la infección por virus Norwalk.

COLECCIÓN DE MUESTRAS.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa, colectándose en tubos estériles y al vacío. El suero se separó por centrifugación y se envió al Banco Nacional de Sueros del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), para su conservación a -20°C (50). Se utilizaron aquellas muestras que fueron útiles para el estudio, que tuvieron información completa para su análisis, como edad, sexo, nivel socioeconómico, etc.

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

El tamaño de la muestra para este proyecto se calculó para construir intervalos de confianza de 95 %, considerando una seroprevalencia de la infección por virus Norwalk del 50 %, usando la estadística de Z para comparar proporciones de variables dicotómicas, a través de la siguiente fórmula.

$$n = \frac{Z^2 (\alpha/2) \times 1-p \times \text{Deff}}{r^2 \times p \times l}$$

donde:

- Z es el cuartil $1 - \alpha/2$ de una variable normal estándar
- p es la proporción de niños seropositivos a VN en la población (50%)
- Deff es el efecto del diseño (2.0, $1 - \alpha = 0.95$)
- r es el error relativo de la estimación

Por lo cual el número total de muestras de suero de niños menores de 10 años de edad para analizar era de $n = 3,073$.

Sin embargo, cuando se realizó la búsqueda de estas muestras en el Banco Nacional de sueros, algunas muestras ya no se encontraron disponibles.

De esta manera se obtuvo una muestra final de 2,988 (97.2%) sueros de niños menores de 10 años de edad de toda la República Mexicana, de manera aleatoria y probabilística, cuya distribución se muestra en la Tabla No. 1:

Tabla No. 1

Muestras de suero de niños de un año a 10 años de edad, incluidos para el estudio de la infección por virus Norwalk de las 32 entidades federativas de la República Mexicana.

No DE ENTIDAD	NOMBRE DE LA ENTIDAD	No. DE MUESTRAS	PORCENTAJE
1	Aguascalientes	21	0.70
2	Baja California Nte.	66	2.21
3	Baja California Sur	13	0.44
4	Campeche	15	0.50
5	Coahuila	78	2.61
6	Colima	11	0.37
7	Chihuahua	165	5.52
8	Chiapas	61	2.04
9	D.F.	324	10.84
10	Durango	38	1.27
11	Guanajuato	149	4.99
12	Guerrero	135	4.52
13	Hidalgo	96	3.21
14	Jalisco	140	4.69
15	México	282	9.44
16	Michoacán	122	4.08
17	Morelos	34	1.14
18	Nayarit	24	0.80
19	Nuevo León	122	4.08
20	Oaxaca	154	5.15
21	Puebla	207	6.93
22	Querétaro	39	1.31
23	Quintana Roo	13	0.44
24	San Luis Potosí	75	2.51
25	Sinaloa	60	2.00
26	Sonora	71	2.38
27	Tabasco	55	1.84
28	Tamaulipas	87	2.91
29	Tlaxcala	29	0.97
30	Veracruz	216	7.23
31	Yucatán	39	1.31
32	Zacatecas	47	1.57
	TOTAL	2,988	100

VARIABLES ESTUDIADAS

Durante la realización de la ENSE, se aplicaron diversos cuestionarios para coleccionar información referente a la localidad estudiada, características de la vivienda y del individuo. La información coleccionada que se analizó incluye:

A) De la vivienda

1. Ubicación geográfica y localización
2. Tipo de vivienda (índice de condiciones de vivienda)
3. Material de construcción predominante en paredes y pisos
4. Tipo de abastecimiento de agua
5. Tipo de eliminación de excretas

B) Del individuo

1. Edad y Sexo
2. Parentesco con el jefe del hogar
3. Lugar de nacimiento
4. Escolaridad
5. Tipo de residencia
6. Número de familias por vivienda
7. Número de individuos por familia
8. Número de cuartos y personas por dormitorio

La familia se definió como el conjunto de individuos que tenían un gasto común para su alimentación, por lo que en cada vivienda podía existir una o más familias

VARIABLE DEPENDIENTE:

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

- Infección por virus Norwalk:

Se define como la presencia de anticuerpos IgA ó IgG específicos en contra del virus Norwalk, por arriba de los valores de corte establecidos para la ELISA, en la muestra de suero analizada.

VARIABLES INDEPENDIENTES:

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

- **Edad:** se toma a partir del nacimiento en adelante, en este estudio abarco a niños desde un año de edad hasta 9 años. Variable continua.
- **Sexo:** se consideraron niños de ambos sexos, masculino y femenino. Variable dicotómica.
- **Numero de individuos en la familia:** se considero como el número de personas que integran a la familia del niño estudiado.

Además partir de la información colectada, se construyeron las siguientes variables independientes:

Lugar de residencia:

Se dividió en 3 áreas:

Area metropolitana: Incluye capitales más densamente pobladas del país como, México, D.F., Guadalajara, Monterrey y Mérida.

Area urbana: Localidades con más de 2,500 habitantes, y

Area rural: Localidades con una población menor a los 2,500 habitantes (49).

Las variables hacinamiento, condiciones de la vivienda y nivel socioeconómico se analizaron de acuerdo a los índices propuestos por Bronfman y cols (51).

- **Nivel de hacinamiento:**

Se determinó a partir del cociente, número de personas en la vivienda entre el número de cuartos de la misma, y se agrupó en tres categorías:

Bueno.- Hasta 2 personas por dormitorio

Regular.- De 2.1. a 3.4 personas por dormitorio

Malo.- más de 3.4 personas por dormitorio.

- **Índice de condiciones de la vivienda:**

Se combino el nivel de hacinamiento con tres variables, 1) material del piso, 2) disponibilidad de agua potable y 3) forma de eliminación de excretas. Para cada una de estas tres variables se consideraron tres categorías en un nivel de medición ordinal, malo, regular y bueno, a partir de las cuales se construyó el índice de condiciones de la vivienda ó INCOVI, que se calificó como bueno para aquellas combinaciones en las que aparecieron por lo menos 2 variables con bueno y una con regular, y malo para las

combinaciones en las que aparecieron por lo menos 2 variables con malo y una con regular y el resto de las combinaciones se ubicaron en la categoría regular.

- **Índice de Nivel Socioeconómico:**

Se consideró la escolaridad del jefe de familia, ordenándola en 3 niveles similares a los previamente señalados, los cuales se combinaron con los tres niveles del INCOVI, dando lugar a nueve combinaciones en base a las cuales se construyó el Índice de Nivel Socioeconómico (INSE), el cual se consideró como bueno para aquellas combinaciones que tuvieron cuando menos un bueno y un regular, malo para aquellas combinaciones en las que hubiera por lo menos un malo y un regular y dejando el resto de las combinaciones como regular. Para el análisis, este índice conservó su carácter ordinal, como malo, regular y bueno (51).

METODOLOGÍA DE LABORATORIO.

Los sueros obtenidos en la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE), se encontraban almacenados en el Banco de Sueros en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE).

Los sueros incluidos en el estudio fueron organizados en cajas con 100 muestras cada una, realizando una relación de las muestras existentes.

- 1) Para todas estas muestras se realizaron diluciones 1:10 en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se organizaron por entidades federativas.
- 2) Los sueros originales sin diluir se guardaron a -70 °C y las diluciones 1:10 de los sueros se mantuvieron a -20 °C.

ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA

Para definir las condiciones del ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra virus Norwalk, se realizó la estandarización del método. Se probaron diferentes tipos de microplacas, diferentes diluciones de los sueros problema, se realizó la titulación de los conjugados anti-IgA y anti-IgG humana y se determinaron los tiempos de lectura más adecuados, para obtener la densidad óptica (D.O) correspondiente a los valores de los controles positivo y negativo ya conocidos.

En la estandarización de la técnica de ELISA:

- A) Se probaron 3 tipos de microplacas para ELISA. Dos tipos eran de la misma marca, Linbro, pero de diferente lote y otro tipo era de marca diferente, Stockwell. Se emplearon diluciones al doble de los sueros desde 1:100 hasta 1:800, para el conjugado anti-IgA y anti-IgG, en base a la mejor diferencia o cociente entre los valores de D.O. de los controles positivos y negativos se encontró que las lecturas más adecuadas se obtuvieron con la placa Linbro, lote 76101008
- B) Se realizó la titulación de los conjugados anti-IgA y anti-IgG humana, usando diluciones al doble de los mismos a partir de 1:500 hasta 1:16,000, buscando la mejor diferencia ó cociente entre los sueros controles positivos y negativos, para así obtener las diluciones de trabajo óptimas para ambos conjugados.
- C) Para el conjugado de anti-IgA humana se determinó que la mejor dilución fue la de 1:1,000 con un cociente del valor de D.O. entre los sueros positivos y negativos (P/N) de 9.08. Con la dilución 1:500 se obtuvo un cociente de 6.96, el cuál era más bajo, y

con la dilución 1:2,000 la relación P/N también baja a 7.80, por lo que se consideró que la dilución más adecuada del conjugado anti-IgA humana era la de 1:1,000.

- D) La mejor diferencia o cociente entre sueros controles positivos y negativos para el conjugado de anti-IgG humana, se observó a una dilución 1:2,000, de acuerdo al valor P/N fue la dilución óptima para trabajar, ya que las diluciones 1:1,000 y 1:4,000 mostraron una relación de P/N menor. De acuerdo a estos valores, se considero que la mejor dilución del conjugado anti-IgG humana era 1:2,000.
- E) Empleando una dilución de los conjugados anti-IgA y anti-IgG humana de 1:1,000 y 1:2,000, respectivamente, se probaron diferentes diluciones de los sueros controles a partir de una dilución 1:50 y diluciones al doble hasta 1:800. La mejor diferencia o cociente de la densidad óptica (D.O) entre sueros positivos y controles negativos, para ambos anticuerpos (IgA e IgG), se obtuvo a una dilución de 1:100.
- F) Se determinó el tiempo más adecuado para la lectura de IgA, que fue a los 30 minutos, a 405 nm, y para IgG a los 10 minutos, a 450 nm, después de adicionar el sustrato y leyendo cada uno de los anticuerpos en una microplaca por separado. Al leer la D.O con los conjugados anti-IgA y anti- IgG aplicados a un mismo pozo de una misma placa, se obtienen las lecturas de ambos anticuerpos de manera secuencial; el tiempo de lectura para el conjugado anti-IgA fue de 35 minutos, y para revelar IgG el mejor tiempo fue de 15 minutos. Las lecturas de ambos conjugados aplicadas a un mismo pozo, de la misma microplaca, fueron comparables a las lecturas que se obtuvieron cuando se aplicó cada conjugado en una microplaca por separado.
- G) Se realizó la determinación de anticuerpos IgA e IgG específicos contra virus Norwalk en 96 muestras de suero del personal de la UIMEIP del Hospital de Pediatría, del C.M.N., Siglo XXI, determinando primero anticuerpos IgA e IgG en placas por separado, utilizando la dilución de conjugados anti-IgA 1:1,000, y anti-IgG humana 1:2,000. Después se procedió a determinar ambos anticuerpos, IgA e IgG de manera secuencial, en el mismo pozo de una microplaca, y el tiempo de lectura se ajustó para obtener lecturas semejantes a las obtenidas en los ensayos por separado, como ya se anotó previamente. Del corrimiento de las muestras del personal de la UIMEIP se obtuvieron tres sueros controles positivos, para el corrimiento de todas las muestras de suero de la encuesta; un control positivo alto (MEB), un control positivo medio (AGR) y un control positivo bajo (HDP).

TÉCNICA DE ELISA

En el presente estudio se empleó el método de ELISA informado por Jian y cols (34). El antígeno que se empleó es el virus recombinante de virus Norwalk obtenido a través del sistema de expresión de baculovirus (18).

La técnica de ELISA empleada para la búsqueda de anticuerpos IgA e IgG específicos contra virus Norwalk en las muestras obtenidas de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica, Una vez estandarizada, quedó establecida de la siguiente manera (Ver figura No. 1):

A) Adherencia del antígeno:

- 1) Se cubren todos los pozos de una microplaca de 96 pozos, con excepción de la primera columna del extremo izquierdo que se utilizará como blanco con 100 μ l de partículas de virus Norwalk expresadas en baculovirus con una concentración de 1 μ g/mL en PBS 0.01M (dilución final 1:3,000), (ver esquema No.1). Para cada placa se usan 10 mL de PBS 0.01M, pH 7.2 y 3.33 μ l del concentrado de partículas del antígeno de virus Norwalk recombinante (rVN).
- 2) Se cubre la placa y se incuba hasta el día siguiente a 4°C

B) Bloqueo de uniones inespecíficas:

- 3) Se lava la placa dos veces con 200 μ l de PBS/Tween 0.05 %.
- 4) Se bloquea la placa agregando en cada pozo 200 μ l de una solución de leche semidescremada en polvo (LSP) al 5 % en PBS, excepto los pozos de la columna blanco del extremo izquierdo.
- 5) Se cubre la placa y se incuba a 37°C durante 1.5 horas

C) Acoplamiento del anticuerpo sérico:

- 6) Durante este periodo de incubación, se descongelan las diluciones 1:10 de cada muestra de suero.
- 7) Se lava la placa una vez con 200 μ l de PBS /Tween 0.05 %.
- 8) Se agregan 100 μ l por pozo de cada control positivo y negativo por duplicado, a una dilución 1:100 en LSP 1 % (ver diagrama No.1).
- 9) Se agregan 100 μ l por pozo de cada muestra de suero a una dilución de 1:100 en LSP 1 % a partir de cada suero previamente diluido 1:10 (ver diagrama No. 1).

10) Se cubre la placa e incuba a 37°C durante 1.5 horas.

11) Se lava la placa cuatro veces con 200 µl de PBS /Tween 0.05 %.

D) Acoplamiento de los conjugados:

12) Se preparan 10 mL de una mezcla que contiene ambos conjugados, agregando 100 µl de una dilución 1:10 del conjugado de ratón anti-IgA humana/fosfatasa alcalina para tener una dilución final de 1:1,000; más 50 µl de una dilución 1:10 del conjugado de cabra anti-IgG humana/peroxidasa, teniendo una dilución final de 1:2,000 en 10 mL de LSP al 1 % en PBS.

13) Se procede a adicionar 100 µl de la mezcla de ambos conjugados a cada pozo de la microplaca, excepto la columna blanco del extremo izquierdo.

14) Se cubre la placa e incuba a 37°C durante 1.5 horas.

E) Desarrollo de la reacción colorida:

15) Durante el periodo de incubación las soluciones amortiguadoras y reactivos correspondientes a cada sustrato se deja fuera del refrigerador para que alcancen la temperatura ambiente.

16) Se procede a preparar los sustratos en fresco. Para cada placa se preparan 10 mL de solución amortiguadora de dietanolamina, pH 9.8 + 2 tabletas de p-nitrofenilfosfato (PNFF) de 5 mg, para revelar IgA.

17) Se prueba la reactividad del sustrato con el conjugado remanente de IgA, para ello se colocan 50 µl del sustrato preparado en el paso anterior y 50 µl del conjugado remanente, llevándose a cabo una reacción que toma un color amarillo claro, con la cual se prueba la reactividad del conjugado con el sustrato.

18) Se lava la placa seis veces con 200 µl de PBS/Tween 0.05 %.

19) Se procede a adicionar 100 µl del sustrato de PNFF a cada pozo de la placa, INCLUYENDO la columna blanco del extremo izquierdo.

20) Se incuba a temperatura ambiente en la obscuridad y a los 35 minutos se determina la lectura a una absorbancia de 405 nm, para la determinación de anticuerpos IgA.

21) Se lava la placa 5 veces con 200 µl de PBS /Tween 0.05%.

22) Se procede a preparar el sustrato en fresco para revelar IgG. Para cada placa de preparan 10 mL de solución amortiguadora de citratos, pH 5.2 + 2 tabletas de orto-fenilendiamina (OFD) de 5 mg + 4 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

- 23) Se Prueba la reactividad del sustrato de IgG con el conjugado remanente. Se colocan también 50 μ l de sustrato de OFD y 50 μ l del conjugado remanente observando un cambio a color anaranjado.
- 24) Se agregan 100 μ l de sustrato de OFD recién preparado en cada pozo de la microplaca, INCLUYENDO la columna blanco del extremo izquierdo.
- 25) Se incuba a temperatura ambiente en la oscuridad y a los 15 minutos se determina la lectura a 450 nm, para realizar la determinación de anticuerpos IgG.

FIGURA No. 1

ELISA para la Detección de Anticuerpos IgA e IgG Anti-VN en Suero

Lectura DO: 405/450nm
Substrato: PNFF x 35 min/OFD x 15 min
Lavado: 6x
Conjugado: Anti-IgA/IgG (humana)
conjugada con Fosfatasa
alcalina/ Peroxidasa
1.5 h a 37°C
Lavado: 4x
Muestra: Suero en dilución 1:100
en LSD 1%/PBS
1.5h a 37°C
Lavado: 1x
Bloqueo: LSP 5%/PBS
1.5 h a 37°C
Lavado: 2x PBS/Tween 0.05%
Antígeno: Antígeno de la cápside de VN
expresado en baculovirus (rVN)
1 µg/ml en PBS 0.01M (1:3,000)
durante la noche a 4°C
Fase sólida: Placas Linbro Titertek

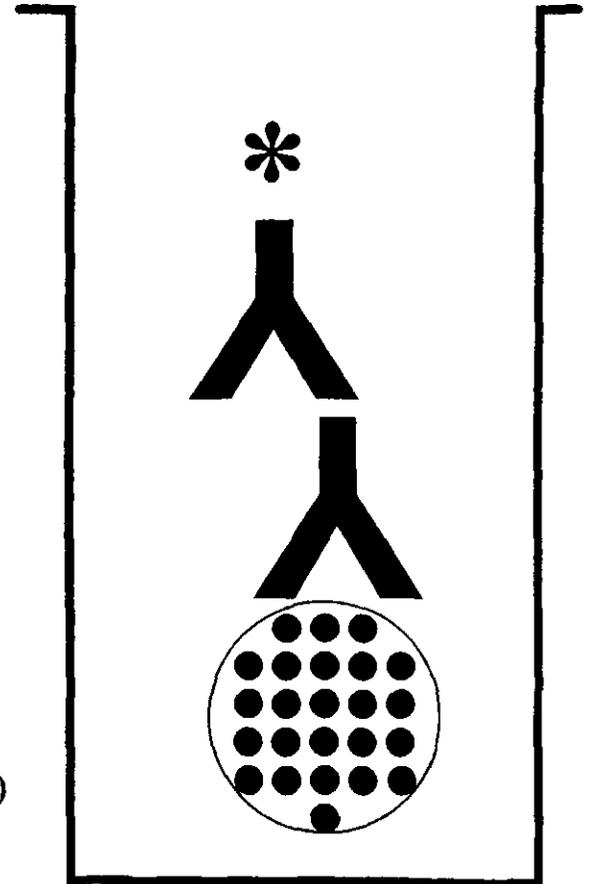


Diagrama No. 1

Protocolo de ELISA para determinar anticuerpos IgA e IgG anti-VN en suero.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Control positivo alto	M									
B	B	Control positivo alto		U								
C	L	Control positivo medio			E							
D	A	Control positivo medio				S						
E	N	Control negativo					T					
F	C	Control negativo						R				
G	O	Control positivo bajo							A			
H		Control positivo bajo								S		

I.- Placa sensibilizada con rVN 1:3,000 e incubación a 4°C.

II.- Bloqueo con LSP 5 % en PBS e incubación de 90 minutos a 37°C.

III.- Aplicación de sueros controles en la segunda columna por duplicado, así como de muestras de suero 1:100 en LSP 1 % e incubación de 90 minutos a 37° C.

IV.- Adición de conjugados anti-IgA IgG e incubación de 90 minutos a 37°C.

V.- Adición de sustratos, incluyendo la columna del extremo izquierdo blanco.

VI.- lectura de absorbancia a 405 nm, para anticuerpos IgA y 450 nm para anticuerpos IgG.

Determinación de los valores de corte para un resultado positivo de los anticuerpos IgA e IgG específicos contra virus Norwalk:

Los puntos de corte para determinar los valores de densidad óptica (D.O) a partir de los cuales se consideró como positiva la presencia de anticuerpos IgA e IgG específicos contra virus Norwalk, fueron determinados como el promedio de la densidad óptica (D.O) más tres desviaciones estándar de los valores observados en los controles negativos a una dilución de 1:100, siendo para IgA ≥ 0.240 y para IgG ≥ 0.270 (Tabla No. 2).

Se consideró la presencia de infección por virus Norwalk en aquellas muestras de suero, cuyo valor de la densidad óptica para ambos anticuerpos, IgA e IgG específicos, eran iguales o mayores al punto de corte, o cuando solamente el anticuerpo IgA ó solamente el anticuerpo IgG específico era mayor al punto de corte. Por otro lado, Cuando la densidad óptica de ambos anticuerpos IgA e IgG específicos, eran menores a sus correspondientes puntos de corte establecidos, la muestra de suero fue considerada negativa, como se muestra en la Tabla No. 2

Tabla No. 2. PUNTOS DE CORTE ESTABLECIDOS PARA LA INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK

ANTICUERPO	PUNTO DE CORTE (ELISA)	INFECCIÓN			NO INFECCIÓN
		+	+	-	-
IgA	≥ 0.240	+	+	-	-
IgG	≥ 0.270	+	-	+	-

(+) Muestra positiva

(-) Muestra negativa

MATERIAL EMPLEADO

Vasos de precipitados de 50 y 100 mL (Pyrex)

Probeta de 1,000 mL (Kimax)

Probeta de 1,000 mL (Pyrex)

Matraz Erlenmeyer de 1,000 y 4,000 mL (Pyrex)

Matraz Erlenmeyer con tapón de rosca de 125, 250 y 500mL (Pyrex)

Matraz Balón de 6,000 mL (Pyrex)

Pipetas graduadas de 5,10 mL (Pyrex)

Pipetas Pasteur (Kimble)

Frascos con tapa de rosca de 100, 250, 500 y 1,000 mL (Duran)

Frascos con tapa de rosca de 100 mL (Flow laboratories, Inc).

Frascos ámbar de 1,000 mL

Tubos de centrifuga de plástico de 50 mL

Puntas para micropipeta de 20, 200 y 1,000 μ l

Canal para disposición de reactivos

Perilla para succionar

Microplacas de 96 pozos para ELISA Linbro lote 76101008

Fitros para esterilizar (millipore swinnex-47)

Membrana esterilizadora para filtro poro 0,22 μ M 8 milliporo

Jeringa desechable de 50 mL

Micropipeta Gilson de 20, 200 y 1,000 μ l (Gilson)

Pipeta multicanal de 12 canales (Costar)

Cronómetro modelo 190554 serie 0224.114

Recipiente de plástico para hielo

REACTIVOS Y SOLUCIONES

REACTIVOS

Na_2HPO_4 para análisis (P.A), (Merck)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ P.A., (Merck)

NaCl P.A.(Monterrey)

Tween 20 (Sigma)

Leche semidescremada en polvo (Svelty Nestlé)

Ácido cítrico (Mallinckrodt)

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ P.A.

Azida de sodio, Reactivo analítico (R.A), (Sigma)

Dietanolamina (Merck)

HCL concentrado

HCl 0.1N

NaOH 0.1 N

Tabletas de para-nitrofenil-fosfato (PNFF), (SIGMA)

Tabletas de orto-fenilendiamina (OFD), (SIGMA)

H_2O_2 30 %, Volumen/Volumen (V/V)

SOLUCIONES

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.01M), pH 7.2

PBS/ TWEEN 2%

TWEEN 0.05%

Leche semidescremada en polvo (LSP) 5%, y 1% en PBS

Solución amortiguadora de citratos, pH 5.2

Solución amortiguadora de dietanolamina, pH 9.8

EQUIPO

Balanza Analítica Sartorius 2003 MPL

Balanza granataría Metter Toledo PB 2003

Lector de ELISA Labsystems integrated EIA

Impresora Hewlett Packard Deskjet 500C

Vortex Fisher Scientific G-560 serie 2-235854

Refrigerador de -4°C

Congelador de -20°C

Potenciómetro internacional científica Metrohm Herisau

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La seroprevalencia de la infección por virus Norwalk, se determinó de manera global y de acuerdo a edad, sexo, número de individuos por familia, por entidades de la República Mexicana, tipo de área de residencia, y características sociodemográficas. En cada caso el numerador estuvo constituido por el número de sujetos seropositivos a virus Norwalk y el denominador por la población total en estudio correspondiente.

Se eligió la prueba de chi cuadrada χ^2 para el análisis estadístico de los resultados, porque es una prueba estadística útil para el análisis de variables no paramétricas (52).

Dentro de la prueba de χ^2 existen variantes, las cuales se aplican de acuerdo a las condiciones de análisis del estudio.

La χ^2 para bondad de ajuste: Se utiliza cuando es necesario efectuar comparaciones entre frecuencias obtenidas para una variable categórica (frecuencias observadas) en un estudio, con las especificadas de acuerdo con una distribución teórica (frecuencias esperadas). Es decir que se quiere averiguar si las discrepancias que se encuentran entre las frecuencias observadas y las esperadas no se deben al azar, sino a que por alguna razón no aleatoria el fenómeno estudiado no se ajusta a las frecuencias teóricas (53). En este estudio esta variante se emplea para la comparación de seropositivos de acuerdo al sexo.

La prueba de χ^2 para homogeneidad: Se usa con frecuencia para determinar si dos o más poblaciones son homogéneas. Con esto se quiere decir que las distribuciones de datos son similares con respecto a una variable de criterio en particular.

La prueba de χ^2 para independencia: La muestra utilizada en una prueba de independencia consta de elementos extraídos aleatoriamente a partir de la misma población. Esta prueba se utiliza para verificar si las mediciones de variables de 2 criterios son independientes o están asociadas entre sí en una población dada. Tales pruebas pueden emplearse en variables como el nivel de educación e ingresos (52).

La prueba de χ^2 para tendencia: Se utiliza para determinar una asociación no debida al azar, del incremento o decremento significativo de la variable dependiente, con una o más variables independientes. En este estudio esta variante se empleó para determinar la posible asociación entre la presencia de infección por virus Norwalk, con el aumento en la edad, el número de individuos en la familia, y el deterioro de las condiciones sociodemográficas (54).

La prueba de χ^2 de Mantel-Haenszel: Se utiliza como en este estudio, cuando existe una o más variables confusoras que se asocian o se relacionan con la variable dependiente, como en este estudio fue la edad, que influyó en los resultados de infección por virus Norwalk, y para la cual fue necesario realizar ajuste estadístico. (54).

La razón de momios: Es una medida de la fuerza y sentido de la asociación entre el factor de exposición (causa) y el efecto (infección), que está muy relacionada con el riesgo relativo, tomándose como base la unidad, la cual aumenta conforme se incrementa el *riesgo relativo de infección (factor de riesgo)* y disminuye conforme el riesgo de infección es menor (*factor de protección*) (53).

El valor de probabilidad (P): Se utiliza para determinar si la diferencia estadística observada es o no significativa y se determina de acuerdo al intervalo de confianza establecido para la prueba, el cual fue del 95 %, con un nivel de significancia de α 0.05 ($P < 0.05$).

Se puede observar si la diferencia entre dos o más proporciones es estadísticamente significativa (valor de probabilidad), comparando el valor de discrepancia obtenido (χ^2 calculada), con el valor de χ^2 esperado, que se obtiene de tablas de distribución de la χ^2 , El criterio de interpretación utilizado será, si hay discrepancia entre los valores observados y los esperados nos indicará que habrá entonces un grado de significancia estadística entre las variables estudiadas (53,55).

El manejo de datos por métodos simples se complicó debido al gran número de muestras estudiadas, de modo que se procedió al análisis con ayuda de un procesador computable con sistema IBM.

No se incluye cada una de las tablas para χ^2 , debido a que el análisis del estudio en su mayor parte se realizó con χ^2 para tendencia, ajustada a la edad o con corrección de Yates, que hacen a la χ^2 lo más exacta posible para el análisis, al igual que la probabilidad obtenida es más exacta.

RESULTADOS

Se realizó la búsqueda de anticuerpos IgA e IgG específicos contra virus Norwalk en 2,988 muestras de suero de niños de 1 a 10 años de edad, obtenidas de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica realizada de marzo de 1987 a mayo de 1988. En 2,905 niños (97.2 %, del total) se contó con información completa, para resolver el análisis de las características sociodemográficas asociadas a la presencia de infección por virus Norwalk.

El punto de corte establecido para determinar si existía infección por virus Norwalk fue, tomado en base a la media más tres desviaciones estándares de la densidad óptica de los controles negativos probados a una dilución de 1:100, dichos puntos de corte fueron: para IgA ≥ 0.240 y para IgG ≥ 0.270 (Tabla No. 2).

Se consideraron como positivas para la presencia infección por virus Norwalk, aquellas muestras de suero cuya densidad óptica de los anticuerpos IgA ó IgG específicos eran iguales o mayores a los puntos de corte respectivos, o bién, cuando ambos anticuerpos IgA e IgG específicos eran positivos. Cuando la densidad óptica de los dos anticuerpos IgA e IgG específicos eran menores a sus correspondientes puntos de corte las muestras se consideraron como negativas, Tabla No. 2.

Tabla No. 2. PUNTOS DE CORTE ESTABLECIDOS PARA LA INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK

ANTICUERPOS	PUNTO DE CORTE (ELISA)	INFECCIÓN			NO INFECCIÓN
		+	+	-	
IgA	≥ 0.240	+	+	-	-
IgG	≥ 0.270	+	-	+	-

(+) Muestra positiva

(-) Muestra negativa

La seroprevalencia global de infección por virus Norwalk en niños de 1 a 10 años de edad de la República Mexicana fue de 96.2 %, 2,874 positivos de los 2,988 niños estudiados.

INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK CON RESPECTO AL SEXO.

De los 2,988 sueros estudiados, 1,541 fueron del sexo masculino, de los cuales 1,484 fueron positivos, para la infección por virus Norwalk (96.3 %). Del sexo femenino se obtuvieron un total de 1,447 sueros, de los cuales 1,390 (96.1 %) resultaron positivos para infección por virus Norwalk. Al comparar el porcentaje de muestras positivas entre el sexo masculino y femenino, a través de la prueba estadística de χ^2 , se obtuvo un valor de $\chi^2 = 0.12$, con una probabilidad de $P = 0.73$, por lo tanto, la prueba no es estadísticamente significativa, ya que el valor de probabilidad establecido es de $P < 0.05$, por consiguiente podemos decir que la infección por virus Norwalk ocurre de manera indistinta en ambos sexos (Tabla No. 3).

Tabla No. 3 INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK DE ACUERDO AL SEXO

SEXO	INFECCIÓN POR VN		TOTAL DE NIÑOS ESTUDIADOS	PORCENTAJE DE POSITIVOS
	NEG	POS		
Masculino	57	1,484	1,541	96.3
Femenino	57	1,390	1,447	96.1
TOTAL	114	2,874	2,988	96.2 (porcentaje global)

$\chi^2 = 0.12$; $P = 0.73$ (No significativa)

NEG. Negativo

POS. Positivo

ANTICUERPOS DE IgA ESPECÍFICOS CON RESPECTO AL SEXO.

Al analizar los resultados obtenidos de los anticuerpos IgA específicos contra virus Norwalk con respecto al sexo, se observó para el sexo masculino 60.2 % de positividad y para el sexo femenino 69.3 %. Las muestras positivas analizadas muestran una $\chi^2 = 27$ y una probabilidad de $P < 0.001$ (valor estadísticamente significativo ya que $P < 0.05$). Con base en estos resultados podemos decir que las niñas producen con mayor frecuencia anticuerpos IgA específicos, Tabla No. 4.

Tabla No. 4 ANTICUERPOS IgA ESPECÍFICOS CON RESPECTO AL SEXO

SEXO	ANTICUERPOS DE IgA		TOTAL	PORCENTAJE DE POSITIVOS
	NEG	POS		
Masculino	613	928	1,541	60.2
Femenino	444	1,003	1,447	69.3
TOTAL	1,057	1,931	2,988	64.62

$\chi^2 = 27; P < 0.001$

ANTICUERPOS IgG CON RESPECTO AL SEXO

En la Tabla No. 5 se muestra el porcentaje de sueros positivos para anticuerpos IgG específicos contra virus Norwalk. El sexo masculino obtuvo 96.2 % y el sexo femenino 95.8 % de muestras positivas, el análisis una $\chi^2 = 0.29$ y una $P = 0.59$ considerando que $P < 0.05$, no hay diferencia estadística significativa en base a la presencia de anticuerpos IgG específicos de acuerdo al sexo.

Tabla No. 5 ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS CON RESPECTO AL SEXO.

SEXO	ANTICUERPOS DE IgG		TOTAL	PORCENTAJE DE POSITIVOS
	NEG	POS		
Masculino	58	1,483	1,541	96.2
Femenino	60	1,387	1,447	95.8
TOTAL	118	2,870	2,988	96.0

$\chi^2 = 0.29; P = 0.59$ (no significativa).

SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK CON RESPECTO A LA EDAD

La seroprevalencia de infección por virus Norwalk durante el primer año fue de 74.5 %, considerando una razón de momios en este grupo de edad de 1.0, la prevalencia aumenta a los tres años a un 96.6 % y con ello la razón de momios se incrementa a 9.6. Después de los tres primeros años, el incremento del porcentaje de la infección por virus Norwalk ocurre de manera más lenta alcanzando en niños de 8 años de edad un porcentaje máximo de 98.1 % de sueros positivos y una razón de momios de 18.1; a los 9 años existe una pequeña disminución en el porcentaje de muestras positivas de 97.5 %, al igual que la razón de momios a 13.4, obteniéndose de manera global una $\chi^2 = 63.725$ (para tendencia), $P < 0.001$ indicando que existe incremento significativo de la infección por virus Norwalk con la edad. Los datos se muestran en la Tabla No. 6.

Tabla No. 6 INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK CON RESPECTO A LA EDAD

EDAD (AÑOS)	TOTAL DE NIÑOS ESTUDIADOS	INFECCIÓN POR VN		PORCIENTO DE POSITIVOS	RAZÓN DE MOMIOS
		NEG	POS		
1	98	25	73	74.5	1.0
2	145	14	131	90.3	3.2
3	204	7	197	96.6	9.6
4	243	11	232	95.5	7.2
5	435	15	420	96.6	9.6
6	428	11	417	97.4	13.0
7	471	10	461	97.9	15.8
8	484	9	475	98.1	18.1
9	480	12	468	97.5	13.4
TOTAL	2,988	114	2,874	96.2	

$\chi^2 = 63.725$ (para tendencia); $P < 0.001$

ANTICUERPOS IgA ESPECÍFICOS DE ACUERDO A LA EDAD

Los anticuerpos IgA específicos se incrementan paulatinamente de acuerdo a la edad. Al año, el porcentaje de muestras positivas es de 40.8 % considerando a esta edad una razón de momios de 1.0; a los 3 años la prevalencia se incrementa a 56.4 %, con una razón de momios de 1.9, alcanzando un incremento de 72.5 % a los 9 años, con una razón de momios de 3.8; con una $\chi^2 = 69.79$ (para tendencia), de acuerdo a estos resultados se observa una $P < 0.001$, que es menor a la probabilidad establecida de $P < 0.05$ estadísticamente significativa. De acuerdo a la razón de momios observamos que conforme aumenta la edad se incrementa el riesgo de adquirir anticuerpos IgA específicos, debidos a infección por virus Norwalk. Tabla No.7 y Gráfica No.1.

Tabla No. 7 ANTICUERPOS IgA ESPECÍFICOS DE ACUERDO A LA EDAD

EDAD (AÑOS)	TOTAL DE NIÑOS ESTUDIADOS	INFECCIÓN POR VN		PORCIENTO DE POSITIVOS	RAZÓN DE MOMIOS
		NEG	POS		
1	98	58	40	40.8	1.0
2	145	73	72	49.7	1.4
3	204	89	115	56.4	1.9
4	243	104	139	57.2	1.9
5	435	166	269	61.8	2.3
6	428	135	293	68.5	3.1
7	471	160	311	66.0	2.8
8	484	140	344	71.1	3.6
9	480	132	348	72.5	3.8
TOTAL	2,988	1,057	1,931	64.6	

$\chi^2 = 69.79$ (para tendencia); $P < 0.001$

ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS DE ACUERDO A LA EDAD

La seroprevalencia de anticuerpos IgG específicos con respecto a la edad, muestran porcentajes más elevados, comparados con la seroprevalencia de anticuerpos IgA específicos. La seroprevalencia de anticuerpos IgG se incrementa de acuerdo a la edad. En el primer año es de 74.5 %, con una razón de momios de 1.0, a los 3 años se presenta el mayor incremento llegando a 96.6 %, con una razón de momios de 9.6; continuando con un incremento paulatino de anticuerpos IgG desde los 5 años en adelante, alcanzando a los 8 años un 97.7 % de positividad y una razón de momios de 14.7, observando un descenso a los 9 años a 97.5 % y una razón de momios de 13.4, obteniendo una $\chi^2 = 59.26$ (para tendencia) y una $P < 0.001$, que es menor a $P < 0.05$, Tabla No. 8, Gráfica No. 1.

Estos resultados indican que conforme aumenta la edad, aumenta la probabilidad de adquirir anticuerpos IgG específicos, debido a una infección por virus Norwalk.

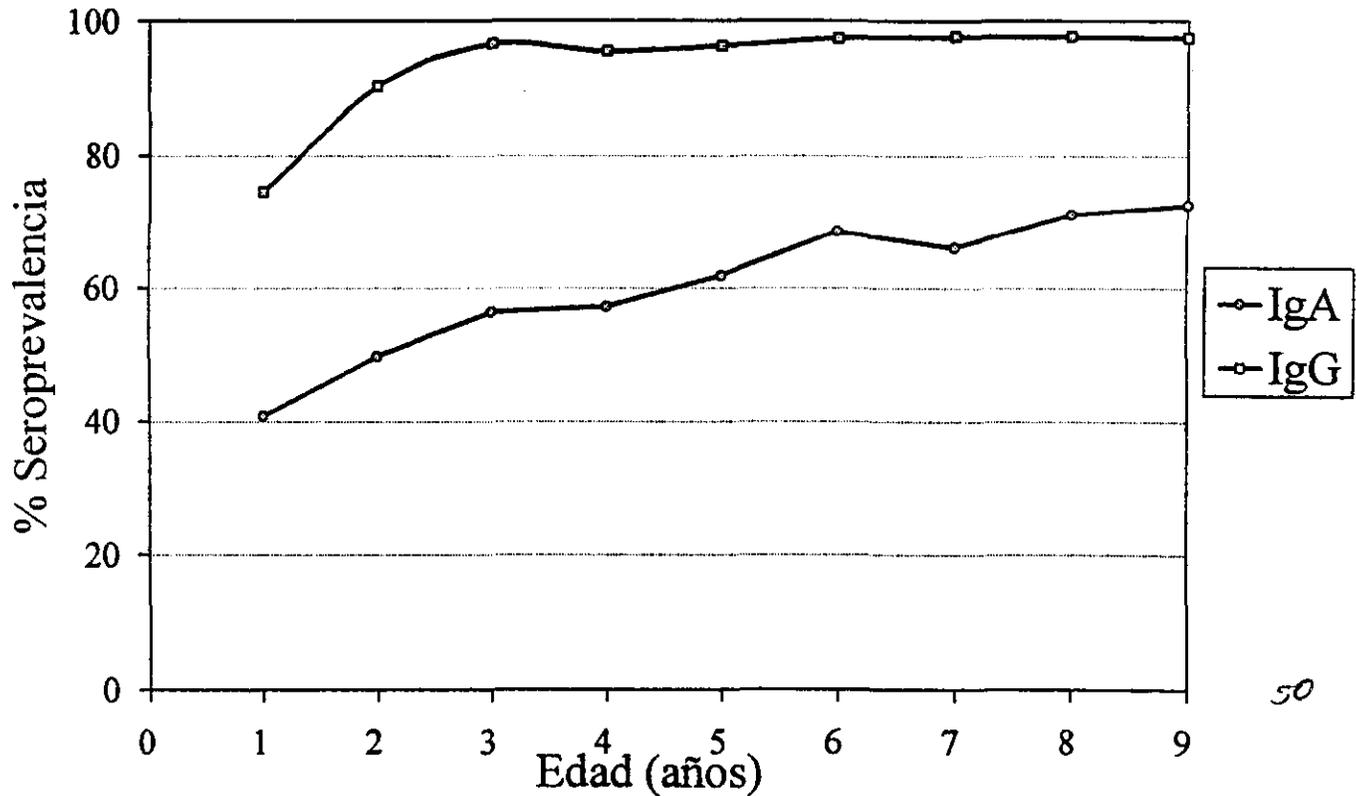
Tabla No. 8 ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS DE ACUERDO A LA EDAD.

EDAD (AÑOS)	TOTAL DE NIÑOS ESTUDIADOS	INFECCIÓN POR VN NEG	POS	PORCIENTO DE POSITIVOS	RAZÓN DE MOMIOS
1	98	25	73	74.5	1.0
2	145	14	131	90.3	3.2
3	204	7	197	96.6	9.6
4	243	11	232	95.5	7.2
5	435	16	419	96.3	9.0
6	428	11	417	97.4	13.0
7	471	11	460	97.7	14.3
8	484	11	473	97.7	14.7
9	480	12	468	97.5	13.4
TOTAL	2,988	1180	2,870	96.0	

$\chi^2 = 59.26$ (para tendencia); $P < 0.001$

GRÁFICA No. 1

Seroprevalencia de los Anticuerpos Contra Virus Norwalk de Acuerdo a la Edad



TÍTULOS SERÍCOS DE ANTICUERPOS ISOTIPO-ESPECÍFICOS CONTRA VIRUS NORWALK DE ACUERDO A LA EDAD.

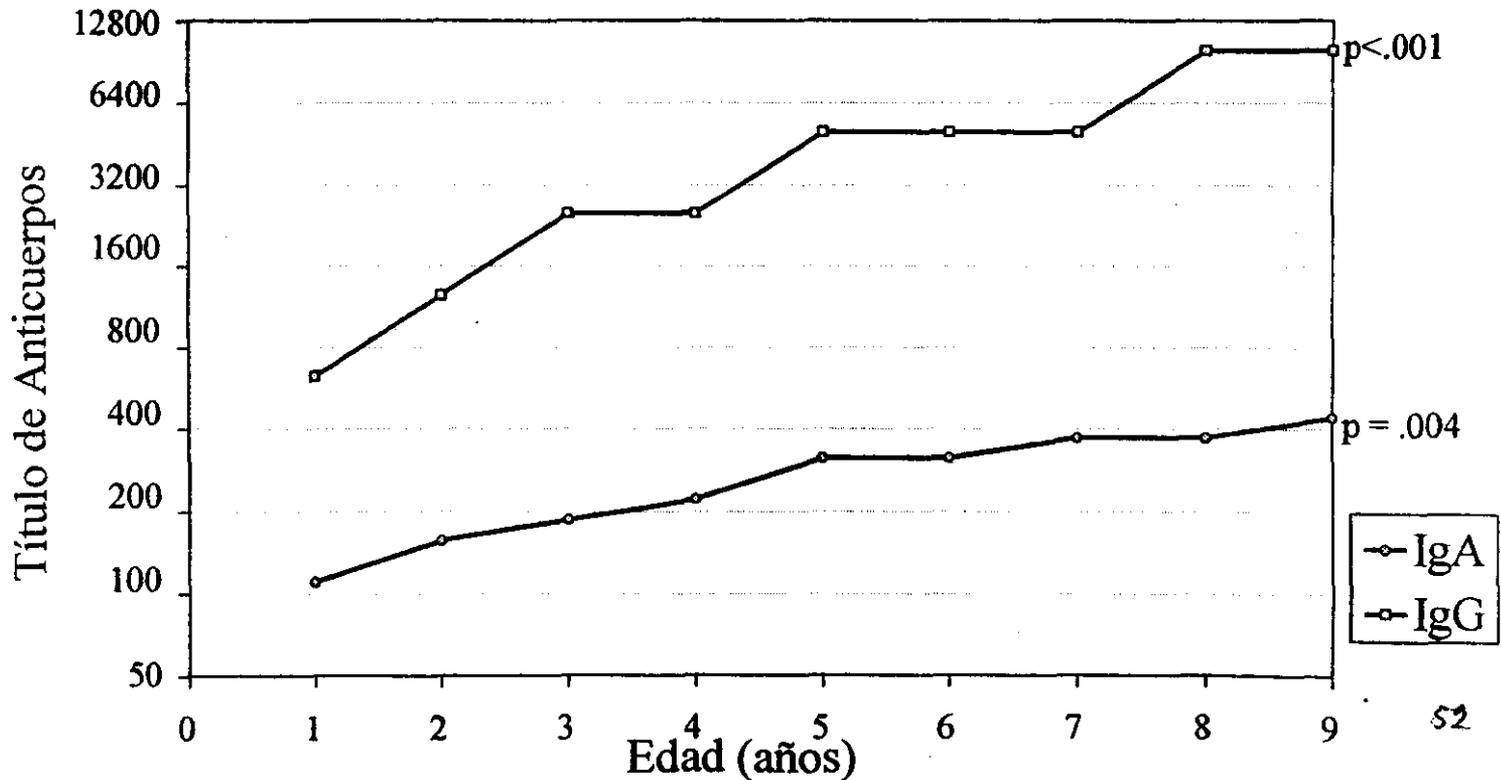
Los títulos de anticuerpos IgA e IgG específicos contra por virus Norwalk de acuerdo a grupos de edad, se muestran en la Gráfica No. 2.

El título de anticuerpos IgA específicos al año de edad fue de 1:115, aumentando lentamente; a los 5 años se observa un incremento en el título de 1:330 manteniéndose estable entre los 5 y 6 años, continuando con un aumento leve en los niños de 9 años, con títulos de IgA de 1:460. Este incremento en el título de anticuerpos IgA con una significancia estadística de, $P = 0.004$.

El título de anticuerpos IgG específicos muestra un incremento más significativo, que el de los anticuerpos IgA específicos debidos a infección por virus Norwalk. (Gráfica No. 2). Al año de edad los anticuerpos IgG tienen un título de 1:660, que a los 3 años de edad se incrementan hasta un título de 1:2,600, que se mantuvo estable hasta los 4 años de edad, continuando con un aumento a los 5 años a 1:5,250, permaneciendo estable hasta los 7 años de edad. A los 8 años de edad el título se vuelve a incrementar hasta 1:10,500 manteniéndose constante en niños de 9 años de edad. Este incremento en el título de anticuerpos IgG específicos contra virus Norwalk conforme aumenta la edad es estadísticamente significativo ($P < 0.001$).

GRÁFICA No. 2

Título de Anticuerpos Séricos Contra Virus Norwalk de Acuerdo a la Edad



INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK DE ACUERDO A LAS ENTIDADES FEDERATIVAS DE LA REPÚBLICA MEXICANA.

De acuerdo a los datos agrupados que se muestran en la Tabla No. 9 por entidades federativas de la República Mexicana, se observa que el estado o entidad que presentó la más baja seroprevalencia de anticuerpos contra virus Norwalk fue Baja California Sur con 84.6 %.

Los estados que tuvieron una seroprevalencia de infección por virus Norwalk entre 90 % y 94 % fueron: Aguascalientes, Baja California Norte, Durango, Guerrero, Hidalgo, México, Puebla y Tamaulipas.

Los estados en los cuales se presentó una seroprevalencia de infección por virus Norwalk entre 95 % y 99 % fueron: Coahuila, Chihuahua, Chiapas, D.F., Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Veracruz y Zacatecas.

Los estados con una seroprevalencia de infección por virus Norwalk de 100 % fueron: Campeche, Colima, Morelos, Nayarit, Quintana Roo, Tlaxcala y Yucatán.

Como se muestra en la figura No. 2 del mapa de la República Mexicana, no se localizó una región específica del país con una mayor prevalencia de la infección por virus Norwalk, únicamente se distingue que la menor prevalencia de infección ocurrió en Baja California Sur, en contraste con la mayor prevalencia que ocurrió en la Península de Yucatán.

Tabla No. 9 PORCENTAJE DE INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK DE ACUERDO A LA ENTIDAD FEDERATIVA.

No. DE ENTIDAD	ENTIDAD	NIÑOS		TOTAL	PORCIENTO (%)
		NEG	POS		
1	Aguascalientes	2	19	21	90.5
2	Baja California Norte	6	60	66	90.9
3	Baja California Sur	2	11	13	84.6
4	Campeche	0	15	15	100
5	Coahuila	1	77	78	98.7
6	Colima	0	11	11	100
7	Chihuahua	4	161	165	97.6
8	Chiapas	3	58	61	95.1
9	Distrito Federal	15	309	324	95.4
10	Durango	2	36	38	94.7
11	Guanajuato	6	143	149	96.0
12	Guerrero	7	128	135	94.8
13	Hidalgo	7	89	96	92.7
14	Jalisco	1	139	140	99.3
15	México	16	266	282	94.3
16	Michoacán	2	120	122	98.4
17	Morelos	0	34	34	100
18	Nayarit	0	24	24	100
19	Nuevo León	6	116	122	95.1
20	Oaxaca	4	150	154	97.4
21	Puebla	4	203	207	93.1
22	Querétaro	1	38	39	97.4
23	Quintana Roo	0	13	13	100
24	San Luis Potosí	1	74	75	98.7
25	Sinaloa	2	58	60	96.7
26	Sonora	2	69	71	97.2
27	Tabasco	2	53	55	96.4
28	Tamaulipas	6	81	87	93.1
29	Tlaxcala	0	29	29	100
30	Veracruz	10	206	216	95.4
31	Yucatán	0	39	39	100
32	Zacatecas	2	45	47	95.7
	TOTAL	114	2,874	2,988	96.2*

*Porcentaje global de seroprevalencia de infección por virus Norwalk en base al nivel nacional 96.2 %.

FIGURA No. 2
**Seroepidemiología de la Infección por el Virus
Norwalk en México, 1987-1988**



PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK ASOCIADA A LUGAR DE RESIDENCIA

Al comparar la prevalencia de infección por virus Norwalk de acuerdo al lugar de residencia, se observa en el área Metropolitana una prevalencia de 94.7 %, que se considera una razón de momios de 1.0. En el área Urbana la prevalencia se incrementó a 95.9 %, con una razón de momios de 1.2, continuando con un incremento de la prevalencia de infección por virus Norwalk en el área Rural de 97.3 %, con una razón de momios de 2.0. Este incremento paulatino en el riesgo de infección entre las 3 áreas, conforme disminuyen las condiciones de urbanización es estadísticamente significativo $\chi^2=0.853$ (para tendencia ajustada a la edad), $P = 0.003$ al compararlos con el valor de $P<0.05$ (Tabla No. 10).

Tabla No. 10 INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK ASOCIADA AL ÁREA DE RESIDENCIA

Lugar de residencia	Metropolitana		Urbana		Rural		P*
	%	RM**	%	RM	%	RM	
	94.7	1.0	95.9	1.2	97.3	2.0	0.003

* Probabilidad por chi cuadrada para tendencia, ajustada para la edad.

** Razón de momios.

PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK DE ACUERDO AL NÚMERO DE INDIVIDUOS EN LA FAMILIA.

En el análisis de infección por virus Norwalk, de acuerdo al número de individuos que integran la familia, se observa un incremento paulatino en el porcentaje de seroprevalencia; por ejemplo, en niños de familias integradas por 4 miembros se obtuvo una seroprevalencia de 94.7 %, que se incrementó a 96.9 % en familias de 7 miembros, continuando en aumento en familias de 11 miembros a 97.7 %, hasta alcanzar 100 % de seroprevalencia, prácticamente en todas las familias que tienen 13 miembros ó más. Este incremento paulatino en el porcentaje de seroprevalencia de infección por virus Norwalk conforme aumenta el número de sujetos en la familia, es estadísticamente significativo $\chi^2 = 7.47$ (para tendencia); con una $P = 0.006$, que es menor a $P < 0.05$, Tabla No. 11.

Tabla No. 11 INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK DE ACUERDO AL NÚMERO DE INDIVIDUOS QUE INTEGRAN LA FAMILIA

No. DE INTEGRANTES POR FAMILIA	NÚMERO TOTAL DE NIÑOS ESTUDIADOS	NIÑOS < DE 10 AÑOS CON INFECCIÓN POR VN		PORCIENTO DE POSITIVIDAD
		NEG	POS	
2	6	0	6	100
3	104	4	100	96.1
4	395	21	374	94.7
5	530	21	509	96.0
6	547	29	518	94.7
7	390	12	378	96.9
8	305	3	302	99.0
9	215	8	207	96.3
10	159	7	152	95.6
11	87	2	85	97.7
12	76	1	75	98.7
13	29	0	29	100
14	30	1	29	96.7
15	15	0	15	100
16	16	0	16	100
TOTAL	2,905	110	2,795	

$\chi^2 = 7.47$ (para tendencia); $P = 0.006$.

ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS CONTRA VIRUS NORWALK DE ACUERDO AL NÚMERO DE INDIVIDUOS EN LA FAMILIA.

La prevalencia de anticuerpos IgG aumenta progresivamente conforme se incrementa el número de miembros de la familia. Este incremento va desde 94.7 %, observado en familias con 4 miembros, seguido por 96.7 % en familias con 7 individuos, continuando con 98.7 % en familias con 12 individuos y a partir de las familias con 13 individuos ó más la seroprevalencia es prácticamente del 100 %. Este también es estadísticamente significativo con $\chi^2 = 6.64$ (para tendencia); y una $P = 0.01$; Tabla No. 12, Gráfica No. 3

Tabla No. 12, ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS CONTRA VIRUS NORWALK DE ACUERDO AL NÚMERO DE INDIVIDUOS EN LA FAMILIA

NÚMERO DE INTEGRANTES POR FAMILIA	NÚMERO TOTAL DE NIÑOS ESTUDIADOS	ANTICUERPOS IgG		PORCIENTO DE POSITIVIDAD
		NEG	POS	
2	6	0	6	100
3	104	4	100	96.2
4	395	21	374	94.7
5	530	21	509	96.0
6	547	30	517	94.5
7	390	13	337	96.7
8	305	4	301	98.7
9	215	9	206	95.8
10	159	7	152	95.6
11	87	2	85	97.7
12	76	1	75	98.7
13	29	0	29	100
14	30	1	29	96.7
15	15	0	15	100
16	16	0	16	100
TOTAL	2,905	114	2,791	

$\chi^2 = 6.64$ (para tendencia); $P = 0.01$

ANTICUERPOS IgA ESPECÍFICOS CONTRA VIRUS NORWALK DE ACUERDO AL NÚMERO DE INDIVIDUOS EN LA FAMILIA.

La prevalencia de anticuerpos IgA específicos, no muestran una tendencia en relación con el número de individuos que integran la familia; se observan variaciones en la prevalencia en su mayoría entre 58.1 % y 67 %. El análisis en $\chi^2 = 0.394$ (para tendencia); $P = 0.530$ muestran que no existe una tendencia estadísticamente significativa, (Tabla No. 13, Gráfica No. 3).

TABLA No. 13 ANTICUERPOS IgA ESPECÍFICOS CONTRA VIRUS NORWALK DE ACUERDO AL NÚMERO DE INDIVIDUOS EN LA FAMILIA.

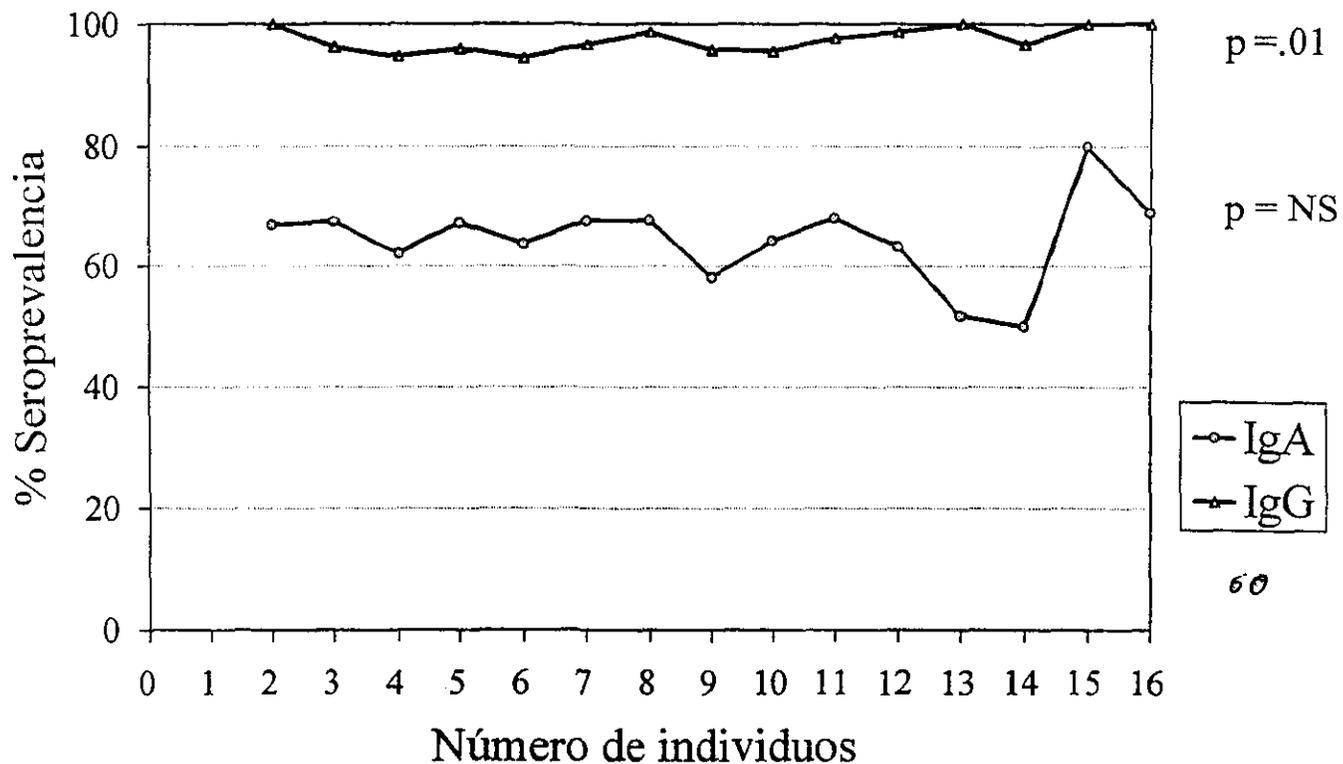
NÚMERO DE INTEGRANTES POR FAMILIA	NÚMERO TOTAL DE NIÑOS ESTUDIADOS	ANTICUERPOS IgA		PORCIENTO DE POSITIVOS
		NEG	POS	
2	6	2	4	66.7
3	104	34	70	67.3
4	395	150	245	62.0
5	530	175	355	67.0
6	547	199	348	63.6
7	390	127	263	67.4
8	305	99	206	67.5
9	215	90	125	58.1
10	159	57	102	64.1
11	87	28	59	67.8
12	76	28	48	63.2
13	29	14	15	51.7
14	30	15	15	50.0
15	15	3	12	80.0
16	16	5	11	68.8
TOTAL	2,905	1,027	1,878	

$\chi^2 = 0.394$ (para tendencia)

$P = 0.53$ (no es significativa)

GRÁFICA No. 3

Seroprevalencia de los Anticuerpos Contra VN de Acuerdo al Tamaño de la Familia



CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS ASOCIADAS A INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK

Las características que se consideraron fueron: Nivel de hacinamiento, condiciones de la vivienda y nivel socioeconómico, agrupando dichas variables en 3 niveles: Bueno, regular y malo (Tabla No. 14).

Conforme a Bronfman y cols (50), el nivel de hacinamiento se determinó de acuerdo al número de personas por dormitorio, de modo que, en el nivel bueno que se establece con una razón de momios de 1.0, observa una seroprevalencia de 94.3 %, el nivel regular tiene 95 %, con una razón de momios de 1.2 y en el nivel malo, el porcentaje aumentó hasta 97.1 %, con una razón de momios de 2.3, de donde $\chi^2 = 11.946$ (para tendencia ajustada para la edad), con una probabilidad estadística significativa de $P = 0.0005$, ya que $P < 0.05$. (Tabla No. 14).

Con respecto a las condiciones de la vivienda; cuando las condiciones son buenas se presenta una seroprevalencia de 95.3 %, con una razón de momios de 1.0, en condiciones regulares se incrementa a 96.7 %, con una razón momios de 1.6 y en malas condiciones, el aumento es de 96.9 % con una razón de momios de 1.9, de donde $\chi^2 = 5.12$ (para tendencia ajustada para la edad), y un valor estadísticamente significativo de $P = 0.02$, ($P < 0.05$), (Tabla No.14).

La seroprevalencia de acuerdo al nivel socioeconómico fue: para el nivel socioeconómico bueno 94.5 %, con una razón de momios 1.0, para el nivel regular 96.5 %, con una razón de momios de 1.6, y en el malo de 97.5 %, con una su razón de momios de 2.3; de donde se obtuvo una $\chi^2 = 12.773$ (para tendencia ajustada para la edad) con un valor estadísticamente significativo de $P = 0.0003$, al compararlo con $P < 0.05$, (Tabla No 14).

Tabla No. 14 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS ASOCIADAS A LA INFECCIÓN POR VIRUS NORWALK.

Nivel estudiado	Bueno		Regular		Malo		p *
	%	RM	%	RM	%	RM	
Hacinamiento	94.3	1.0	95	1.2	97.1	2.3	0.0005
Condiciones de la vivienda	95.3	1.0	96.7	1.6	96.9	1.9	0.02
Nivel socioeconómico	94.5	1.0	96.5	1.6	97.5	2.3	0.0003

*Probabilidad por χ^2 (para tendencia), ajustada para la edad.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Existen pocos estudios en el ámbito mundial, relacionados con la infección por virus Norwalk; debido a que el virus no se puede cultivar *in vitro*, los estudios epidemiológicos fueron posibles a partir de la clonación del genoma del virus por Jiang y cols (15); y así poder obtener un antígeno recombinante expresado en el sistema de baculovirus. En México el estudio más relevante que empleó esta metodología se realizó en una población peri-urbana de la ciudad de México, en niños menores de 2 años de edad (34).

El presente estudio comprende una muestra representativa de la República Mexicana. Se estudiaron 2,988 muestras de sueros de niños de uno a 10 años de edad, en los que se realizó la búsqueda de anticuerpos IgA e IgG específicos contra la infección por virus Norwalk, mediante el método de ELISA, empleando antígeno recombinante de virus Norwalk (rVN). Estas muestras fueron colectadas durante la Encuesta Nacional Seroepidemiológica realizada de marzo de 1987 a mayo de 1988.

En el estudio se estableció un punto de corte para los anticuerpos IgA e IgG específicos contra virus Norwalk, para tener un valor del que se pudiera partir para poder determinar cuando una muestra se consideraba negativa o positiva; de acuerdo a la lectura de densidad óptica de ambos anticuerpos y así definir si existía ó *no-infección*. Se consideraron muestras negativas cuando los dos anticuerpos, IgA e IgG específicos, estuvieron por debajo de estos puntos de corte; cuando se presentó alguno de los dos o ambos anticuerpos por arriba del valor de corte se consideraron muestras positivas (Tabla No. 2).

Obteniendo en el estudio un porcentaje de 96.2 % de seroprevalencia global.

La seroprevalencia de infección por virus Norwalk de acuerdo con la edad mostró que la mayoría de los niños desde el primer año de vida ya han estado en contacto con el virus, porque muestran una seroprevalencia de anticuerpos IgG altos los cuales se incrementan considerablemente hasta los 3 años y a partir de esa edad el incremento se da en forma paulatina hasta los 9 años de edad, debido a las reinfecciones que sufren los niños. Los niveles de anticuerpos IgA específicos se presentan de manera semejante a los anticuerpos IgG específicos pero en menor escala (Tablas: 6,7,8).

Se hizo la comparación de resultados obtenidos por el método de ELISA con un estudio previo de niños mexicanos donde también se obtuvieron resultados semejantes a los del estudio (34). Con estudios realizados en países desarrollados y en desarrollo anteriormente donde utilizaron el método de bloqueo de radio inmunoensayo (RIA) empleando antígeno de virus Norwalk obtenido de heces de voluntarios infectados, pues no se contaba con otra fuente de obtención de antígeno, se observó que los niños de países en desarrollo adquieren anticuerpos para virus Norwalk a más temprana edad que los niños de países desarrollados (56,57), y actualmente se sigue el mismo patrón de obtención de anticuerpos para virus Norwalk en estudios realizados ya más recientemente donde se utiliza el método de ELISA con el rVN como antígeno y mismo que se utilizó en el presente estudio (21,28,29,32,56,57).

recientemente donde se utiliza el método de ELISA con el rVN como antígeno y mismo que se utilizó en el presente estudio (21,28,29,32,56,57).

Respecto a los títulos de anticuerpos séricos contra virus Norwalk, se pudo apreciar que los títulos de anticuerpos IgA específicos son bajos al año de edad e incrementan en forma paulatina conforme aumenta la edad, mientras que los títulos de anticuerpos específicos IgG se presentan altos en los niños desde el primer año de edad, lo que nos indica que los niños se infectan en forma temprana (gráfica No. 2). La presencia de títulos de anticuerpos IgA específicos en sangre nos demuestran que hubo una seroconversión en los niños por contacto con el virus; además, los títulos de anticuerpos IgG deberían de ser más bajos ya que durante el primer año de edad los anticuerpos IgG de origen materno disminuyen considerablemente y los niños de nuestro estudio ya tienen títulos de anticuerpos considerablemente altos, lo que nos indica que los niños del presente estudio ya han estado en contacto con el virus Norwalk antes de cumplir el primer año de edad.

De los pocos estudios que reportan títulos de anticuerpos se pudo comparar con un estudio realizado en un país desarrollado, como Finlandia (58), donde se observó que niños menores de 2 años de edad que presentan títulos de anticuerpos IgG \geq a 1:50 tienen menor riesgo de infección por virus Norwalk que los que presentan títulos menores de 1:50, siendo estos títulos datos más bajos que los obtenidos en el presente estudio.

Los niños de un país en desarrollo como Kuwait (59), presentan títulos de anticuerpos IgG específicos más elevados al año de edad que los niños mexicanos, por lo que se observa que nuestro país sigue más los patrones de infección por virus Norwalk de países en desarrollo. Aunque no podemos decir con exactitud a que edad se empiezan a infectar los niños del presente estudio, porque este es un estudio transversal y no longitudinal, los títulos de anticuerpos IgA e IgG se incrementaron en mayor escala durante los tres primeros años de edad, (gráfica No. 2), siguiendo un patrón similar al de estudios realizados en voluntarios infectados, donde los títulos de anticuerpos IgG específicos que se adquieren disminuyen menos que los títulos de anticuerpos IgA específicos (27,33); por lo que los títulos de anticuerpos IgG se comportan de acuerdo a lo reportado en la literatura (40), donde nos menciona que los anticuerpos se sintetizan en las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B activos.

Los anticuerpos IgG son los más abundantes en suero, son los únicos que atraviesan la barrera placentaria, apareciendo en poca concentración en la respuesta primaria y en la respuesta secundaria en mayor concentración (41).

Los títulos de anticuerpos IgG se elevan lenta y tardíamente, pero permanecen altos con un pequeño descenso y los anticuerpos IgA se elevan más rápido pero descienden un poco más sin llegar a desaparecer (27,37). Los anticuerpos IgA después de la seroconversión se encuentran en menor concentración en sangre que los anticuerpos IgG, los anticuerpos IgA se encuentran principalmente en secreciones de mucosas, necesitan más sitios de unión con el antígeno, por funcionar como monomérico y dimérico, los anticuerpos IgG solo son monoméricos.

En lo que se refiere a anticuerpos IgM en el presente estudio no se cuantificaron porque solo se presentan en la fase aguda de la infección y no se consideraron dentro de los objetivos planteados, por otro lado de acuerdo a estudios realizados se ha observado que la presencia de anticuerpos tanto IgA, IgG e IgM no protegen contra posteriores reinfecciones (35), de acuerdo a lo observado con voluntarios que presentaban anticuerpos altos por virus Norwalk antes de ser retados con el virus y después del reto con el virus vuelven a presentar infección elevando a un más sus anticuerpos.

Al analizar la seroprevalencia de infección por virus Norwalk de acuerdo al sexo se observó que se presenta de igual manera tanto en niñas como en niños (Tabla No. 3), estos resultados son semejantes a otro estudio que menciona que el virus Norwalk infecta de igual manera a hombres y mujeres (21). Por lo que la infección es indiferente del sexo.

En la seroprevalencia de infección por virus Norwalk de acuerdo a los estados de la República Mexicana observamos que el estado que presentó la menor seroprevalencia fue Baja California Sur, tal vez debido a que tiene un adecuado desarrollo socioeconómico y por ende mejores condiciones de vida, mayor atención médica, mayor comunicación entre la población, mejores viviendas y por ubicación geográfica tiene comunicación directa únicamente con el estado de Baja California Norte que también tienen un buen desarrollo socioeconómico, que es el tercero en incremento de seroprevalencia. En contraste con los estados de la Península de Yucatán y además donde se observó una seroprevalencia de 100 %, son estados con nivel socioeconómico regular o bajo, por lo que sus condiciones de vida son más pobres. (Tabla No. 9).

Aún con lo mencionado previamente y al comparar con el resto del país, no existe una región donde se pueda apreciar una área de un mayor riesgo de infección por virus Norwalk. No se encontró una característica especial de las entidades que influyera directamente sobre la seroprevalencia de infección por virus Norwalk, por lo que en general la seroprevalencia de infección por virus Norwalk en la República Mexicana es alta; no existe un estudio anterior donde se analicen muestras representativas de todo el país.

Al analizar la seroprevalencia de infección por virus Norwalk de acuerdo al área de residencia se observó un menor riesgo de infección en el área Metropolitana, dicho riesgo de infección y seroprevalencia aumenta al empeorar las condiciones del lugar de residencia en el área urbana y rural (Tabla No. 10). Estos resultados son directamente proporcionales que, conforme empeoran las condiciones de residencia en el país, disminuyen los servicios de educación, condiciones de saneamiento e higiene, contribuyendo a la adquisición de un mayor número de enfermedades infecciosas como es el caso de la infección por virus Norwalk. Al comparar nuestros resultados con un estudio realizado en el área rural y urbana en Inglaterra, se observó una situación contraria a la del estudio que nos ocupa, ya que niños de 6 a 11 meses de edad de áreas rurales tienen menos proporción de anticuerpos, que los de áreas urbanas y a partir de los 2 años se presentan de igual manera (25), esto es debido a que en países desarrollados como Inglaterra las condiciones de vida en el área rural son mejores, ya que existe un

menor hacinamiento, lo contrario de lo que ocurre en México donde en el área rural se carece por lo general de los servicios básicos de saneamiento ambiental.

Al analizar la seroprevalencia de infección por virus Norwalk de acuerdo al número de personas por familia, observamos que en el país la mayor parte de los niños estudiados forman parte de familias constituidas de 4 a 8 miembros, los niños de familias de 8 miembros tienen una seroprevalencia muy alta, son pocos los niños estudiados de familias integradas de 15 y 16 miembros, pero son niños que presentan mayor seroprevalencia de infección por virus Norwalk, lo que nos confirma que entre mayor es el número de integrantes por familia mayor es el riesgo que tienen los niños de adquirir infección por virus Norwalk. Los anticuerpos IgG específicos son más altos y persisten más por ser anticuerpos de memoria, mientras que en los anticuerpos IgA específicos son más bajos y persisten menos, causa por la cual tal vez no fueron significativos. No se encontró un estudio previo que compare la relación entre la seroprevalencia de infección por virus Norwalk y el número de personas en cada familia.

Al analizar las condiciones de hacinamiento, de la vivienda y agruparlas en tres niveles como son: bueno, regular y malo, se observó que en ambas condiciones es mayor el porcentaje de seroprevalencia, y el riesgo de infección por virus Norwalk al empeorar las condiciones de hacinamiento y de la vivienda, de un buen a un mal nivel aunque la variación en el incremento del porcentaje es pequeña es suficiente para ser significativo, debido a que el número de muestras estudiadas es muy grande, lo que hace que las pequeñas variaciones de porcentaje puedan ser significativas.

Al analizar el porcentaje de infección de acuerdo al nivel socioeconómico se observó el mismo patrón obtenido previamente para el hacinamiento y las condiciones de la vivienda, siendo alta la seroprevalencia de infección por virus Norwalk desde que existe un buen nivel socioeconómico, pero se incrementa significativamente la seroprevalencia de infección cuando existe un nivel socioeconómico bajo.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el nivel de hacinamiento, las condiciones de la vivienda y el nivel socioeconómico, se observa que si en nuestro país estas condiciones mejoran, probablemente sería menor la prevalencia de infección por virus Norwalk, pero desafortunadamente de acuerdo a todos los resultados, se refleja un deficiente desarrollo del país, ya que los niños se infectan desde muy temprana edad de vida teniendo una seroprevalencia muy alta a nivel Nacional.

Estos resultados se compararon con estudios realizados en otros países en desarrollo y desarrollados que emplearon la misma técnica de ELISA con el antígeno rVN, la cual es muy sensible y específica y nos da a conocer una alta seroprevalencia de anticuerpos para virus el Norwalk (21).

Al comparar nuestros resultados con los realizados en otros países en niños y adultos por el método de RIA, como Estados Unidos e Yugoslavia países desarrollados con un buen nivel socioeconómico, la formación de anticuerpos por virus Norwalk se da en forma más

tardía, en comparación a países en desarrollo con un nivel socioeconómico bajo, donde la infección por virus Norwalk se presenta en niños a edad muy temprana (56). Algo similar se observa en otro estudio en donde se compararon niños de Filipinas, Taiwan y Estados Unidos, donde los niños de Estados Unidos presentaron un menor porcentaje de infección por virus Norwalk (59).

La infección por virus Norwalk detectada por medio de la técnica de ELISA que emplea el rVN se encuentra a edades mucho más tempranas en niños de países en desarrollo, como es el caso de México, donde el nivel socioeconómico es bajo y por ende sus condiciones no son adecuadas, ya que la mayor parte de la población vive con condiciones de hacinamiento malas, en comparación con países desarrollados donde sus condiciones de vida son mejores, por lo que la infección por virus Norwalk se adquiere a edad más tardía, como lo muestran los estudios realizados en Inglaterra (29) y Japón (21), donde los niños rara vez se infectan por virus Norwalk antes de los dos años. En Japón las personas de 50 años son los que alcanzan una seroprevalencia del 98 % (29), mientras que los niños de nuestro país a los 5 años de edad ya presentan una seroprevalencia del 98 % de infección por virus Norwalk, observando que el nivel socioeconómico del país es bajo y sigue patrones similares a los países en desarrollo.

La seroprevalencia de infección por virus Norwalk es más alta en países en desarrollo, como el nuestro, por su bajo nivel socioeconómico, porque la mayor parte de la población vive en condiciones insalubres, sus condiciones de la vivienda son inadecuadas y con un nivel de educación deficiente, siendo esto algunos de los factores que contribuyen a aumentar el número de enfermedades infecciosas en nuestro país.

CONCLUSIONES

Considerando los resultados de seroprevalencia de la infección por virus Norwalk en nuestro país, de la muestra que se analizó de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE) se obtuvieron las siguientes conclusiones:

La seroprevalencia de anticuerpos IgA e IgG específicos para la infección de virus Norwalk en niños mexicanos de 1 a 9 años de edad es mayor al 90 %, ocurriendo con mayor frecuencia dentro de los 3 primeros años de vida, incrementándose los títulos de anticuerpos al aumentar la edad lo que sugiere la presencia de posibles reinfecciones ocurridas.

La infección por virus Norwalk en niños mexicanos es indistinta del sexo, además desde el punto de vista epidemiológico afecta de igual manera a niños y a niñas.

La infección por virus Norwalk en niños de uno a 9 años de edad se presenta con mayor frecuencia en el área rural, que en el área urbana y Metropolitana.

La infección por virus Norwalk se presenta con mayor frecuencia en familias numerosas, que viven en condiciones de vivienda y hacinamiento inadecuadas, y en general la seroprevalencia aumenta cuando el nivel socioeconómico es bajo.

Es probable que el mejoramiento de las condiciones de saneamiento ambiental, de los hábitos de higiene y en general la mejoría de las condiciones socioeconómicas pueden disminuir el riesgo de adquirir la infección por virus Norwalk

SUGERENCIAS

Es de gran importancia continuar realizando más investigaciones en México sobre la seroprevalencia de la infección por virus Norwalk con las características que se contemplan en este estudio y otras que pudieron haberse omitido, como: un estudio de cohorte para realizar un seguimiento desde el nacimiento hasta los 4 años de edad y poder cuantificar anticuerpos de fase aguda, como son los del tipo IgM, el detectar antígenos en heces y así poder diagnosticar si en México los niños se empiezan a infectar antes del año con virus Norwalk, además de otro estudio a nivel nacional como el realizado, para observar si después de 10 años de mayor introducción de información acerca de la *prevención de las enfermedades gastrointestinales*, los altos índices de infección por virus Norwalk han disminuido.

Este estudio es el primero que se realiza en el ámbito nacional sobre prevalencia de anticuerpos para virus Norwalk, después del realizado con la cohorte de niños mexicanos (34) y en el estudio en el que incluyeron adultos atendidos en la Escuela de Medicina de Guadalajara (33). Además, nos permitió conocer la seroprevalencia de infección por virus Norwalk en nuestro país en años previos, así como algunos factores que se relaciona con la adquisición de infección por virus Norwalk. Este estudio puede servir de base para posteriores estudios, ya que como es sabido México es un país donde el índice de enfermedades gastrointestinales es aún elevado (10).

ANEXOS

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS* 0.01M), pH 7.2

Na₂HPO₄4.834 g

NaH₂PO₄·H₂O1.26 g

NaCl34.0 g

H₂O destilada, desionizada, aforar a 4L.

Medir el pH a 7.2 y esterilizar en autoclave por 15 minutos.

PBS*/ TWEEN* 2% (V/V)

PBS 0.01 M..... 392 mL

Tween 20..... 8.0 mL

Tween 0.05% (V/V)

PBS 0.01 M 390 mL

PBS/Tween 2% 10 mL

Leche semidescremada en polvo (LSP*) 5% en PBS. (V/V)

LSP..... 2.5 g

PBS 0.01M..... 50 mL

Leche semidescremada en polvo (LSP*) al 1% (P/V)

LSP 0.5 g

PBS 0.01 M 50 mL

ó también preparar de la siguiente manera

LSP 5% / PBS 10 mL

PBS 0.01 M..... 40 mL

Solución amortiguadora de citratos pH 5.2

Ácido cítrico	1.46 g
Na ₂ HPO ₄	2.36 g
H ₂ O destilada, desionizada, aforar a	4 L

ajustando el pH a 5.2

Esterilizar por filtración.

Almacenar a 4°C.

Solución amortiguadora de dietanolamina, pH 9.8

MgCl ₂ . 6H ₂ O	100 mg
Azida de sodio	200 mg
H ₂ O destilada, desionizada	800 mL
Dietanolamina	97 mL

Ajustar el pH con 5 mL de HCl concentrado, aforar a un litro, almacenando a 4°C en frasco ámbar.

* Ver glosario pagina 71.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN. *Ácido desoxirribonucleico*

ARN. *Ácido ribonucleico*

C.M.N. Centro Médico Nacional.

D.O. Densidad óptica.

ELISA. *Ensayo inmuno-enzimático.*

FC. *Fracción cristalizable de la proteína*

IgA. *Inmunoglobulina A.*

IgD. *Inmunoglobulina D*

IgG. *Inmunoglobulina E*

IgG. *Inmunoglobulina G*

IgM. *Inmunoglobulina M*

LSP. *Leche semidescremada en polvo*

MIE. *Microscopía inmunoelectrónica.*

OFD. *Orto-fenilendiamina.*

PBS. *Solución Amortiguadora de fosfatos*

P/N *Relación de densidad óptica de sueros controles positivos entre sueros controles negativos o (cociente) en la ELISA, que es útil para observar cuantas veces el control negativo puede estar en el positivo.*

PNFF. *Para-nitrofenilfosfato*

RIA. *Radio inmunoensayo*

rVN. *Virus Norwalk recombinante.*

TORCH. *Complejo que estudia y detecta infecciones para: Toxoplasma, rubéola, citomegalovirus, herpes y otros.*

UIMEIP. *Unidad de investigación médica de enfermedades infecciosas y parasitarias.*

VN. *Virus Norwalk.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Tay J, Gutiérrez M, Rodríguez M, López R, Romero R. Microbiología y parasitología médicas. 2a. ed. México: Editorial Méndez editores, 1994: Cap 2.1-2.9, Cap 2.102.16.
2. Schelegel H. Microbiología general. 2a. ed. Barcelona: Editorial Omega, 1979; 103-16.
3. Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Guerra H. Microbiología. Mecanismo de las enfermedades infecciosas enfoque mediante resolución de problemas. 2a. ed. Bogotá: Editorial Médica Panamericana, 1994: 146-147, 415-16.
4. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. Tratado de microbiología. 3a. ed. Barcelona: Editorial Salvat, 1984: 695-704.
5. Carpenter P. Microbiología. 4a. ed. México: Editorial Interamericana, 1984: 147-50.
6. WHO Technical Report Series, No. 288, 1964 (Enteric Infections: report of a WHO Expert Committee).
7. Diarrhoeal Diseases Control Programme. Weekly epidemiological record, 1979; 16: 121-3.
8. Farreras V, Domurus V, Rozman C. Medicina interna. 12a. ed. Barcelona España: Editorial Doyma, 1992: vol.1: 136-37.
9. Pezzarossi HE, Blanco RA. Infecciones entéricas en países en vías de desarrollo. Enfermedades infecciosas y microbiología 1994; 14: 371-82.
10. Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos JI. Manual de infectología clínica. 14a. ed. México: Editorial Méndez, 1994: 65-85.
11. Kapikian AZ, Wyatt RG. Viral Gastrointestinal Infections. En: Feigin RD, Cherry JD, Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 3a. ed. Filadelfia: Saunders, 1992: 655-76.
12. Kapikian AZ, Watt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. J Virol 1972; 10: 1075-85.
13. Alder J, Zick R. Winter vomiting disease. J Infect Dis 1969; 119: 668-73.

14. Kapikian AZ, Chanock RM. Grupo de Virus Norwalk. En: Fields BN, Virology, 3a. ed. Filadelfia: Editorial Lippincott, 1996: 783-810.
15. Jiang X, Graham DY, Wang, et al. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990; 250: 1580-83.
16. Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, et al. Proteins of Norwalk virus. *J Virol* 1981; 37: 994-9.
17. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk Virus. *Virology* 1993; 195: 51-61.
18. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992; 66: 6527-32.
19. Green KJ, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ, Estes MK. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2185-91.
20. Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis* 1994; 170: 34-43.
21. Numata K, Nakata S, Jiang X, Estes MK, Chiba S. Epidemiological study of Norwalk virus infections in Japan and southeast Asia by enzyme-linked immunosorbent assays with Norwalk virus capsid protein produced by the baculovirus expression system. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 121-6.
22. Jiang X, Matson DO, Cubitt WD, Estes MK. Genetic and antigenic diversity of human caliciviruses (HuCVs) using RT-PCR and new EIAs. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 251-62.
23. Greenberg HB, Valdesuso J, Yolken RH, et al. Role of Norwalk virus in outbreaks of nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis* 1979; 139: 564-8.
24. Kaplan JE, Gary WG, Baron RC, et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1982; 96: 756-61.
25. Gray JJ, Jiang X, Morgan-Capner P, Desselberger U, Estes MK. Prevalence of antibodies to Norwalk virus in England: detection by enzyme-linked immunosorbent assay using baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1022-25.

26. Andreoli TE, Carpenter CCJ, Lefkowitz RJ, Murrar J, et al. Cecil Tratado de medicina interna. 18a. ed. México: Editorial Interamericana, 1991: vol 2: 1949-52.
27. Erdman DD, Gary GM, Andersin LJ. Serum immunoglobulin A response to Norwalk virus infection. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1417-18.
28. Gabbay YB, Glass RJ, Monroe SS, et al. Prevalence of antibodies to Norwalk virus among Amerindians in isolated Amazonia communities. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 728-33.
29. Parker SP, Cubitt WD, Jiang X, Estes MK. Seroprevalence studies using a recombinant Norwalk virus protein enzyme immunoassay. *J Med Virol* 1994; 42: 146-50.
30. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 1977; 297: 86-9.
31. Sherris JC, Champoux JJ, Neidhardt FC, Ray CG. Microbiología médica. Washintong: Editorial Doyma, 1993: 651-8.
32. Ryder RW, Singh N, Reeves WC, Kapikian AZ, Greenberg HB, Sack RB. Evidence of immunity induced by naturally acquired Rotavirus and Norwalk virus infection on remote Panamanian islands. *J Infect Dis* 1985; 151: 99-105.
33. Johnson PC, Hoy J, Mathewson JJ, et al. Occurrence of Norwalk virus infections among adults in Mexico. *J Infect Dis* 1990; 162: 389-93.
34. Jiang X, Matson DO, Velázquez FR, et al. Study of Norwalk-related viruses in Mexican children. *J Med Virol* 1995; 47: 309-16.
35. Treanor J, Jiang X, Paul H, Estes MK. Subclass-specific serum antibody responses to recombinant Norwalk virus capsid antigen (rVN) in adults infected with Norwalk, Snow Mountain or Hawaii virus. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1630-3.
36. Parker SP, Cubitt WD, Measurement of IgA responses following Norwalk virus infection and other human caliciviruses using a recombinant Norwalk virus protein EIA. *Epidemiol Infect* 1994; 113:143-52.
37. Cukor G, Nowak NA, Blacklow NR. Immunoglobulin M. Responses to the Norwalk virus of gastroenteritis. *Infect Immun* 1982; 37: 463-8.
38. Gary GW, Anderson LJ, Keswick BH, et al. Norwalk virus antigen and antibody response in an adult volunteer study. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2001-3

39. Gray JJ, Cunliffe C, Ball J, Graham DY, Deseelberger U, Estes MK. 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* 1994; 32: 3059-63.
40. Bellanti JA, *Inmunología*. 3a. ed. México: Editorial Interamericana, 1986: 98-9.
41. Rojas O. *Inmunología de memoria*. México: Editorial Médica Panamericana, 1996: 85.
42. Stites DP, Terr AI. *Inmunología básica y clínica*. 7a. ed. México: Editorial el Manual Moderno, 1993: 129-31.
43. Gray GM, Kaplan JE, Stine SF, Anderson LJ. Detection of Norwalk antibodies and antigen with a biotianavidin immuno assay. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 274-8.
44. Modore HP, Treanor JJ, Pray KA, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for Snow Mountain and Norwalk agents of viral gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1988; 24: 456-9.
45. Kapikian AZ, Greenber HB, Cline WL, et al. Prevalence of antibody to the Norwalk agent by a newly developed immune adherence hemagglutination assay. *J Med Virol* 1978; 2: 281-94.
46. Ball JM, Estes MK, Hardy ME, Conner ME, Opekun AR, Graham DY. Recombinant Norwalk virus like particles as an oral vaccine. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 243-9.
47. Margni RA. *Inmunología e inmunquímica fundamentos*. 4a. ed. Buenos Aires Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1989; 456-69.
48. Rose NR, Friedmanl, Fahes JL. *El laboratorio en inmunología clínica*. 2a. ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1984: 414-25.
49. Tapia R, Gutiérrez G, Sepúlveda J. Metodología de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica México. *Salud Pública Méx* 1991; 34: 124-35.
50. Magos C, Sánchez F, Gutiérrez G, Tapia R. Banco Nacional de Sueros. *Salud Pública Méx* 1991; 34: 136-47.
51. Bronfman M, Guiscafré H, Castro V, et al. II. La medición de la desigualdad: una estrategia metodológica, análisis de las características socioeconómicas de la muestra. *Arch Invest Méd* 1988; 19: 351-60.

52. Downie NM, Heath RW. Métodos estadísticos aplicables. 5a. ed. México: editorial Harla; 1986: 229-40.
53. Mendez I, Namihira D, Moreno L, Sosa C. El protocolo de investigación, lineamientos para su elaboración y análisis. México. Editorial Trillas, 1984: 131-137, 162-71.
54. Rosner B. Fundamentals of bioestadistics 2a. ed. Estados Unidos: Editorial Duxbury press, 1986: 346.
55. Pardell H, Cobo E, Canela J. Manual de bioestadística. España. Editorial Masson, 1986; 13.
56. Greenberg HB, Valdesuso J, Kapikian AZ, et al. Prevalence of antibody to the Norwalk virus in various countries. *Infect Immun* 1979; 26: 270-3.
57. Cukor G, Blacklow NR, Echeverria P, Bedigian MK, Purrugan H, Basaca-Sevilla V. Comparative study of the acquisition of antibody to Norwalk virus in pediatric populations. *Infect Immun* 1980; 29: 822-3
58. Lew JF, Valdesuso J, Vesikari T, et al. Detección of Norwalk virus or Norwalk-like virus infections in Finnish infants and young Children. *J Infect Dis* 1994; 169: 1364-67.
59. Dimitrov DH, Dashti SA, Ball JM, Et al Prevalence of antibodies to human caliciviruses (HuCVS) IN Kuwait established by ELISA using baculovirus-expressed capsid antigens representing two genogroups of (HuCVs). *J Med Virol* 1997; 51: 115- 8.