

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología



**Capacidad protectora de la leche materna
frente a las infecciones por norovirus**

Tesis Doctoral presentada por:

Parisá Khodayar Pardo

(Lda. Medicina. F. E. Pediatría)

Dirigida por:

Prof^a. Cecilia Martínez Costa

Prof. Javier Buesa Gómez

290E PEDIATRÍA

Valencia 2012



Dña. Cecilia Martínez Costa, Doctora en Medicina por la Universidad de Valencia y Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Obstetrica y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

D. Javier Buesa Gómez, Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia y Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAMOS:

Que el trabajo titulado “**Capacidad protectora de la leche materna frente a las infecciones por norovirus**” ha sido realizado íntegramente por Dña. Parisá Khodayar Pardo bajo nuestra supervisión. Dicho trabajo está concluido y, en nuestro criterio, reúne todos los méritos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a 24 de abril de 2012.

Fdo. Prof^a. Cecilia Martínez Costa

Fdo. Prof. Javier Buesa Gómez

A mi familia, pues son lo que más quiero, lo único imprescindible para mí.

A mis padres, Isabel y Jahangir, mi referencia en todos los aspectos de la vida.

Gracias por haberme enseñado el respeto a la diversidad del ser humano y
el amor por los niños, que son la base de mi profesión.

A mi hermana Sami y a mi cuñado Paco por su fortaleza y generosidad.

A mi hermano Víctor por su madurez y nobleza.

AGRADECIMIENTOS

A la Profa. Martínez Costa, mi maestra y amiga, de la que admiro el conocimiento profundo que tiene de su especialidad y la enorme dedicación a sus pacientes. Gracias por creer en mí y apoyarme siempre. Gracias por permitirme aprender de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica y darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral que es parte de mi realización personal.

Al Prof. Javier Buesa, al que considero un profesional de excelencia, he de agradecer el haberme integrado en su laboratorio y ayudado a desarrollar una nueva faceta como Médico: la investigación.

Al Prof. Brines, al que conozco desde hace 11 años, como estudiante, alumna interna, residente y Peditra. Gracias por la sinceridad de sus consejos, por su generosidad al compartir su experiencia con los más jóvenes y por orientarme sabiamente a comprender la Pediatría.

A mis compañeros del Hospital Clínico con los que comparto tantas horas y vivencias diferentes. Gracias porque con ellos he aprendido mucho más que Pediatría en mis años de trabajo.

A las enfermeras de la Cocina Dietética por haber colaborado en la recogida de las muestras y datos clínicos.

A mis compañeros de laboratorio por su compañía en las largas horas que he pasado allí.

Al Prof. Francisco Núñez, compañero Peditra del Hospital Clínico, y al Prof. José Bermúdez, de la Facultad de Matemáticas, por ayudarme con amabilidad en el tratamiento estadístico de los resultados.

A todas las madres participantes por haber entendido el interés de esta investigación. Y, muy especialmente, a todos los niños que he tratado estos años pues siempre han sido capaces de hacerme sonreír en los momentos más difíciles y porque son la única razón para continuar con mi esfuerzo diario.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	8
INTRODUCCIÓN	
1. LA DIARREA AGUDA EN LA INFANCIA	
1.1. EPIDEMIOLOGÍA	
1.1.1. Impacto de la diarrea aguda en la infancia.....	11
1.1.2. Agentes etiológicos principales.....	11
1.1.3. Morbilidad.....	13
1.1.4. Mortalidad.....	15
1.1.5. Factores de riesgo.....	17
1.2. PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA	
1.2.1. Fisiología del transporte intestinal.....	18
1.2.2. Tipos de diarrea aguda.....	18
1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	
1.3.1. Diferencias geográficas.....	20
1.3.2. Características del huésped.....	21
1.3.3. Características del patógeno infectante.....	21
1.4. TRATAMIENTO	
1.4.1. Rehidratación oral.....	22
1.4.2. Realimentación precoz.....	24
1.4.3. Otros tratamientos.....	25
1.4.4. Micronutrientes.....	27
2. PRINCIPALES VIRUS ENTÉRICOS	
2.1. ROTAVIRUS.....	28
2.2. CALICIVIRUS.....	29
2.3. ASTROVIRUS.....	31

2.4. ADENOVIRUS ENTÉRICOS	32
2.5. OTROS VIRUS ENTÉRICOS	33
3. CALICIVIRUS. EL GÉNERO NOROVIRUS	
3.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	34
3.2. TAXONOMÍA	35
3.3. ESTRUCTURA	
3.3.1. Estructura tridimensional del virión nativo	36
3.3.1.1. Estructura del genoma	36
3.3.1.2. Proteínas virales estructurales	37
3.3.1.3. Proteínas virales no estructurales	38
3.3.2. Estructura de las partículas pseudovíricas	40
3.4. BIOLOGÍA DEL VIRUS	
3.4.1. Cultivos celulares	41
3.4.2. Modelos animales	42
3.4.3. Avances moleculares	43
3.4.3.1. Clonación del genoma	43
3.4.3.2. Producción de partículas pseudovíricas	43
3.4.3.3. Aplicación de la genética reversa	45
3.4.4. Desarrollo de vacunas	45
3.5. DIAGNÓSTICO	
3.5.1. Diagnóstico presuntivo	46
3.5.2. Diagnóstico de laboratorio	46
3.5.2.1. Microscopía electrónica directa e inmunomicroscopía electrónica	46
3.5.2.2. Ensayo de hemaglutinación por inmunoadherencia y radioinmunoensayo	47
3.5.2.3. Enzimoimmunoensayos	47
3.5.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa	49
3.6. EPIDEMIOLOGÍA	
3.6.1. Distribución geográfica	50

3.6.1.1. Situación a nivel mundial	50
3.6.1.2. Situación en Europa	52
3.6.1.3. Situación en España	53
3.6.2. Posibles huéspedes	54
3.6.3. Propiedades físico-químicas del virus	55
3.6.4. Mecanismos de transmisión	55
3.6.4.1. Brotes transmitidos por alimentos	56
3.6.4.2. Brotes transmitidos por agua.....	57
3.6.4.3. Brotes transmitidos persona a persona	58
3.7. PATOGENIA	
3.7.1. Entrada y periodo de incubación.....	59
3.7.2. Replicación.....	59
3.7.3. Excreción y diseminación de NoV por el huésped.....	60
3.8. INMUNIDAD.....	61
3.8.1. Respuesta innata.....	62
3.8.2. Respuesta adaptativa	63
3.8.2.1. Humoral.....	63
3.8.2.2. Celular	64
3.9. SUSCEPTIBILIDAD DEL HUÉSPED	64
3.9.1. Polimorfismo del sistema HBGA humano	65
3.9.2. Diversidad de los NoV en el reconocimiento de los receptores HBGA.....	68
3.9.3. Modelos de interacción de los NoV-HBGA.....	70
3.9.4. Múltiples redes de interacción entre NoV y receptores HBGA	72
3.9.5. Participación de los HBGA en la inmunidad del huésped frente a NoV.....	73
3.9.6. Los HBGA de la leche materna como receptores señuelo para NoV.....	74
3.10. MECANISMO DE ADAPTACIÓN EVOLUTIVA	75
4. INMUNIDAD DE LA LECHE MATERNA	
4.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	76

4.2. MECANISMOS DE PROTECCIÓN

4.2.1. Factores probióticos	78
4.2.2. Anticuerpos secretores	79
4.2.3. Otros componentes defensivos de la leche materna	82
4.2.3.1. Inhibidores del metabolismo de los patógenos.....	82
4.2.3.2. Enzimas	84
4.2.3.3. Mucina.....	84
4.2.3.4. Lactadherina.....	85
4.2.3.5. Fibronectina.....	85
4.2.3.6. Componentes del complemento	85
4.2.3.7. Lípidos.....	85
4.2.3.8. Leucocitos	86
4.2.4. Agentes antiinflamatorios y antioxidantes	88
4.2.4.1. Factores promotores del crecimiento epitelial y de las barreras mucosas	88
4.2.4.2. Agentes antioxidantes	89
4.2.4.3. Enzimas que degradan mediadores de la inflamación.....	89
4.2.4.4. Citoquinas antiinflamatorias	89
4.2.5. Factores inmunomoduladores	90
4.2.6. Glicanos: oligosacáridos y glicoconjugados	92

4.3. LOS OLIGOSACÁRIDOS Y GLICOCONJUGADOS DE LA LECHE MATERNA

4.3.1. Diversidad estructural	92
4.3.2. Concentración	94
4.3.3. Efectos locales de los glicanos	96
4.3.4. Capacidad protectora frente a las infecciones por NoV	100
4.3.4.1. Expresión constitutiva.....	100
4.3.4.2. Resistencia a los enzimas digestivos	102
4.3.4.3. Efectividad clínica de la protección de los oligosacáridos.....	103
4.3.4.4. Efectos sistémicos de los glicanos	104

5. HIPÓTESIS	107
6. OBJETIVOS	108
7. MATERIAL Y MÉTODOS	
7.1. DISEÑO	109
7.2. MUESTRA POBLACIONAL	109
7.3. MUESTRAS CLÍNICAS	
7.3.1. Leche materna	109
7.3.2. Suero	110
7.3.3. Saliva.....	110
7.4. ANTICUERPOS	
7.4.1. Anticuerpos monoclonales	111
7.4.2. Otros anticuerpos.....	111
7.5. MÉTODOS	
7.5.1. Producción y purificación de partículas pseudovíricas (VLPs) de NoV GII.4 mediante baculovirus recombinantes	112
7.5.1.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie	113
7.5.1.3. Observación al microscopio electrónico tras tinción negativa con ácido fosfotúngstico	116
7.6. ENSAYOS DE UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA.....	117
7.7. ENSAYOS DE BLOQUEO DE LA UNIÓN DE VLPs DE NOROVIRUS A SALIVA	
7.7.1. Método de Bradford	120
7.8. ANÁLISIS POR ELISA DE ANTICUERPOS EN SUERO Y LECHE MADURA FRENTE A NOROVIRUS	121
7.9. DETERMINACIÓN POR PCR DEL GENOTIPO SECRETOR (FUT2)	
7.9.1. Extracción del ADN total de las muestras de leche materna.....	123
7.9.2. Análisis por PCR del gen FUT2.....	124
7.10. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS LEWIS	127
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	128

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA POBLACIONAL	129
2. GRUPOS SANGUÍNEOS, GENOTIPO FUT2 Y ANTÍGENOS LEWIS	
2.1. GRUPOS SANGUÍNEOS.....	130
2.2. GENOTIPO FUT2	131
2.3. ANTÍGENOS LEWIS.....	132
3. ANÁLISIS REALIZADOS EN LECHE MATERNA	137
3.1. ACTIVIDAD BLOQUEANTE DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA	
3.1.1. Ensayos de bloqueo de la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor (sese)	138
3.1.2. Ensayos de bloqueo de la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo secretor homocigoto (SeSe).....	139
3.1.3. Análisis estadístico de los resultados de porcentaje de inhibición (PI) de muestras de leche humana sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según las características de las madres participantes	140
3.1.3.1. Diferencias del PI según la edad materna en el momento del parto	140
3.1.3.2. Diferencias en el PI según la edad gestacional	141
3.1.3.3. Diferencias en el PI según el origen geográfico materno	142
3.1.3.4. Diferencias en el PI según el grupo sanguíneo materno	142
3.1.3.5. Diferencias en el PI según el genotipo FUT2 materno	143
3.1.3.6. Diferencias en el PI según los antígenos Lewis maternos	145
3.1.3.7. Diferencias según la etapa madurativa de la leche materna	147
3.1.3.8. Diferencias en el PI según el tipo de saliva empleada	148
3.2. DETERMINACIÓN DE IgA ANTI NoV EN LM MADURA/TRANSICIÓN	
3.2.1. Descripción y análisis estadístico del PI de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 en función del título de IgA anti-NoV láctea	150
3.2.2. Descripción y análisis estadístico del origen geográfico, edad gestacional, grupo sanguíneo, genotipo FUT2 y antígenos Lewis maternos en función del título de IgA anti-NoV láctea	151

3.2.3. Estudios de correlación del título de IgA anti-NoV en leche madura/de transición, la edad materna y PI de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva	153
4. ANÁLISIS REALIZADOS EN SUERO	154
4.1. ACTIVIDAD BLOQUEANTE DE MUESTRAS DE SUERO FRENTE A LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA	154
4.2. DETERMINACIÓN DE IgG ESPECÍFICA ANTI-NoV GII.4 EN SUERO MATERNO	
4.2.1. Descripción y análisis estadístico del PI de suero y de la leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 en función del título de IgG anti-NoV en suero	155
4.2.2. Descripción y análisis estadístico del origen geográfico, edad gestacional, grupos sanguíneos, genotipo FUT2 y antígenos Lewis en función del título de IgG anti-NoV en suero	156
4.2.3. Estudios de correlación del título de IgG anti-NoV en suero con la edad materna en el momento del parto, el PI del suero y de la leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva	158
4.3. DETERMINACIÓN IgA ESPECÍFICA ANTI-NoV EN SUERO	
4.3.1. Descripción y análisis estadístico de la edad materna en el momento del parto, edad gestacional y PI de suero y leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 en función del título de IgA anti-NoV en suero.....	159
4.3.2. Descripción y análisis estadístico del origen geográfico, edad gestacional, grupos sanguíneos, genotipo FUT2 y antígenos Lewis en función del título de IgA anti-NoV en suero	160
4.3.3. Estudios de correlación del título de IgG anti-NoV en suero con la edad materna en el momento del parto, el PI del suero y de la leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva	162
DISCUSIÓN.....	165
CONCLUSIONES.....	185
ANEXOS	187
BIBLIOGRAFÍA.....	191

TABLAS

Tabla 1. Agentes etiológicos de gastroenteritis aguda más frecuentes según la edad (Guarino et al., 2008).

Tabla 2. Soluciones de rehidratación oral.

Tabla 3. Recomendaciones de tratamiento antibiótico de la AAP en las gastroenteritis agudas bacterianas.

Tabla 4. Prevalencia de los principales virus entéricos en la especie humana

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *Calicivirus*.

Tabla 6. Proteínas no estructurales de *Calicivirus* (Sosnovtsev et al., 2006).

Tabla 7. Criterios de Kaplan (Kaplan et al., 1982a).

Tabla 8. Principales receptores “Toll-like” y afinidad.

Tabla 9. Unión de oligosacáridos/HBGAs sintéticos a VLPs de NoV (Huang et al., 2005).

Tabla 10. IgA secretora en leche materna frente a patógenos microbianos comunes.

Tabla 11. Proteínas y glicoproteínas de la leche materna (Kunz et al., 1999).

Tabla 12. Mecanismos de acción de diversos agentes defensivos de la leche materna.

Tabla 13. Antiinflamatorios y antioxidantes de la leche materna.

Tabla 14. Agentes inmunomoduladores de la leche materna.

Tabla 15. Concentración (g/dL) de ciertos componentes de la leche materna en las diferentes etapas de la lactancia (Kunz et al., 1999).

Tabla 16. Estructura de los principales oligosacáridos de la leche materna (Chaturvedi et al., 2001a).

Tabla 17. Concentración de los principales oligosacáridos de la leche materna (Chaturvedi et al., 2001a).

Tabla 18. Oligosacáridos de la leche materna como receptores microbianos (Kunz et al., 2000).

Tabla 19. Interacciones proteína-carbohidrato de los glicanos de la leche materna.

Tabla 20. Genotipo FUT2 y antígenos Lewis de las muestras de saliva.

Tabla 21. Anticuerpos monoclonales empleados para la determinación de antígenos Lewis.

Tabla 22. Anticuerpos conjugados empleados en ensayos de bloqueo, de análisis de anticuerpos y determinación de Ag Lewis.

Tabla 23. Preparación del gel PAGE inferior (“resolving gel”, RG).

Tabla 24. Preparación del gel PAGE superior (“stacking gel”, SG).

Tabla 25. Composición del tampón de electroforesis (5 x).

Tabla 26. Azul de Coomassie.

Tabla 27. Solución decolorante.

Tabla 28. Concentración proteica de muestras de saliva empleadas.

Tabla 29. Diluciones de las muestras de suero y leche madura para el análisis de anticuerpos frente a NoV.

Tabla 30. Secuencia de oligonucleótidos sintéticos empleados para la amplificación del gen secretor humano, FUT2 (Lindesmith et al., 2003).

Tabla 31. Edad en el momento del parto de las madres participantes y edad gestacional.

Tabla 32. Características de grupos de RN pretérmino (semanas de gestación).

Tabla 33. Origen geográfico de las madres.

Tabla 34. Grupos sanguíneos de las madres.

Tabla 35. Genotipo FUT2 de las madres.

Tabla 36. Genotipo FUT2 según origen geográfico materno.

Tabla 37. Genotipo FUT2 según edad gestacional.

Tabla 38. Grupos sanguíneos de las madres según genotipo FUT2.

Tabla 39. Antígenos Lewis de las madres.

Tabla 40. Antígenos Lewis materno según su origen geográfico, grupo de edad gestacional y sanguíneo.

Tabla 41. Análisis antígenos Lewis según el origen geográfico materno y edad gestacional (estudio de regresión logística).

Tabla 42. Antígenos Lewis de las madres según su genotipo FUT2.

Tabla 43. Antígenos Lewis según el genotipo FUT2 materno (estudio de regresión logística).

Tabla 44. Actividad bloqueante de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor (sese).

Tabla 45. Análisis de diferencias de PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoVs GII.4 a saliva de individuo no secretor según la concentración (W de Wilcoxon).

Tabla 46. Actividad bloqueante de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo secretor homocigoto (SeSe).

Tabla 47. Comparación PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV a saliva en función de la edad materna en el momento del parto (prueba de correlación de Pearson).

Tabla 48. Comparación PI de muestras de LM sobre la unión de VLPs de NoV a saliva en función de la edad gestacional (prueba de Kruskal-Wallis).

Tabla 49. Comparación PI de muestras de leche materna sin diluir sobre la unión de VLPs de NoV a saliva en función del origen geográfico materno (prueba de Kruskal-Wallis).

Tabla 50. Comparación PI de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva en función del grupo sanguíneo materno (Kruskal-Wallis).

Tabla 51. PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según el genotipo FUT2 materno.

Tabla 52. Comparación PI de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva en función del genotipo FUT2 materno (prueba de Mann-Whitney).

Tabla 53. Descripción y comparación PI de muestras de LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según los antígenos Lewis (Kruskal-Wallis).

Tabla 54. Comparación genotipo FUT2 y antígenos Lewis maternos con PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de no secretor y secretor homocigoto (estudio de regresión logística).

Tabla 55. Comparación PI leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según la etapa madurativa de la leche (Friedman).

Tabla 56. Comparación PI leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de secretor según la etapa madurativa de la leche (prueba W de Wilcoxon).

Tabla 57. Comparación PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según el tipo de saliva empleada (prueba de Friedman).

Tabla 58. Comparación PI de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según el tipo de saliva empleada (W de Wilcoxon).

Tabla 59. Títulos de IgA anti-NoV en leche madura/de transición.

Tabla 60. Comparación de PI de LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva en función del título de IgA anti-NoV en leche madura/de transición (prueba de Kruskal-Wallis).

Tabla 61. Comparación origen geográfico, grupo de edad gestacional, grupo sanguíneo y genotipo FUT2 maternos en función del título de IgA anti-NoV en L mad/LT (*Chi cuadrado*).

Tabla 62. Comparación antígenos Lewis según el contenido de IgA en LM madura/de transición (estudio de regresión logística).

Tabla 63. Comparación títulos IgA anti-NoV en leche madura/de transición con edad materna en el momento del parto y PI muestras LM sobre la unión de NoV GII.4 a muestras de saliva (prueba de correlación de Spearman).

Tabla 64. Actividad bloqueante de muestras de suero de la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de no secretor.

Tabla 65. Frecuencia y porcentaje de títulos de IgG anti-NoV en suero.

Tabla 66. Comparación de edad materna en el parto, edad gestacional y PI de suero y LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva en función del título de IgG anti-NoV en suero (prueba de Kruskal-Wallis).

Tabla 67. Comparación origen geográfico, grupo de edad gestacional, grupo sanguíneo y genotipo FUT2 maternos en función del título de IgG anti-NoV en suero (*Chi cuadrado*).

Tabla 68. Comparación antígenos Lewis maternos en función del contenido de IgG anti-NoV en suero (estudio de regresión logística).

Tabla 69. Comparación títulos IgG anti-NoV en suero con edad materna en el momento del parto y PI muestras LM sobre la unión de NoV GII.4 a muestras de saliva (prueba de correlación de Spearman).

Tabla 70. N° de casos y porcentaje de títulos de IgA anti-NoV suero.

Tabla 71. Comparación de edad materna en el parto, edad gestacional y PI de suero y LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva en función del título de IgA anti-NoV en suero (prueba de Kruskal-Wallis).

Tabla 72. Comparación origen geográfico, grupo de edad gestacional, grupo sanguíneo y genotipo FUT2 maternos en función del título de IgA anti-NoV en suero (*Chi cuadrado*).

Tabla 73. Comparación antígenos Lewis maternos en función del contenido de IgA anti-NoV en suero (estudio de regresión logística).

Tabla 74. Comparación títulos IgA anti-NoV en suero con edad materna en el momento del parto, PI suero y PI muestras LM sobre la unión de NoV GII.4 a muestras de saliva (prueba de correlación de Spearman).

FIGURAS

Figura 1. Distribución de causas de mortalidad en niños menores de 5 años, incluyendo el periodo neonatal (modificado de WHO, 2008).

Figura 2. Distribución de la carga de enfermedad por edades según el nivel socioeconómico (Parashar et al., 2003a).

Figura 3. Tasa de incidencia de episodios diarreicos por grupos de edad por niño y año a partir de datos obtenidos de tres estudios prospectivos realizados en países en desarrollo (Kosek et al., 2003).

Figura 4. Mortalidad asociada a diarrea aguda (casos por 1000 habitantes) por grupos de edad a partir de tres estudios de investigación epidemiológica realizados en países en desarrollo (Kosek et al., 2003).

Figura 5. Tasas de mortalidad infantil por causa y región. Fallecimientos cada 1000 niños de 0-4 años (WHO, 2008b).

Figura 6. Representación esquemática de los mecanismos patogénicos principales de la diarrea aguda (Walker et al., 2004).

Figura 7. Microfotografía electrónica de viriones de rotavirus procedentes de un filtrado de muestras de heces de un niño con gastroenteritis (Kapikian et al., 1974).

Figura 8. Microfotografía electrónica de viriones de norovirus (izquierda) y sapovirus (derecha).

Figura 9. Microfotografía de partículas de astrovirus de aproximadamente 30 nm de diámetro en el contenido intestinal de cordero (Mendez et al., 2007).

Figura 10. Microfotografía electrónica de adenovirus teñido negativamente (Philipson et al., 1975).

Figura 11. Organización genómica de *Calicivirus* (Green et al., 2007).

Figura 12. Estructura de la cápside y proteínas estructurales de norovirus (Green et al., 2007).

Figura 13. Correspondencia entre dominios del genoma y secuencia aminoacídica (Green et al., 2007).

Figura 14. Tinción específica de MNV-1 en células de estirpe macrofágica (Wobus et al., 2004).

Figura 15. Microfotografías electrónicas de tinción negativa de la partícula P.

Figura 16. Brotes de gastroenteritis aguda por NoV GII.4 en el segundo semestre de 2004, 2005 y 2006 en Europa (modificado de Kroneman et al., 2006).

Figura 17. Distribución geográfica según comunidades autónomas de brotes de norovirus declarados en España en el año 2003 (Boletín epidemiológico semanal, 2005).

Figura 18. Tinción inmunohistoquímica de la unión de extractos hepáticos de RHDV a HBGAs tipo 2 de células traqueales de conejo (Ruvoen-Clouet et al., 2000).

Figuras 19, 20 y 21. Vías de síntesis de HBGAs (modificado de Hutson et al., 2004).

Figura 22. Inhibición de la unión de NoV por leche materna (modificado de Jiang et al., 2004a).

Figura 23. Representación gráfica de la interacción de NoV y HBGA basada en la clasificación en dos grupos de unión de NoV con los HBGAs: el grupo de unión ABO y Lewis (Tan et al., 2005b).

Figura 24. Detección por inmunofluorescencia de la expresión de Ag VP1 (de cápside) de NoV GII.4 en células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante.

Figura 25. Western blot de VLPs de NoV GII.4 tras electroforesis de gel de poliacrilamida con SDS-PAGE y revelado por quimioluminiscencia con antisuero de conejo anti-NoV.

Figura 26. Imagen de VLPs de NoV GII.4 tras tinción negativa con ácido fosfotúngstico.

Figura 27. Esquema de los ensayos de bloqueo de la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva mediante leche materna o suero.

Figura 28. Ley de Beer-Lambert.

Figura 29. Esquema de los análisis por ELISA de anticuerpos en suero y leche madura frente a NoV.

Figura 30. Imagen de electroforesis de los productos de amplificación por PCR del gen FUT2 sometidos a digestión enzimática por Ava-II.

Figura 31. Cromatogramas del gen FUT2: (A) secretor heterocigoto, (B) secretor homocigoto y (C) no secretor.

Figura 32. Mediana, intervalo intercuartílico y rango de edad gestacional (semanas de gestación) de la muestra de estudio.

Figura 33. Origen geográfico.

Figura 34. Grupos sanguíneos.

Figura 35. Genotipo FUT2.

Figura 36. Antígenos Lewis.

Figura 37. Algoritmo de los análisis realizados en leche materna y n° de muestras empleadas.

Figura 38. Títulos IgA anti-NoV en leche madura/de transición.

Figura 39. Algoritmo de los análisis realizados en suero y n° de muestras empleadas.

Figura 40. Títulos de IgG anti-NoV en suero.

Figura 41. Títulos de IgA anti-NoV en suero.

ABREVIATURAS

2'-FL: 2-fucosilactosa.

AAP: "American Academy of Pediatrics" (Academia americana de Pediatría).

Ag HBs: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

Ala: alanina.

AMPc: adenosín-monofosfato cíclico.

Arg: arginina.

BSA: seroalbúmina bovina.

CSF: "colony-stimulating factor" (factor estimulante de colonias).

DC-SIGN: "dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin" (célula dendrítica específica para la adhesión intercelular de la no-integrina captadora de molécula 3).

EBHSV: "European brown hare syndrome virus" (virus del síndrome de la liebre parda europea).

ESPGHAN: "European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition" (Sociedad europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica).

FBVE: "Foodborne viruses in Europe" (virus transmitidos por alimentos en Europa).

FCV: "feline calicivirus" (calicivirus felino).

Fe: felino.

Fuc: L-fucosa.

FUT: fucosiltransferasa.

Gal: D-galactosa.

GEA: gastroenteritis aguda.

Glc: D-glucosa.

GlcNAc: N-acetilgalactosamina.

GMPc: guanosín-monofosfato cíclico.

Ha: liebre.

HBGAs: "histo-blood group antigens" (antígenos histo-sanguíneos humanos).

Hu: humano.

HV: Hawaii virus.

IFN: interferón.

IgAs: inmunoglobulina A secretora.

IL: interleuquina.

LaV: lagovirus.

LDFH-I: lactosa N-difucohexosa.

Le: Lewis.

Lys: lisina.

MFGE-8: “milk fat globule-8” (globule graso de la leche nº 8).

MNV: NoV murino.

MxV: Mexico virus.

NeuAc: ácido siálico / ácido N-acetilneuramínico.

NoV: norovirus.

NTPasa: nucleótido-trifosfatasa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPD: orto-fenilenediamina dihidroclorato.

ORF: “open reading frame” (pauta abierta de lectura).

PAF: “platelet activating factor” (factor de activación plaquetario).

PBS: tampón fosfato salino.

PCR-RFLP: reacción en cadena de la polimerasa de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (“restriction fragments length polymorphisms”).

PiV: Parris island virus.

Pol: polimerasa.

Pro: proteinasa.

Ra: conejo.

RHDV: “Rabbit haemorrhagic disease virus” (virus de la enfermedad hemorrágica del conejo).

RIA: “radio immune assay” (radioinmunoensayo).

RT-PCR: “reverse transcription polymerase chain reaction” (reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa).

SaV: sapovirus.

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico.

Ser: serina.

SeSe: secretor homocigoto.

Sese: secretor heterocigoto.

sese: no secretor.

Sf9: Spodoptera frugiperda.

SMV: Snow Mountain virus.

SRSV: “small round structured virus” (virus pequeños y redondos).

ssRNA: “single stranded RNA” (ARN de cadena única).

Sw: cerdo.

Thr: treonina.

TLR: receptores “toll-like”.

TNF: “tumoral necrosis factor” (factor de necrosis tumoral).

UNICEF: “United Nations Children’s Fund” (Fundación para la Infancia de las Naciones Unidas).

VEE: virus de la encefalitis equina venezolana.

VESV: “vesicular exanthema swine virus” (virus del exantema vesicular porcino).

VeV: vesivirus.

VHA: virus hepatitis A.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

VLPs: “virus-like particles” (partículas pseudovíricas).

VP: “viral protein” (proteína viral).

VPg: “viral protein genome-linked” (proteína unida al genoma viral).

WHO: “World Health Organization” (Organización Mundial de la Salud).

INTRODUCCIÓN

1. LA DIARREA AGUDA EN LA INFANCIA

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

1.1.1. Impacto de la diarrea aguda en la infancia

Si bien es cierto que la mortalidad en la infancia ha declinado claramente desde los 15 millones de defunciones en 1980 hasta los 9 millones en 2007, condiciones prevenibles y tratables como la neumonía, la diarrea, la malaria y el sarampión siguen encabezando las causas de mortalidad en los niños menores de 5 años (Parashar et al., 2003a), *figura 1*. De ellas, la diarrea aguda continúa siendo un problema de salud que afecta a la infancia en todo el mundo siendo la responsable del fallecimiento de 1,8 millones de niños cada año en este grupo de edad (Kosek et al., 2003).

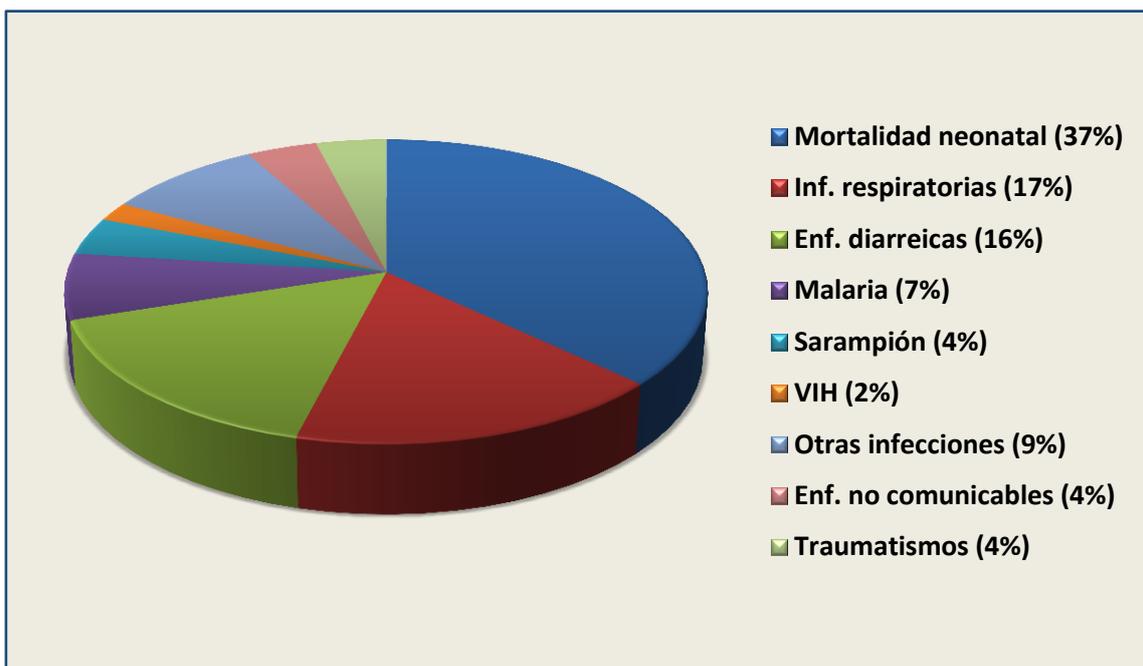


Figura 1. Distribución de causas de mortalidad en niños menores de 5 años, incluyendo el periodo neonatal (modificado de WHO, 2008b).

1.1.2. Agentes etiológicos principales

Los episodios de diarrea aguda tienen un origen principalmente infeccioso (Guandalini et al., 2004), siendo los principales agentes etiológicos *Vibrio cholerae*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., amebas y patógenos virales diversos, principalmente rotavirus y calicivirus. La frecuencia

relativa de cada patógeno difiere ampliamente según la zona geográfica, el estado inmunitario y la edad del huésped.

En relación con la localización geográfica, existe un predominio de infecciones intestinales bacterianas y protozoarias en los países en desarrollo, en comparación con los países desarrollados donde es más frecuente un origen viral (Greenberg et al., 1992). En los países desarrollados las infecciones intestinales son habitualmente esporádicas, pero continuamente se identifican y declaran epidemias que ocurren con más frecuencia de octubre a mayo (con un pico de incidencia de enero a marzo), tratándose en la mayoría de los casos de diarreas virales, por rotavirus y norovirus (NoV) principalmente, si bien *Campylobacter jejuni* y *Salmonella* sp. presentan picos de incidencia de mayo a junio y de septiembre a octubre (Guarino et al., 2008). Los parásitos son una causa infrecuente en niños sanos, identificándose *Cryptosporidium* sp. y *Giardia lamblia* como los más prevalentes (Pickering et al., 1984; Lacroix et al., 1987; Guerrant et al., 1990; Ish-Horowitz et al., 2003). Los NoV y los virus de la hepatitis A (VHA) se reconocen en la actualidad como los patógenos de transmisión por agua o alimentos más importantes, en relación a las epidemias que producen y al número de personas afectadas a nivel global (Breese et al., 2002; Koopmans et al., 2004).

Hay que considerar que en pacientes con alteraciones de la inmunidad, como los enfermos por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), enfermedades oncológicas y otras situaciones análogas, se observa una gama más amplia de patógenos, tales como *Isoospora belli*, *Cryptosporidium parvum* y *Cyclospora cayetanensis* (Cohen et al., 2001).

Respecto a las diferencias por edad (tabla 1), rotavirus es el agente etiológico de diarrea en la infancia más frecuente en todo el mundo y presenta un pico de incidencia entre los 6 y 24 meses, a diferencia de las bacterias que suelen ser más comunes en los primeros meses de vida y en los años escolares (Guandalini et al., 2004).

Por otra parte, es preciso considerar que aunque las infecciones intestinales son con mucho la causa más común de diarrea aguda en la infancia, esta puede ser generada por muchas otras condiciones, tales como infecciones extraintestinales (otitis media aguda, neumonía e infecciones del tracto urinario), fármacos (implicando al *Clostridium difficile* como responsable de muchos de los casos de diarrea asociada a antibióticos de amplio espectro. McFarland et al., 2000), alergias alimentarias (afectan a un 3% de los niños, siendo la alergia a la proteína de leche de vaca la más frecuente), alteraciones de los procesos de digestión y absorción (tales como el déficit de sacarasa-isomaltasa y la intolerancia a la lactosa en el contexto de un proceso malabsortivo), la quimioterapia y/o radioterapia (resultado de la alteración de la función absorbente de la mucosa intestinal), el abdomen agudo (es el caso de la apendicitis aguda. Enab et

al., 2002) y otras alteraciones más infrecuentes (como el déficit de niacina o la ingesta de metales pesados).

Tabla 1. AGENTES ETIOLÓGICOS DE GASTROENTERITIS AGUDA MÁS FRECUENTES SEGÚN LA EDAD (Guarino et al., 2008)		
< 1 año	1-4 años	> 5 años
Rotavirus	Rotavirus	<i>Campylobacter</i> sp.
Norovirus	Norovirus	<i>Salmonella</i> sp.
Adenovirus	Adenovirus	Rotavirus
<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.	Norovirus
	<i>Campylobacter</i> sp.	
	<i>Yersinia</i> sp.	

1.1.3. Morbilidad

Al estimar la frecuencia global de la diarrea aguda es probable que se subestime en los países en desarrollo. En ellos tienen lugar un 98% de las muertes de niños menores de 5 años, sin embargo carecen de sistemas de registro vital que permitan conocer con exactitud las causas de defunción en este grupo de edad. Los datos disponibles al respecto tienen una cobertura muy variable, oscilando del 12 al 81% (Stenberg et al., 2007). En China, por ejemplo, existe un sistema de registro vital que aporta datos de causas de fallecimiento de forma sistemática, pero su exhaustividad para los menores de 5 años es cuestionable (Boschi-Pinto et al., 2008). Esta carencia de datos fidedignos es el principal obstáculo para diseñar los planes de salud para los menores de 5 años de estas áreas por parte de los organismos nacionales e internacionales (Boschi-Pinto et al., 2008).

En nuestro medio, la información rutinaria de los episodios de diarrea aguda infecciosa tiende a ser heterogénea pues la mayoría de los casos no precisan asistencia hospitalaria y son atendidos en atención primaria o simplemente en el domicilio. Además, la diarrea puede aparecer asociada a una gama muy amplia de otras enfermedades, lo que dificulta el diagnóstico diferencial.

A pesar de la imprecisión de las fuentes de información, podemos afirmar que la diarrea es la enfermedad más prevalente a nivel mundial en todas las edades, incluso en las regiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que incluyen a los países más ricos (WHO, 2008b). En general se observa que en las revisiones del tema la morbilidad de la diarrea aguda en la infancia ha aumentado ligeramente en todo el mundo desde 1990 hasta el año 2000, lo que

puede deberse a que el crecimiento de la población mundial ha tenido lugar a expensas de los países más pobres.

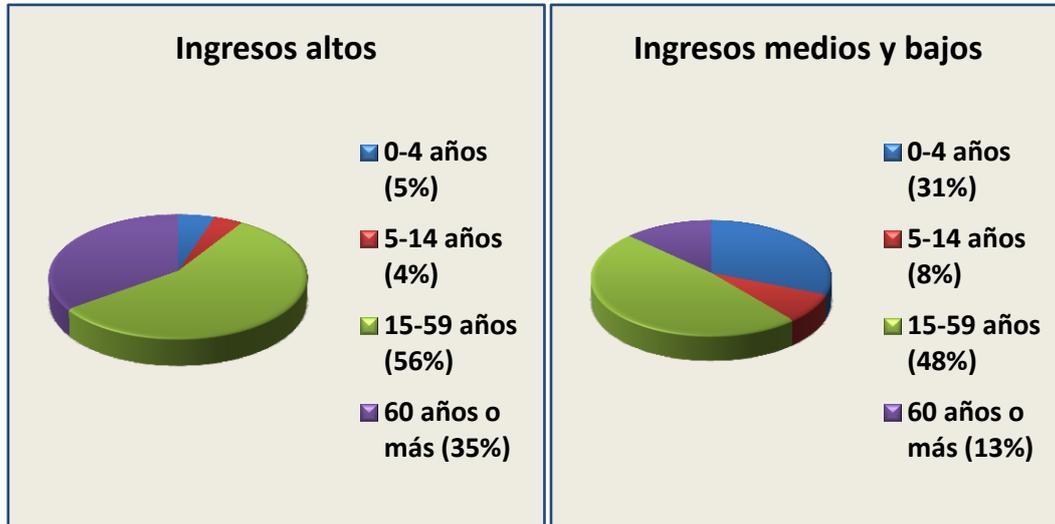


Figura 2. Distribución de la carga de enfermedad por edades según el nivel socioeconómico (Parashar et al., 2003a).

La prevalencia de enfermedad en los diferentes grupos de edad se ve muy afectada por el nivel socioeconómico de la población, de forma que los ingresos altos implican una esperanza de vida mayor y morbilidad en etapas tardías de la vida, a diferencia de los ingresos bajos que implican una morbi-mortalidad más precoz.

Para los niños menores de 5 años de edad en los países en desarrollo se cuantifica una tasa de incidencia de 3,2 episodios por niño y año, aunque entre los 6 y 11 meses alcanza 4,8 episodios por niño y año (Kosek et al., 2003), como muestra la *figura 3*. No debemos ignorar que las formas generalizadas de malnutrición, el marasmo y el kwashiorkor, así como los déficits minerales y vitamínicos que los acompañan pueden influir en la función inmunitaria del huésped (Beisel, 1982), incrementando el riesgo de cronificación y las secuelas de esta afección (Baqui et al., 1993; Duncan et al., 1997), tales como la talla baja, las disfunciones físicas y cognitivas e incluso la defunción (Guerrant et al, 1999a), consecuencias comunes en los niños malnutridos que padecen diarrea aguda. La malnutrición, de hecho, es una condición que aparece asociada a un 35% de los fallecimientos por diferentes causas en los niños menores de 5 años (Black et al., 2008; WHO., 2008a).

En los países desarrollados la mortalidad por diarrea es excepcional, en cambio son enormes los costes directos (gastos médicos) e indirectos (pérdida de días de trabajo de los padres) por la elevada prevalencia de la enfermedad (Tucker et al., 1998). En Estados Unidos,

la tasa de incidencia de la diarrea se ha estimado en 1-2,5 episodios por niño y año (Ho et al., 1988) generando un 10% de las hospitalizaciones en menores de 5 años (Glass et al., 1991). En Europa, la tasa de incidencia es bastante similar pues oscila de 0,5 a 1,9 episodios por niño y año en menores de 3 años (Tompkins et al., 1992; Caprioli et al., 1996; Guandalini et al., 2000; De Wit et al., 2001b; Maltezos et al., 2001; Olesen et al., 2005).

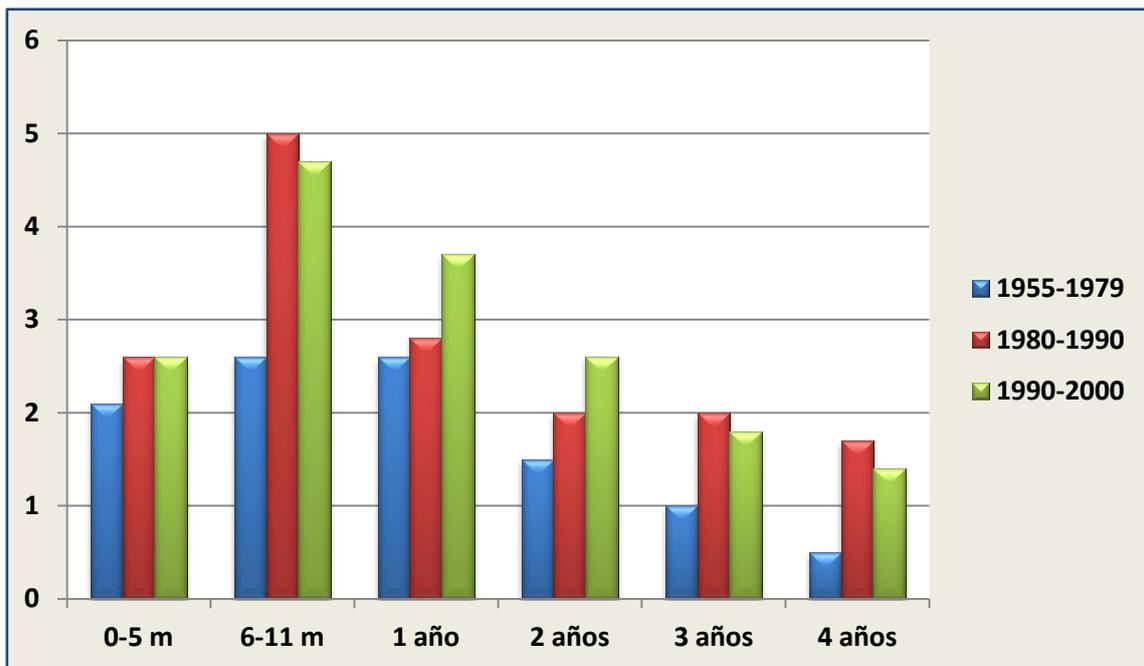


Figura 3. Tasa de incidencia de episodios diarreicos por niño y año por grupos de edad a partir de datos obtenidos de tres estudios prospectivos realizados en países en desarrollo (Kosek et al., 2003).

1.1.4. Mortalidad

La mortalidad de la infancia asociada a la diarrea ha disminuido de forma lenta pero constante en las últimas décadas. Los datos publicados por Kosek et al. indican que en los países en desarrollo las muertes anuales de menores de 5 años por diarrea cayeron de 4,6 millones en 1982 a 3 millones en 1992 y 2,5 millones en el 2003, a pesar del crecimiento de la población y la inclusión de China en los análisis más recientes. Las estimaciones de mortalidad del año 2003 revelaron que 4,9 de cada 1000 niños por año fallecieron como consecuencia de la diarrea aguda en los primeros 5 años de vida en estas áreas, lo que supone un descenso respecto a las cifras previas de 13,6 de cada 1000 niños por año en el periodo de 1955 a 1979 y 5,6 de cada 1000 niños por año de 1992 al 2000, siendo esto más pronunciado en los menores de 1 año (figura 4). Supone una media de un 21% de todas las muertes de niños por debajo de 5 años en estas áreas (Kosek et al., 2003). Parashar et al. aportan datos muy similares, cuantifican en 2,1

millones las muertes en la infancia debidas a diarrea aguda (Parashar et al., 2003b), en cambio Boschi-Pinto et al. obtienen una cifra menor 1,87 millones de muertes de menores de 5 años por año (intervalo de confianza al 95%: 1,56-2,19), aproximadamente un 19% de todas las muertes de niños menores de 5 años.

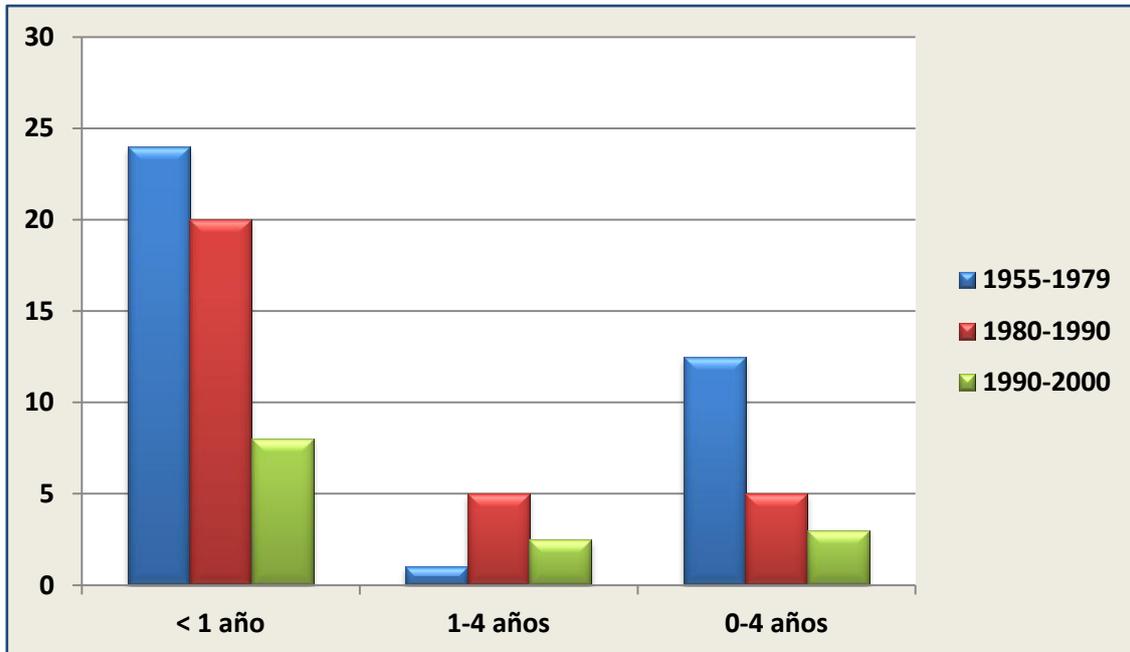


Figura 4. Mortalidad asociada a diarrea aguda (casos por 1000 habitantes) por grupos de edad a partir de tres estudios de investigación epidemiológica realizados en países en desarrollo (Kosek et al., 2003).

Las regiones de la OMS de África y el Sudeste asiático incluyen el 78% (1,46 millones) de todas las muertes por diarrea que tienen lugar en el mundo en desarrollo, un 73% de ellas tienen lugar en tan solo 15 países (Boschi-Pinto et al., 2008), *figura 5*. La disminución progresiva de las cifras de mortalidad en las últimas décadas puede atribuirse a la generalización del uso de soluciones de rehidratación oral, junto con el apoyo a la lactancia materna, la educación femenina y las mejoras sanitarias en los países en desarrollo (Victoria et al., 2007; Forsberg et al., 2007).

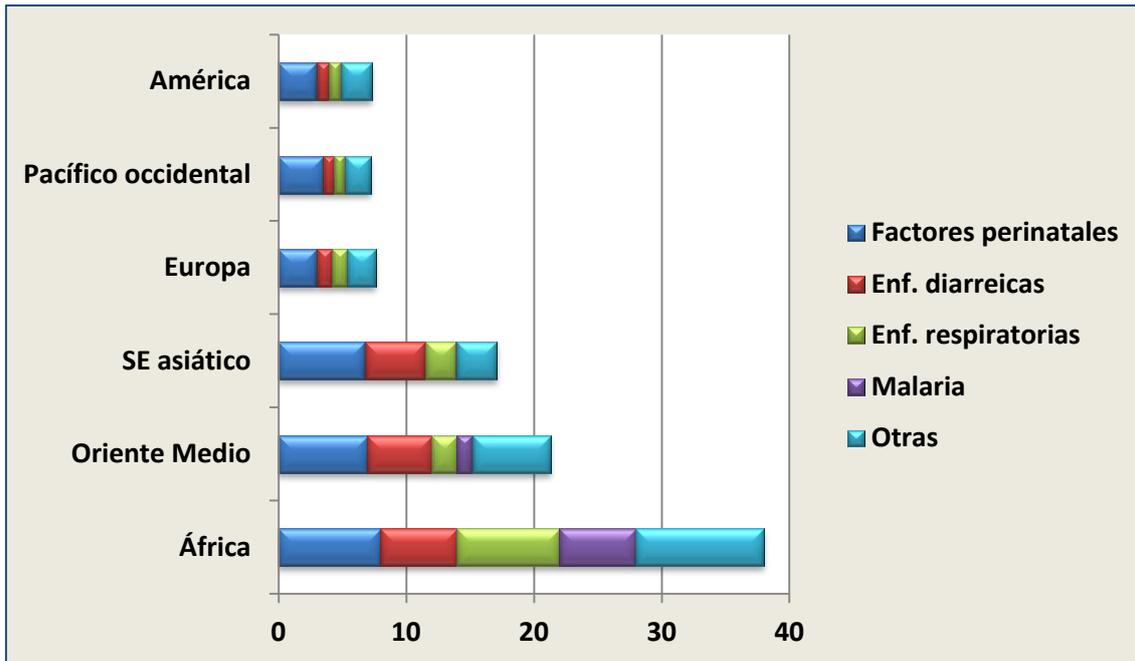


Figura 5. Tasas de mortalidad infantil por causa y región. Fallecimientos cada 1000 niños de 0-4 años (WHO, 2008b).

1.1.5. Factores de riesgo

La elevada morbi-mortalidad asociada a la diarrea aguda en la infancia es conocida por las organizaciones sanitarias internacionales, por lo que entre los Objetivos de Desarrollo para el Nuevo Milenio de las Naciones Unidas se ha incluido la disminución en dos tercios de la tasa de mortalidad por diarrea aguda en los niños menores de 5 años entre 1990 y 2015 (WHO, 2009).

La OMS recalca la responsabilidad que tiene la falta de acceso al agua potable y los medios sanitarios inadecuados, así como las prácticas de higiene insuficientes de gran parte de la población mundial en la morbilidad de la enfermedad. Se estima que un 88% de los casos de diarrea aguda son atribuibles a estos tres factores y su mejora podría prevenir al menos un 9,1% de la carga de enfermedad mundial y un 6.3% de todas las muertes por diarrea aguda, especialmente de niños en países en desarrollo (Stenberg et al., 2007).

Esfuerzos dirigidos por la OMS durante el periodo de 1990 a 2006 permitieron el acceso al agua potable a más de un billón de personas en el mundo y extendieron mejoras en los medios de evacuación a aproximadamente 1,1 billones de personas (WHO, 2009); sin embargo, como se ha concluido en la Cumbre Mundial sobre los Objetivos del Tercer Milenio de 2010, todavía estamos lejos de haber completado estos propósitos.

1.2. PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA

1.2.1. Fisiología del transporte intestinal

Bajo circunstancias fisiológicas el intestino delgado absorbe grandes cantidades de sodio, cloro y bicarbonato, secreta hidrogeniones y en menor medida cloro y bicarbonato, el agua sigue de forma pasiva el transporte de solutos. Existe absorción y secreción tanto en el villi como en las criptas, aunque mayoritariamente la absorción tiene lugar en la región vellosa y la secreción en la críptica (Veereman-Wauters et al., 2006). Debido a que la capacidad absorptiva de los enterocitos supera con creces la secretora el resultado neto es a favor de la absorción (Guandalini et al., 2004).

El transporte intestinal de agua y electrolitos es un proceso finamente regulado que resulta de la interacción de diferentes mecanismos: el sistema nervioso entérico, las células de la lámina propia, y las células epiteliales. Los agentes reguladores liberados, responsables del mantenimiento de la homeostasis, incluyen péptidos hormonales, aminas activas, metabolitos del ácido araquidónico y óxido nítrico.

1.2.2. Tipos de diarrea aguda

En la diarrea aguda existe un desbalance del funcionamiento de los procesos de absorción y secreción en el intestino delgado y/o grueso. Puede ser el resultado de un efecto osmótico que actúa en el lumen (diarrea osmótica) o bien de un estado de secreción activa inducida por los enterocitos (diarrea secretora), ambos conducen a una disminución de la consistencia de las heces y/o a un incremento de la frecuencia de las mismas por lo general mayor o igual a 3 en 24 horas (*Figura 6*). La diarrea aguda es por definición autolimitada, con una duración menor a 7 días (Guarino et al., 2008).

En la diarrea osmótica la eliminación fecal no suele ser masiva, guarda una proporción directa con la cantidad ingerida de nutrientes no absorbibles y mejora cuando se interrumpe dicha ingesta. La osmolaridad de las heces es elevada, excediendo los 100 mOsm/kg, a lo que contribuyen el contenido electrolítico, los nutrientes no absorbibles y sus productos de degradación.

Se observa por ejemplo, tras la ingesta de azúcares no absorbibles como la lactosa en los intolerantes a estos carbohidratos o bien de forma secundaria a las infecciones intestinales. Los virus muestran un fuerte tropismo por las células epiteliales del intestino delgado y destruyen selectivamente un gran número de enterocitos maduros con capacidad absorptiva, por medio de lisis y/o apoptosis, lo que lleva a una inadecuada absorción de fluidos, electrolitos y nutrientes intraluminales (Bass et al., 2004).

LA DIARREA AGUDA EN LA INFANCIA. Patogenia y fisiopatología.

En la diarrea secretora, los rasgos clínicos más característicos son el elevado ritmo de deposiciones, la falta de respuesta al ayuno y una osmolaridad fecal normal.

Esta situación puede ocurrir como consecuencia de muchos trastornos, aunque la causa más frecuente es la infección por determinadas bacterias intestinales. Tras su colonización, suelen adherirse o invadir el epitelio intestinal (el intestino delgado proximal en el caso de bacterias enterotoxigénicas y el distal y colon en las citotóxicas) y producen enterotoxinas (exotoxinas que permiten la secreción incrementando un segundo mensajero intracelular como el AMPc, GMPc o protein-kinasa C o citotoxinas como el *Vibrio cholerae*), lo que desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias que inducen la liberación de prostaglandinas o factores activadores de plaquetas con acciones hipersecretoras (Guerrant et al., 1999b). El papel del colon en la diarrea secretora es diferente según la causa (Field et al., 1989; Kunzelman et al., 2002), de forma general la capacidad de absorción de la mucosa colónica está maximizada para compensar parcialmente la pérdida de agua del intestino delgado, sin embargo hay situaciones en las cuales el colon está directamente implicado en el estímulo secretor: cuando la diarrea es el resultado de una infección por una bacteria citotóxica (*Clostridium difficile*, *E. coli* enterohemorrágica y *Shigella* sp.) o cuando es hiperestimulado a través del sistema nervioso entérico tras la liberación de una enterotoxina en el intestino delgado (enterotoxina colérica, toxinas termoestable y termolábil de *Klebsiella* sp., enterotoxina y toxina enteroagregante de *E. coli*. Field et al., 1989).

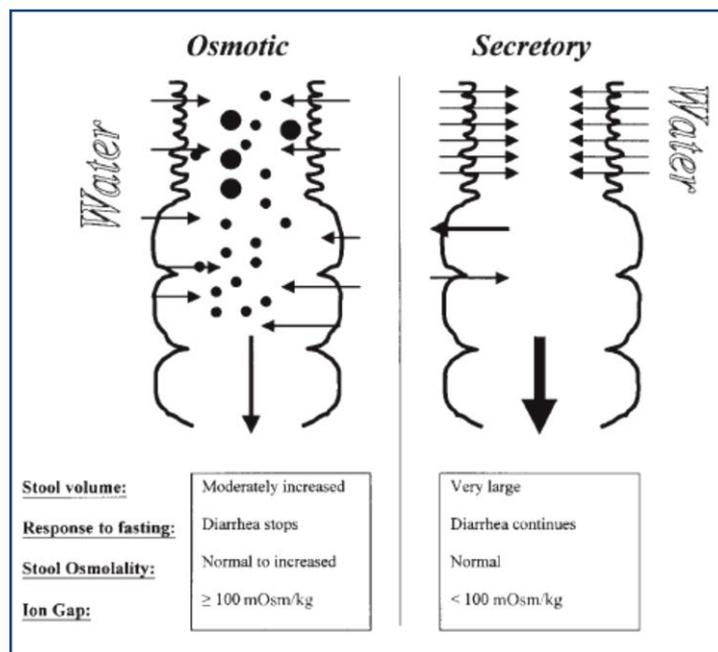


Figura 6. Representación esquemática de los mecanismos patogénicos principales de la diarrea aguda (Walker et al., 2004).

A pesar de que los casos de diarrea puramente osmótica o puramente secretora existen, en la mayoría de procesos ambos mecanismos conviven y se trata de cuadros mixtos desde el punto de vista patogénico y fisiopatológico. En la diarrea por rotavirus, existe una alteración grave de la función absorptiva tras la invasión masiva de los enterocitos maduros que explica la diarrea osmótica y además una hipersecreción de las criptas desencadenada por una enterotoxina, la proteína no estructural NSP4, que genera la secreción de cloro transepitelial calcio-dependiente produciendo la diarrea.

Si bien el mecanismo de diarrea osmótica descrito previamente es aplicable a los agentes clásicos de la enteritis viral como rotavirus, astrovirus, calicivirus y adenovirus entéricos, virus como citomegalovirus, virus de Ebstein-Barr y el virus de la inmunodeficiencia humana pueden asociarse a diarreas que probablemente se deban a otros mecanismos, como citoquinas inflamatorias locales o sistémicas.

1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La presentación clínica y el curso de la enfermedad son enormemente variables y dependen del medio geográfico, de las características del huésped y del patógeno infectante.

1.3.1. Diferencias geográficas

Las diferencias geográficas son determinantes en dos aspectos principales: la gravedad del episodio diarreico y su probabilidad de evolución a la cronicidad.

La diarrea aguda en los países desarrollados es casi invariablemente una enfermedad benigna y autolimitada que se resuelve en poco tiempo si hay una correcta reposición del agua y electrolitos y se mantiene un buen aporte nutricional, sin embargo existen casos de mayor gravedad como deshidrataciones y septicemias, principalmente en lactantes y por ciertos agentes como rotavirus y algunas bacterias intestinales (por ej. *Salmonella* sp.), respectivamente. En cambio, en los países en desarrollo un episodio diarreico suele minar a un paciente con un estado nutricional ya comprometido previamente y tiene un efecto deletéreo en la salud del niño que es más susceptible a la deshidratación, la caquexia y la muerte.

Aunque es algo excepcional en nuestro medio, hasta un 3% de las diarreas agudas evolucionan hacia la cronicidad. La infrecuente aparición de una diarrea prolongada en un niño sano por lo demás, suele deberse a una sensibilización a las proteínas alimentarias. En la fase aguda de la infección intestinal, este estado de sensibilización obedece a un aumento del paso de antígenos secundario a la mucosa dañada y al aumento de su permeabilidad. Se ha descrito que en los niños, las proteínas de la leche de vaca son la causa más frecuente de sensibilización

proteica (Walker-Smith, 1994). En contraposición, en los países en desarrollo en caso de superar la enfermedad, la malnutrición y el estado inmunitario debilitado favorecen la evolución de la diarrea a la cronicidad (WHO, 1985) hasta en un 20% de los episodios (Bhandari et al., 1992; Bhandari et al., 1994).

1.3.2. Características del huésped

En relación con el huésped, la edad y el estado nutricional son los factores más importantes.

En cuanto a la edad, cuanto más pequeño sea el niño, mayor será el riesgo para una deshidratación más grave y amenazante para la vida, como consecuencia de su mayor porcentaje de agua corporal total y la limitada capacidad de compensación renal de los lactantes. La influencia de la edad en la evolución a la cronicidad es una cuestión no resuelta de forma definitiva, sin embargo en países en desarrollo, se ha observado que la enteritis postdiarrea guarda una correlación inversa con la edad (Victoria et al., 1992; Fauveau et al., 1991).

En referencia al estado nutricional, aproximadamente un 80% de niños normnutridos que padecen diarrea aguda evolucionan favorablemente, a diferencia de los malnutridos que suelen presentar mayor gravedad del episodio diarreico (Guandalini et al., 2000). Entre los factores que pueden condicionar esta evolución se encuentran (Kukurozovic et al., 2002) la reducción de la secreción gástrica (Gracey et al., 1977), la alteración de la motilidad intestinal, la disminución de la síntesis de anticuerpos secretores y la alteración inmunitaria, puesto que favorecen el sobrecrecimiento bacteriano en el tramo intestinal proximal (Mata et al., 1972). Asimismo, con frecuencia se produce un déficit de inmunidad celular en los niños malnutridos y con diarrea como consecuencia de un déficit de micronutrientes como la vitamina A, la piridoxina, el ácido fólico y/o el zinc (Beisel et al., 1982) o de infecciones bacterianas o virales previas (Kauffman et al., 1976; Kantor, 1975). Además, la malnutrición implica un recambio epitelial intestinal disminuido y por tanto déficits enzimáticos y un retraso en la recuperación de la diarrea infecciosa, lo que contribuye a la malabsorción y prolonga la diarrea (Gracey et al., 1972) incrementando la mortalidad en estos niños.

1.3.3. Características del patógeno infectante

Cuando se analizan los niños con diarrea por diferentes agentes patógenos se observan diferencias en relación a su duración y manifestaciones clínicas.

En cuanto a su duración, la diarrea aguda generalmente suele prolongarse de 5 a 10 días. Las diarreas bacterianas tienden a declinar desde el principio debido a que las toxinas se unen de una forma irreversible a los enterocitos y se eliminan con la renovación de estas células de la cripta al villi, en cambio las diarreas víricas tienden a intensificarse durante varios días debido a

la extensión de la atrofia de las vellosidades y suelen tener un curso más prolongado (Guandalini et al., 2004).

En relación con las manifestaciones clínicas, la fiebre, el dolor abdominal en forma de calambres y la sangre mezclada con las deposiciones son más frecuentes en pacientes con patógenos bacterianos enteroinvasivos como *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Yersinia* sp., *Campylobacter* sp. y *Entamoeba histolytica* (Guandalini et al., 1988), mientras que los niños afectados por *Escherichia coli* enterotóxica (Guarino et al., 1989) y agentes víricos, especialmente rotavirus, sufren mayor deshidratación, vómitos y deposiciones más líquidas.

Asimismo, se ha descrito en los últimos años la asociación entre ciertos agentes causantes de diarrea aguda y manifestaciones extraintestinales, en ocasiones de gravedad. Es el caso de *Campylobacter jejuni*, especialmente el serotipo O:19, con el síndrome de Guillain-Barré (Nachamkin et al., 1998; Mishu et al., 1993) y de *Escherichia coli* productora de una toxina similar a *Shigella* sp. con el síndrome hemolítico-urémico (Myers et al., 1997).

1.4. TRATAMIENTO

Esencialmente, los principios del tratamiento de la diarrea aguda consisten en prevenir y revertir la deshidratación y minimizar las consecuencias nutricionales del daño de la mucosa intestinal (Veereman-Wauters et al., 2006).

1.4.1. Rehidratación oral

El riesgo mayor en la diarrea aguda es la pérdida de agua y electrolitos con la consiguiente deshidratación y pérdida de la homeostasis del equilibrio ácido-base y del sodio.

Hasta mediados de los años 60, se asumía que la vía intravenosa era la única adecuada para la rehidratación. Posteriormente, se demostró que las bacterias enterotoxigénicas dejan intacta la mucosa del intestino delgado, por tanto sus funciones absorptivas, y que el transporte de sodio acoplado a glucosa queda indemne en las diarreas secretoras inducidas por AMPc (Cash et al., 1970; Hirschhorn et al., 1968), así como en aquellas mediadas por GMPc (Guandalini et al., 1982). De esta manera, los procesos de absorción de sodio y glucosa son respetados compensando la pérdida masiva de fluidos que tiene lugar en este tipo de diarreas.

Estos hechos constituyeron las bases fisiopatológicas para el programa conjunto de la OMS y la Fundación para la Infancia de las Naciones Unidas (UNICEF) con el objetivo de diseñar soluciones de rehidratación oral como tratamiento principal de la diarrea aguda. Mostraron tal eficacia que llegaron a catalogarse como “el avance médico más importante de este siglo” (WHO, 2006; Elliot et al., 1989; International Study Group on Reduced Osmolality

Solutions, 1995) al estimar que han evitado más de 1 millón de muertes tanto en países en desarrollo como en países desarrollados (Walker-Smith, 1990).

Inicialmente la OMS recomendó una fórmula estándar con 90 mmol/L de sodio y 111 mmol/L de glucosa, con una osmolaridad total de 311 mOsm/L, para todas las causas de diarrea aguda y edades. Sin embargo, muchos estudios *in vitro* e *in vivo* en los años 80 y 90 demostraron que concentraciones más bajas de sodio y glucosa (sodio: 60-75 mmol/L y glucosa: 75 y 100 mmol/L, con una osmolaridad total de 225-260 mOsm/L. Wapnir et al., 1985; Sandhu et al., 1989; Booth et al., 1992) incrementaban la absorción de agua inducida por solutos y por tanto eran más eficaces que las soluciones más osmolares favoreciendo una mayor rehidratación y disminuyendo el número de deposiciones (Mahalanabis et al., 1996; Desjeux et al., 1997; Thillainayagam et al., 1998), sin riesgo añadido de padecer alteraciones del sodio (Hahn et al., 2002).

Actualmente la OMS, la ESPGHAN (“European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition”, la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. Sjazewska et al., 2000) y la AAP (“American Academy of Pediatrics”, Academia americana de Pediatría) consideran que las soluciones de rehidratación oral de baja osmolaridad constituyen la forma más segura, fisiológica, y efectiva de proporcionar rehidratación y mantener la hidratación en niños con diarrea aguda (Provisional Comité on Quality Improvement Subcomité of Acute Gastroenteritis, 1996; Hahn et al., 2001; Murphy et al., 2004). No obstante, la solución de rehidratación oral original de la OMS resulta todavía preferible en las áreas donde la prevalencia de cólera es alta (Hahn et al., 2001), dado que sigue siendo una causa fundamental de morbilidad y mortalidad en determinadas partes del mundo e induce las mayores pérdidas de sodio en las heces de las infecciones intestinales conocidas, alrededor de 90 mmol/L (Seas et al., 1996).

En la *tabla 2* se detalla la composición de los dos tipos de soluciones comercializadas en nuestro país.

Tabla 2. SOLUCIONES DE REHIDRATACIÓN ORAL							
	Na⁺ (mMol/L)	Cl⁺ (mMol/L)	K⁺ (mMol/L)	Citrato (mMol/L)	Bicarbonato (mMol/L)	Glucosa (mMol/L)	Osmolaridad (mOsm/L)
Sueroral	90	90	20	10	-	111	311
Sueroral hiposódico	60-75	41	20	-	30	75-100	225-260

1.4.2. Realimentación precoz

Se considera que los niños lactados al pecho que padecen diarrea aguda deben continuar con la lactancia materna sin ningún tipo de interrupción. De hecho, la lactancia materna no sólo tiene un conocido efecto protector contra la infección intestinal (Wyatt et al., 1969; Mata et al., 1969a; Glass et al., 1976; Clemens et al., 1986; McLean et al., 1986; Glass et al., 1989; Golding et al., 1997; Morrow et al., 1999; Kramer et al., 2001), sino que además promueve una recuperación más rápida y proporciona una mejor nutrición en el lactante en estas circunstancias (Brown, 1994a). Esto es incluso más importante en los países en desarrollo, donde la retirada de la lactancia materna en un medio donde las alternativas de alimentación para un lactante son limitadas ha demostrado exacerbar la deshidratación y desnutrición en los niños con diarrea aguda (Battacharaya et al., 1995).

En los lactantes alimentados artificialmente, el tema es mucho más controvertido. Durante años, el remedio popular de la diarrea aguda ha sido el ayuno, dada la interpretación de que el “reposo” del intestino podría ser beneficioso. Esta visión fue inicialmente planteada por Powers en 1926 que en su revisión de la diarrea en la infancia recomendaba un ayuno absoluto durante el periodo de enfermedad y una reintroducción de la fórmula a concentraciones progresivamente crecientes, lo que ha sido puesto en duda por numerosos autores a lo largo del siglo pasado (Chung et al., 1948; Rees et al., 1979; Dugdale et al., 1982). Actualmente la evidencia a favor de la realimentación precoz es arrolladora (Isolauri et al., 1986; Brown et al., 1991; Brown et al., 1994b), de hecho muchos estudios han proporcionado evidencias de que en niños sin deshidratación grave ni acidosis metabólica un reinicio de la alimentación tras haber completado la rehidratación oral en las primeras 4 a 6 horas es bien tolerada (Isolauri et al., 1985; Isolauri et al., 1986; Chew et al., 1993), es más, permite una restauración más rápida de la permeabilidad intestinal debido a la enteritis (Isolauri et al., 1989; Nanulescu et al., 1995).

Por otra parte, aunque se pensó que la intolerancia secundaria a la lactosa era una circunstancia limitante en los niños con diarrea y que había que retrasar la reintroducción de las fórmulas lácteas, hoy en día a pesar de la presencia de sustancias reductoras en las heces de niños con diarrea, no se recomienda el retraso de la introducción de los lácteos como se hace con frecuencia y de forma errónea en los países desarrollados en las diarreas leves y moderadas.

A modo de resumen, el grupo de trabajo de ESPHGAN recomienda como tratamiento óptimo de los niños con deshidratación leve a moderada en Europa, el uso de soluciones de rehidratación oral en las 4-6 primeras horas y la rápida reintroducción de la alimentación normal, incluyendo la lactosa a continuación (Walker-Smith et al., 1997; Sandhu, 2001).

1.4.3. Otros tratamientos

Probióticos. Los probióticos han formado parte de la nutrición humana durante siglos (Bengmark, 1998), pero ha sido en las últimas décadas cuando ha nacido un interés creciente acerca de su utilidad en la prevención y tratamiento de la diarrea aguda.

Son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades específicas ejercen efectos beneficiosos para la salud más allá de la nutrición (Guarner et al., 1998). Se les atribuye la propiedad de estimular la resistencia inespecífica a patógenos microbianos y potenciar las defensas gastrointestinales del huésped a través de la síntesis de sustancias antimicrobianas, la competición por nutrientes necesarios para el crecimiento de patógenos y/o la modificación de toxinas o sus receptores (Sjzewska et al., 2001; Veereman-Wauters et al., 2006). Se ha descrito que ciertos probióticos favorecen la proliferación linfocítica, estimulan la fagocitosis e incrementan la secreción de citoquinas, incluido el IFN-gamma (interferón-gamma. Sjzewska et al, 2006).

Lactobacillus rhamnosus de la cepa GG (ATCC 53103) es con diferencia el probiótico investigado más ampliamente. En diversos ensayos clínicos ha demostrado su efectividad en la prevención (Du Pont, 1997; Hi et al., 1997) y tratamiento (Vanderhoof et al., 2002; Guandalini et al., 2002) de la diarrea aguda en niños y adultos. El efecto es más pronunciado en la diarrea por rotavirus (Isolauri et al., 1991; 1994) y en la prevención de la diarrea prolongada (Guandalini et al., 2000), pues reduce el tiempo de eliminación de partículas víricas (Guarino et al., 1997). De hecho tras muchos ensayos clínicos doble ciego, randomizados y controlados con diversas especies de *Lactobacillus* sp. en niños con diarrea aguda (Guandalini et al., 2000), los ensayos clínicos más recientes corroboran su seguridad y eficacia (Huang et al., 2002; Van Niel et al., 2002; Sjzewska et al., 2007). *Saccharomyces boulardii* también ha demostrado beneficio aunque con un grado de evidencia menor (Szajewska, 2001).

Terapia antimicrobiana. En las infecciones bacterianas, la decisión de tratar a un niño con antibióticos no es fácil, puesto que los patógenos bacterianos han demostrado un aumento de resistencia a los tratamientos antibióticos habituales, su efectividad es variable y su uso puede prolongar el estado de portador. En la *tabla 3* se resumen las principales indicaciones y fármacos según el Comité de Enfermedades Infecciosas de la AAP.

Tabla 3. RECOMENDACIONES DE TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO DE LA AAP EN LAS GASTROENTERITIS AGUDAS BACTERIANAS

ETIOLOGÍA	INDICACIONES	FÁRMACOS
<i>Campylobacter sp.</i>	Diagnóstico precoz Formas graves	Macrólidos Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Salmonella no typhi</i>	Lactantes menores de 3 meses Pacientes con MCP (malnutrición calórico-proteica) Inmunodeprimidos	Ampicilina Cotrimoxazol Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Shigella sp.</i>	Diarrea sintomática	Cotrimoxazol Ampicilina Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Yersinia sp.</i>	Septicemia Pacientes inmunodeprimidos Pacientes con talasemia mayor	Cotrimoxazol Cefalosporinas de 3ª generación Aminoglucósidos

Fármacos antisecretores. Considerando la gran prevalencia de la diarrea aguda, es obvio que disponer de un fármaco antisecretor seguro y eficaz sería muy útil. Esta búsqueda ha sido muy infructuosa y todas las guías actuales advierten de que el uso de fármacos antisecretores en esta entidad sería más dañino que beneficioso. La mayoría de los nuevos agentes antisecretores (clorpromazina, loperamida y octeótrido) tienen un efecto limitado y no se libran de potenciales efectos adversos debido a sus propiedades inhibitoras de la motilidad intestinal (Veereman-Wauters et al., 2006).

En cambio, el racecadotril ha demostrado ser un fármaco seguro y eficaz en el tratamiento de la diarrea aguda (Farthing et al., 1999; Matheson et al., 2000). Es un inhibidor específico de las encefalinasas, peptidasas de membrana celular localizadas principalmente en el epitelio de yeyuno e íleon, previene la degradación de las encefalinas a nivel intestinal permitiendo su acción de reducción intracelular de AMPc y GMPc lo que evita la secreción electrolítica (Salazar-Lindo et al., 2000).

1.4.4. Micronutrientes

En los últimos años, ha despertado un gran interés el posible papel de la suplementación con zinc en la prevención y el tratamiento de la diarrea aguda en los países en desarrollo. Un ensayo clínico controlado y doble ciego en Bangladesh demostró que la suplementación con 20 mg/d de zinc elemental condujo a una menor duración del proceso, menor volumen de heces y una mejor recuperación ponderal en lactantes desnutridos mayores de seis meses con diarrea aguda (Roy et al., 1997; Bhutta et al., 2000; Bahl et al., 2001).

Respecto a su utilidad en la prevención de la diarrea aguda, ensayos clínicos doble-cego, aleatorizados y controlados con placebo en niños de 6 meses a 3 años mostraron que en los países en desarrollo la suplementación diaria de zinc conduce a una reducción sustancial de la incidencia de la enfermedad de un 37 % y de la diarrea persistente en un 20 % de los pacientes (Sachdev et al., 1988; Sazawal et al., 1995).

A la luz de estos resultados, se asume que la suplementación de zinc debe administrarse a niños malnutridos, mayores de seis meses que viven en áreas con un elevado riesgo de padecer infecciones intestinales, tanto antes como durante la diarrea aguda (WHO, 2004; Lukacik et al., 2008; Black et al., 2001). Publicaciones en lactantes menores de 6 meses (Walker et al., 2007; Lazzerini et al., 2008) y en niños sin deficiencias nutricionales no muestran una disminución de la gravedad o de la duración de la diarrea (Boran et al., 2006).

Está siendo estudiado también, el papel que puedan desempeñar otros micronutrientes en la prevención y tratamiento adyuvante de la diarrea aguda, tales como la vitamina A, el ácido fólico, el selenio, el manganeso y el magnesio (Bahn et al., 1998), aunque por el momento no se han obtenido conclusiones definitivas sobre su posible utilidad.

2. PRINCIPALES VIRUS ENTÉRICOS

Si bien desde mediados del siglo XX se sospechaba de los virus como agentes causantes de infecciones intestinales, no fue hasta 1972 cuando Kapikian et al. identificaron un virus redondo de pequeño tamaño (virus Norwalk) en muestras fecales procedentes de afectados por un brote de GEA, gastroenteritis aguda (Kapikian et al., 1972). Un año más tarde, Bishop et al. observaron la presencia de rotavirus en la mucosa duodenal de niños con diarrea aguda (Bishop et al., 1973), a lo que siguió la identificación de astrovirus y adenovirus entéricos en muestras de heces de niños enfermos (Madeley et al., 1975; Morris et al., 1975).

Actualmente, se reconoce que los principales virus causantes de diarrea aguda en el ser humano son rotavirus, calicivirus (norovirus y sapovirus), astrovirus, adenovirus, torovirus, coronavirus, picobirnavirus, virus Aichi y bocavirus (*tabla 4*).

Tabla 4. PREVALENCIA DE LOS PRINCIPALES VIRUS ENTÉRICOS EN LA ESPECIE HUMANA	
Rotavirus	30-50%
Norovirus	17,3%
Astrovirus	15%
Adenovirus	1-9%

2.1. ROTAVIRUS

Rotavirus (*figura 7*) es el principal agente causal de diarrea aguda infecciosa en lactantes y niños pequeños (especialmente entre los 6 y 24 meses), siendo responsable de un 30 a un 50% de los episodios en los países desarrollados (Lynch et al., 2003; Dormitzer et al., 2005). Provoca 139 millones de casos y 2 millones de hospitalizaciones al año, es la causa más común de deshidratación en niños (Glass et al., 1997) y se asocia a un 6% de todas las defunciones que se producen en niños menores de 5 años y a cerca de medio millón en personas de todas las edades (Glass et al., 1997; Parashar et al., 2003b).

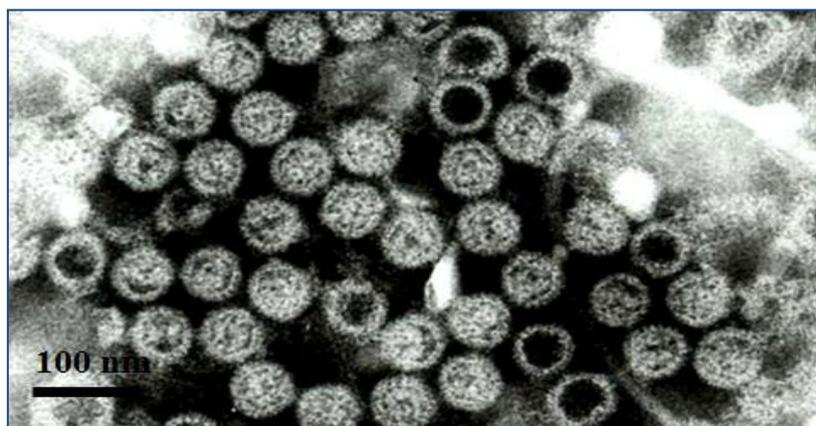


Figura 7. Microfotografía electrónica de viriones de rotavirus procedentes de un filtrado de muestras de heces de un niño con gastroenteritis (Kapikian et al., 1974).

La cápside externa aparece como un reborde fino que rodea a las protuberancias formadas por las estructuras de VP6. Las partículas vacías con centro oscuro están exentas de ARN genómico.

2.2. CALICIVIRUS

Los norovirus (NoV) y sapovirus (SaV) son los géneros de la familia *Caliciviridae* que pueden producir infecciones intestinales en el hombre.

Los norovirus se han relacionado tanto con episodios esporádicos de diarrea aguda (Pang et al., 2000), como con epidemias de vómitos y diarrea en campamentos (Jenkins et al., 1985), residencias infantiles (Tsugawa et al., 2006) y salas de hospitalización (Sder et al., 1986).

Son la principal causa de diarrea aguda epidémica no bacteriana en todas las edades, excepto en la infancia donde son los segundos en frecuencia tras rotavirus (Moreno-Espinosa et al., 2004; Treanor et al., 2005). Provocan de un 7 a un 12% de las hospitalizaciones por diarrea aguda en niños menores de 3 años (Marie-Cardin et al., 2002; Zintz et al., 2005; Murata et al., 2007) y hasta un 17,3% de los casos en niños menores de 5 años (Junquera et al., 2009), lo que equivale a 64.000 casos de diarrea aguda que precisan hospitalización, 900.000 visitas médicas en los países desarrollados y 200.000 fallecimientos en los países en desarrollo en menores de 5 años (Manish et al., 2008).

En España hay pocos datos epidemiológicos de significación clínica en niños, estudios realizados en Madrid mostraron que NoV fue el responsable de un 11,5% de las diarreas agudas de origen nosocomial en una Unidad de Lactantes, ocupando el segundo lugar tras rotavirus (Román et al., 2004), asimismo se obtuvo una incidencia de 7,7% de casos de diarrea aguda esporádica por NoV en niños menores de 5 años (Román et al., 2002). Otro estudio realizado en Levante obtiene una incidencia un poco superior, un 14,2% (Buesa et al., 2002).

El genogrupo GII es el hallado con mayor frecuencia tanto en éstos como en otros estudios epidemiológicos. Principalmente el genotipo GII.4, seguido por GII.3, GII.1, GII.7, GII.2 y GII.16 (Galera Castilho et al., 2006; Khamrin et al., 2007; Nguyen et al., 2007b).

La diarrea aguda por NoV (*figura 8*) se caracteriza clínicamente por la aparición brusca de náuseas (79%), vómitos (69%), principalmente en los mayores de un año (Kaplan et al., 1982a; Gotz et al., 2002) debido a un retraso marcado en el vaciamiento gástrico (Meeroff et al., 1980), diarrea no sanguinolenta (66%), fiebre (37%) y dolor abdominal (30%). Estudios de la enfermedad por NoV inducida experimentalmente muestran afectación duodenal, pues revelan una malabsorción transitoria de grasa, D-xylosa, y lactosa (Blacklow et al., 1972; Schreiber et al., 1973), una disminución de los niveles enzimáticos del borde en cepillo (trehalasa y fosfatasa alcalina), estando conservada la actividad de adenilato-ciclase en el yeyuno (Agus et al., 1973; Levy et al., 1976) y la secreción gástrica de ácido clorhídrico, pepsina y factor intrínseco (Meeroff et al., 1980). Se han descrito diferencias notables en cuanto a la gravedad clínica (Ruuska et al., 1990) y al tiempo de excreción de partículas virales en los niños menores de 2 años y los niños entre 2 y 5 años, siendo los primeros los más afectados (Murata et al., 2007).

En general, las manifestaciones clínicas suelen durar 48 a 72 horas, raramente tienen consecuencias graves y no evolucionan a cronicidad, salvo en determinados grupos de riesgo. En pacientes con enfermedades cardiovasculares, tras trasplante renal o que reciben terapia inmunosupresora por otros motivos, la infección por NoV puede producir hipocaliemia, un incremento de la proteína C reactiva y de la creatinín-fosfoquinasa (Mattner et al., 2006). En el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal se ha relacionado con brotes de la misma (Khan et al., 2009). Además se ha descrito la persistencia de la infección sintomática durante más de un año en pacientes pediátricos oncológicos (Simon et al., 2006) y adultos inmunodeprimidos (Nilsson et al., 2003; Kauffman et al., 2003; Mattner et al., 2006). Así como fallecimientos en las edades extremas de la vida, recién nacidos (Turcios-Ruiz et al., 2008) y ancianos (Chadwick et al., 2000).

La aplicación de las técnicas de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa) para el diagnóstico de NoV ha permitido la identificación de un número creciente de nuevos diagnósticos. Son cada vez más numerosas las publicaciones acerca de la infección por NoV en el periodo neonatal (Wiechers et al., 2008; Sommer et al., 2009): el genotipo GII.3 de NoV ha mostrado una asociación causal con una epidemia de enterocolitis necrosante (Stuart et al., 2010) y diversas cepas del genogrupo II se han relacionado con la aparición de apneas en recién nacidos prematuros (Kalmaludden et al., 2009). Además, se ha notificado la asociación con manifestaciones extraintestinales como episodios convulsivos (Chen et al., 2009), meningismo y coagulación intravascular diseminada en pacientes de mayor edad (MMWR, 2002).

En cambio, el impacto de los sapovirus (*figura 8*) como agentes causales de diarrea aguda en humanos no ha sido del todo establecido. Las publicaciones muestran que los sapovirus humanos sólo se han encontrado en casos esporádicos y en algún brote epidémico de causa mixta en la infancia, se ha descrito su asociación a niños con diarrea aguda que acuden a guarderías (Matson et al., 1990; Grohmann et al., 1991) y escuelas (Miyoshi et al., 2010).

Sin embargo en los últimos años, ha acontecido un cambio epidemiológico en la infección por sapovirus habiéndose identificado brotes epidémicos también en adultos en diferentes países: Holanda, Suecia, Eslovenia, Taiwan, Japón y Rusia (Svraka et al., 2010).

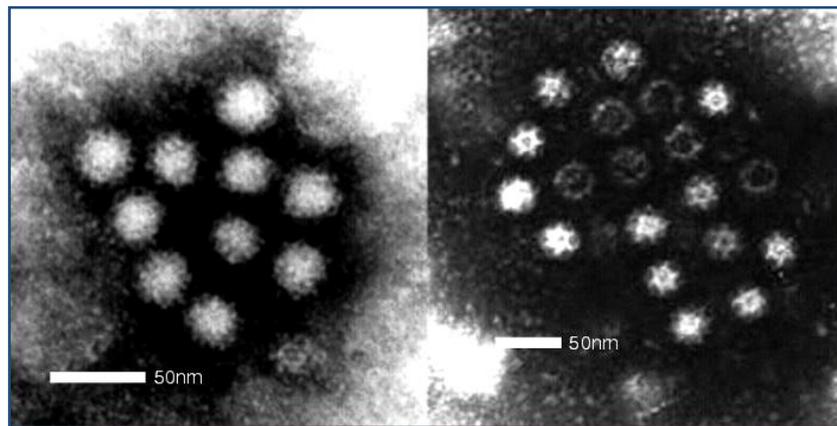


Figura 8. Microfotografía electrónica de viriones de norovirus (izquierda) y sapovirus (derecha).

2.3. ASTROVIRUS

Actualmente se conoce que los astrovirus (*figura 9*) suman hasta un 15% de los casos de diarrea aguda en la edad pediátrica (Glass et al., 1996; Pang et al., 1999; Dennehy et al., 2001; Wilhelmi et al., 2003).

Las diarreas por astrovirus suelen ser leves y autolimitadas, se presentan en forma de casos esporádicos o bien brotes epidémicos en comunidades, hospitales y guarderías (Dalton et al., 2002; Guix et al., 2002; Espul et al., 2004; Victoria et al., 2007), siendo responsables de entre un 4,5 a un 16% de la GEA nosocomial (Shastri et al., 1998). Si bien también se han relacionado con casos de enteritis hemorrágica, diarrea sanguinolenta e incluso enterocolitis necrosante en recién nacidos pretérmino y a término (Bagci et al., 2010).

Los astrovirus se clasifican en serotipos-genotipos, mostrando muy buena correlación entre ellos (Wilhelmi et al., 2003). Hasta la fecha se han descrito 8 serotipos-genotipos, de los cuales el serotipo 1 es el más frecuentemente detectado en la mayoría de estudios (Wilhelmi et al., 2003), de hecho en España ha sido identificado en un 64% de los casos, seguido por los serotipos 2 (21%) y 3 (7%), (Guix et al., 2002; Dalton et al., 2003).

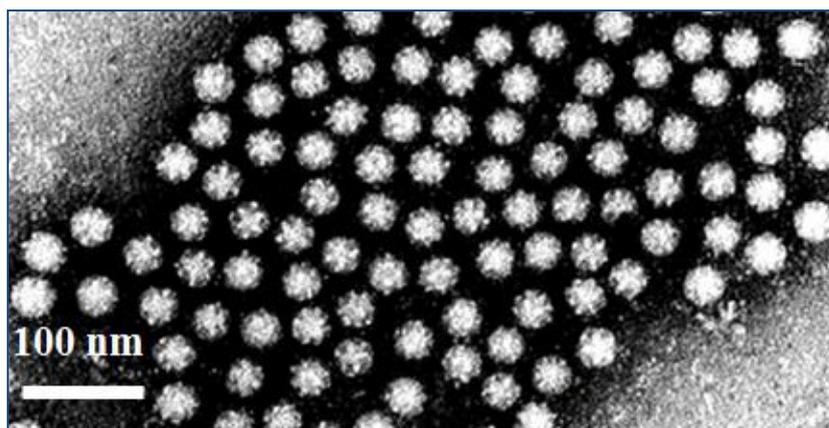


Figura 9. Microfotografía de partículas de astrovirus de aproximadamente 30 nm de diámetro en el contenido intestinal de cordero (Mendez et al., 2007).

2.4. ADENOVIRUS ENTÉRICOS

Los adenovirus entéricos (*figura 10*) presentan tasas muy variables de infección, oscilando entre un 1 y un 20% de los casos de diarrea en la infancia (Hermann et al., 1988; Kotloff et al., 1989; Baum et al., 2005; Farkas et al., 2007), las cifras publicadas en España son de un 1 a un 9%.

La mayoría de las infecciones intestinales por adenovirus son leves (Wold et al., 2007), no obstante se han notificado casos de diarrea prolongada por adenovirus 40 y 41 en pacientes inmunodeprimidos (Treviño et al., 2001). Estos serotipos pertenecen al grupo F y se han asociado a infecciones intestinales con mayor frecuencia, si bien los serotipos 31, 12 y 18 del grupo A, así como, 1, 2, 5 y 6 del grupo C también se han visto implicados en estos procesos, aunque de una forma más excepcional (Brown et al., 1996).

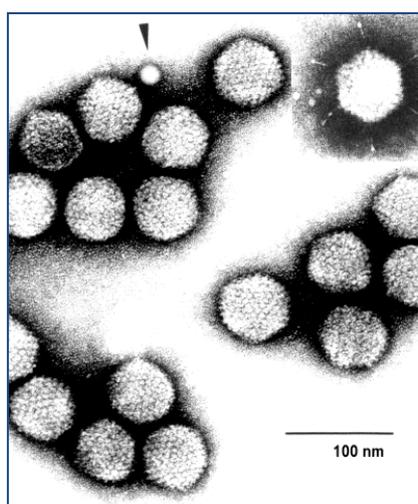


Figura 10. Microfotografía electrónica de adenovirus teñido negativamente (Philipson et al., 1975).

2.5. OTROS VIRUS ENTÉRICOS

Los géneros *Torovirus* y *Coronavirus*, pertenecientes a la familia *Coronaviridae* se han asociado con casos de GEA en humanos.

Los torovirus, descubiertos por primera vez en las heces de niños con gastroenteritis en 1984, se han asociado tanto con casos de diarrea aguda como crónica y podrían ser agentes etiológicos de la diarrea aguda de origen nosocomial (Beards et al., 1986; Wilhelmi et al., 2003).

Los coronavirus se identificaron como agentes de diarrea en 1975, lo que ha sido corroborado en estudios sucesivos hasta el momento actual (Madeley et al., 1975; Widdowson et al., 2005a; Farkas et al., 2007).

Los picobirnavirus se han encontrado en las heces de una amplia variedad de especies animales, así como en las de niños y adultos con diarrea, habiéndose descrito su aparición en las muestras fecales de pacientes inmunodeprimidos (Wilhelmi et al., 2003; Farkas et al., 2007).

Los virus Aichi, pertenecientes al género *Kobuvirus* de la familia *Picornaviridae*, se identificaron por primera vez en las heces procedentes de un brote alimentario en Japón en 1989. En estudios posteriores se han encontrado anticuerpos séricos en población sana en todas las edades (Yamashita et al., 2000; Ribes et al., 2010).

Los bocavirus humanos, conocidos previamente como agentes de infección respiratoria, se han asociado recientemente a casos de diarrea aguda en niños. Se plantea que podrían ser responsables de hasta un 9,1% de los casos de diarrea aguda en niños españoles (Vicente et al., 2007).

3. CALICIVIRUS. EL GÉNERO NOROVIRUS

3.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La identificación de los virus gastrointestinales como agentes etiológicos de la diarrea aguda fue un largo proceso que requirió varias décadas. Los estudios en voluntarios sanos desarrollados en los años 40 y 50 en Estados Unidos y Japón cumplieron un papel fundamental al demostrar que la administración de heces filtradas y libres de bacterias de individuos enfermos a voluntarios sanos podía desencadenar infección intestinal (Reinman et al., 1945; Gordon et al., 1947; Kojima et al., 1948; Fukumi et al., 1957; Jordan et al., 1953), numerosos intentos para cultivar virus a partir de esos filtrados de heces fueron infructuosos y una gran proporción de las GEA quedaba sin filiar en esa época (Reinman et al., 1945).

En 1972 Kapikian et al., tras investigar un brote de GEA sucedido en un centro escolar de Norwalk (Ohio) en 1968 (Adler et al., 1969), describieron por primera vez el prototipo de calicivirus, el virus Norwalk. Estudiaron las deposiciones de voluntarios a los que se había administrado heces libres de bacterias procedentes de las muestras recogidas a pacientes afectados en dicho brote (Dolin et al., 1971) e identificaron unas partículas pequeñas (de 27 nm en su diámetro menor y 32 nm en el mayor), redondeadas y con unas indentaciones en forma de copa en su superficie. Estas partículas se agregaron mediante suero de un convaleciente usando la inmunomicroscopía electrónica que permite la observación directa de complejos antígeno-anticuerpo recubriendo las partículas víricas y facilita su detección (Kapikian et al., 1972). Otras descripciones posteriores fueron realizadas por Madeley y Cosgrove en 1976 en heces de niños con gastroenteritis (Madeley et al., 1976), Flewett y Davies en una epidemia de vómitos en una escuela londinense el mismo año (Flewett et al., 1976) y Cubitt et al. en el intestino delgado de un niño fallecido por GEA en 1979 (Cubitt et al., 1979; Walker-Smith et al., 1999).

Mediante la inmunomicroscopía electrónica se identificaron otras partículas víricas de morfología similar pero distintas antigénicamente que se denominaron Hawaii (Thornhill et al., 1977), Montgomery County, Tawton (Caul et al., 1979) y Snow Mountain (Dolin et al., 1982), de acuerdo con las regiones geográficas donde se produjeron los brotes epidémicos. Además, esta técnica permitió la titulación antigénica y la demostración de la relación existente entre las partículas identificadas en heces y las manifestaciones clínicas (Kapikian et al., 1972). En 1977, Chiba et al. describieron calicivirus en un brote de GEA en preescolares y escolares residentes en una casa de acogida en Sapporo (Japón) e identificaron diferencias antigénicas de género con los virus Norwalk por medio de la inmunomicroscopía electrónica (Nakata et al., 1996), la producción de suero hiperinmune en cobayas frente a partículas víricas purificadas de virus Sapporo/82/Japón fue fundamental en su caracterización antigénica. Los virus Sapporo se convertirían de esta forma en los agentes prototipo del actual género Sapovirus (SaV).

La laboriosidad de la técnica de la inmunomicroscopía electrónica promovió el desarrollo del radioinmunoensayo (RIA), inicialmente para el virus Norwalk (Greenberg et al., 1981) y posteriormente para las partículas de Snow Mountain (Dolin et al., 1986). Asimismo en 1986, Treanor et al. desarrollaron un anticuerpo monoclonal para el agente Snow Mountain (Treanor et al., 1986) y a continuación para el virus Norwalk y otros, lo que simplificó los métodos de detección.

3.2. TAXONOMÍA

El denominado virus Norwalk, se considera actualmente el prototipo del género *Norovirus*. Pertenece a la familia *Caliciviridae* junto con los géneros *Sapovirus*, *Lagovirus* y *Vesivirus* (Tabla 5), recientemente se ha propuesto la inclusión del género *Nebovirus* (Patel et al., 2002).

Los principales agentes patógenos humanos de esta familia son NoV y SaV, como patógenos exclusivamente animales se incluyen lagovirus (LaV) que causan enfermedad hemorrágica letal en conejos (RHDV, “Rabbit haemorrhagic disease virus”) y vesivirus (VeV), como los calicivirus felinos (FCV), que causan infección respiratoria en gatos.

<i>Tabla 5. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE CALICIVIRUS</i>		
GÉNERO	ESPECIE	CEPA REPRESENTATIVA
<i>Norovirus</i> (NoV)	Norwalk virus (NV)	Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US
<i>Sapovirus</i> (SaV)	Sapporo virus (SV)	Hu/SaV/GI.1/Sapporo/1982/JP
<i>Lagovirus</i> (LaV)	Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV)	Ra/LaV/RHDV/GH/1988/DE
	Virus del síndrome de la liebre parda europea (EBHSV)	Ha/La/EBHSV/GD/1989/FR
<i>Vesivirus</i> (VeV)	Virus del exantema vesicular porcino (VESV)	Sw/VeV/VESV/A48/1948/US
	Calicivirus felino (FCV)	Fe/VeV/FCV/F9/1958/US

En la *tabla 5* los criptogramas están organizados de la siguiente forma: especie huésped de la cual se ha obtenido el virus / género / especie (o genogrupo) / nombre de la cepa / año de detección / país de origen. Las siglas correspondientes a las abreviaturas en inglés de las especies huésped y los países son las siguientes: Fe (felino), Ha (liebre), Hu (humano), Sw (cerdo), Ra (conejo), DE (Alemania), FR (Francia), JP (Japón) y US (Estados Unidos).

3.3. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN

3.3.1. Estructura tridimensional del virión nativo

Los viriones de calicivirus exhiben una simetría icosaédrica con $T=3$. La cápside contiene 90 dímeros de la proteína de cápside y forma una cubierta compuesta por 90 capsómeros dispuestos a modo de protuberancias arciformes (Prasad et al., 1994a; 1994b; Prasad et al., 1996; Prasad et al., 1999; Chen et al., 2004), formando 32 cavidades que dan apariencia de cálices a la superficie de la partícula viral.

La crioinmunomicroscopía electrónica, la cristalografía con rayos X y los estudios de procesamiento de imagen de calicivirus han mostrado diferencias sutiles en la estructura de las cápsides de los diferentes géneros de calicivirus (Chen et al., 2004). No obstante, todos ellos responden a la apariencia de “virus pequeños y redondos” enunciada a partir de las imágenes clásicas por microscopía óptica de campo oscuro (Prasad et al., 1994a; 1994b).

3.3.1.1. Estructura del genoma

Los virus de la familia *Caliciviridae* tienen un genoma constituido por una sola cadena de ARN (ssRNA, “single stranded RNA”) de sentido positivo, de un tamaño aproximado de 7,3 a 8,5 Kb. Poseen dos o más pautas abiertas de lectura (ORF, “open reading frame”) según el género, que contienen los genes que codifican las proteínas estructurales y no estructurales, como muestra la *figura 11* (Meyers et al., 1991; Herbert et al., 1996; Morales et al., 2004; Neill et al., 2002).

En cuanto a los NoV, el ORF1 codifica la poliproteína precursora de las proteínas no estructurales, mientras que los ORF2 y ORF3 codifican la proteína mayor de la cápside (VP1) y la proteína menor de la cápside (VP2), respectivamente. Los VeV también codifican VP1 en una ORF separada (ORF2), mientras que los SaV y LaV lo hacen en un locus contiguo al de las poliproteínas grandes no estructurales del ORF1 (Cauchi et al., 1992; Seah et al., 1999; Cauchi et al., 1999).

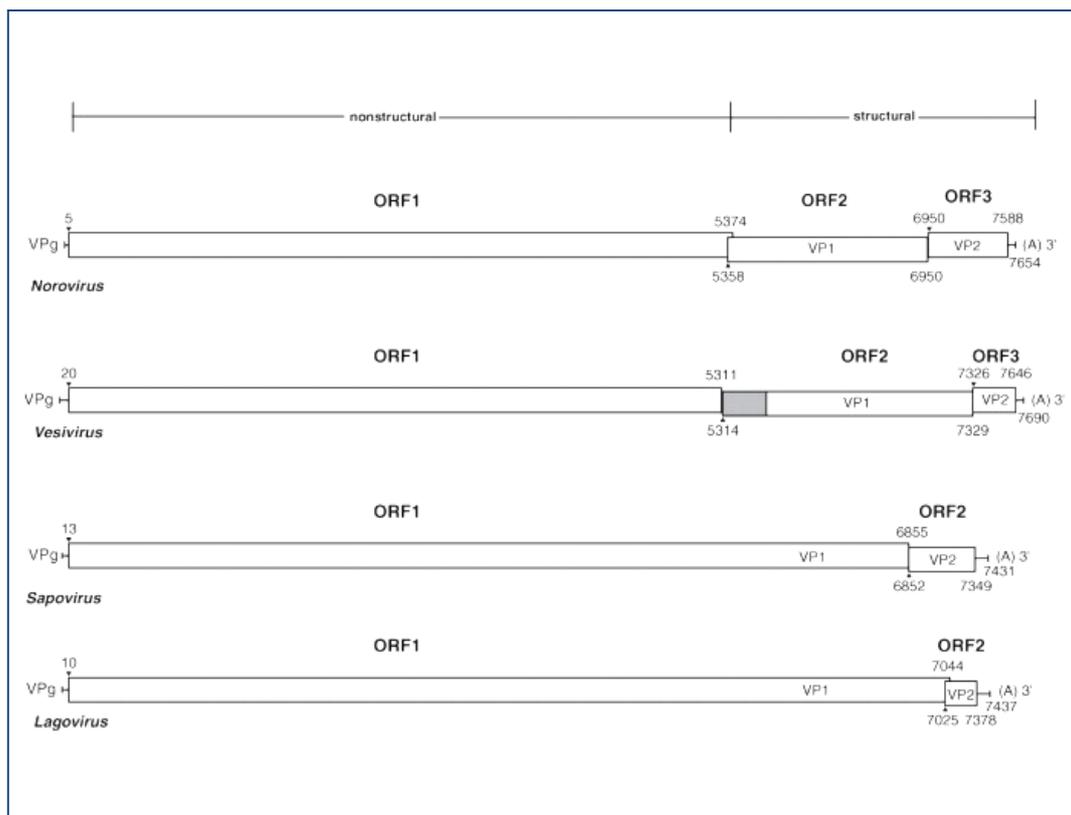


Figura 11. Organización genómica de Calicivirus (Green et al., 2007).

3.3.1.2. Proteínas virales estructurales

En los viriones maduros de *calicivirus* se identifican tres proteínas, denominadas VP (“viral protein”, proteína viral): VP1, VP2 y VPg (“viral protein genome-linked”, proteína unida al genoma viral), figura 12 (Sosnovtsev et al., 2000).

La principal proteína estructural es VP1, de aproximadamente 60.000 daltons (Da) y presente en 180 copias (90 dímeros) por virión. El predominio de VP1 en la formación de la estructura de la cápside vírica explica su papel como sitio de unión a los receptores de las células del huésped, lo que se atribuye a su fracción P2 (Green, 2007).

La VP2 es variable en tamaño entre los calicivirus (12.000 a 29.000 Da) y también difiere en su secuencia genética entre los diferentes géneros (Cauchi et al., 1992; Seah et al., 1999). Es considerada una proteína estructural menor porque sólo está presente en una o dos copias por virión y su función no se conoce con exactitud (Wirblich et al., 1995; Glass et al., 2000; Sosnovtsev et al., 2000; Glass et al., 2003), aunque se cree que la presencia de VP2 aumenta la eficiencia de la expresión de VP1 y mejora la estabilidad (Sosnovtsev et al., 2005) y maduración

de dicha partícula (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). De hecho, se ha descrito la interacción entre las proteínas VP1 y VP2 tanto para NoV (Glass et al., 2003) como para calicivirus felinos (Kaiser et al., 2006), lo que apoya su participación en estas funciones. Además, se han identificado diferencias entre las VP2 de las VLPs recombinantes y los viriones nativos en cuanto a peso molecular (PM), 23 KDa y 35 KDa, respectivamente. Lo que sugiere que las proteínas de los viriones nativos podrían desempeñar otras funciones que desconocemos (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003).

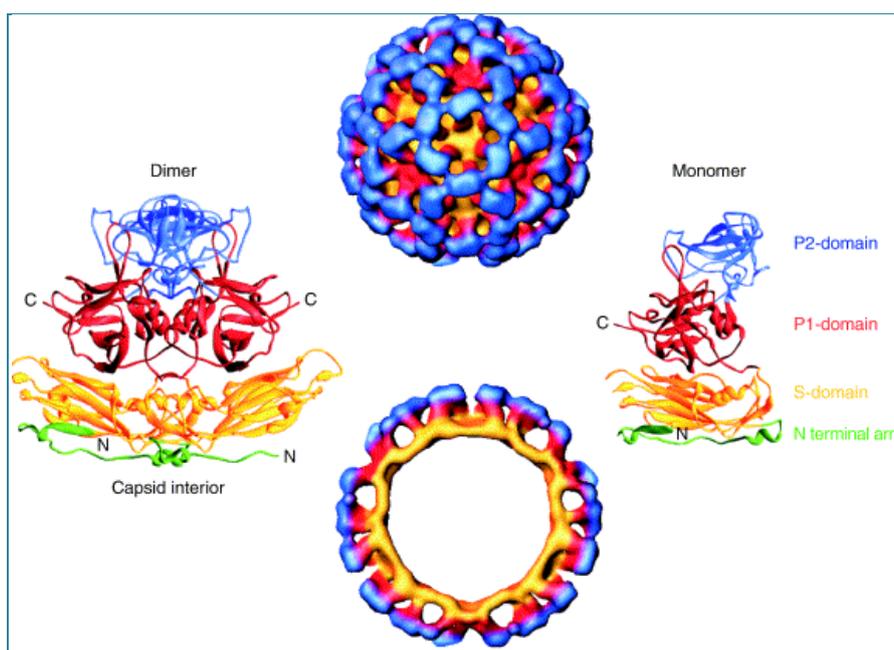


Figura 12. Estructura de la cápside y proteínas estructurales de norovirus (Green et al., 2007).

La VPg se halla unida por enlace covalente al ARN genómico y subgenómico de las células infectadas (Dunham et al., 1998), su presencia es minoritaria con una o dos copias por virión (Schaffer et al., 1980; Sosnovtsev et al., 2002) y aunque se encuentra integrada en la partícula viral es probable que su función sea principalmente la de una proteína no estructural durante la replicación.

3.3.1.3. Proteínas virales no estructurales

Las proteínas no estructurales de los calicivirus (tabla 6) provienen de la escisión de una gran poliproteína codificada en el ORF1 cuyo PM es de 200 KDa (Liu et al., 1999b; Sosnovtseva et al., 1999). Los procesos de escisión son mediados por una proteinasa específica, la 3C proteinasa (Boniotto et al., 1994), que actúa en puntos de restricción concretos descritos en cepas del género *Norovirus* (Liu et al., 1996; Liu et al., 1999b), *Vesivirus* (Sosnovtsev et al., 2002), *Lagovirus* (Wirblich et al., 1996; König et al., 1998) y *Sapovirus* (Oka et al., 2005).

CALICIVIRUS. EL GÉNERO NOROVIRUS. Estructura del virión.

Se observan algunas variaciones entre las diferentes estrategias de proteólisis de los calicivirus, pero de forma global coinciden en el orden genómico de las proteínas no estructurales: (a) en el caso de los NoV, estudios en el virus Southampton han permitido definir cinco puntos de corte en la poliproteína ORF1 por lo que se ha descrito que liberan seis productos maduros (Liu et al., 1996; Liu et al., 1999b), (b) los lagovirus, representados por el RHDV, tienen el máximo número de puntos de escisión: seis, lo que resulta en siete fragmentos finales denominados NS1 a NS7 (NS, “non structural”, no estructural).

Tabla 6. PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE CALICIVIRUS (Sosnovtsev et al., 2006)

PROTEÍNA	FUNCIÓN
NS1	Desconocida
NS2	Desconocida
NS3	NTPasa
NS4	Desconocida
NS5	VPg
NS6	Proteinasa
NS7	ARN-polimerasa ARN dependiente

La disponibilidad de los mapas de escisión de las proteínas no estructurales de calicivirus ha permitido dilucidar la estructura tridimensional y la función de estas proteínas individualmente (Hardy et al., 2005). Las funciones de las tres proteínas no estructurales principales de los calicivirus se infirieron a partir de secuencias de picornavirus, la 2C helicasa, la 3C proteinasa y la 3D ARN-polimerasa dependiente de ARN (Neil et al., 1990). Los estudios bioquímicos confirmaron actividades análogas en las proteínas de calicivirus que corresponden a las proteínas NS3 NTPasa (función nucleótido-trifosfatasa), NS6 Pro (con función proteinasa. Prasad et al., 1999), NS5 (con función VPg) y la NS7 Pol (con función ARN-polimerasa dependiente de ARN). Tanto la similitud en cuanto al orden genómico de las proteínas no estructurales, como la fuerte homología en ciertos fragmentos sugieren un ancestro común para calicivirus y picornavirus.

3.3.2. Estructura de las partículas pseudovíricas

El ensamblaje de la proteína de la cápside VP1 en partículas pseudovíricas (VLPs) es un proceso eficiente que no requiere ni ARN (Jiang et al., 1992b) ni la proteína menor de la cápside VP2 (Laurent et al., 1994; Leite et al., 1996). Se ha descrito que la proteína de la cubierta S de NoV contiene todo lo necesario para iniciar el ensamblaje de la cápside de la partícula pseudovírica, mientras que el dominio protuberante P contribuye a incrementar la estabilidad de la cápside añadiendo contactos intermoleculares entre las subunidades diméricas y limitando su tamaño (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002).

La estructura atómica de las VLPs (“virus like particles”, partículas pseudovíricas) recombinantes de NoV se ha determinado mediante cristalografía con rayos X, definiendo dos dominios principales en VP1, la cubierta S y la protuberancia P (Prasad et al., 1999).

El dominio S forma la parte interna de la cápside que envuelve al genoma de ARN y mantiene los contactos icosaédricos de la estructura en T=3 y el dominio P forma las protuberancias arciformes que surgen de la cubierta y contienen los dímeros de contacto (Prasad et al., 1999).

Al comparar las secuencias de aminoácidos correspondientes a estos dominios en diferentes genotipos de NoV (*figura 13*) se observa que el dominio S (región N-terminal de VP1: aminoácidos 1-225) está relativamente conservado, mientras que el dominio P (fracción C-terminal de VP1: aminoácidos 226-530) presenta una naturaleza aminoacídica más variable. Además, el dominio P se encuentra dividido en el subdominio P1 (aminoácidos 226-278 y 406-530) y el subdominio P2 (aminoácidos 279-405). Este último es la región de VP1 con mayor variabilidad secuencial, por lo que se le atribuye la especificidad antigénica y la unión a receptores (Hardy et al., 1996; White et al., 1996; Prasad et al., 1999; Nilsson et al., 2003; Tan et al., 2003; Lochridge et al., 2005).

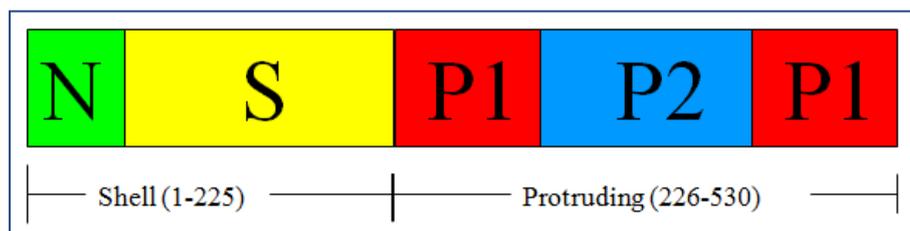


Figura 13. Correspondencia entre dominios del genoma y secuencia aminoacídica (Green et al., 2007).

3.4. BIOLOGÍA DEL VIRUS

3.4.1. Cultivos celulares

La clasificación inicial para los denominados virus pequeños, redondos y estructurados (SRSV, “small round structured virus”) fue descrita por Caul y Appleton en 1982 (Caul et al., 1982), basándose en su tamaño y morfología. Sin embargo, la imposibilidad de aislar el virus en cultivo celular no permitió progresar en su conocimiento hasta el desarrollo de técnicas moleculares. No obstante, podemos afirmar que actualmente no existe ningún cultivo celular para el aislamiento de NoV, a pesar de los grandes esfuerzos realizados durante décadas para mimetizar la fase exacta de diferenciación de las células epiteliales intestinales y de reproducir las condiciones ambientales originarias en un sistema de cultivo celular para NoV (Duizer et al., 2004b) y SaV humanos, asimismo tampoco hay un modelo animal disponible, lo que dificulta su estudio.

El reciente descubrimiento de que un miembro del género NoV, el NoV murino (MNV), es capaz de replicarse en cultivos celulares y de infectar ratones (Karst et al., 2003) ha supuesto un avance indudable en el conocimiento de este género de virus. El NoV murino crece en células dendríticas y macrófagos de origen murino y forma placas en células RAW264.7, una línea celular continua de estirpe macrofágica, *figura 14* (Wobus et al., 2004). Sin embargo, su replicación no constituye un modelo experimental de la patogenia de los NoV humanos (Chaudry et al., 2007).

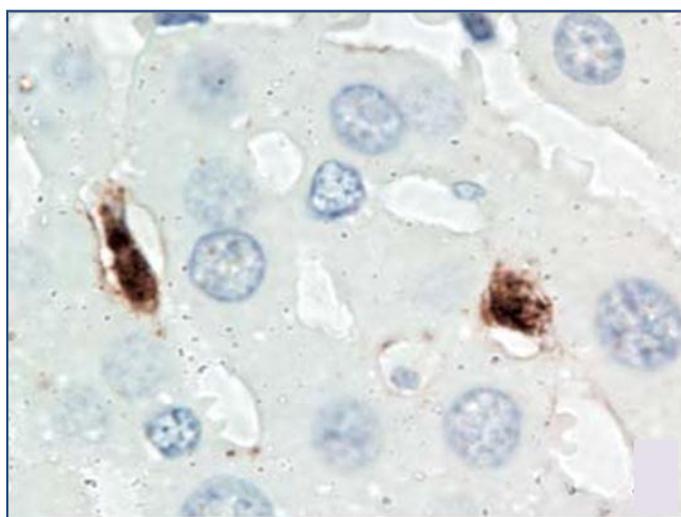


Figura 14. Tinción específica de MNV-1 en células de estirpe macrofágica (Wobus et al., 2004).

La aplicación de técnicas de inmunohistoquímica a secciones de hígado de ratones STAT1 *-/-* dos días tras la infección oral mostró una tinción específica para MNV-1 en las células de Kupfer de los hígados infectados al exponerse a suero de MNV-1 inmune y no preinmune.

Se planteó que la creación de un sistema de células epiteliales intestinales que reprodujera las condiciones fisiológicas del huésped *in vivo*, permitiría el desarrollo de un modelo patogénico para los NoV humanos. Esta hipótesis llevó a diseñar un sistema tridimensional para propagar NoV, mediante el crecimiento de células en tres dimensiones sobre una estructura de colágeno adyacente a un sistema rotatorio. Se basaba en el principio de que órganos y sistemas funcionan en un ambiente tridimensional y que este contexto espacial es necesario para el desarrollo de cultivos celulares que mimeticen los tejidos y órganos de los que proceden (Straub et al., 2007). Los resultados descritos por este estudio fueron aparentemente muy satisfactorios, sin embargo no han podido ser reproducidos en otros laboratorios posteriormente.

Respecto a otros géneros, el calicivirus entérico porcino (PEC), un SaV, puede propagarse en líneas celulares pero para una replicación óptima es necesario un medio de crecimiento que incluya el contenido intestinal de un cerdo gnotobiótico (Flynn et al., 1988b). Los ácidos biliares son un factor esencial entre los componentes de dicho contenido intestinal, pues adicionados en exclusiva al medio de cultivo celular son capaces de mantener su replicación (Chang et al., 2004). Es también el caso del calicivirus canino que precisa la adición de tripsina para su crecimiento (Schaffer et al., 1985). En cuanto a los vesivirus crecen en cultivo celular de fibroblastos de riñón, pero los lagovirus no crecen en líneas celulares aunque se ha conseguido infectar *in vitro* hepatocitos de conejo (Konig et al., 1998).

3.4.2. Modelos animales

Se han realizado numerosos intentos para desarrollar un modelo animal de enfermedad que permita el estudio de las GEA humanas por NoV. Repetidos ensayos no fueron capaces de inducir enfermedad tras su introducción en el tracto alimentario de ratones, cobayas, conejos, gatos, terneros y diferentes especies de primates salvajes (Blacklow et al., 1972; Dolin et al., 1972; Wyatt et al., 1977; Wyatt et al., 1978), de hecho en chimpancés a los que se inocularon NoV se identificó una respuesta serológica por medio de radioinmunoensayo y antígeno en heces, pero no desarrollaron enfermedad clínica en ningún momento (Wyatt et al., 1978; Jiang et al., 2004a; 2004b; Rockx et al., 2005a). Se planteaba que esto podía deberse a que las cepas virulentas de NoV fueran endémicas en primates salvajes.

Sin embargo, estudios más recientes sí han demostrado el desarrollo de enfermedad sintomática en animales expuestos oralmente a NoV humanos. Macacos de cola de cerdo recién nacidos expuestos oralmente con filtrado de heces humanas con NoV GII.3 presentaron diarrea (Subekti et al., 2002), al igual que lechones gnotobióticos expuestos a NoV humanos GII.4 en los que además se encontraron evidencias de replicación del virus en los enterocitos (Cheetham et al., 2006).

Otra aproximación en el desarrollo de un modelo patogénico animal para NoV se ha centrado en el estudio de la infección animal por calicivirus homólogos. Se han detectado NoV en las heces de ratones (cepa MNV-1. Karst et al., 2003), cerdos (cepa SW418. Sugieda et al., 1998) y ganado bovino (virus Jena. Liu et al., 1999a), lo que sugiere que existe replicación en su tracto intestinal. A raíz de ello se ha podido emplear un modelo de NoV bovino para la evaluación de las vacunas candidatas con VLPs de NoV (Han et al., 2006).

3.4.3. Avances moleculares

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha constituido el punto de partida para aumentar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos de replicación y el impacto real de la enfermedad por NoV.

3.4.3.1. Clonación del genoma

Uno de los avances más importantes lo constituyó en 1990 la clonación del genoma del virus Norwalk por Jiang et al. a partir de viriones parcialmente purificados de material fecal humano (Jiang et al., 1990). Esto permitió aplicar las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa (RT-PCR) y de secuenciación al estudio de estos virus, además de expresar in vitro proteínas víricas en sistemas de procariotas y eucariotas.

Basándose en estas técnicas, se segregaron los NoV en dos grupos filogenéticos que se denominaron genogrupos I (GI) y II (GII), Norwalk formaba parte del GI y Hawaii y Snow Mountain pertenecían al GII (Lew et al., 1994b; 1994c; Wang et al., 1994). Actualmente, se clasifican los NoV en cinco genogrupos con 29 genotipos o clusters: 8 en GI, 17 en GII, 2 en GIII y 1 en GIV y GV, basándose en el análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos para la proteína de cápside de 164 cepas de NoV (Zheng et al., 2006; Buesa et al., 2008). Las cepas que infectan a los seres humanos pertenecen a los genogrupos I, II y IV, mientras que a los genogrupos III y V pertenecen las cepas que infectan a los animales.

Las cepas de cada genotipo, definidos por tener al menos un 80% de identidad de los aminoácidos sobre la secuencia total de la cápside, se pueden subdividir a su vez en variantes según las secuencias y los análisis filogenéticos. Análisis efectuados en Europa con más de mil NoV asociados a brotes han mostrado una marcada variación genética y es el genogrupo II y en particular el genotipo GII.4 el predominante (Noel et al., 1999).

3.4.3.2. Producción de partículas pseudovíricas

Otro de los grandes avances en la investigación de los NoV lo constituye la replicación de la proteína viral 1 (VP1) de la cápside en sistemas de expresión, como la producción de partículas pseudovíricas en células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) con baculovirus recombinantes expresando la proteína VP1 (ORF2) de NoV, *figura 15* (Jiang et al., 1992b) o

con un vector del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE. Harrington et al., 2002) mediante la expresión del dominio P de la cápside en *Escherichia coli* (Tan et al., 2005c; Tan et al., 2004).

Las partículas pseudovíricas (VLPs) muestran una morfología (Prasad et al., 1994a; 1994b) y antigenicidad (Green et al., 1993) similares a las del virión infectivo. Además, ha sido posible expresar VLPs de diferentes genogrupos lo que ha permitido demostrar sus diferencias antigénicas (Jiang et al., 1995a; 1995b), dada la imposibilidad de desarrollar ensayos de neutralización (Hansman et al., 2005).

Las VLPs recombinantes se han utilizado en muchas áreas de la investigación de NoV: el desarrollo de métodos diagnósticos (Jiang et al., 2000), los estudios estructurales de la cápside (Venkataram et al., 2000), el análisis de la unión e interacciones con el receptor (White et al., 1996; Marionneau et al., 2002; Hutson et al., 2003), la investigación de las relaciones antigénicas (Hansman et al., 2006) y el desarrollo de vacunas (Estes et al., 2000).

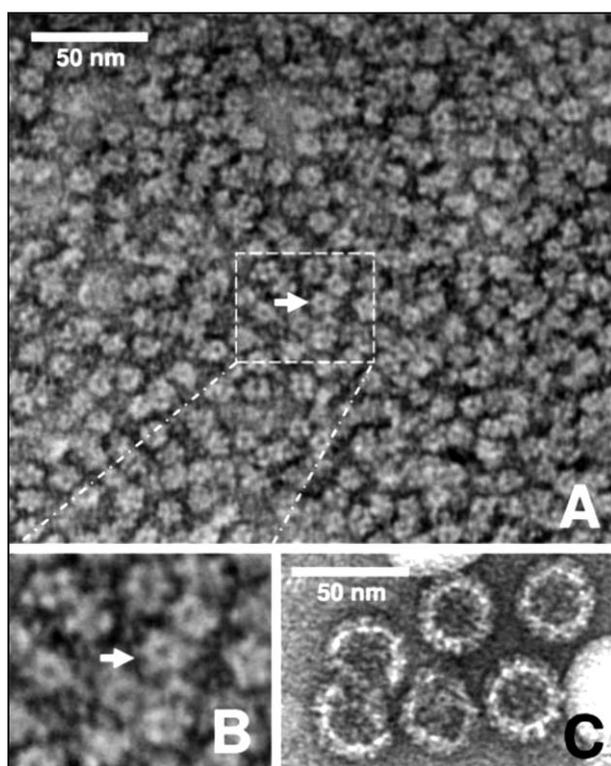


Figura 15. Microfotografías electrónicas de tinción negativa de la partícula P.

(A) Partícula P del mutante de VA387 H/P-CDCRGDCFC purificada por FPLC (“Fast protein liquid chromatography”). Las flechas indican la típica estructura del anillo pentagonal de la partícula P. La parte central de la imagen A se ha ampliado en la imagen B. (C) VLPs de VA387 purificadas por gradiente de sacarosa.

3.4.3.3. Aplicación de la genética reversa

La aplicación de la genética reversa al estudio de los NoV supone un gran avance, pues la habilidad de generar NoV definidos genéticamente en cultivos tisulares podría proporcionar una oportunidad para comprender la relación entre los mecanismos básicos de replicación del NoV en cultivo tisular y su patogénesis en el huésped natural, así como entre sus características estructurales y propiedades funcionales (Sosnovtsev et al., 1995; Sosnovtsev et al., 1998; Neil et al., 2000; Sosnovtsev et al., 2002; Thumfarte et al., 2002; Chang et al., 2005).

El sistema de genética reversa se desarrolló inicialmente para el calicivirus felino (Sosnovtsev et al., 1995), el calicivirus entérico porcino (Chang et al., 2002) y el recientemente identificado NoV murino (Karst et al., 2003). Sin embargo, hasta la fecha, ningún sistema de genética reversa ha sido descrito para NoV humanos. Las publicaciones en relación con NoV murino describen un sistema de expresión por medio del virus vacuna (Anasaka et al., 2005; Katayama et al., 2006), este sistema (basado en la ARN-polimerasa T7) no permite la recuperación del NoV murino debido a un efecto inhibitorio de la infección del virus vacuna en su replicación. En cambio, el sistema de ARN-polimerasa del virus de la viruela aviar, que ha resultado efectivo para la recuperación del virus de la gripe aviar (Casais et al., 2001), el virus de la enfermedad de Newcastle (Peeters et al., 1999), el virus de la peste bovina (Das et al., 2000) y el virus de la bursitis infecciosa aviar (Boot et al., 1999) sin mostrar un efecto deletéreo en su replicación, ha demostrado también ser útil en la recuperación de NoV murinos definidos genéticamente en cultivo tisular (Chadry et al., 2007). Gracias a ello han podido identificarse estructuras genómicas importantes para su replicación (Simmonds et al., 2008), determinantes de virulencia de su cápside (Bailey et al., 2008) y la región 3' de su genoma viral (Bailey et al., 2010).

Recientemente se ha publicado una nueva estrategia para obtener NoV murinos modificados genéticamente mediante técnicas de genética reversa que se basan en la transfección con transcritos de ARN con “cap” directamente en las células (Yunus et al., 2010).

3.4.4. Desarrollo de vacunas

Una de las estrategias más prometedoras en cuanto al desarrollo de vacunas protectoras frente a NoV, consiste en el desarrollo de VLPs recombinantes de NoV producidas en células Sf9 y plantas. Estas vacunas han mostrado ser inmunógenas y seguras en ratones y humanos tras su administración oral e intranasal, mostrando una respuesta de producción de anticuerpos tanto a nivel local como sistémico, sin riesgo de desarrollar la enfermedad (Ball et al., 1999; Tacket et al., 2003; Tacket et al., 2000; Herbst-Kralovetz et al., 2010).

Otro aspecto a considerar en cuanto al diseño de estas vacunas es el de los genotipos de NoV que son diana de protección por la vacuna, parece que la vacunación multivalente podría

proporcionar una mayor protección frente a un espectro más amplio de NoV que la vacunación monovalente (LoBue et al., 2006). Además, la respuesta vacunal implica la proliferación de las células T CD4⁺, T CD8⁺ y B de forma específica según los tejidos (Chachu et al., 2008).

Por tanto, todavía existen muchos retos en el desarrollo de una vacuna efectiva y segura, como son nuestro insuficiente conocimiento de la relación entre inmunidad y protección, la breve duración de la inmunidad, la ausencia de protección cruzada y la existencia de múltiples tipos genéticos y antigénicos de NoV.

3.5. DIAGNÓSTICO

3.5.1. Diagnóstico presuntivo

Ante la ausencia de procedimientos diagnósticos certeros, en 1982 Kaplan y sus colaboradores establecieron unos criterios epidemiológicos que han demostrado su utilidad para sospechar de los NoV como causa de un brote de gastroenteritis aguda, *tabla 7* (Kaplan et al., 1982a). Estos criterios han sido validados al resultar razonablemente sensibles y altamente específicos para diferenciar clínicamente los brotes por NoV de los debidos a otras causas (Turcios et al., 2006).

Tabla 7. CRITERIOS DE KAPLAN (Kaplan et al., 1982a)

- Más de la mitad de los afectados evolucionan con vómitos
- El periodo de incubación es de 24-48 horas
- La duración de la enfermedad es de 12 a 60 horas
- No se identifican patógenos bacterianos en los coprocultivos

3.5.2. Diagnóstico de laboratorio

3.5.2.1. Microscopía electrónica directa e inmunomicroscopía electrónica

Si bien la microscopía electrónica directa fue inicialmente el único método disponible para el diagnóstico de los calicivirus, presenta una serie de limitaciones que la han relegado hoy en día a un uso excepcional para el diagnóstico: (a) la detección de virus en muestras fecales requiere concentraciones del orden de 10⁶ partículas por ml (Doane et al., 1994). El escaso número de viriones presentes en las heces de niños mayores de 2 años y adultos explica la baja sensibilidad en ellos, por lo que es recomendable el empleo de la inmunomicroscopía electrónica o la inmunomicroscopía electrónica en fase sólida en este grupo de edad (Kapikian

et al., 1980), si bien dado que tanto rotavirus como NoV son eliminados en grandes cantidades en las heces de los niños de entre 6 y 24 meses podría utilizarse en el diagnóstico etiológico de la GEA en este rango de edad (Brandt et al., 1981) (b) asimismo, precisa de microscopistas experimentados y de un equipo caro, por lo que no es factible para estudios epidemiológicos o clínicos extensos. No obstante, podría ocupar un lugar como herramienta diagnóstica de casos esporádicos; (c) el momento de la recogida de las heces es crítico en el éxito de la detección vírica, es posible detectar los virus en gran parte de las muestras recogidas durante las primeras 72 horas tras el establecimiento de la enfermedad, pero solamente en un número mínimo de muestras fecales recogidas superado dicho periodo (Thornhill et al., 1975).

La inmunomicroscopía electrónica presenta limitaciones similares, a pesar de que fue inicialmente diseñada para la detección de NoV. Es capaz de identificar NoV en tan sólo la mitad de las muestras fecales provenientes de estudios de voluntarios sanos que desarrollaron enfermedad clínica tras la exposición a NoV (Thornhill et al., 1975) y en un tercio de las heces obtenidas de brotes epidémicos de GEA por NoV en individuos que presentaron respuesta serológica frente a él (Kaplan et al., 1982b), lo que puede explicarse por una concentración de virus insuficiente en las muestras y/o el momento de la recolección de las mismas.

3.5.2.2. Ensayo de hemaglutinación por inmunoadherencia y radioinmunoensayo

El ensayo de hemaglutinación por inmunoadherencia frente a NoV se desarrolló para permitir la evaluación de los niveles de anticuerpos en un número amplio de muestras de suero y permitir el desarrollo de estudios epidemiológicos de seroprevalencia (Kapikian et al., 1978). Fue rápidamente reemplazado por el radioinmunoensayo pues precisa menos antígeno y es más sensible (Greenberg et al., 1978a; 1978b; Kapikian et al., 1996).

El radioinmunoensayo emplea suero preinfección y de estado de convalecencia de un voluntario infectado experimentalmente con NoV del que se conoce que presenta una alta titularidad de anticuerpos (por medio de inmunomicroscopía electrónica o hemaglutinación por inmunoadherencia) para capturar el virus en pocillos. Emplea IgG purificada de dicho individuo marcada con I^{125} para detectar las partículas virales de la muestra problema.

3.5.2.3. Enzimoimmunoensayos

La producción de VLPs recombinantes de calicivirus humanos ha permitido el desarrollo de nuevos métodos de inmunoensayo (Jiang et al., 2000; Atmar et al., 2001).

El enzimoimmunoensayo para la detección de antígenos de NoV en muestras fecales presenta una sensibilidad similar a la observada en el radioinmunoensayo (Hermann et al., 1985; Madores et al., 1986; Glass et al., 2000), con la ventaja adicional de la mayor estabilidad de los reactivos empleados. El desarrollo de las técnicas de enzimoimmunoensayo mediante la

producción de suero policlonal hiperinmune, tras la inmunización de diferentes especies animales con VLPs, se ha utilizado para la detección de antígenos en diferentes muestras clínicas (Jiang et al., 1995a; 1995b; Hale et al., 1999). El suero policlonal hiperinmune es bastante específico, pues permite la detección de VLPs recombinantes inmunizantes homólogas, pero no heterólogas, y además los ensayos en que se emplea alcanzan una sensibilidad comparable a la de la RT-PCR (Graham et al., 1994; Jiang et al., 1995c ; Kamata et al., 2005). Una limitación de estos ensayos aparece en su aplicación a muestras clínicas, es el caso del ensayo de detección que utiliza suero hiperinmune frente a VLPs de virus Norwalk pues sólo detecta algunos de los virus de genogrupo I y no es capaz de detectar los de genogrupo II (Lew et al., 1994a; Jiang et al., 1995a; 1995b), además no existe ningún enzimoimmunoensayo que emplee suero policlonal comercializado en la actualidad.

En los últimos años, se ha avanzado enormemente en el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos para cada genogrupo de NoV para su aplicación en los ensayos de detección de antígenos virales en muestras clínicas (Hermann et al., 1995; Hardy et al., 1996; Hale et al., 2000; Kitamoto et al., 2002; Yoda et al., 2003; Parker et al., 2005). Estos han mostrado tanto una elevada especificidad frente al genotipo concreto de NoV inmunizante, como una sensibilidad que duplica la alcanzada por las técnicas de enzimoimmunoensayo que emplean suero policlonal hiperinmune (Herrman et al., 1995). Recientemente se ha descrito un epítipo común para el genogrupo I de NoV, que ha permitido la detección antigénica con una reactividad amplia para todos los NoV de este genogrupo (Hale et al., 2000), sería deseable el mismo objetivo en los NoV de genogrupo II pues permitiría la valoración de un gran número de muestras de una forma rápida y eficiente.

Asimismo, existen kits comerciales basados en la detección de antígenos de NoV por métodos inmunoenzimáticos. Poseen una elevada especificidad, pero una moderada sensibilidad, y resultan especialmente útiles cuando hay que diagnosticar brotes de gastroenteritis de los que se dispone de muchas muestras, en esta situación la detección fiable del virus en unos pocos casos es suficiente para la confirmación de la etiología de la enfermedad (Gray et al., 2007), en caso contrario, se recomienda el estudio por técnicas de RT-PCR si se mantiene un alto índice de sospecha. En España existen dos ensayos inmunoenzimáticos comercializados para diagnosticar infecciones por NoV, IDEIA Norovirus (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) y RIDASCREEN Norovirus (R-Biopharm). En comparación con la RT-PCR la especificidad de estos ensayos fue de 93,91 y 96,37% y la sensibilidad de 58,93 y 43,81%, respectivamente. Más reciente es un método rápido consistente en un ELISA de membrana que detecta cepas de los genogrupos I y II (RIDA QUICK Norovirus, R-Biopharm).

Debido a las dificultades técnicas, hasta ahora no se había desarrollado ninguna técnica inmunocromatográfica para el diagnóstico rápido de NoV, como las existentes para rotavirus. Los kits recientemente desarrollados muestran una sensibilidad cercana al 100% y una especificidad del 75% (Nguyen et al., 2007a; Khamrin et al., 2009).

En cuanto a los ensayos de ELISA que utilizan las VLPs recombinantes para la detección de anticuerpos destacar su sensibilidad y especificidad para detectar la respuesta inmunitaria frente a calicivirus humanos. Se encuentran títulos de anticuerpos totales anti-NoV hasta 40 veces superiores por enzimoimmunoensayo con VLPs recombinantes que por medio del radioinmunoensayo o la inmunomicroscopía electrónica (Green et al., 1993; Monroe et al., 1993). El ensayo de ELISA con VLPs de virus Norwalk es capaz de detectar respuestas de anticuerpos en voluntarios a los que se administraron virus Norwalk, Hawaii, y Snow Mountain (Monroe et al. 1993; Treanor et al., 1993; Graham et al., 1994), pero no permite discernir entre genotipos de NoV por la existencia de anticuerpos con reactividad cruzada (Noel et al., 1997; Belliot et al., 2001).

3.5.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa

Hasta 1993 el principal método diagnóstico disponible era la microscopía electrónica, sin embargo el conocimiento del genoma del virus Norwalk condujo rápidamente al diseño de los cebadores de la región polimerasa que permitieron la amplificación de fragmentos de otros calicivirus y la secuenciación de los mismos (De Leon et al., 1992; Jiang et al., 1992a).

En la actualidad la reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa (RT-PCR) se ha convertido en la técnica de referencia para el diagnóstico de NoV, pues permite una rápida detección en muestras clínicas (heces o vómitos) y ambientales (alimentos contaminados, agua o fómites. Moe et al., 1994; Atmar et al., 2001), así como la comparación de los niveles de ARN (Kageyama et al., 2003).

No sólo es extremadamente sensible sino específica, ya que permite detectar y diferenciar entre genogrupos I y II. Además, la secuenciación de los amplificados permite identificar el genotipo del aislado al comparar la secuencia con otras que han sido depositadas en bases de datos como la base europea de NoV disponible en <<https://hypocrates.rivm.nl/bnwww/Divine-Event/index.html>>. Por ello resulta particularmente útil en los estudios epidemiológicos para descubrir el origen de un brote o caracterizar cepas y se ha utilizado ampliamente en este contexto.

Hay varias consideraciones para el desarrollo óptimo de estas técnicas (Atmar et al., 2001): (a) en primer lugar, el procedimiento de extracción de ARN debe permitir la purificación del ARN viral sin haber sufrido degradación y estar libre de inhibidores de la reacción, para ello

se recomienda usar en el ensayo controles internos de ARN que evitarían la aparición de falsos negativos (Schwab et al., 1997; Parshionikar et al., 2004); (b) en segundo lugar, la elección de los cebadores es fundamental pues de ellos depende la sensibilidad y especificidad del ensayo. La mayoría de los cebadores han sido diseñados para detectar la región más conservada de la ARN-polimerasa ARN-dependiente (Moe et al., 1994; Wang et al., 1994; Ando et al., 1995; Green et al., 1995; Matson et al., 1995; Le Guyader et al., 1996; Berke et al., 1997; Jiang et al., 1999; Schwab et al., 2000), aunque otras regiones del genoma viral han sido también objeto de amplificación como la 2C-helicasa, la región de la cápside y el ORF3 (Matsui et al., 1991; De Leon et al., 1992; Moe et al., 1994; Wang et al., 1994; Green et al., 1997; Hafliger et al., 1997; Noel et al., 1997); (c) el uso de la PCR “nested o semi-nested” es un método que permite aumentar la probabilidad de detectar NoV (Sugieda et al., 1996; Green et al., 1998; Ohyama et al., 1999), utiliza dos rondas de amplificación de PCR empleando uno (“semi-nested”) o ambos (“nested”) cebadores en la segunda ronda dirigidos hacia la región del genoma objetivo en la amplificación inicial. Resulta 10 a 1.000 veces más sensible que la RT-PCR de una ronda única (Green et al., 1998) y ha sido empleada para detectar la presencia de múltiples cepas virales en una única muestra (Sugieda et al., 1996; Ohyama et al., 1999); (d) en relación con la confirmación de los productos de PCR se han empleado muchos métodos. Uno de los más sencillos es la electroforesis en gel, que asocia un gran número de falsos positivos (Atmar et al., 1993; Atmar et al., 1996). Como alternativa más segura se encuentran los ensayos de hibridación, aunque dada la variabilidad de las secuencias genómicas de los NoV resulta difícil seleccionar una sonda única o un pequeño número de ellas que sean capaces de detectar todas las secuencias posibles de NoV (Le Guyader et al., 1996). Actualmente, la secuenciación del ADN de los productos de la RT-PCR es el método más fiable para interpretar estos ensayos (Green et al., 1997; Maunula et al., 1999). No obstante es costoso y laborioso, lo que impide su aplicación a un número amplio de muestras. Es por ello por lo que también se han desarrollado la hibridación en blot de línea reversa (RLBH, “reverse line blot hybridization”. Vinjé et al., 2000b) y el análisis de la movilidad de híbridos (HMA, “heteroduplex mobility assay”. Green et al., 2004) en laboratorios de referencia pues permiten analizar simultáneamente un elevado número de cepas.

3.6. EPIDEMIOLOGÍA

3.6.1. Distribución geográfica

La prevalencia de NoV como causa de gastroenteritis esporádica y epidémica ha sido subestimada durante largo tiempo debido a que no se realiza de rutina su diagnóstico (Patel et al., 2008). De hecho, sólo un 5% de los profesionales de la Salud Pública en Estados Unidos identifica a los NoV como uno de los patógenos causantes de brotes de diarrea aguda

transmitidos por agua y alimentos (Jones et al., 2001), si bien un estudio retrospectivo de los brotes por agua y alimentos notificados en EEUU durante el periodo 1998-2000 aplicando los criterios de Kaplan (Kaplan et al., 1982b) concluyó que, como mínimo un 28% de ellos los cumplían y podían atribuirse a NoV (Turcios et al., 2006).

Estudios de prevalencia en la población general obtienen un 73,3% de resultados positivos en 3.250 muestras de suero estudiadas por EIA para virus Norwalk (un 24,6% de niños de 6 a 11 meses y un 89,7% de personas mayores de 60 años. Gray et al., 1993). Además, la reciente aplicación de las técnicas de RT-PCR ha demostrado que los NoV son la causa más frecuente de diarrea aguda no bacteriana en todo el mundo, salvo en la infancia. En los niños menores de 5 años se estima que representan aproximadamente el 12% (4,4-30,7%) de los casos de diarrea aguda (Patel et al., 2008), lo que significa que son la segunda causa de diarrea aguda en la infancia tras rotavirus.

Los brotes de gastroenteritis por NoV se producen durante todo el año, aunque existe una mayor incidencia durante los meses más fríos en los países de clima más templado (Mounts al., 2000), recientemente se ha descrito un incremento de brotes por NoV en primavera y verano en estas regiones (Lopman et al., 2003a).

En la mayoría de los brotes las cepas más comunes son los clusters del genogrupo II, especialmente el genotipo GII.4 que ha predominado durante los últimos 20 años en todo el mundo, causando pandemias de diarrea aguda por NoV (Noel et al., 1999; Marshall et al., 2001; Fankhauser et al., 2002; Buesa et al., 2002; Marshall et al., 2005; Donaldson et al., 2008; Lindesmith et al., 2008). También ha sido identificado en España como el más prevalente (Dominguez et al., 2008; Buesa et al., 2008).

En los últimos 15 años se han descrito diversos subtipos o variantes de este genotipo que han infectado a la población mundial de forma secuencial (Lopman et al., 2004b; Siebenga et al., 2007). Se plantea que la persistencia de NoV GII.4 año tras año pueda deberse a las variaciones antigénicas que experimenta. Estudios experimentales en los que se enfrentaban Ac Mo y cepas de NoV GII.4 de diferentes estaciones epidémicas han demostrado que se producen tanto variaciones sutiles como cambios evolutivos en los epítomos antigénicos de las cepas de NoV, proporcionando una evidencia directa de que los NoV GII.4 están sometidos a una variación antigénica, probablemente como respuesta a la presión ejercida por la respuesta inmunitaria de la población, tal como sucede con virus Influenza, VIH y hepatitis C. La variación antigénica de los NoV podría influir significativamente en el diseño de vacunas o de terapia inmunológica eficaz frente a estos importantes patógenos humanos (Lindesmith et al., 2011).

3.6.1.1. Situación a nivel mundial

En Estados Unidos se han publicado estudios epidemiológicos que identifican a los calicivirus como los agentes etiológicos de brotes epidémicos de diarrea aguda no bacteriana en un 81% de los casos (Blanton et al., 2006), de los cuales el 40% tiene un origen alimentario (Mead et al., 1999; Olsen et al., 2000; Lynch et al., 2006).

Estudios realizados en otros países nos muestran los siguientes datos: (a) Brasil: 20% de las diarreas agudas (Borges et al., 2006; Victoria et al., 2007), (b) Chile : 45% de las diarreas agudas (Vidal et al., 2005), (c) Tailandia : 14% de las diarreas agudas (Guntapong et al., 2004 ; Khamrin et al., 2007), (d) Australia : 50% de las diarreas agudas no bacterianas de aparición epidémica (Marshall et al., 2001) y 20,5% del total de las diarreas agudas (OzFood Network, 2004; Tu et al., 2007), (e) Japón : 77% de la diarreas agudas no bacterianas de aparición epidémica (Inouye et al., 2000; Hamano et al., 2005), (f) en Argentina la incidencia de gastroenteritis por NoV, tanto en brotes epidémicos como casos esporádicos, ha estado ligeramente por debajo de rotavirus (24,2% vs 25,2%) en niños menores de 3 años, sin embargo estudios más recientes revelan que NoV ha alcanzado el primer puesto como causa de brotes epidémicos de diarrea aguda no bacteriana en la infancia (Gomes et al., 2007).

3.6.1.2. Situación en Europa

Un estudio europeo con más de 3.700 brotes de diarrea aguda no bacteriana ocurridos entre 1995 y 2000 muestra una relación causal con NoV en un 85% de ellos (Lopman et al., 2003b; Goutam et al., 2005). Ante estos resultados, en el año 2001 se constituyó la Red Europea de Vigilancia de Infecciones Víricas Transmitidas por Alimentos (FBVE, “Foodborne Viruses in Europe”), formada por trece países, para analizar la información epidemiológica y de laboratorio obtenida de los centros colaboradores y poder abordar el incremento observado en la incidencia de los brotes epidémicos por NoV, estudiar los genotipos causantes y su evolución a lo largo del tiempo.

Los datos que se obtuvieron mostraron que el incremento acaecido en el año 2002 fue concomitante con la aparición de una nueva variante de NoV (Lopman et al., 2004b). Durante el periodo 2004-2005 se observó un incremento de brotes notificados al FBVE con importantes diferencias según los distintos países: Alemania, Inglaterra y Gales notificaron más de mil brotes, mientras que Francia notificó sólo seis (Kroneman et al., 2006). En el periodo 2005-2006 de nuevo se observó un incremento en el número de brotes alimentarios y la aparición de nuevas variantes de GI.4 (Kroneman et al., 2008).

Existen otras muchas publicaciones que proporcionan datos específicos por países, en Holanda de un 86 a un 91% de los brotes epidémicos de diarrea aguda no bacteriana (Vinjé et al., 1996) y un 10% del total de las GEA se atribuyen a NoV (de Wit et al., 2001a; Siebenga et

al., 2007) y en Finlandia un 60,6% de los brotes epidémicos de diarrea aguda no bacteriana se deben a NoV (Maunula et al., 2005).

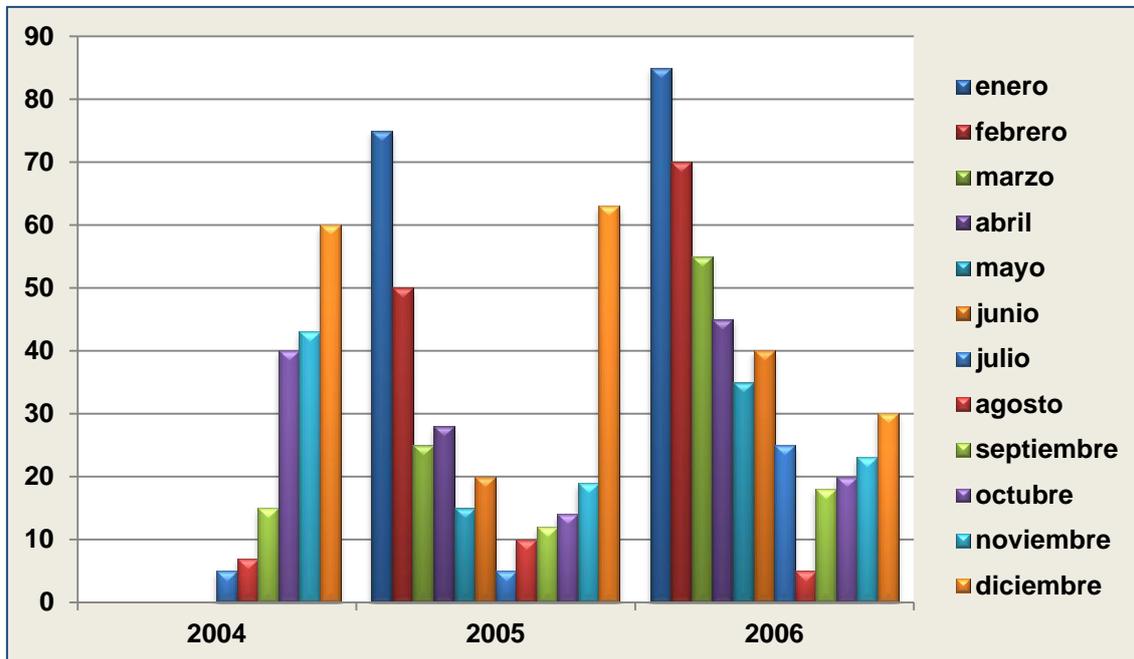


Figura 16. Brotes de gastroenteritis aguda por NoV GII.4 en el segundo semestre de 2004, 2005 y 2006 en Europa (modificado de Kroneman et al., 2006).

La recopilación de datos por medio de la FBVE permite observar la estacionalidad de los brotes epidémicos por NoV en Europa. Aparecieron principalmente en los meses de diciembre de 2004 y enero y febrero de 2005, así como en diciembre de 2005 y enero y febrero de 2006.

3.6.1.3. Situación en España

En España, de 1999 a 2003 se observó un incremento en el número de brotes de diarrea aguda por NoV respecto a los datos de años previos. La distribución por comunidades autónomas no fue homogénea, mostrando una mayor incidencia en Cataluña (0,32/100.000 en el año 2003 y 752 personas afectadas por NoV GII.4 en 2004; Domínguez et al., 2008), seguida por Galicia, Castilla y León, Madrid, Comunidad Valenciana e Islas Baleares. En cambio en Cantabria, Navarra, La Rioja, Extremadura, Ceuta y Melilla no se notificó ningún brote por NoV durante ese periodo, *figura 17*.

Disponemos de datos más específicos por regiones: en Asturias el NoV se ha identificado en un 8,6% de los niños hospitalizados por diarrea aguda (Boga et al., 2004) y en la zona oriental de España, Cataluña y la Comunidad Valenciana ha sido identificado como agente causal de un 87,1% de las diarreas agudas de aparición epidémica (Buesa et al., 2008).

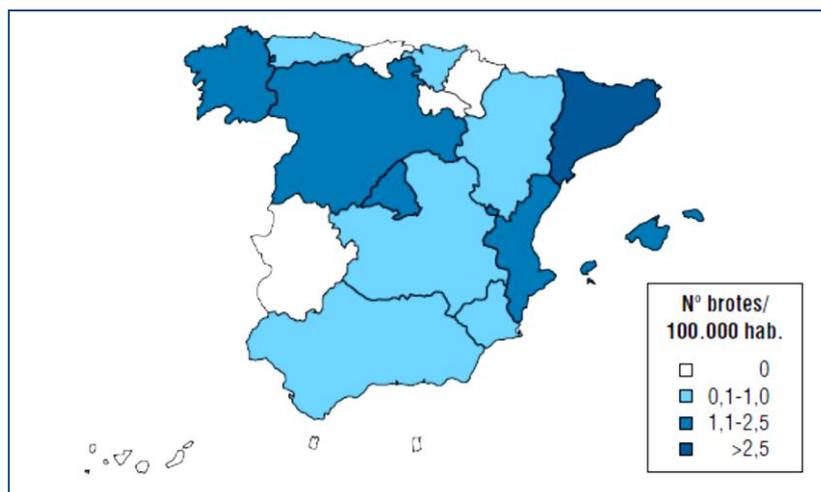


Figura 17. Distribución geográfica según comunidades autónomas de brotes de norovirus declarados en España en el año 2003 (Boletín epidemiológico semanal, 2005).

El ámbito en que aparecieron los brotes fue mayoritariamente el de las residencias geriátricas y el mecanismo de transmisión más frecuente el interpersonal, con una creciente aportación de la transmisión alimentaria en los últimos dos años: un 24,2%, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,009$) en Cataluña, donde un 60% de brotes por NoV fueron transmitidos por alimentos (Grupo de Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico de Norovirus, 2004; Grupo de Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico de Norovirus, 2005).

En cuanto a la estacionalidad se aprecia que existe una distribución homogénea a lo largo de todo el año con un pico entre los meses de mayo y octubre (Lopman et al., 2003a), aunque en el año 2003 tuvo lugar un incremento puntual en el mes de febrero (Grupo de Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico de Norovirus, 2005).

3.6.2. Posibles huéspedes

El hombre es el único reservorio de NoV confirmado, aunque no se puede descartar el reservorio animal (Van der Poel et al., 2000; Oliver et al., 2004; Farkas et al., 2005), pues los calicivirus son lo suficientemente divergentes como para esperar una posible adaptación a ellos. Existen varios datos que podrían apoyar esto: (a) el descubrimiento reciente de calicivirus humanos y animales genéticamente relacionados sugiere que dicha transmisión puede haber ocurrido en algún momento de su evolución (Van der Poel et al., 2000), (b) asimismo, la descripción de casos de transmisión de calicivirus interespecies en lugares donde el nicho

ecológico de los virus se ha alterado. Es el caso de la transmisión de calicivirus marinos del género VeV a cerdos domésticos en los Estados Unidos en los años 30 a partir de la ingesta de desperdicios crudos o la infección de un técnico de laboratorio por el virus del león marino de San Miguel tras la manipulación de muestras contaminadas (Smith et al., 1998).

3.6.3. Propiedades físico-químicas del virus

Los NoV son virus estables dentro de un amplio rango de temperatura, sobreviven a la congelación, la refrigeración y el calentamiento hasta 60°C. De aquí, que se puedan encontrar en hielos elaborados con agua contaminada (Cannon et al., 1991; Khan et al., 1994).

Además, se muestran resistentes a los medios de desinfección habituales, tales como: (a) éter al 20% a 4°C, (b) incubación a 60°C durante 30 minutos o (c) tratamiento con hipoclorito sódico entre 3,75-6,25 g/L (cloro libre residual 0,5 a 1 mg/L), una concentración que sería suficiente para inactivar otros virus entéricos del agua potable de consumo (rotavirus y poliovirus). Requieren para su inactivación tratamientos con 10 mg/L de cloro libre, que sería la concentración utilizada para descontaminar un agua considerada no potable (Barker et al., 2004; Duizer et al., 2004a; Green et al., 2007). Es por ello que pueden permanecer en una gran variedad de superficies que se constituyen como reservorio de los virus y facilitan su propagación, especialmente cuando se trata de entornos cerrados.

Asimismo, se ha demostrado la resistencia de los NoV al medio ácido. Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que el ARN de NoV permanece intacto después de 30 minutos a pH 2 y temperatura corporal, lo que explica que sobrevivan al paso por el estómago (Dolin et al., 1972; Duizer et al., 2004a).

3.6.4. Mecanismos de transmisión

El medio de transmisión más importante es la ruta fecal-oral. Los primeros casos de un brote suelen aparecer frecuentemente tras la exposición al agua o a los alimentos contaminados. En cuanto a la diseminación de la infección, existen dos factores que tienen una gran responsabilidad: (a) la dispersión del virus a través de los vómitos, tanto por la formación de aerosoles como por la contaminación de fómites (Marks et al., 2003) y (b) la contaminación de los aseos públicos (Cheesbrough et al., 2000).

Además, los NoV poseen una serie de características que facilitan su propagación en brotes epidémicos: (a) su dosis infectiva es muy baja, se calcula que 10 partículas víricas son suficientes para causar una infección, (b) la excreción viral suele ser muy intensa durante un periodo de tiempo prolongado, incluso después de que hayan desaparecido los síntomas, (c) como se ha comentado en el apartado anterior, la resistencia medioambiental de sus viriones es muy alta y (d) una persona puede sufrir múltiples reinfecciones, pues la respuesta inmunitaria

confiere una protección de corta duración. Por estos motivos, la infección por NoV se extiende muy rápidamente en entornos como hospitales, colegios, guarderías, hoteles y residencias (Parashar et al., 2001; Evans et al., 2002; Marks et al., 2003).

El estudio de los brotes epidémicos de gastroenteritis permite destacar la importancia que tiene el NoV como agente causal y conocer el mecanismo de transmisión por el cual se ha llegado a producir el brote, cosa que no sucede con los casos esporádicos. Sin embargo, no se puede obviar que los brotes representan sólo la parte más pequeña de todos los casos, ya que incluyen exclusivamente los que han consultado con los servicios sanitarios, se han podido relacionar epidemiológicamente, notificado a los servicios de Salud Pública y finalmente investigado. Estos pueden clasificarse según su mecanismo de transmisión en brotes transmitidos por medio de alimentos o agua y de persona a persona.

3.6.4.1. Brotes transmitidos por alimentos

La falta de notificación de brotes, referida previamente (Glass et al., 2000; Cowden et al., 2002) impide ofrecer datos exactos; sin embargo las tendencias observadas indican que los brotes por NoV transmitidos por alimentos son cada vez más frecuentes, relacionándose con hasta un 90% de gastroenteritis asociadas al consumo de alimentos contaminados, motivo por el cual la Unión Europea los ha escogido (junto con el virus de la hepatitis A) para el control específico en alimentos de riesgo.

Existe una gran diversidad de alimentos que pueden ser vehículo para los NoV (Cliver et al., 2006), bien por estar contaminados en origen o haberse contaminado durante el proceso de preparación. Estudios elaborados por diversos autores indican que el consumo de marisco ocasiona la mayoría de brotes por NoV. Las ostras, moluscos y bivalvos con su sistema de filtrado concentran las partículas virales presentes en el agua y al ser consumidos tras un tratamiento con vapor suponen un gran riesgo de transmisión de virus entéricos como los NoV (Kageyama et al., 2004; Doyle et al., 2004; Hamano et al., 2005), por ello se recomienda que se sometan a un proceso de cocción que alcance una temperatura en el interior del molusco superior a 90°C durante 1,5 minutos como mínimo. Adicionalmente, se deben emplear medidas para evitar la contaminación de moluscos en áreas de cultivo de bivalvos como la identificación de fuentes de contaminación en las costas o la prohibición del vertido de aguas fecales desde barcos (Millard et al., 1987; Simmons et al., 2001; Koopmans et al., 2004; Widdowson et al., 2005b; Le Guyarder et al., 2006; Françoise et al., 2006).

Los alimentos que han sido preparados por un manipulador infectado y no se someten a tratamiento térmico posterior, como los bocadillos y ensaladas, o los alimentos que se pueden contaminar por lavado con agua con material fecal, como frutas y verduras crudas envasadas, pueden ocasionar brotes (Parashar et al., 2001; Sala et al., 2005). La contaminación de los

alimentos a partir de un manipulador que no ha cumplido con las normas higiénicas es muy difícil de evitar ya que la excreción del virus en una persona infectada puede producirse incluso antes de iniciar los síntomas (Goller et al., 2004), permanecer asintomático o con síntomas muy leves (Hedberg et al., 1993; Morbidity and Mortality Weekly Report, 2006) y prolongarse incluso semanas o meses después de la recuperación (Kauffman et al., 2003; Gallimore et al., 2004). Se recomienda que los trabajadores que hayan sufrido una gastroenteritis no se incorporen al trabajo hasta 48-72 h después de su recuperación; una alternativa podría ser la asignación temporal del trabajador a una labor que no implique la manipulación de alimentos (Parashar et al., 2001).

La detección de NoV en los alimentos es compleja. Los métodos como la microscopía electrónica o el enzimoimmunoanálisis requieren al menos una concentración de 10^5 - 10^6 partículas víricas por mililitro, niveles muy superiores a las dosis infectivas de 10 unidades por gramo de alimento, lo que hace necesarios métodos diagnósticos más sensibles como la RT-PCR (Green et al., 1998; Vinjé et al., 2003; Jothikumar et al., 2005; Morton et al., 2009).

3.6.4.2. Brotes transmitidos por agua

Aunque menos frecuentes que los propagados por alimentos, se han descrito brotes por consumo de agua procedente de la red de distribución pública, pozos (Beller et al., 1997), fuentes o hielos comerciales (Cannon et al., 1991) y algunos relacionados con el baño en lagos y piscinas (Craig et al., 1993; Bosch, 1998).

En Estados Unidos, durante el periodo 2000-2004, de un total de 226 brotes de gastroenteritis por NoV estudiados, sólo 12 (5%) fueron transmitidos por agua (Blanton et al., 2006). La contaminación de las aguas de consumo puede ser resultado de filtraciones en el sistema de alcantarillado, en inundaciones y lluvias torrenciales o defectos en el sistema de cloración (Bosch et al., 1998; Morbidity and Mortality Weekly Report, 2005). Asimismo, se han descrito brotes asociados al consumo o contacto en zonas recreativas con aguas contaminadas (Khan et al., 1994; Fankhauser et al., 2002; Maunula et al., 2005).

Hasta hace poco, los métodos analíticos no permitían detectar la presencia de NoV en el agua por lo que se utilizaba como método de aproximación la detección de microorganismos indicadores de contaminación fecal como el recuento de coliformes (Parashar et al., 2001). Por este motivo, el primer brote documentado en el cual se detectó NoV en el agua se remonta a 1997 (Beller et al., 1997). Actualmente las técnicas de RT-PCR se pueden aplicar para evaluar la contaminación del agua, pero es necesaria la concentración de grandes volúmenes para poder detectar la presencia del virus (Bosch et al., 2006; Morton et al., 2009). Por ello hay que tener en cuenta que su identificación en una muestra de agua que puede haber sido el mecanismo de transmisión en un brote de gastroenteritis por NoV confirmaría el brote, pero su ausencia no lo

excluiría siempre que los datos epidemiológicos indicaran que el consumo de dicha agua fuera la explicación más plausible de su origen.

3.6.4.3. Brotes de transmisión persona a persona

Uno de los motivos por los cuales algunos autores consideran que las infecciones por NoV son un problema emergente es porque, debido a los cambios en el estilo de vida de los países desarrollados y al envejecimiento de la población, existe un mayor número de personas que viven en residencias geriátricas (Green et al., 2002; Widdowson et al., 2004; Wu et al., 2005; Centers for Disease Control and Prevention and National Center for Health Statistics. National Nursing Home Survey, 1999). La infección por NoV tiene un gran riesgo de complicaciones en este grupo (Mattner et al., 2006) y se relaciona con elevadas tasas de mortalidad (Goodgame et al., 2006; Okada et al., 2006).

En los centros sanitarios la duración del proceso es más largo y en estas instituciones los brotes se transmiten muy rápidamente, presentan elevadas tasas de ataque y son especialmente difíciles de controlar (Parashar et al., 2001), siendo los costes generados de consideración (Lopman et al., 2004a; Zingg et al., 2005). Estos hechos avalan la importancia de implementar medidas de prevención de la infección nosocomial por NoV (Barker et al., 2004).

En cuanto a las infecciones sucedidas en el domicilio, en algunos países no es obligada la notificación, pero sería conveniente, pues a partir de su estudio epidemiológico podrían llegar a identificarse casos con un origen común fuera de la familia y esto permitiría estimar mejor la extensión del problema.

En los últimos años han adquirido especial importancia los brotes en cruceros (Smolinski et al., 2003; Enserik et al., 2006; Koopmans et al., 2006), en los cuales la infección se adquiere a partir de una fuente común (agua o alimentos contaminados) y posteriormente tiene lugar la transmisión de persona a persona de manera rápida y sencilla (Rooney et al., 2004). La prevención de estos brotes debe constar de varias medidas como el control de la fuente de infección, medidas de desinfección ambiental adecuadas, precauciones de contacto con las personas enfermas y promoción del lavado de manos en la tripulación y los pasajeros (Isakbaeva et al., 2005). Un problema adicional que plantean es que no suele estar claro quién ha de ser el responsable de la investigación y de las actuaciones de control, se plantea que se deberían regir por una normativa de ámbito internacional (Widdowson et al., 2004; Isakbaeva et al., 2005; Takkinen et al., 2006; Takkinen et al., 2006. Enserik et al., 2006).

3.7. PATOGENIA

3.7.1. Entrada y periodo de incubación

Los calicivirus humanos penetran en el cuerpo humano por la vía oral, vehiculizados por agua, alimentos, tras contacto con fómites o tras su aerosolización en los vómitos (Caul et al., 1994; Chadwick et al., 1994; Paterson et al., 1997; Marks et al., 2000; Marks et al., 2003).

Estudios realizados en voluntarios infectados por NoV muestran que el periodo de incubación es corto, de 10 a 50 horas, con una media de 24 horas (Dolin et al., 1971; Blacklow et al., 1972; Dolin et al., 1972; Wyatt et al., 1974; Steinhoff et al., 1980; Kaplan et al., 1982a). En el caso del virus Snow Mountain, el periodo de incubación en una enfermedad inducida experimentalmente fue de 19 a 41 horas con una media de 27 horas (Dolin et al., 1982).

3.7.2. Replicación

El lugar de replicación de los calicivirus humanos es el tracto gastrointestinal superior. Las biopsias duodenales de enfermos muestran un ensanchamiento y acortamiento de las vellosidades intestinales, hipertrofia críptica y signos inflamatorios, tales como infiltración por células mononucleares y vacuolización citoplasmática. En muestras de yeyuno de voluntarios que desarrollaron la enfermedad tras la administración oral de virus Norwalk o Hawaii también se observaron estas lesiones histopatológicas (Dolin et al., 1971; Agus et al., 1973; Schreiber et al., 1973; Schreiber et al., 1974), lo que coincide con hallazgos procedentes de estudios de experimentación animal en los que se identificaron lesiones en el intestino delgado de cerdos infectados con calicivirus entérico porcino (PEC) y SaV (Flynn et al., 1988a). Además, los virus se han detectado por microscopía electrónica en las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado. El estudio de biopsias intestinales de voluntarios a los que se administraron virus Norwalk y Hawaii, pero que se mantuvieron asintomáticos, también mostró estas lesiones mucosas (Schreiber et al., 1973; Schreiber et al., 1974; Meeroff et al., 1980). En el caso de pacientes pediátricos, el examen de las biopsias intestinales de niños a los que se ha practicado un trasplante intestinal y están infectados por NoV ha permitido observar un aplanamiento de las vellosidades y un aumento de los infiltrados mononucleares en la lámina propia, cuando se compararon con controles sanos (Morotti et al., 2004).

El hecho de que los hallazgos microscópicos referidos no aparecieran en otros tramos del aparato digestivo (fundus gástrico, antro o recto) de voluntarios infectados y sintomáticos (Widerlite et al., 1975) planteó la posible existencia de un tropismo celular. La información acerca de los tropismos celulares y tisulares de los calicivirus humanos es limitada, un estudio al respecto mostró que VLPs recombinantes de NoV marcadas con radioisótopos eran capaces de unirse a diversos tipos celulares con una eficiencia diferente de internalización en cada una

de ellas (White et al., 1996). Los ensayos de unión de estas VLPs con 13 líneas celulares de diferentes orígenes, incluyendo enterocitos humanos (células Caco-2 diferenciadas e indiferenciadas) y células de insecto (*Spodoptera frugiperda* 9), mostraron que las células diferenciadas Caco-2 unieron significativamente más VLPs recombinantes que ninguna otra línea celular. Por otra parte los NoV murinos muestran un tropismo por las células macrofágicas y dendríticas del sistema inmunitario de ratón (Wobus et al., 2004), si bien los NoV humanos no coinciden en dicha afinidad.

Las conclusiones obtenidas de los estudios acerca del tropismo celular de las VLPs recombinantes de NoV indujeron a pensar en la existencia de receptores determinados genéticamente, que mediarían la unión de las partículas virales a ciertos tipos celulares (Kreutz et al., 1994; Maeda et al., 2002). Tras la interacción del virión con la célula huésped mediante estos receptores, la partícula penetra y el ARN genómico se libera de la cápside y pasa al citoplasma. La traducción inicial del genoma introducido es mediada por interacciones entre la proteína estructural VPg, ligada al ARN genómico y subgenómico, la proteína no estructural NS5 y los mecanismos de traducción de la célula (Goodfellow et al., 2000; Daughenbaugh et al., 2003). Una vez transcrito el ORF1 para producir la poliproteína no estructural, la NS6-Pro la escindirá en varios sitios de restricción obteniéndose como productos las proteínas no estructurales que permitirán las siguientes etapas del proceso (Sosnovtsev et al., 2002). A continuación, se inicia la síntesis de una hebra de ARN complementaria (negativa) a partir de la estructura del ARN genómico empezando por el extremo 3' de la hebra de ARN con sentido positivo (Gutiérrez-Escolano et al., 2003), que servirá a su vez como molde para transcribir más ARN genómico y subgenómico de sentido positivo (Neill et al., 1998) que se empleará para codificar la síntesis de las proteínas estructurales VP1 y VP2 (proceso en el que participa la proteína no estructural NS7-Pol. Herbert et al., 1996).

3.7.3. Excreción y diseminación de NoV por el huésped

Los calicivirus humanos se liberan del tracto intestinal del huésped a través de las heces. También se han detectado en muestras de vómitos, por inmunomicroscopía electrónica y reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción reversa (RT-PCR), (Greenberg et al., 1979; Kilgore et al., 1996; Mc Evoy et al., 1996; Green et al., 1998).

Se ha demostrado que la capacidad de transmisión de los calicivirus es muy alta, de modo que los individuos infectados tienen una probabilidad elevada de contagiar a sus contactos domiciliarios o muy cercanos, así, en brotes de exposición única son muy frecuentes los casos secundarios. En la infección experimental de voluntarios se observa por inmunomicroscopía electrónica su diseminación desde el momento del establecimiento de la enfermedad hasta no más de 72 horas después de los primeros síntomas (Thornhill et al., 1975; Dolin et al., 1982).

Técnicas más sensibles como la RT-PCR han demostrado que la diseminación de los NoV puede suceder desde antes del establecimiento de los síntomas (Gaulin et al., 1999; Goller et al., 2004) y durar varios días o semanas, incluso tras la resolución de la enfermedad clínica (Graham et al., 1994; Okhuysen et al., 1995; Rockx et al., 2005a). Este aspecto lo corroboran estudios de la historia natural de la infección por NoV en una comunidad que muestran que el 26% de 99 pacientes examinados eliminaban virus (detectados por RT-PCR) hasta tres semanas tras el establecimiento de la enfermedad, con la tasa máxima de diseminación prolongada (38%) en niños menores de un año (Rockx et al., 2002). Estas observaciones sugieren que los individuos infectados que se recuperan de la infección por NoV pueden continuar eliminando partículas virales más allá del periodo sintomático.

Asimismo, existen estudios que ponen de manifiesto que hay infecciones en individuos que permanecen asintomáticos y sin embargo propagan el virus de una forma silente (Centers for Disease Control and Prevention and National Center for Health Statistics. National Nursing Home Survey, 1999). Desde el punto de vista epidemiológico, este es un hallazgo con grandes implicaciones concretamente en relación a la actitud frente a los brotes epidémicos que pueden causar los manipuladores de alimentos convalecientes de la enfermedad (Curry et al., 1987; Parashar et al., 1998; Reid et al., 1988; White et al., 1986).

3.8. INMUNIDAD

Sobre la respuesta inmunitaria frente a los NoV en humanos se conoce muy poco. Diversas observaciones clínicas y serológicas de individuos infectados en brotes epidémicos y de grupos de voluntarios expuestos experimentalmente a NoV sugieren que no parece seguir el patrón que se observa frente a otros virus (Matsui et al., 2000).

Los humanos demuestran un alto grado de susceptibilidad tanto a las infecciones naturales como a las inducidas experimentalmente por NoV, ya que en algunas epidemias por NoV más de un 80% de los voluntarios adultos resultan enfermos (Kaplan et al., 1982b) y aproximadamente un 50% desarrollan repetidamente enfermedad tras varios contactos con NoV, sugiriendo que la respuesta inmunitaria desarrollada en infecciones previas proporciona una protección escasa (Dolin et al., 1972; Wyatt et al., 1974; Steinhoff et al., 1980; Blacklow et al., 1982).

Sin embargo, existe un porcentaje de la población que no es susceptible a la infección por NoV tras el primer contacto ni los sucesivos, lo que hace plantearnos la existencia de otros factores diferentes a la inmunidad tradicional que determinan la resistencia frente a ellos.

3.8.1. Respuesta innata

El rápido aclaramiento de la infección por NoV murino en los ratones inmunocompetentes indica el importante papel que desempeña el sistema inmunitario innato hasta el momento en que el sistema inmunitario adaptativo es capaz de generar una respuesta efectiva (Mumphrey et al., 2007). De hecho, la infección por NoV murino al ratón que carece de los receptores de Interferón tipo I y II (IFN $\alpha/\beta/\gamma$) o de la molécula STAT-1 resulta letal (Karst et al., 2003; Mumphrey et al., 2007).

Diversas proteínas inician la respuesta de IFN frente a los virus (Takeuchi et al., 2007), son los receptores “Toll-like” (TLR, *tabla 8*. Iwasaki et al., 2004), las helicasas Rig-I-like (RLHs. Sumpter et al., 2005; Pichlmair et al., 2007), PKR (Garcia et al., 2007) y RNasa L (Malathi et al., 2007). Sin embargo, los sensores iniciales que específicamente reconocen los NoV y son responsables de su subsiguiente activación son desconocidos.

Los TLRs se localizan en la membrana plasmática y los compartimentos endosomales, los TLR 7 y 8 reconocen el ARN de cadena única (Lund et al., 2004; Heil et al., 2004; Diebold et al., 2004), el TLR 9 reconoce el ADN (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000) y el TLR 3 el ADN de doble cadena. Los RLHs son sensores localizados en el citoplasma (Pichlmair et al., 2007), incluyen Rig-I y MDA-5 (Takeuchi et al., 2007; Fujita et al., 2007; Yoneyama et al., 2004). Rig-I reconoce preferentemente el ARN 5’-fosforilado (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006), mientras que MDA-5 el ADN de doble cadena (Yoneyama et al., 2005).

Recientemente se ha descubierto que la carencia de Rig-I confiere resistencia frente a NoV *in vitro* (Guix et al., 2007). MDA5 es el sensor predominante de los NoV murinos e inicia la respuesta inmunitaria frente a estos virus, TLR3 también interviene en la respuesta a los NoV murinos en ciertos tejidos (McCartney et al., 2008).

Tabla 8. PRINCIPALES RECEPTORES “TOLL-LIKE” Y AFINIDAD

RECEPTOR “TOLL-LIKE”	AFINIDAD
TLR 3	ADN doble cadena
TLR 7	ARN de cadena única
TLR 8	ARN de cadena única
TLR 9	ADN
Rig-I	ARN 5’ fosforilado
MDA-5	ADN de doble cadena

3.8.2. Respuesta adaptativa

3.8.2.1. Humoral

La mayoría de la información acerca de la respuesta inmunitaria humoral frente a los NoV, tanto sistémica como local, proviene de estudios en voluntarios (Dolin et al., 1972; Wyatt et al., 1974; Parrino et al., 1977; Lindesmith et al., 2010).

Respecto a la respuesta sistémica, se han descrito dos etapas: (a) la inmunidad a corto plazo es posiblemente específica para cada genogrupo viral, probablemente para cada genotipo. Los estudios realizados con voluntarios demuestran que los individuos infectados por un NoV concreto desarrollan una respuesta inmunitaria después de la infección que, aunque de corta duración (entre 6 y 14 semanas), confiere protección frente a una nueva exposición al mismo virus durante dicho periodo (Wyatt et al., 1974; Parrino et al., 1977; Johnson et al., 1979). Esta es una respuesta intensa de tipo IgG, IgM e IgA a nivel sérico frente al genotipo homólogo y débil frente a genotipos heterólogos dentro del mismo genogrupo (Hale et al., 1998; Rockx et al., 2005c; Iritane et al., 2007); (b) la inmunidad a largo plazo se desvía del patrón tradicional. Doce voluntarios expuestos al NoV en dos ocasiones, con una diferencia de 27 a 42 meses, mostraron dos patrones diferentes de respuesta a la exposición secuencial (Parrino et al., 1977): seis desarrollaron enfermedad gastrointestinal tras la exposición inicial y nuevamente tras ese periodo de 27 a 42 meses, sin embargo los otros seis no enfermaron tras la exposición inicial ni tras la segunda exposición 27 a 42 meses después (Iritani et al., 2007). Los estudios serológicos, en los que los anticuerpos séricos antes de la primera exposición fueron medidos por inmunomicroscopía electrónica y radioinmunoensayo, no proporcionan una explicación para la diferente susceptibilidad (Parrino et al., 1977; Greenberg et al., 1981; Cukor et al., 1982). Se observó la paradoja de que los voluntarios que no enfermaron tenían muy pocos o casi ningún anticuerpo específico anti-NoV medible en suero antes del primer contacto experimental (Parrino et al., 1977), es más, no eran capaces de desarrollarlos tras el segundo contacto. En cambio, los voluntarios que enfermaron tras dicha exposición y que fueron evaluados serológicamente presentaban altos niveles de anticuerpos específicos previos al primer contacto, que incluso se incrementaron más tras el contacto posterior.

La observación de que los anticuerpos séricos frente a NoV se correlacionan con una susceptibilidad a la infección por NoV y proporcionan una protección de escasa duración se ha realizado en muchos otros estudios en voluntarios sanos (Johnson et al., 1990; Graham et al., 1994; Lindesmith et al., 2003). Una posible explicación podría ser que la carencia de anticuerpos frente a una cepa determinada de NoV se debería a una ausencia de susceptibilidad a la infección de carácter constitucional.

En relación con la respuesta local, un estudio reciente realizado en voluntarios ha demostrado el desarrollo de una respuesta rápida de tipo IgA a nivel de la mucosa intestinal tras la exposición experimental a estos virus (Lindesmith et al., 2003). Queda por determinar la capacidad protectora que confiere y durante cuánto tiempo ya que hasta el momento se ha observado repetidamente una discordancia entre los niveles de anticuerpos a nivel yeyunal y los coproanticuerpos con la susceptibilidad a la infección (Blacklow et al., 1979; Greenberg et al., 1981; Baron et al., 1984; Johnson et al., 1990; Madore et al., 1990). Es decir, en aquellos individuos que presentaban mayores niveles de estos anticuerpos previos a la exposición se ha observado una mayor susceptibilidad a la infección.

3.8.2.2. Celular

La respuesta inmunitaria mediada por células se ha estudiado en voluntarios tras la inmunización oral con VLPs recombinantes de NoV. Las VLPs recombinantes de Norwalk desencadenan una respuesta inmunitaria celular que induce procesos de proliferación celular virus-específicos, un incremento de IFN-gamma en ausencia de producción de IL-4, patrón predominante tipo Th-1 de producción de citoquinas (Tacket et al., 2003). Esto se ha observado también en un estudio de 15 voluntarios infectados con Snow Mountain, en los que se identifica un incremento significativo de los niveles de IFN-gamma e IL-2, pero no IL-6 o IL-10, en el segundo día tras la exposición mostrando nuevamente un predominio de la respuesta Th-1 (Lindesmith et al., 2005).

3.9. SUSCEPTIBILIDAD DEL HUÉSPED

Las discrepancias observadas entre los estudios clínicos y serológicos llevaron durante años a plantear la hipótesis de la existencia de un factor constitucional, determinado genéticamente que pudiera condicionar la susceptibilidad o resistencia frente a las infecciones por NoV (Parrino et al., 1977; Blacklow et al., 1982; Koopmans et al., 1982; Baron et al., 1984; Cukor et al., 1984).

El estudio inicial que profundizó en esta hipótesis fue publicado por Ruvoen-Clouet et al. en el año 2000. En él describe cómo los virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV, LaV) y sus VLPs recombinantes son capaces de unirse a los antígenos histosanguíneos humanos (HBGAs), carbohidratos complejos expresados en las células epiteliales del tracto respiratorio, genito-urinario y digestivo, así como en los hematíes de conejos y humanos, como muestra la *figura 18* (Ruvoen-Clouet et al., 2000; Lindesmith et al., 2003).

Los HBGAs referidos son codificados por los genes FUT2, en un 80% de la población caucásica del N de Europa y América, lo que coincide con la tasa de ataque media en los brotes

epidémicos por NoV. Esto podría sugerir que el gen FUT2 se asocia con una susceptibilidad a las infecciones esporádicas y a los brotes epidémicos causados por NoV (Thorven et al., 2005).

Por ello se diseñaron estudios con el virus Norwalk, en los que se demostró que las VLPs recombinantes del virus eran capaces de unirse a los HBGAs de saliva y enterocitos de individuos productores de FUT2 (secretores), pero no de no productores (no secretores) *in vitro* (Marionneau et al., 2002). Esta misma asociación se confirmó *in vivo* por medio de estudios en voluntarios sanos donde se observó susceptibilidad a la infección en los individuos secretores y resistencia a la misma en la mayoría de los no secretores (Marionneau et al., 2002; Hutson et al., 2002; Lindesmith et al., 2003; Hutson et al., 2004; Le Pendu et al., 2004; Hutson et al., 2005; Tan et al., 2005a; 2005b). Posteriormente se han publicado numerosas investigaciones de brotes epidémicos, así como estudios de prevalencia de otros representantes de NoV (Meyer et al., 2004; Dai et al., 2004; Rockx et al., 2005b; Fretz et al., 2005) desprendiéndose de ellos resultados similares.

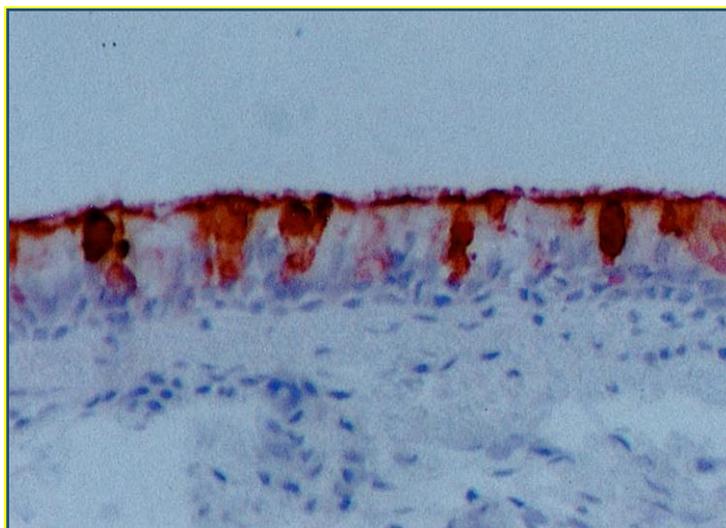


Figura 18. Tinción inmunohistoquímica de la unión de extractos hepáticos de RHDV a HBGAs tipo 2 de células traqueales de conejo (Ruvoen-Clouet et al., 2000).

3.9.1. Polimorfismo del sistema HBGA humano

Los HBGAs son carbohidratos complejos presentes en la parte más protruyente de muchas glicoproteínas o glicolípidos de la superficie de los hematíes y del epitelio mucoso del tracto digestivo, respiratorio y genitourinario humanos (Ravn et al., 2002; Le Pendu et al.,

2004). También están presentes como oligosacáridos libres en fluidos biológicos como la leche materna, la saliva, el contenido intestinal y la sangre.

Los determinantes antigénicos HBGAs parten de cuatro tipos principales de estructuras sacarídicas precursoras. Las principales, tipo 1 y 2, se diferencian en las uniones entre Gal y N-acetilglucosamina, 1-3 y 1-4 respectivamente. Las enzimas FUT1 y FUT2 (α -1,2 fucosiltransferasas) son responsables de la síntesis de los antígenos H a partir de ellas por la adición de un grupo fucosa (Fuc), como muestran las *figuras 19 y 20*. De forma que FUT1 actúa preferentemente sobre las cadenas sacarídicas tipo 2 generando el antígeno H tipo 2, mientras que FUT2 actúa sobre las tipo 1 generando el antígeno H tipo 1, si bien también se ha descrito su acción sobre las cadenas tipo 2 y 3 (Barry et al., 2005).

Se han observado diferentes patrones de expresión para FUT1 y FUT2 según los tejidos (Morgan et al., 2000; Ravn et al., 2001). Los precursores tipo 1 se encuentran principalmente en el tracto digestivo y el aparato respiratorio y los precursores tipo 2 se encuentran fundamentalmente en la superficie de los eritrocitos. En la superficie de los enterocitos el gen FUT2 controla la expresión del antígeno H tipo 1, el ligando principal para la unión de las VLPs recombinantes a las células epiteliales intestinales (Mariounneau et al., 2002) y el receptor principal de NoV. También se ha descrito la unión de las VLPs recombinantes de virus Norwalk al antígeno H tipo 3 (Clausen et al., 1986a; 1986b), procedente de otras cadenas precursoras (Stanley et al., 2008).

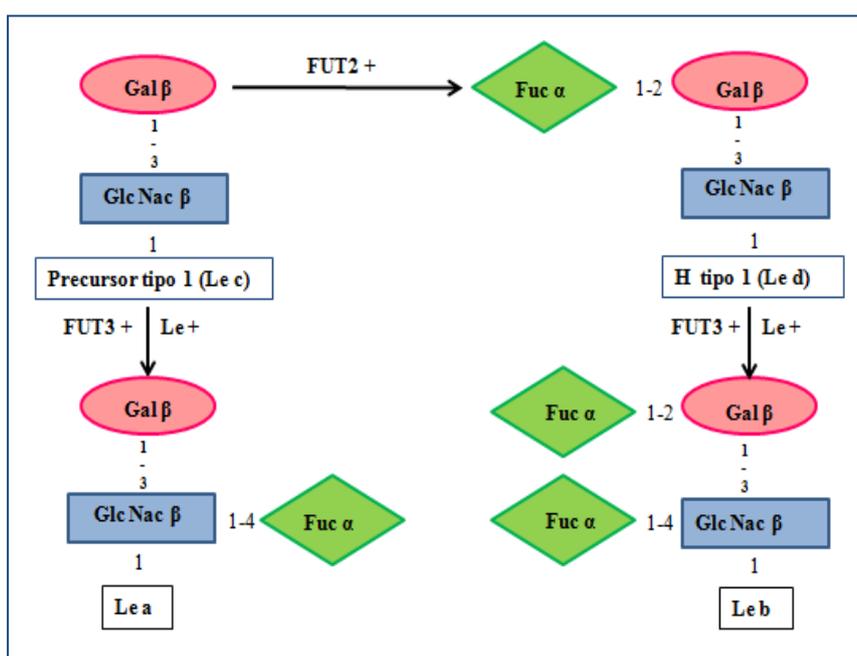


Figura 19. Vías de síntesis de antígenos HBGAs (modificado de Hutson et al., 2004).

La fucosiltransferasa 3 (FUT3) adiciona un grupo Fuc mediante enlaces α -1,3 o α -1,4 (Grollman et al., 1969). Su acción sobre el precursor tipo 1 tiene como resultado un trisacárido denominado antígeno Lewis a (Le a) y sobre el antígeno H tipo 1 el antígeno Lewis b (Le b), *figura 19*. De forma análoga la acción de la enzima FUT3 sobre el precursor tipo 2 tiene como resultado el antígeno Lewis x (Le x) y sobre el antígeno H tipo 2 el Lewis y (Le y), *figura 20*.

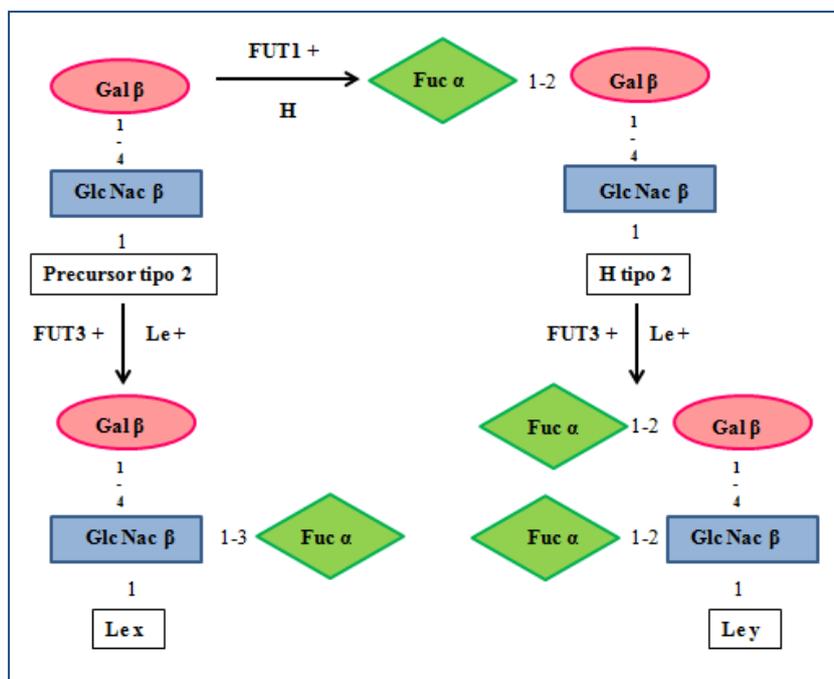


Figura 20. Vías de síntesis de antígenos HBGAs (modificado de Hutson et al., 2004).

El antígeno H sirve como sustrato para las glucosiltransferasas A y B, que unirán los epítopos A, B o ambos, es decir, una N- acetilgalactosamina (GlcNAc) y/o una galactosa (Gal) en el punto de unión α -1,3 a los trisacáridos H de tipo 1 o tipo 2 para producir un tetrasacárido A tipo 1 o tipo 2, B tipo 1 o tipo 2 o AB tipo 1 o tipo2, respectivamente (Tan et al., 2005b). La acción de la enzima FUT3 sobre los antígenos A o B tipo 1 resulta en un antígeno tetrasacárido denominado A Lewis b (A Le b) y B Lewis b (B Le b), respectivamente (Tan et al., 2005b), como vemos en la *figura 21*.

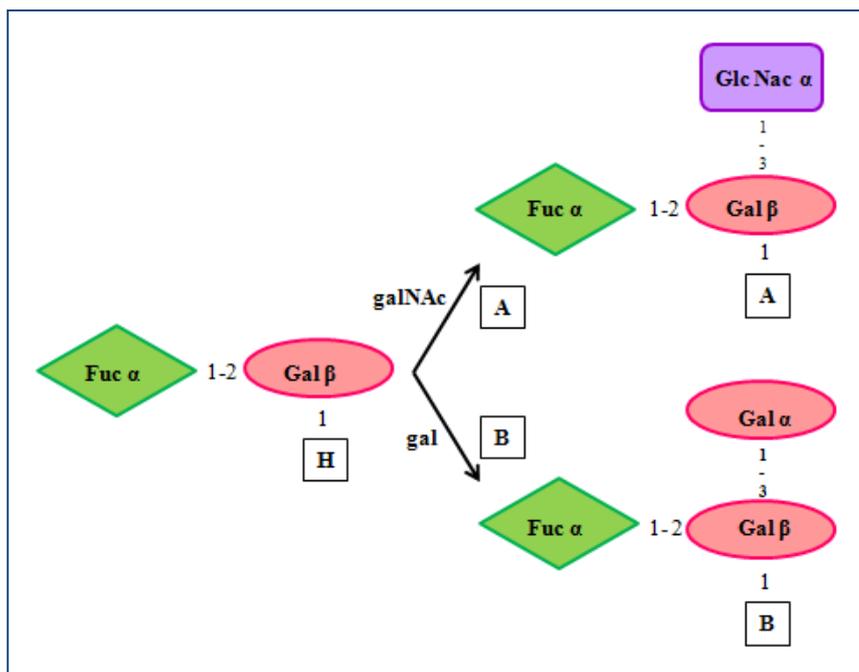


Figura 21. Vías de síntesis de antígenos HBGAs (modificado de Hutson et al., 2004).

Cada una de las familias de genes ABO, Lewis y secretor pueden contener alelos silentes que llevarían a fenotipos nulos de los loci, la presencia o ausencia de alelos de los genes FUT1, FUT2 y FUT3 que codifican las enzimas que glucosilan de forma secuencial distintos precursores de los receptores HBGA determina si un individuo es susceptible a la infección por una cepa determinada de NoV: (a) el gen recesivo FUT1 (“Bombay”) ocurre con una frecuencia muy baja (10^{-5} a 10^{-6} individuos), si bien no ha sido bien establecido cuál es su significado clínico (Marionneau et al., 2001), (b) el estado denominado “secretor” depende de la expresión del gen FUT2 que codifica la enzima α -1,2 fucosiltransferasa, es el principal determinante de la susceptibilidad a las infecciones por NoV de forma que los individuos con dos alelos mutados FUT2 carecen del antígeno H tipo 1 en sus células epiteliales intestinales y son denominados “no secretores” y muestran una resistencia a la infección por determinados NoV (Rockx et al., 2005b; Thorven et al., 2005), (c) el gen silente FUT3 se encuentra en aproximadamente un 10-20% de la población, los individuos que no lo expresan no producirán Le^a o Le^b en sus superficies mucosas (Marionneau et al., 2001), (d) asimismo, las mutaciones inactivadoras de la familia ABO son comunes y presentan una amplia variación entre las diferentes poblaciones y razas (Le Pendu et al., 2004).

3.9.2. Diversidad de los NoV en el reconocimiento de los receptores HBGA

Los NoV difieren considerablemente en su capacidad de reconocimiento de los receptores HBGA humanos (Figura 22). Usando un panel de muestras de saliva bien caracterizadas

representando diferentes grupos sanguíneos Huang et al. describieron 7 patrones de unión de NoV al receptor de acuerdo con el tipo ABO, Lewis y secretor de los donantes (Huang et al., 2003; Huang et al., 2005). Posteriormente, Harrington et al. describieron un patrón adicional (Harrington et al., 2002; Harrington et al., 2004). Además, se identificaron dos genotipos de NoV (VA115 y virus Desert Shield, DSV) que no se unieron a ninguno de los HBGA humanos (Huang et al., 2005). Estos mismos resultados se obtuvieron usando VLPs recombinantes de NoV generadas con un vector del VEE (Harrington et al., 2002) mediante la expresión del dominio P de la cápside en *Escherichia coli* (Tan et al., 2004; Tan et al., 2005c).

Los estudios basados en saliva han sido confirmados por medio de ensayos de unión y bloqueo usando oligosacáridos sintéticos análogos a los HBGA (Huang et al., 2005). En el caso del prototipo de NoV, el virus Norwalk, se observa su unión a la saliva de los tipos secretores A y O, pero no a la de los secretores B ni a los no secretores. De forma análoga se une a los oligosacáridos sintéticos tipo A, Le b, B Le b, H1 y H3, que son los productos HBGA esperados para los secretores A y O, pero no se une a los oligosacáridos producidos por los individuos de grupo B (Huang et al., 2005). Respecto a otros NoV, el genotipo VA387 (NoV GII.4) se une a los secretores A, B y O, pero se une muy excepcionalmente a los no secretores y por tanto reconoce los oligosacáridos sintéticos A, B, Le b, B Le b, H1 y H3, pero no Le a ni Le b. Asimismo, se han descrito comportamientos imprevisibles en la unión de los NoV a saliva y a oligosacáridos sintéticos, existen cepas que sólo reconocen A y B o bien A o bien B. Además los genotipos VA207, Boxer y OIF (Operation of Iraqi Freedom) se unen a la saliva de los secretores y no secretores con una afinidad variable (Huang et al., 2005), muestran actividades de unión impredecibles con los oligosacáridos sintéticos Lewis: OIF reacciona con Le^a, VA207 con Le b y B Le b, y Boxer con Le b y B Le b, pero ninguno de los tres genotipos reconoce los oligosacáridos A o B (Huang et al., 2005; Tan et al., 2005b).

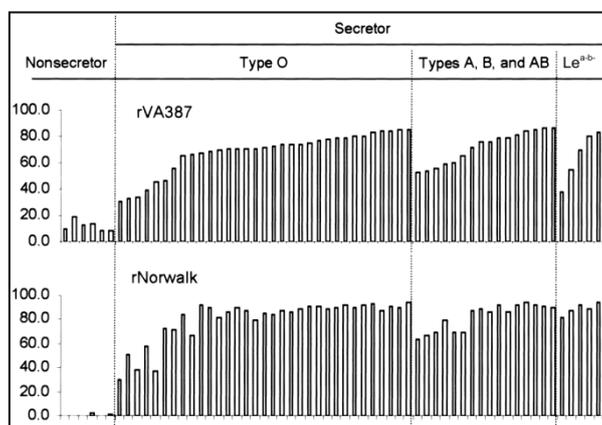


Figura 22. Inhibición de la unión de NoV por leche materna (modificado de Jiang et al., 2004a).

La actividad bloqueante de la leche materna de las primeras semanas postparto de 60 mujeres frente a la unión de 2 genotipos de NoV (VA387 y Norwalk) a receptores específicos se midió mediante ensayos de unión a receptores en saliva en presencia o ausencia de leche materna. La propiedad bloqueante se calculó en base a las diferencias de densidad óptica en presencia o ausencia de leche materna.

Los tipos de antígenos histosanguíneos se detallan en la parte superior de la figura.

Se han desarrollado muy diferentes aproximaciones al estudio de la especificidad de unión NoV-receptor HBGA como el bloqueo de la unión por leche humana o por anticuerpos monoclonales específicos de los antígenos H, los ensayos de hemaglutinación y la lisis de la unión mediante el tratamiento con glucosidasas específicas (Marionneau et al., 2002; Harrington et al., 2002; Hutson et al., 2003; Huang et al. 2003; Harrington et al., 2004; Huang et al., 2005).

Hay que tener en cuenta también que se han identificado discrepancias menores en los resultados obtenidos por diferentes métodos (Huang et al., 2005). Por ej. Hawaii, que no se une a ninguno de los HBGAs en los ensayos de saliva, reacciona con los oligosacáridos sintéticos A, B y Le^b. De forma similar, BUDS reacciona con los oligosacáridos sintéticos A y B, pero se une solamente a la saliva tipo A (Huang et al., 2005). Parris island (PiV), Mexico (MxV) y Hawaii no se unen a la saliva tipo O, pero sí al antígeno sintético Le b (Huang et al., 2005; Tan et al., 2005^a; 2005^b). Snow Mountain se une a los antígenos tipo B, pero un estudio en voluntarios no muestra una correlación con la infección clínica en estos individuos (Lindesmith et al., 2005). A pesar de lo imprevisible de estas actividades de unión, han demostrado ser reproducibles y dosis-dependientes.

Asimismo, se ha descrito la influencia de ciertos factores del huésped en la actividad de unión al receptor, por ej. la adición de extractos de heces resulta en un incremento significativo de la unión de ciertos genotipos a la saliva humana (Harrington et al., 2004).

3.9.3. Modelos de interacción NoV-HBGA

La gran susceptibilidad que muestra la población a diferentes cepas de NoV (Harrington et al., 2002; Huang et al., 2003; Harrington et al., 2004; Huang et al., 2005; Tan et al., 2005a) a pesar de la existencia de una especificidad en la unión de cada cepa de NoV a receptores HBGA (Parrino et al., 1977), plantea la hipótesis de la existencia de otros receptores adicionales o unas interacciones de un nivel de complejidad mayor al conocido en la unión de NoV-HBGA (Carlsson et al., 2009).

En relación a esto, los patrones de interacción NoV-HBGA referidos pueden dividirse en dos grandes grupos: los grupos de unión ABO y Lewis (Huang et al., 2005), como muestra la *tabla 9*. Todos los genotipos de los grupos de unión ABO (VA387, Grimsby, Norwalk, C59,

CALICIVIRUS. EL GÉNERO NOROVIRUS. Susceptibilidad del huésped.

MOH, PiV, MxV, BUDS, HV y SMV) se unen a los tipos A y/o B y O de saliva de los secretores, pero no parecen unirse a los no secretores. A diferencia de esto, los genotipos del grupo de unión Lewis (VA207, Boxer y OIF) se unen a los HBGAs de los no secretores y a los de tipo O de los secretores y no se unen o lo hacen débilmente a los tipos A y B de los secretores. Estas actividades débiles de unión de estos genotipos a los tipos A y B en saliva no se deben a la unión con los oligosacáridos A ni B, sino a los epítomos Lewis o H de las moléculas precursoras de los antígenos A o B de estos individuos, VA207 y Boxer podrían tener dos sitios de unión (uno para cada uno de los epítomos Lewis y H) mientras que OIF podría tener un sitio para el epítomo Lewis solamente (*figura 22*). Como se ha comentado previamente, estos genotipos no reconocen los epítomos A y B, de hecho su presencia podría tener un efecto negativo (de enmascaramiento de epítomo) que justificaría la baja actividad de unión de los genotipos Lewis con los tipos A y B de secretores en saliva en comparación con la saliva de los no secretores o de los secretores tipo O, en los cuales la unión podría resultar de las moléculas precursoras como A Le b o B Le b antes de que se convirtieran en los antígenos maduros A y B, respectivamente. Este efecto de enmascaramiento de epítomo es más aparente en el genotipo VA207, en el cual las VLPs revelan una típica interacción en tres pasos que muestra una unión más fuerte a la saliva de los no secretores, de intensidad intermedia a la saliva de los secretores tipo O y más débil a los de tipo A y B. En el caso de Boxer, el epítomo H podría tener un papel más importante, pero el enmascaramiento de los epítomos ABO también existe. Al comparar los perfiles de unión de los tres genotipos Lewis, el efecto de enmascaramiento del epítomo B parece más fuerte ya que ninguno se une a saliva de individuos secretores tipo B.

Tabla 9. UNIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS/HBGAS SINTÉTICOS A VLPS DE NOV (Huang et al., 2005)

OLIGOSACÁRIDOS/ HBGAs	GENOTIPOS DE NOV									
	GRUPO DE UNIÓN ABO							GRUPO DE UNIÓN LEWIS		
	VA387	Norwalk	MxV	PiV	HV	MOH	BUDS	OIF	VA207	Boxer
Le^a (tri-)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Le^b (tetra-)	++	++	+	+	+	-	-	-	-	++
Le^x (tri-)	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
Le^y (tetra-)	++++	+	-	-	-	-	-	-	+++	++
H-1 (tri-)	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
H-2 (tri-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H-3 (di-)	++++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A (tri-)	++++	+++	++	+	+	+++	+++	-	-	-
B (tri-)	++++	-	+	++	++	+++	+++	-	-	-

Para dilucidar la relación entre los dos grupos de unión se ha propuesto un modelo de interacción del NoV al HBGA (Huang et al., 2005; Tan et al., 2004), que asume que la proteína de la cápside de cada genotipo tiene una superficie de unión que puede acoplar uno o dos epítomos de los tres HBGAs mayores (ABO, H o Lewis), como muestra la *figura 23*. Cada uno podría unirse a esta superficie de forma independiente y la participación de ambos epítomos en la unión puede resultar en una ampliación de las especificidades del huésped para los diferentes genotipos.

Por ejemplo, todas las cepas del grupo de unión ABO tienen un sitio común para los epítomos ABO, mientras que las cepas VA387, GrV y Norwalk tienen un sitio adicional para el epítomo H por lo que estos genotipos tienen un rango más amplio de posibles huéspedes que aquellos con un solo sitio de unión a los epítomos ABO, como MOH, BUDS y SMV.

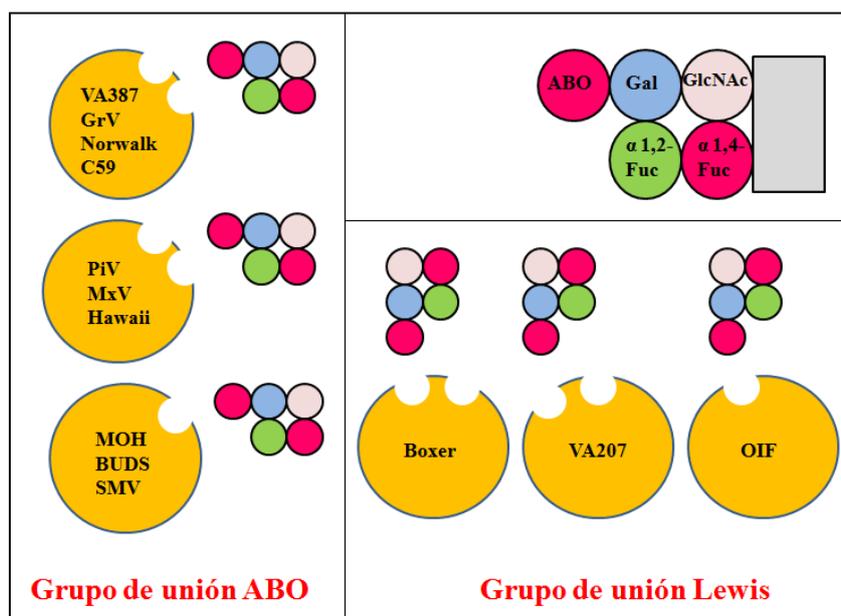


Figura 23. Representación gráfica de la interacción de NoV y HBGA basada en la clasificación en dos grupos de unión de NoV con los HBGA: el grupo de unión ABO y Lewis (Tan et al., 2005b).

La estructura de cinco círculos mostrada en la esquina superior derecha representa el pentasacárido, producto final de la vía de síntesis de los HBGA. Asimismo, se indican los sitios potenciales de unión de los diferentes géneros de NoV para los epítomos de los HBGA.

3.9.4. Múltiples redes de interacción entre NoV y los receptores HBGA

Recientemente se han obtenido por cristalografía de alta resolución los detalles estructurales del dominio P de VA387 unido al receptor HBGA (Cao et al., 2007), lo que nos proporciona un conocimiento mucho más profundo de la estructura establecida para la

interacción de ambos y permite una correlación con los estudios de funcionalidad por medio de ensayos de mutagénesis dirigida (Prasad et al., 1994a; 1994b; Prasad et al., 1999; Tan et al., 2006; Tan et al., 2005c; Tan et al., 2003; Tan et al., 2004; Chakravarti et al., 2005).

Los HBGAs nativos de la superficie celular y los sitios de unión al receptor de las cápsides virales son multivalentes y podrían formar una gran red con diferentes niveles de interacción que proporcionarían una gran afinidad en las interacciones del virus con el huésped. Los estudios de densidad electrónica han descrito extensas redes de enlaces hidrogenados entre la cápside y los ligandos sacarídicos. Una de las principales cadenas laterales de los receptores de ligandos, la α -1,3-Fuc (el epítipo H), interacciona de forma intensa con una cavidad abierta en la superficie de interacción de la unión al receptor que se compone de tres integrantes: (1) Ser343, Thr344 y Arg345 sobre una cadena β -laminar que forma el fondo de la cavidad, (2) Asp374 mediante una curvatura larga forma un muro en la cavidad y (3) Ser441, Gly442 y Tyr443 por medio de otra curvatura forman otro muro en la misma. Los epítipos A y B (N-acetilgalactosamina y galactosa, respectivamente) probablemente interaccionan con Ala346, Lys348 y Ser441 (Cao et al., 2007), un sitio de interacción más lejano del anillo de β -1,3-Gal junto a los epítipos A y B cercano a Asp391, cuya unión podría favorecer la afinidad de interacción a los receptores. La superficie de interacción de unión al receptor se encuentra en los dímeros P, indicando que la dimerización del dominio P no es sólo importante para la formación de la cápside sino también esencial para el funcionamiento de la unión al receptor. Además de las interacciones específicas descritas, podrían ocurrir otras para estabilizar la unión del NoV al receptor específico (Tan et al., 2003; Tan et al., 2004; Chakravarti et al., 2005; Tan et al., 2005c). En ellas podrían intervenir aminoácidos alrededor de la superficie de interacción de unión con los residuos glucídicos y moléculas diferentes de los HBGAs como la proteína de membrana de 105 KDa y el heparán sulfato (Tamura et al., 2000; Tamura et al., 2004).

3.9.5. Participación de los HBGA en la inmunidad del huésped frente a NoV

El descubrimiento de la asociación entre HBGAs específicos y la infección clínica por NoV ha supuesto un avance muy significativo en la investigación de estos virus, pues explica una serie de cuestiones controvertidas acerca de sus mecanismos de infección y respuesta inmunitaria que han desconcertado a los científicos durante décadas.

En primer lugar, en los estudios con voluntarios sanos se observaba mayor susceptibilidad a la infección en aquellos individuos con títulos de anticuerpos específicos más altos previos a la exposición (Parrino et al., 1977; Greenberg et al., 1979; Black et al., 1982; Blacklow et al., 1982; Baron et al., 1984; Blacklow et al., 1987; Kapikian et al., 1996) y resistencia a la misma en los que carecían de ellos (Parrino et al., 1977). Además, al analizar los brotes epidémicos era

característica la existencia de un enclaustramiento del virus en una misma familia y no la habitual propagación por razones de cercanía o contacto (Kappus et al., 1982).

En base a estas observaciones se formuló la hipótesis de la existencia de un factor genético que participaría en los mecanismos de especificidad del huésped y determinaría su susceptibilidad o resistencia, lo que llevó al descubrimiento de la participación de los HBGA en el reconocimiento de los NoV por el huésped.

Actualmente se interpreta que aquellos voluntarios que nunca se infectaron con NoV tras la exposición no debían tener receptores en su mucosa intestinal que permitieran su internalización y posterior replicación. En cambio aquellos individuos con niveles elevados de anticuerpos frente a NoV serían susceptibles a estas infecciones al indicar estos anticuerpos una exposición e infección en el pasado por los viriones, debido a la presencia de receptores HBGA en los enterocitos.

Sin embargo, los anticuerpos producidos no serán protectores si los genotipos de NoV que han desencadenado su producción guardan una relación antigénica débil con los responsables del nuevo contacto (Kitamoto et al., 2002; Lochridge et al., 2005; Hansman et al., 2006) o, en caso de tratarse de genotipos homólogos, si ha transcurrido un periodo superior a 14 semanas. En consecuencia, los niveles elevados de anticuerpos sólo sirven como un marcador de exposición en el pasado a ciertos genotipos de NoV pero no condicionan inmunidad protectora en el sentido clásico de la misma.

3.9.6. Los HBGA de la leche materna como receptores señuelo para NoV

Las evidencias clínicas observadas en estudios retrospectivos de niños lactados al pecho frente a niños que toman fórmula (Newburg et al., 1995b; Jiang et al., 2004a; 2004b; Morrow et al., 2005; Newburg et al., 2005a; 2005b; Marionneau et al., 2005; Newburg et al., 2009), así como en estudios prospectivos de cohortes de madre-hijo que analizan la incidencia de la infección por NoV en estos niños (Morrow et al., 2004) muestran que, además de los nutrientes que proporciona, la leche materna contiene elementos beneficiosos que protegen a los niños frente a enfermedades infecciosas.

La leche humana contiene cientos de oligosacáridos con complejas estructuras y diferentes tamaños (Kunz et al., 2000), que pueden ser una rica fuente de receptores que actuarían como señuelo para muchos patógenos.

La composición de dichos oligosacáridos viene dada por diferentes factores constitucionales de las madres, que podrían explicar la variabilidad existente en su unión a los NoV. Jiang et al. diseñaron un panel de muestras de leche de madres sanas para estudiar su capacidad de bloqueo de la unión de las VLPs de NoV a los antígenos HBGA y describieron

actividades bloqueantes significativamente diferentes en relación con los grupos sanguíneos de las madres donantes y los genotipos de NoV usados en los ensayos (Jiang et al., 2004a; 2004b), *figura 22*.

3.10. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN EVOLUTIVA

El género NoV presenta una enorme variabilidad genética que se explica por mutaciones puntuales y por recombinación entre diferentes fragmentos homólogos de ARN que por coinfección han entrado en una misma célula (Oliver et al., 2004). Asimismo, se ha descrito la recombinación genética entre fragmentos heterólogos, es decir entre diferentes genogrupos, genotipos y subgenotipos, incluso entre los genogrupos de NoV que producen infecciones en animales (II, III y V), lo que sugiere la posibilidad de infecciones zoonóticas en humanos (Phan et al., 2007). En relación con esto, se ha publicado una clasificación de NoV que, a diferencia de los esquemas existentes (basados en los análisis filogenéticos convencionales), organiza los virus en diferentes genogrupos y genotipos según sus propiedades funcionales, resultado de las sutiles variaciones evolutivas que han experimentado (Chakravarty et al., 2005).

El estudio de los mecanismos evolutivos de persistencia de los NoV se ha realizado, fundamentalmente, con el genogrupo GII.4, el genotipo predominante a nivel mundial en los últimos 20 años. Se ha propuesto que GII.4 ha sufrido un proceso de evolución secuencial similar al ocurrido con los virus gripales (Donaldson et al., 2008). La mayor parte de sus variaciones ocurren cerca del dominio de unión al receptor, en la proteína VP1, y consisten en cambios de aminoácidos de la región P2 (Nilsson et al., 2003) y en zonas adyacentes de la región P1 (Donaldson et al., 2008), no obstante también se han descrito cambios en la región altamente conservada de la ARN-polimerasa (Vinjé et al., 2000a). Estas variaciones permitirían escapar a los virus del reconocimiento por los anticuerpos y originarían nuevos patrones de unión a los receptores HBGA (Donaldson et al., 2008; Lindesmith et al., 2008), lo que explicaría la posibilidad de infección a individuos no secretores descrita en numerosas publicaciones (Jiang et al., 2004a; 2004b; Carlsson et al., 2009; Tan et al., 2009).

Las variaciones antigénicas no son la única razón para la alta prevalencia de los NoV. Como se ha comentado previamente, el hecho de que un NoV específico sea capaz de reconocer diferentes antígenos histosanguíneos y, por tanto, un amplio espectro de huéspedes también contribuye a ello (Tan et al., 2005a; 2005b).

4. INMUNIDAD DE LA LECHE MATERNA

4.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Paul von Ehrlich publicó en 1891 las primeras evidencias de que la lactancia materna podía conferir una protección inmunitaria al lactante tras realizar estudios en modelos animales de experimentación (Von Ehrlich., 1891, citado por Cheeda et al., 1998). Sin embargo, no fue hasta la primera mitad del siglo XX cuando se desarrollaron estudios en humanos para investigar esta hipótesis. Entonces Woodbury y Grulee et al. observaron que la incidencia y la gravedad de las enfermedades diarreicas era mucho menor en los niños lactados al pecho frente a aquellos alimentados con fórmula (Woodbury., 1922; Grulee et al., 1934; Grulee et al., 1935). En los años 50, debido a la mejora en la composición de las fórmulas lácteas artificiales y a la mayor ganancia de peso de los niños alimentados con ellas, muchos recomendaron la alimentación con fórmula de modo preferente a la leche materna lo que se relacionó con una morbilidad y mortalidad crecientes debido a diarrea aguda y enfermedades respiratorias en los lactantes. A raíz de ello resurgió el interés acerca del estudio de las posibles propiedades protectoras de la leche materna frente a estas entidades.

Se publicaron numerosas descripciones acerca de la diferente morbi-mortalidad en los lactantes alimentados al pecho o con fórmula, tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados (Wyatt et al., 1969; Mata et al., 1969b; Glass et al., 1976; Clemens et al., 1986; McLean et al., 1986; Glass et al., 1989) y se demostró que el espectro de protección proporcionado por la lactancia materna incluía tanto las infecciones intestinales bacterianas como víricas, incluyendo *Shigella* sp. (Mata et al., 1969a; Clemens et al., 1986; Glass et al., 1989), *Salmonella* sp. (Glass et al., 1989), *Escherichia coli* (Glass et al., 1989), *Vibrio cholerae* (Glass et al., 1983), rotavirus (Totterdell et al., 1976; McLean et al., 1981; Duffy et al., 1986) y poliovirus. Además, la diferente susceptibilidad a la adquisición de infecciones en niños lactados al pecho y alimentados con fórmula también se observó en relación con las infecciones respiratorias (Downham et al., 1976; Kramer et al., 1988; Howie et al., 1990; Pullan et al., 1990; Hamosh et al., 1991; Grulee et al., 1991).

Para explicar estos hallazgos se plantearon inicialmente diversas hipótesis: (a) que la leche materna, al tener menor grado de contaminación por microorganismos patógenos que la fórmula, transmitía menos infecciones a través de ella, (b) que debido al espaciamiento entre los nacimientos que implica el efecto contraceptivo de la lactancia la existencia de niños susceptibles a agentes infecciosos comunes era menor en familias donde se practicaba la lactancia materna y (c) que los niños lactados al pecho se encontraban con menor probabilidad en residencias infantiles y por tanto tenían una menor exposición a otros niños, portadores de patógenos microbianos (Wyatt et al., 1969).

Sin embargo, la resistencia natural frente a infecciones intestinales y respiratorias observada en los niños lactados al pecho no parecía explicarse completamente por estas circunstancias epidemiológicas, se planteó que debían existir componentes con propiedades protectoras en la leche materna responsables de tal propiedad. Así, Wyatt y Mata describieron una menor incidencia de infecciones en los niños que tomaban lactancia materna incluso cuando ciertas bacterias como *Shigella* sp. se identificaban en la leche (Wyatt et al., 1969) y demostraron que la cercanía a otros niños no explicaba por completo las diferencias de incidencia de infecciones en los lactantes.

Además, la leche materna ha demostrado sus propiedades protectoras en un grupo de niños especialmente susceptibles a la infección como son los recién nacidos pretérmino. En ellos el retraso madurativo del sistema inmunitario, los problemas médicos que presentan (las enfermedades pulmonares, digestivas y los trastornos nutricionales) y la necesidad de procedimientos clínicos invasivos incrementan el riesgo de adquisición de infecciones por agentes oportunistas (Aerde, 1991). Winberg et al. en Suecia fueron los primeros en publicar que el riesgo de sepsis disminuye en los recién nacidos pretérmino alimentados con leche humana (Winberg et al., 1971). Estas observaciones fueron confirmadas por Yu et al. en Australia y Narayanam et al. en la India, quienes encontraron una relación directa entre la administración de suplementos alimenticios extraídos de la leche materna y una menor frecuencia de infección en recién nacidos de muy bajo peso (Yu et al., 1981; Narayanam et al., 1980).

Los estudios epidemiológicos sugieren que la leche humana protege frente a la enterocolitis necrosante (Eibl et al., 1988) y, aunque se han desarrollado múltiples investigaciones para esclarecer los factores responsables de esta protección, estos no han sido completamente elucidados (Lucas et al., 1990a). Además, existen evidencias experimentales de que uno de los componentes antiinflamatorios de la leche humana (la α -1-antitripsina) previene frente a muchas de las alteraciones vasculares y pulmonares que suceden como consecuencia de la exposición a un ambiente hiperóxico en ratas recién nacidas, tales como la elevación de la actividad elastolítica pulmonar (Koppel et al., 1994). En cuanto a los efectos de la lactancia materna en los recién nacidos pretérmino tras la hospitalización inicial, Malloy y Graubard revisaron la relación entre el tipo de alimentación y diferentes factores biológicos y sociales en la tasa de rehospitalización de los niños que habían nacido prematuramente y demostraron que la alimentación con leche materna fue un factor predictor independiente para un menor riesgo de rehospitalización en estos niños (Malloy et al., 1994).

La adquisición de conocimientos acerca del sistema inmunitario de la leche materna fue un proceso lento que se inició en la última parte del siglo XVII, cuando Van Leeuwenhoek

observó unas estructuras en la leche materna que no fue capaz de identificar (Van Leeuwenhoek et al., 1695, citado por Cheeda et al., 1998). En 1837 Alfred Donné describió unos glóbulos y corpúsculos granulares en la leche humana (Donné et al., 1837, citado por Cheeda et al., 1998), pero debido a la falta de extensiones citológicas adecuadas no se identificaron como células hasta principios del siglo XX ni como leucocitos hasta 1968 (Smith et al., 1968).

En la década de los 70 se conocían los siguientes aspectos generales del mismo (Goldman et al., 1973; Goldman et al., 1986): (a) gran similitud al sistema inmunitario de las mucosas, (b) adaptación de sus componentes a resistir en un ambiente hostil del tracto gastrointestinal, al no modificarse por los enzimas digestivos ni los cambios de pH, (c) actividad sinérgica de sus agentes efectores en la destrucción de ciertas bacterias, (d) protección independiente de la activación de cascadas inflamatorias y (e) relación inversa de la producción diaria de diferentes factores y su secreción a través de la leche materna con la habilidad del niño lactado para generar dichos agentes en sus mucosas, es decir una evolución coordinada de la maduración del sistema inmunitario del niño y la habilidad de la madre para producir y secretar factores inmunitarios de la glándula mamaria a la leche.

El sistema inmunitario de la leche materna, sus características y la mayoría de sus componentes se han conocido en las cuatro últimas décadas. En la actualidad, se conoce con mucha mayor extensión su organización y mecanismos de acción.

4.2. MECANISMOS DE PROTECCIÓN

4.2.1. Factores probióticos

En 1905 Tissier et al. (Cheeda et al., 1998), documentaron la diferencia de composición de la microflora intestinal entre los niños lactados al pecho y los alimentados con fórmulas lácteas. Los niños que tomaban leche materna mostraban un predominio de lactobacilos, en particular *Lactobacillus bifidus* (conocido actualmente como *Bifidobacterium bifidum*) en sus heces (György et al., 1974; Nichols et al., 1975; Bezkorovainy et al., 1979; Bezkorovainy et al., 1981), en cambio en la microbiota intestinal de los niños alimentados con fórmulas adaptadas y de los adultos se aisló *Escherichia coli* principalmente (Tissier, 1905).

Debido a que *Lactobacillus* sp. produce grandes cantidades de ácido acético y láctico a partir de lactosa, la presencia de estos ácidos junto con la baja capacidad tampón de la leche humana hace que el pH en el intestino distal sea de aproximadamente 5, lo que puede impedir la colonización por muchos patógenos (Fomon, 1995). Además las cepas de *Lactobacillus GG* colaboran en la recuperación de la gastroenteritis aguda por rotavirus (Isolauri et al., 1991) y podrían incrementar la formación de anticuerpos IgA, IgM, e IgG específicos frente a estos

virus entéricos (Kaila et al., 1992). Es por ello por lo que se planteó la hipótesis de que la leche materna podría mediar la protección del niño lactado frente a ciertos patógenos intestinales a través de componentes promotores de la colonización por *Lactobacillus bifidus*.

Sin embargo, no fue hasta 1974 cuando se aisló un glicano de la leche materna con propiedades promotoras del crecimiento de *Lactobacillus bifidus* y se identificó con el previamente denominado “factor bifidus” (Gyorgy et al., 1974). Posteriormente se han reconocido otros glicanos, especialmente en la fracción de caseínas, no digeribles y capaces de modificar la microflora intestinal actuando como una fuente nutricional para la microbiota saprofita (Macfarlane et al., 1997), es decir con un efecto prebiótico (Bezkorovainy et al. 1979; Bezkorovainy et al., 1981).

4.2.2. Anticuerpos secretores

Los anticuerpos secretores se encuentran, junto con la lactoferrina, la lisozima, las mucinas y la lactadherina, entre las principales proteínas de la leche materna que presentan actividad antimicrobiana directa.

Tras el descubrimiento de la IgA secretora (IgAs) en la leche humana por Hanson en 1961 este anticuerpo ha sido considerado el componente protector principal de la leche materna (Hanson et al., 1961; Hanson et al., 1962), puesto que las elevadas concentraciones de IgA en el calostro parecían explicar un mecanismo de transmisión de factores inmunitarios de la madre al niño adicional al paso transplacentario de IgG durante la gestación.

La IgA constituye más del 95% de las inmunoglobulinas de la leche materna (Goldman et al., 1989), está integrada por dos monómeros idénticos de IgA formados por cadenas ligeras λ que se encuentran unidos por un polipéptido de 75 KDa denominado *cadena de unión* a diferencia de las inmunoglobulinas del suero humano en las que predominan las cadenas ligeras κ (Brown et al., 1976). La IgA dimérica sufrirá varias modificaciones que la transformarán en IgAs *in situ*.

El descubrimiento de anticuerpos tipo IgA en la leche materna con especificidad frente a patógenos inusuales (*tabla 10*) y las investigaciones sobre su origen han permitido conocer que los eventos desencadenantes de la producción de IgA secretora específica frente a ciertos patógenos podrían ser las infecciones maternas por estos agentes (Goldblum et al., 1975). Se plantea que los patógenos que producen estas infecciones podrían estimular las células mononucleares de las placas de Peyer del intestino delgado distal (en el caso de las infecciones intestinales) y otros centros linfoides (en el caso de infecciones de diferente origen). Como consecuencia, tendría lugar una liberación de citoquinas (Erle et al., 1994) que inducirían a los linfocitos B IgM⁺ a transformarse en células B IgA⁺ o a completar su diferenciación final a células secretoras de IgA (Beagley et al., 1989; Schultz et al., 1991; Kono et al., 1991;

Whitmore et al., 1991). Estas células, probablemente, migrarían secuencialmente a través de los canales intestinales linfáticos, el conducto torácico y la circulación vascular, gracias a hormonas lactogénicas y otros factores no conocidos completamente, (Roux et al., 1978; Weisz-Carrington et al., 1978) hasta la glándula mamaria y el árbol bronquial (Fishaut et al., 1981; Streeter et al., 1988). Al parecer su diferenciación hacia células plasmáticas tendría lugar a su llegada y con esta configuración permanecerían en la lámina propia de la glándula mamaria. Los dímeros de IgA producidos por aquellas células plasmáticas se transformarían en IgAs en este momento y se unirían a los receptores de polímeros de inmunoglobulinas de la pared basolateral de las membranas celulares del epitelio de la glándula mamaria (Brown et al., 1976; Brandtzaeg et al., 1978; Mostov et al., 1982; Crago et al., 1982; Bakos et al., 1991). El complejo resultante receptor-dímero de IgA sería transportado al extremo apical de la célula, donde la porción intracitoplasmática original del receptor se retiraría y la molécula resultante, la IgA secretora se secretaría a la leche (Brandtzaeg et al., 1978; Mostov et al., 1982).

Es conocido que la primera subclase de IgA (IgA₁) es susceptible a las proteasas intestinales que atacan la región bisagra de la molécula (Gilbert et al., 1983) y la desestructuran, pero la segunda subclase (IgA₂) es resistente a ellas y su abundancia en la leche materna garantiza el aporte suficiente al recién nacido (Lindh et al., 1985; Goldman et al., 1989). La leche materna además contiene anticuerpos de tipo IgAs frente a las proteasas anti-IgA que ayudan a evitar la destrucción de esta inmunoglobulina (Gilbert et al., 1983). Un dato que confirma la resistencia de la IgA de la leche materna a los enzimas digestivos es la presencia de IgA en las heces de los recién nacidos, aproximadamente 30 veces mayor a la encontrada en los niños alimentados con fórmula (Schanler et al., 1986; Prentice et al., 1987; Goldblum et al., 1989). Cuando es ingerida por el lactante, la resistencia de la IgA secretora a los enzimas digestivos permite que alcance el intestino delgado donde se une a los patógenos entéricos y así protege al niño lactado (Hanson et al., 1991), de forma análoga sucede en el caso del árbol bronquial y las infecciones respiratorias (Goldman et al., 1985; Slade et al., 1987).

En resumen, las vías enteromamaria y broncomamaria podrían ser los medios por los que se confiere una protección inmunitaria mediada por IgAs frente a patógenos específicos intestinales y respiratorios a los recién nacidos que toman lactancia materna, lo que es relevante porque los anticuerpos de la mucosa intestinal y respiratoria y el repertorio de inmunoglobulinas de unión al antígeno no se producen de forma óptima durante la infancia más precoz (Adderson et al., 1992).

Tabla 10. IgA SECRETORA EN LECHE MATERNA FRENTE A PATÓGENOS MICROBIANOS COMUNES

BACTERIAS Y TOXINAS	VIRUS	OTROS
<i>Escherichia coli</i>	Rotavirus	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Shigella</i> sp.	Virus respiratorio sincitial	<i>Candida albicans</i>
<i>Salmonella</i> sp.	Poliovirus	
<i>Campylobacter</i> sp.	Otros Enterovirus	
<i>Vibrio cholerae</i>	Virus Influenza	
<i>Haemophilus influenzae</i>	Citomegalovirus	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	VIH	
<i>Clostridium difficile</i>		
<i>Clostridium botulinum</i>		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Helicobacter pylori</i>		

La concentración de IgAs en la leche materna es mayor en el calostro (Goldblum et al., 1982) y declina progresivamente hasta un nivel de 1 mg/ml aproximadamente en etapas posteriores de la lactancia (Asensi et al., 2006; Goldman et al., 1982). Se estima que la media aproximada de ingesta diaria de IgA en el recién nacido a término, sano, lactado al pecho es de 125 mg/kg/día con un mes de vida y 75 mg/kg/día a los 4 meses (Butte et al., 1984), cantidades suficientes para garantizar las mencionadas propiedades protectoras al niño en todas las etapas de la lactancia (Goldblum et al., 1982; Goldman et al., 1982; Goldman et al., 1983; Butte et al., 1994).

La protección por la IgA parece ser un mecanismo efectivo principal para proteger a los niños de los patógenos a los que la madre se ha expuesto previamente. Sin embargo, el decalaje temporal existente entre la exposición materna a un nuevo patógeno y la aparición de IgAs en su leche supone un tiempo suficiente para que el patógeno pueda establecer la infección en el niño si éste se expone a él, por lo que se planteó que debían de existir otros factores protectores en la leche materna que explicaran las evidencias clínicas observadas.

Tras el descubrimiento de la IgAs de la leche materna, se identificaron otros tipos de inmunoglobinas en la leche humana. Se ha descrito la presencia de IgM en la leche materna aunque en mucha menor concentración que en el suero (Mata et al., 1971; Jatsyk et al., 1985). Además existen diferencias estructurales entre la IgM láctea y sérica, pues si bien ambas presentan una estructura pentamérica, algunas moléculas de IgM de la leche humana presentan

componentes secretores asociados (Goldman et al., 1989). En cuanto a su especificidad, parece desarrollarse de forma similar a lo descrito para la IgA.

La IgG está también presente en pequeñas cantidades en la leche materna (Mata et al., 1971; McClelland et al., 1978; Keller et al., 1984; Jatsyk et al., 1985; Goldman et al., 1989), de hecho todas las subclases de IgG han sido detectadas en ella (Keller et al., 1983), observándose una mayor proporción de IgG₄ en la leche humana que en el suero (Keller et al., 1983). Asimismo, existen pequeñas cantidades de IgD en la leche materna (Keller et al., 1984). En cambio la IgE está prácticamente ausente (Underdown et al., 1976).

4.2.3. Otros componentes defensivos de la leche materna

Se ha detectado un grupo heterogéneo de componentes de la leche materna que presentan una acción sinérgica y complementaria a la de los anticuerpos secretores y otros factores inmunitarios de la leche materna (*Tabla 11*).

4.2.3.1. Inhibidores del metabolismo de los patógenos

La lactoferrina es una glicoproteína de cadena única con dos componentes globulares, cada uno de los cuales presenta un sitio de unión al hierro (Anderson et al., 1980).

Posee reconocidas propiedades antimicrobianas: (a) un 90% de la lactoferrina presente en la leche materna se une a ciertas bacterias y hongos y tras quelarlos con hierro impide su proliferación (Bullen et al., 1972; Stephens et al., 1980; Spik et al., 1982; Sturat et al., 1984), proceso que favorece el bicarbonato, principal tampón de la leche materna; (b) uno de sus fragmentos (la lactoferricina) destruye ciertos microorganismos dañando sus membranas externas, para lo que requiere Ca²⁺, Mg²⁺ y Fe³⁺ (Arnold et al., 1977; Bellamy et al., 1993; Yamauchi et al., 1993); (c) además, existe alguna evidencia de que isoformas de lactoferrina podrían proteger frente a ciertos retrovirus por medio de un proceso independiente a la quelación del hierro (Furmanski et al., 1989), (d) asimismo, las actividades promotoras del crecimiento epitelial que inicia la lactoferrina contribuyen a la defensa del niño lactado (Nichols et al., 1987).

La concentración media de la lactoferrina en el calostro humano está entre 5 y 6 mg/ml (Goldblum et al., 1982). En las siguientes etapas de la lactancia el aumento de volumen de producción de leche aumenta y la concentración de lactoferrina cae aproximadamente a 1 mg/ml a los 2 o 3 meses de lactancia (Goldman et al., 1982). De esta forma la ingesta media de lactoferrina en un niño sano, a término y lactado al pecho es de 260 mg/kg/día al mes de vida y de 125 mg/kg/día a los 4 meses, aproximadamente (Butte et al., 1984).

Debido a la resistencia natural a la proteólisis de la lactoferrina (Samson et al., 1980; Brines et al., 1983; Spik et al., 1966) su excreción fecal es muy superior en niños lactados al

pecho respecto a los alimentados con fórmula (Spik et al., 1982; Schanler et al., 1986; Davidson et al., 1987). La cantidad de lactoferrina excretada en las heces de niños alimentados con leche materna es cercana a 185 veces la excretada por los niños alimentados con fórmula (Wyatt et al., 1969), aunque hay que considerar que esta cifra podría sobreestimar la realidad debido a la presencia de fragmentos inmunorreactivos de lactoferrina en las heces de los niños lactados al pecho (Goldman et al., 1990).

Además, se ha cuantificado un aumento de la excreción urinaria de lactoferrina intacta y fragmentada (Schanler et al., 1986; Goldman et al., 1990), habiéndose demostrado mediante estudios isotópicos que procede de la leche ingerida que tras ser absorbida a nivel intestinal, alcanza la circulación vascular y es filtrada en el riñón (Hutchens et al., 1991).

La κ -caseína es una proteína altamente glicosilada con residuos de ácido siálico cargados (Brignon et al., 1985).

La infección por *Helicobacter pylori* aparece en individuos cada vez menores pero la leche materna parece que provee de cierta protección, pues junto con la IgAs y la lactoferrina podría evitar la unión de *Helicobacter pylori* a la mucosa gástrica humana (Strömquist et al., 1995). La κ -caseína también ha demostrado su capacidad de bloquear la unión de ciertas bacterias a la mucosa actuando debido a su analogía estructural con los receptores de mucosas (Nweburg et al., 1997).

Muy pocos estudios se han centrado en la potencial actividad antimicrobiana de la α -lactoalbúmina. Sin embargo, recientemente se han encontrado 3 fragmentos polipeptídicos con esta propiedad frente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* sp. y *Candida albicans* (Pelligrini et al., 1999). Estos fragmentos son producto de la digestión de la α -lactoalbúmina en el tracto gastrointestinal.

La haptocorrina o proteína ligadora de la vitamina B12 es sensible a la digestión proteolítica en el tracto gastrointestinal del lactante (Goldman et al., 1985), lo que impide que inhiba el crecimiento de patógenos. No obstante, es capaz de impedir el crecimiento de bacterias en la mama y favorecer el transporte de la vitamina B12 desde la circulación a la leche de mujer.

La proteína ligadora de folato se encuentra en muchos tejidos y líquidos corporales. Puede actuar concentrando el folato en la leche o bien facilitando su captación por los receptores de la mucosa con lo que se evita su captación por las bacterias intestinales (Scott et al., 1990). No obstante, no hay pruebas *in vivo* de que ninguno de estos mecanismos tenga ninguna repercusión para la madre o el niño (Scott et al., 1990).

4.2.3.2. Enzimas

La lisozima es una enzima formada por fragmentos proteicos de cadena única de 15 KDa de peso molecular.

Tiene la propiedad de lisar ciertas bacterias con puntos de unión susceptibles, como son las uniones β -1,4 entre el ácido N-acetilneuramínico y los residuos de 2-acetilamino-2-deoxi D-glucosa presentes en sus paredes celulares (Chipman et al., 1969).

Existen concentraciones relativamente altas de lisozima en la leche humana (Chandall et al., 1964; Jolles et al., 1967; Peitersen et al., 1975; Goldblum et al., 1982; Goldman et al., 1982; Goldman et al., 1983; Butte et al., 1983), siendo su concentración media de 70 mcg/ml en el calostro (Goldblum et al., 1982), 20 mcg/ml al mes de vida y 250 mcg/ml a los 6 meses de lactancia (Goldman et al., 1982). Así, la ingesta media aproximada diaria de lisozima en el niño sano, a término, lactado al pecho es de 3 a 4 mg/kg/día al mes de vida y de 6 mg/kg/día a los 4 meses (Butte et al., 1984).

La lisozima es resistente a la digestión por la tripsina y a la desnaturalización debida al ácido, por lo que la cantidad de lisozima excretada en las heces de niños lactados al pecho es ocho veces mayor que en las heces de niños que toman fórmula (Schaneler et al., 1986). Sin embargo, a diferencia de la IgAs y la lactoferrina, la excreción urinaria de esta proteína no se ha detectado en los niños lactados al pecho (Goldblum et al., 1989).

La peroxidasa de la leche humana deriva de los leucocitos de la leche y se trata, por tanto, de una mieloperoxidasa y no de una lactoperoxidasa. Cataboliza la oxidación de los iones de tiocianato para dar productos con actividad bacteriostática (Reiter et al., 1978; Hamosh et al., 1985).

4.2.3.3. Mucina

La mucina de la leche humana es un glicoconjugado de elevado peso molecular (1.000 a 10.000 KDa). Se compone de los extremos amino y carboxiterminal que están escasamente glicosilados, pero son ricos en cisteína (responsable de establecer los enlaces sulfurados entre sus monómeros) y una región central formada por secuencias de 10 a 80 residuos de aminoácidos (aproximadamente un 50% serina y treonina) repetidas en tándem, que se saturan con cientos de oligosacáridos con uniones de tipo O principalmente.

La mucina ha demostrado tener propiedades protectoras frente a dos agentes infecciosos, principalmente: (a) inhibe la unión de las fimbrias S de *Escherichia coli* a las células epiteliales bucales humanas (Scrotten et al., 1992) y (b) ha demostrado evitar la infección por rotavirus en un modelo experimental en ratones (Yolken et al., 1992), pues tras su deglucosilación es capaz

de causar la hidrólisis del ácido N-acetilneuramínico y con ello inactivar este virus (Yolken et al., 1992).

4.2.3.4. Lactadherina

La MFGE-8 (“Milk fat globule-8”), también denominada lactadherina de la leche materna, es una glicoproteína sialilada de 46 KDa que se asocia a la mucina (Yolken et al., 1992).

Es capaz de inhibir la infección de las células MA104 por rotavirus *in vitro*, propiedad dosis dependiente y que pierde cuando se retira la fracción de ácido siálico de la molécula (Yolken et al., 1992). Efectos similares se han observado *in vivo* en niños lactados al pecho expuestos a rotavirus, donde se aprecia una mayor presencia en el contenido de lactadherina de la leche materna que toman los niños asintomáticos frente a los que padecen la infección (Newburg et al., 1998).

4.2.3.5. Fibronectina

La fibronectina es una molécula de alto peso molecular presente con una concentración de 13,4 mg/l en el calostro (Friis et al., 1988).

Facilita la captación de muchos tipos de partículas por las células mononucleares fagocíticas *in vitro*. No obstante, no se conocen con detalle los efectos *in vivo* de esta opsonina.

4.2.3.6. Componentes del complemento

Los componentes de la vía clásica y alternativa del complemento están presentes en la leche materna. Pero su concentración, excepto la del C3, es extremadamente baja lo que sugiere una funcionalidad biológica inexistente o irrelevante (Ballow et al., 1974; Nakajima et al., 1977).

4.2.3.7. Lípidos

Los ácidos grasos y monoglicéridos, generados por la digestión de los sustratos lipídicos más complejos, de la leche humana inhiben *in vitro* la infectividad de ciertos virus encapsulados como herpes simple tipo 1, sarampión, estomatitis vesicular, visna, el virus productor del tumor de mama en el ratón, virus de dengue, citomegalovirus, virus del bosque de Semliki y coronavirus (Welsh et al., 1979; Resta et al., 1985; Isaacs et al., 1986; Thromar et al., 1987; Isaacs et al., 1990). También afectan a parásitos intestinales, como la *Giardia lamblia* y la *Entamoeba histolytica* (Gillin et al., 1985).

Sin embargo el papel *in vivo* de estos productos lipídicos en la resistencia del huésped es desconocido.

Tabla 11. PROTEÍNAS Y GLICOPROTEÍNAS DE LA LECHE MATERNA			
(Kunz et al., 1999)			
PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (KDA)	CONCENTRACIÓN (G/L)	PORCENTAJE DE CARBOHIDRATOS
Caseína			
β-Caseína	24	3-5	-
κ-Caseína	30	1-3	40-60
Proteínas del suero lácteo			
α-Lactoalbúmina	14,2	2-3	-
Seroalbúmnina	68	0,3	-
IgAs	420	0,5-1	12
IgG	160	0,1	7-11
IgM	900	0,02	12
Lactoferrina	78	1-3	6
Lisozima	15	Calostro: 70 mcg/ml Transición: 20mcg/ml Madura: 250 mcg/ml	No hay datos exactos
Mucina	1000-10.000	No hay datos exactos	Altamente glicosilada
Lactadherina	46	No hay datos exactos	Ligada a ácido siálico

4.2.3.8. Leucocitos

Ya en el año 1968 se describió la existencia de leucocitos vivos en la leche humana (Smith et al., 1968). A diferencia de las células B que llegan a través de la vía enteromamaria y broncomamaria a la glándula y se transforman en células plasmáticas que permanecen en sus células epiteliales, los leucocitos atraídos atraviesan el epitelio mamario y pasan a formar parte de la secreción láctea.

Parece probable que los leucocitos de la leche humana proporcionen una marcada protección frente a la infección de la mama, lo que podría ser particularmente importante al principio de la lactancia cuando las mamas están repletas y no se vacían por completo durante cada toma.

Las mayores concentraciones de leucocitos en la leche materna se encuentran en el calostro, donde alcanzan $1-3 \times 10^6$ /ml (Tsuda et al., 1984a), siendo la distribución porcentual de

neutrófilos, macrófagos y linfocitos en la leche humana de aproximadamente un 80, 15 y 4%, respectivamente (Wirt et al., 1992; Kenney et al., 1993).

Neutrófilos y macrófagos. Los neutrófilos y macrófagos de la leche materna son células fagocíticas pues tras su estimulación pueden procesar y presentar antígenos a las células T (Tsuda et al., 1984b; Oksenberg et al., 1985).

La capacidad de los leucocitos polimorfonucleares de la leche humana para destruir y fagocitar microbios es menor que la de los leucocitos sanguíneos, si bien en algunos casos su función fagocítica llega a igualar a la de los neutrófilos de la sangre (Buescher et al., 1986). Se ha observado que tras la exposición a agentes quimiotácticos, los neutrófilos de la leche humana, a diferencia de los sanguíneos, no aumentan su adherencia, polaridad, migración directa (Thorpe et al., 1986) ni deformabilidad (Buescher et al., 1991). En cambio, la motilidad de los macrófagos de la leche humana está aumentada en comparación con sus análogos en la sangre (Özkaragoz et al., 1988). Otra diferencia que muestran los macrófagos del calostro humano, respecto a los fagocitos de otras localizaciones, es que tienen elevadas concentraciones de IgAs que se libera rápidamente durante la fagocitosis (Weaver et al., 1981), pueden sintetizar lisozimas, componentes del complemento, lactoferrina y prostaglandina E₂ (Faden et al., 1981; Blau et al., 1983). Si bien no es seguro que la capacidad tampón del calostro o de la leche definitiva permita su viabilidad tras su paso por el estómago, parece que sus productos sí podrían seguir actuando dentro del intestino.

Los neutrófilos y macrófagos de la leche humana suelen ligarse a lípidos, lo que dificulta su identificación por los métodos de tinción habituales. Existen en cambio métodos alternativos para ello, como el estudio de su contenido de mieloperoxidasa (Crago et al., 1979) o esterasa no específica (Crago et al., 1979) y la identificación de los CD14 (Keeney et al., 1993). Además presentan marcadores fenotípicos de activación y son características una expresión incrementada de CD11b/CD18 y una expresión disminuída de L-selectina (Keeney et al., 1993).

Linfocitos. La proporción de células T y B en las secreciones lácteas más precoces es de un 83% frente a un 6%, respectivamente (Wirt et al., 1992). El reducido número de células B es una consecuencia de su transformación terminal a células plasmáticas.

Tanto las subpoblaciones T CD4⁺ (colaboradoras) como las T CD8⁺ (citotóxicas y supresoras) están presentes en la leche humana (Wirt et al., 1992; Bertotto et al., 1990), sin embargo existe una mayor presencia del fenotipo citotóxico y supresor (CD8⁺) en la leche materna en comparación con la sangre (Wirt et al., 1992), al igual que sucede en las mucosas. Los linfocitos T presentes en la leche humana han mostrado una respuesta *in vitro* frente a diversos antígenos virales (Faden et al., 1981) y pueden verse implicados en la producción de IFN (Goldman et al., 1985), así como en la modulación del desarrollo del sistema IgA a nivel de

las mucosas (Slade et al., 1987). No obstante el papel *in vivo* de las células T en la leche humana es desconocido y aunque algunas observaciones sugieren que podría transmitirse cierta protección inmunitaria frente a la tuberculosis al niño lactado a través de la lactancia materna esto es controvertido (Keller et al., 1987; Pabst et al., 1989).

Todas las células T CD4⁺ y T CD8⁺ de la leche humana portan la isoforma de CD45 (CD45 RO) asociada con la memoria inmunológica (Bertotto et al., 1990; Wirt et al., 1992). Las células CD45 RO⁺ son la principal fuente de citoquinas en la leche materna (Dohlsten et al., 1988) y producen característicamente IFN-alfa (Bertotto et al., 1990; Bertotto et al., 1990; Wirt et al., 1992). Las células T de la leche humana son capaces de producir otras citoquinas como los factores inhibitorios de la migración macrofágica (Keller et al., 1981) y los factores quimiotácticos de las células tumorales (Keller et al., 1981), además de otros marcadores fenotípicos de activación (Wirt et al., 1992). Sin embargo, no hay evidencia de que produzcan el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleuquina 6 (IL-6) ni la interleuquina 10 (IL-10) (Skansén-Saphir et al., 1993).

Tabla 12. MECANISMOS DE ACCIÓN DE DIVERSOS AGENTES DEFENSIVOS DE LA LM

LACTOFERRINA	Quelación por Fe ³⁺
LISOZIMA	Degradación de peptidoglicanos
MUCINAS	Análogos de receptores Degradación de peptidoglicanos
FIBRONECTINA	Opsonina de fagocitos
LÍPIDOS	Dstrucción de virus envueltos
NEUTRÓFILOS Y MACRÓFAGOS	Presentación de antígenos y fagocitosis
LINFOCITOS	Producción de citoquinas

4.2.4. Agentes antiinflamatorios y antioxidantes

A diferencia de la escasez de agentes proinflamatorios, la leche humana contiene una gran variedad de agentes antiinflamatorios (Goldman et al., 1973) y antioxidantes (Tabla 13).

4.2.4.1. Factores promotores del crecimiento epitelial y de las barreras mucosas

Las hormonas y factores de crecimiento epitelial en la leche humana incluyen el cortisol (Kulski et al., 1981), el factor de crecimiento epitelial (Carpenter et al., 1980), la lactoferrina,

que interfiere con ciertos componentes del complemento (Morgan et al., 1975; Veerhuis et al., 1982; Kijlstra et al., 1982; Nichols et al., 1987) y las poliaminas (Sanguansermsi et al., 1974; Romain et al., 1992).

Entre sus mecanismos de acción se postula que podrían afectar al crecimiento, la diferenciación y el recambio de las células epiteliales, limitar la penetración de antígenos libres y microorganismos patógenos e intervenir en otras funciones de las barreras del tracto intestinal (Grosvenor et al., 1993). Se han observado diferencias estructurales y funcionales significativas de estas barreras en adultos y neonatos (Pang et al., 1983; Chu et al., 1986) por lo que se plantea que su maduración podría acelerarse con la leche materna (Widdowson et al., 1976; Heird et al., 1984; Teichberg et al., 1992).

4.2.4.2. Agentes antioxidantes

Componentes similares al ácido ascórbico (Buescher et al., 1992), el α -tocoferol (Chapell et al., 1985; Ostrea et al., 1986) y el β -caroteno (Chapell et al., 1985; Ostrea et al., 1986) son los principales antioxidantes de la leche humana. Los niveles sanguíneos de estos dos últimos son mayores en los niños lactados al pecho que en los niños alimentados con fórmula no suplementada con ellos (Ostrea et al., 1986).

4.2.4.3. Enzimas que degradan mediadores de la inflamación

Ciertas enzimas de la leche materna degradan los mediadores inflamatorios que dañan el tracto intestinal (Lindberg et al., 1982). Es el caso de la asociación del factor de activación plaquetario (PAF) y la enterocolitis necrosante. La administración de PAF a animales de experimentación produce una inflamación intestinal que se asemeja a la enterocolitis necrosante (Caplan et al., 1992), asimismo los niveles séricos de PAF están incrementados en neonatos con esta afección. La producción endógena de PAF-acetilhidrolasa está retrasada en el desarrollo (Caplan et al., 1990; Lucas et al., 1990a), sin embargo la leche humana la contiene (Furukawa et al., 1993) por lo que su ingesta podría prevenir o disminuir los procesos inflamatorios que culminan en la enterocolitis necrosante en los recién nacidos.

4.2.4.4. Citoquinas antiinflamatorias

Ciertas citoquinas antiinflamatorias inhiben las funciones de leucocitos seleccionados (Stigbrand et al., 1976; Kemp et al., 1980; Horne et al., 1983; Hooton et al., 1991), es el caso de las prostaglandinas E1, E2 y F2 α , que presentan propiedades citoprotectoras (Reid et al., 1980; Neu et al., 1988; Chapel et al., 1983; Alzina et al., 1986; Shimizu et al., 1992).

Estudios en modelos animales con deficiencias genéticas sugieren que las citoquinas antiinflamatorias de la leche humana podrían ser importantes en la prevención de alteraciones debidas a procesos inflamatorios. Los ratones homocigotos para el gen nulo de TGF- β 1

presentan infiltraciones espontáneas a nivel multifocal de macrófagos y células T en muchos órganos, principalmente en los pulmones, corazón y glándulas salivares (Kulkarni et al., 1993; Shull et al., 1992; Hines et al., 1994; Christ et al., 1994). Además, existen evidencias experimentales de que los efectos de la deficiencia del factor de crecimiento tumoral β_1 (TGF- β_1) se retrasan con la ingesta de citoquinas provenientes de leche murina (Letterio et al., 1994), (b) el patrón de enfermedad de los animales deficientes en IL-10 se limita, en cambio, al tracto digestivo y depende del establecimiento de una flora intestinal bacteriana (Kühn et al., 1993). A diferencia del caso anterior los efectos del aporte de citoquinas por medio de la leche materna necesitan más estudio.

Tabla 13. ANTIINFLAMATORIOS Y ANTIOXIDANTES DE LA LECHE MATERNA

FACTORES PROMOTORES DEL CRECIMIENTO EPITELIAL Y DE LAS BARRERAS MUCOSAS	Cortisol Factor de crecimiento epitelial Lactoferrina Poliaminas
AGENTES ANTIOXIDANTES	Ácido ascórbico α -tocoferol
ENZIMAS QUE DEGRADAN MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN	PAF-acetilhidrolasa
CITOQUINAS ANTIINFLAMATORIAS	Prostaglandinas E 1, E 2 y F 2 α

4.2.5. Factores inmunomoduladores (tabla 14)

Diversas observaciones han proporcionado las bases para plantear la existencia de agentes inmunomoduladores en la leche humana: (a) en primer lugar, investigaciones epidemiológicas sugieren que los niños lactados al pecho tienen un menor riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 (Meyer et al., 1988), linfoma (Davis et al., 1988) o enfermedad de Crohn (Koletzko et al., 1989) en los años posteriores; (b) los niveles aumentados de ciertos factores inmunitarios propios de los niños lactados al pecho no pueden ser atribuidos a su ingesta a través de la leche materna. La lactancia materna induce al receptor a producir mayores niveles de IFN-alfa en respuesta a la infección por virus respiratorio sincitial (Chiba et al., 1987), asimismo los incrementos de los niveles sanguíneos de fibronectina que se observan en los niños lactados al pecho no guardan relación con la cantidad de dicha proteína en la leche materna (Friss et al., 1988), además se ha observado que la lactancia materna lleva a un desarrollo más rápido de las respuestas de

INMUNIDAD DE LA LECHE MATERNA. Mecanismos de protección.

anticuerpos sistémicas (Stephens et al., 1984) y de IgAs en las secreciones (Schanler et al., 1986; Stephens et al., 1986a; 1986b; Prentice et al., 1987; Goldblum et al., 1989), incluyendo la orina (Prentice et al., 1987; Goldblum et al., 1989); (c) la tercera línea de estudio ha sido el descubrimiento de que todos los tipos de leucocitos de la leche humana son activados. La leche humana favorece el movimiento de los monocitos sanguíneos *in vitro* y gran parte de dicha movilidad puede ser anulada por anticuerpos anti-TNF α (Mushtaha et al., 1989).

Además del TNF α , otras citoquinas, como la interleuquina (IL)-1 β (Munoz et al., 1990), la IL-6, (Saito et al., 1991; Rudloff et al., 1993; Bocci et al., 1993), el INF-alfa, la IL-8, (Palkowetz et al., 1994), el factor de crecimiento β (TGF- β . Noda et al., 1984; Palkowetz et al., 1994; Saito et al., 1993), el factor estimulante de granulocitos (G-CSF. Gilmore et al., 1994), el factor estimulante de macrófagos (M-CSF. Hara et al., 1995) y la IL-10 (Garofalo et al., 1995) han sido identificados en la leche materna. Sin embargo, la extensión de sus efectos en el lactante no se conoce con detalle.

Otros elementos de la leche humana a los que se atribuye un efecto inmunomodulador incluyen las β -casomorfina (Brantl et al., 1985), la prolactina (Grosvenor et al., 1993), los anticuerpos antiidiopáticos (Hahn-Zoric et al., 1993) y nutrientes como el α -tocoferol (Chapell et al., 1985; Ostrea et al., 1986), así como una variedad de nucleótidos que incrementan las células NK, los macrófagos y la actividad de las células T-colaboradoras (Carver et al., 1990; Janas et al., 1992; Jyonouchi et al., 1993; Barness et al., 1994).

Tabla 14. AGENTES INMUNOMODULADORES DE LA LECHE MATERNA

TNF-α	Favorece la producción de Ig y complemento
TGF-β	Favorece el cambio de isotipo de las células B IgA ⁺
IFN-α	Favorece la actividad macrofágica de las células NK y la migración leucocitaria
IL-1β	Activa las células T
IL-6	Incrementa la producción de IgA
IL-8	Quimiotaxis de PMN y células T CD8 ⁺
IL-10	Modula la producción de otras citoquinas
G-CSF	Incrementa la producción de granulocitos
M-CSF	Incrementa la producción de macrófagos
β-CASOMORFINAS, PROLACTINA, α-TOCOFEROL Y NUCLEÓTIDOS	Incrementan la actividad macrofágica, de las células NK y de las células T-colaboradoras

4.2.6. Glicanos: oligosacáridos y glicoconjugados

Los glicanos de la leche materna son oligosacáridos libres que se encuentran solubles en ella, así como carbohidratos más complejos como los glicoconjugados: glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, glicosamínglicos o mucinas.

En los últimos años, los oligosacáridos y glicoconjugados de la leche materna han ganado un interés creciente como componentes de la leche materna con propiedades antiinfecciosas. Se plantea que por medio de su habilidad de inhibir la unión de los patógenos a sus receptores específicos en las células huésped intestinales y bronquiales representan un mecanismo, hasta el momento subestimado, por medio del cual proporcionan una protección eficaz al niño lactado.

Tabla 15. CONCENTRACIÓN (g/dL) DE COMPONENTES DE LA LECHE MATERNA EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA LACTANCIA (KUNZ ET AL., 1999)

Fase de lactancia	CALOSTRO		TRANSICIÓN		MADURA
Días de lactancia	1	4-5	8-10	14	> 36
LACTOSA	4,1 ± 1	5,1 ± 0,5	5,4 ± 0,5	5,4 ± 0,8	6,8 ± 0,6
OLIGOSACÁRIDOS	-	2,4	-	-	1,3
GRASA	2,1 ± 0,9	3,1 ± 0,8	3,7 ± 0,7	3,9 ± 0,7	4 ± 1,2
PROTEINA TOTAL	3,1 ± 0,6	-	-	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2
IgA	0,8	0,2	0,1	0,1	-
LACTOFERRINA	0,5	0,2	0,2	0,2	-

4.3. LOS OLIGOSACÁRIDOS Y GLICOCONJUGADOS DE LA LECHE MATERNA

4.3.1. Diversidad estructural (tabla 16)

Si bien la lactosa de la leche materna se aisló en el año 1633, no fue hasta 1933 cuando se describió la existencia de una fracción glucídica de la leche diferente a la lactosa y en 1950 cuando los glicanos de la leche materna comenzaron a describirse (Newburg et al., 1995b). Actualmente se piensa que existen cientos e incluso miles de oligosacáridos (Stahl et al., 1994), pues más de un centenar de estructuras han sido aisladas e identificadas en la leche humana y continuamente son reconocidas nuevas moléculas (Grönberg et al., 1992).

La mayoría de los oligosacáridos de la leche humana son formaciones derivadas de la adición de monosacáridos a la molécula de lactosa por glicosiltransferasas específicas de la glándula mamaria (Egge et al., 1993). La combinación de D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal) y

N-acetilglucosamina (GlcNAc) por medio de cuatro tipos de uniones terminales de L-fucosa (Fuc) y tres tipos de uniones de ácido siálico/ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), genera una amplia variedad de componentes que coinciden mayoritariamente en presentar lactosa en su región reductora terminal y fucosa o ácido siálico en la región no reductora terminal.

En base a su composición química los oligosacáridos de la leche materna pueden agruparse en: (a) oligosacáridos básicos que representan las estructuras fundamentales para la síntesis de oligosacáridos más complejos: formados por Glc, Gal y GlcNAc, (b) fucosil-oligosacáridos que derivan de la adición a esta estructura básica de una o más moléculas de Fuc, (c) sialil-oligosacáridos, resultantes de la adición a la estructura básica de una o más moléculas de NeuAc y (d) sialilfucosil-oligosacáridos, que contienen tanto Fuc como NeuAc (Coppa et al., 1999).

Los glicoconjugados asocian a esta estructura básica una molécula proteica (glicoproteínas y glicopéptidos), lipídica (glicolípidos) o glucídica de otra naturaleza (glicosamínglicos).

La adición de los residuos de fucosa depende de la acción de fucosiltransferasas en un proceso genéticamente determinado: (a) la α 1,2-fucosiltransferasa (FUT2) se encuentra en un 80% de los individuos caucásicos del N de Europa y América, los denominados individuos secretoras. La leche materna de las madres secretoras se caracteriza por la presencia de 2-fucosilactosa (Fuc α 1,2-Gal β 1,4 Glc), lacto-N-fucopentosa I (Fuc α 1,2-Gal β 1, 3-GlcNAc β 1,3-Gal β 1,4-Glc) y oligosacáridos más complejos que poseen residuos Fuc α 1,2-Gal β 1,3-GlcNAc, (b) la fucosiltransferasa dependiente del gen que codifica el antígeno Lewis (FUT3) está presente en aproximadamente un 90% de la población (Kindberg et al., 2007), une los residuos Fuc por medio de uniones tipo α 1,4 a un residuo GlcNAc de las cadenas tipo 1.

En la leche de las mujeres no secretoras que poseen el gen FUT3 el oligosacárido fucosilado principal es la lacto-N-fucopentosa II (Gal β -1,3-Fuc α -1,4-GlcNAc β -1,3-Gal β -1,4-Glc). Si ambos genes, FUT2 y FUT3 están presentes, uno de los oligosacáridos mayores es la lacto-N-difucohexosa I (Fuc α 1,2-Gal β 1,3-Fuc α 1,4-GlcNAc β 1,3-Gal β -1,4-Glc). En caso de carecer de ambos genes el oligosacárido principal en la leche de estas madres es la lacto-N-fucopentosa III (Gal β 1,4- Fuc α 1,3-GlcNAc β 1,3-Gal β 1,4-Glc).

Además de las fucosiltransferasas, diversas sialiltransferasas podrían unir NeuAc en diferentes posiciones a los oligosacáridos de la leche materna (Kunz et al., 2000).

Tabla 16. ESTRUCTURA DE LOS PRINCIPALES OLIGOSACÁRIDOS

DE LA LECHE MATERNA (Chaturvedi et al., 2001a)

NOMENCLATURA	ESTRUCTURA
<u>FUCOSIL-OLIGOSACÁRIDOS</u>	
2'-Fucosil-lactosa (2'-Fuc-Lac)	Fuc α 1,2-Gal β 1,4-Glc
Lacto-N-fucopentosa I (LNF-I)	Fuc α 1,2-Gal β 1,3-GlcNAc β 1,3-Gal β 1,4-Glc
Lacto-N-difucohexosa I (LDFH)	Fuc α 1,2- Fuc α 1,4-Gal β 1,3-GlcNAc β 1,3-Gal β 1,4-Glc
Lactodifucotetraosa (LDFT)	Fuc α 1,2-Gal β 1,4-Glc-Fuc α ,1-3
<u>SIALIL-OLIGOSACÁRIDOS</u>	
Lacto-N-fucopentosa-II (LNF-II)	Gal β 1,3- Fuc α 1,4-GlcNAc β 1,3-Gal β 1,4-Glc- Gal β 1,4
3-Fucosil-lactosa (3-FucLac)	Gal β 1,4-Glc-Fuc α 1,3
Lacto-N-fucopentosa-III (LNF-III)	GlcNAc β 1,3-Gal β 1,4-Glc-Fuc α 1,4
Lacto-N-difucohexosa-II (LNDFH-II)	Gal β 1,3-Fuc α 1,4-GlcNAc β 1,3-Gal β 1,4-Glc-Fuc α 1,3
<u>OTROS</u>	
Lacto-N-tetraosa (LNT)	Gal β 1,3-GlcNAc β 1,3-Gal β 1,4-Glc
Lacto-N-neotetraosa (LNneoT)	Gal β 1,4-GlcNAc β 1,3-Gal β 1,4-Glc
Monofucosil-lacto-N-hexosa-III (MFLNH-III)	Fuc α 1,3-Gal β 1,4-GlcNAc β 1,6-Gal β 1,4-Glc-Fuc α 1,2-Gal β 1,3-GlcNAc β 1,3
Difucosil-lacto-N-hexosa-a (DFLNHa)	Fuc α 1,3-Gal β 1,4-GlcNAc β 1,6-Gal β 1,4-Glc-Fuc α 1,2-Gal β 1,3-GlcNAc β 1,3

4.3.2. Concentración (tabla 17)

Existen muchas publicaciones acerca de la concentración total de oligosacáridos en la leche materna (Coppa et al., 1990; Thurl et al., 1996; Nakhla et al., 1999; Erney et al., 2000). Los datos obtenidos por grupos diferentes deberían compararse con precaución por las siguientes razones: (a) en primer lugar, no hay todavía métodos rutinarios disponibles para investigar el patrón de los diferentes oligosacáridos de la leche materna, es decir cada método tiene una forma diferente de separación de los oligosacáridos (por ej., la cromatografía por

intercambio iónico o la filtración en gel) lo que puede ofrecer resultados muy dispares y (b) en segundo lugar, en algunos artículos no se especifica el método empleado por lo que no se puede averiguar si toda o parte de la lactosa se ha eliminado de la fracción de oligosacáridos lo que modifica ampliamente los resultados. Además, los residuos proteicos pueden contaminar fracciones con oligosacáridos neutros o ácidos.

En la leche materna se identifican de 20 a 23 g/l en el calostro y de 12 a 14 g/l en la leche madura, de forma que desde el punto de vista cuantitativo los oligosacáridos representan el tercer componente de la leche materna, tras la lactosa y los lípidos (Newburg et al., 1995b), a diferencia de la leche de vaca en la que sólo se detectan pequeñas cantidades (Newburg et al., 1992a).

Las concentraciones de los diferentes oligosacáridos en la leche materna difieren de unos grupos geográficos a otros, si bien parece que el oligosacárido principal es la lacto-N-trehalosa (LNT, presente de 0,5 a 1,5 g/l) que junto con sus derivados monofucosilados llega a suponer de un 50 a un 70% del total de los oligosacáridos de la leche materna (a diferencia de la leche de vaca donde predomina la sialilactosa). Le siguen la lacto-N-fucopentosa I o II.

De los componentes sialilados la sialilactosa (NeuAc α 2,6 Lac y NeuAc α 2,3 Lac) es la más abundante, aproximadamente 1 g/l, seguida por los isómeros de la LNT monosialilada (LST a, b y c) y diasialilada (disialil-LNT).

Las escasas publicaciones que existen acerca del tema no han identificado diferencias cuantitativas ni cualitativas en los oligosacáridos de la leche de madres que han presentado un parto pretérmino o a término (Kunz et al., 2000), aunque son necesarios más estudios sobre esto.

Tabla 17. CONCENTRACIÓN (G/L) DE LOS PRINCIPALES OLIGOSACÁRIDOS DE LA LECHE MATERNA (Chaturvedi et al., 2001a)

<u>FUCOSIL-OLIGOSACÁRIDOS</u>	
2'-Fucosil-lactosa (2'-Fuc-Lac)	2,43 ± 0,26
Lacto-N-fucopentosa I (LNF-I)	1,14 ± 0,18
Lacto-N-fucohexosa I (LDFH-I)	0,50 ± 0,06
Lactodifucotetraosa (LDFT)	0,43 ± 0,04
<u>SIALIL-OLIGOSACÁRIDOS</u>	
3-Fucosillactosa (3-FucLac)	0,86 ± 0,10
Lacto-N-fucopentosa-II (LNF-II)	0,77 ± 0,07
Lacto-N-fucopentosa-III (LNF-III)	0,77 ± 0,07
Lacto-N-difucohexosa-II (LNDFH-II)	0,09 ± 0,01
<u>OTROS</u>	
Lacto-N-trehalosa (LNT)	0,55 ± 1,45
Lacto-N-neotetraosa (LNneoT)	0,17 ± 0,03
Difucosil-lacto-N-hexosa-a (DFLNHa)	0,15 ± 0,04
Monofucosil-lacto-N-hexosa-III (MFLNH-III)	0,11 ± 0,02

4.3.3. Efectos locales de los glicanos

Tras el descubrimiento de los oligosacáridos de la leche materna se planteó que carecían de funcionalidad debido a diversas cuestiones: (a) dada la analogía estructural a los glicoconjugados se pensó inicialmente que eran productos metabólicos resultantes de un exceso de funcionalidad de las enzimas que intervienen su síntesis, (b) además, se encontraron en gran cantidad en las heces de los niños lactados al pecho, lo que llevó a plantear que no eran digeribles y por tanto no tenían una contribución nutricional. A pesar de ello se planteó que el hecho de que los oligosacáridos de la leche materna desempeñaran un papel biológico era plausible, por lo que se desarrollaron diversas investigaciones para conocer los procesos en los que podían intervenir (Newburg et al., 1986).

Los oligosacáridos de la leche materna ingeridos resisten la acidez del intestino (Gnoth et al., 2000), la degradación de las enzimas pancreáticas y del borde en cepillo de los enterocitos (Gnoth et al., 2000; Engfer et al., 2000). Intactos alcanzan el colon donde se convierten en nutrientes de la flora bacteriana colónica y ejercen un efecto prebiótico a través de la promoción del crecimiento de *Bifidobacterium bifidum* (György et al., 1954).

Además, los oligosacáridos de la leche materna y algunos glicoconjugados son sintetizados por los mismos tipos de glicosiltransferasas responsables de la síntesis de los glicanos de las superficies celulares (HBGAs), empleados por la mayoría de los patógenos entéricos y respiratorios para la identificación y unión a células diana como paso crítico para su infectividad. Dada la analogía estructural entre ambas moléculas se planteó que los oligosacáridos de la leche materna podrían actuar competitivamente con los receptores celulares, impidiendo la unión de los patógenos y anulando sus mecanismos de infección. Esto supondría en el caso de los patógenos entéricos la inhibición de su capacidad de unión a los enterocitos y la protección del niño lactado al pecho de ciertas infecciones intestinales y en el caso de los patógenos respiratorios el bloqueo de la unión a las células bronquiales y por tanto la infección pulmonar (*tabla 18*).

Numerosas investigaciones se han dirigido a estudiar la hipótesis de que los oligosacáridos y glicoconjugados de la leche materna actúan como señuelos que compiten con la unión de ciertos patógenos bacterianos y virales, entéricos y respiratorios, así como de algunas toxinas a sus receptores específicos impidiendo el desarrollo de infección (Holmgren et al., 1981; Cleary et al., 1983; Otnaess et al., 1986; Andersson et al., 1986; Laegreid et al., 1986a; 1986b; Holmgren et al., 1987; Laegreid et al., 1987; Newburg et al., 1990; Newburg et al., 1991; Oatness et al., 1982; Cleary et al., 1983; Newburg et al., 1990).

En el caso de la adherencia bacteriana tiene lugar una unión del tipo ligando-receptor entre estructuras de la superficie bacteriana y otras complementarias de la superficie mucosa del huésped. Algunas de las adhesinas mejor caracterizadas de las bacterias son las de *Escherichia coli*, que posee fimbrias tipo 1 (complementarias a residuos de manosa), fimbrias S (complementarias a galactósidos sialilados) o factores de colonización (un grupo heterogéneo con diferentes especificidades de receptor), Leffler et al., 1986; Mirelman et al., 1986; Ofek et al., 1990; Karlsson et al., 1995; Brand Miller, 1999. Las especificidades de unión de los ligandos de las diferentes cepas de *Escherichia coli* podrían explicar las diferencias de colonización intestinal entre los niños lactados al pecho y alimentados con fórmula. En 1983 Parkkinen et al. demostraron que los oligosacáridos sialilados de la leche materna eran capaces de inhibir la actividad de unión de las cepas de *Escherichia coli* que causaban meningitis y sepsis neonatal (Parkkinen et al., 1983). Debido a que las fimbrias S de las cepas de la bacteria presentan una especificidad de unión con los galactósidos silalilados podría especularse que la leche materna con su alto contenido de estos epítomos podría ser responsable de un menor número de infecciones por *Escherichia coli* en los niños lactados al pecho frente a los alimentados con fórmula. Los gangliósidos GM1, glicoesfingolípidos monosialilados (GlcNAc β 1,3), también son receptores análogos de las toxinas termolábiles producidas por *Vibrio cholerae* y *Campylobacter jejuni* (Oatness et al., 1983; Laegreid et al., 1987; Cravioto et al.,

1991). Además, se ha descrito la unión de un glucolípido a la toxina de *Shigella* y a la Shiga-like de *Escherichia coli*. Aproximadamente un 70% de los casos de otitis media en los recién nacidos son causados por infecciones por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. En 1986, Andersson et al. fueron capaces de demostrar que la adhesión de estos microorganismos a estructuras carbonadas específicas de las células epiteliales faríngeas o bucales era inhibida por la leche materna, las subunidades Gal-disacárido parecen ser las responsables de este efecto protector (Andersson et al., 1986).

Es posible que algunos oligosacáridos y glicoconjugados de la leche materna también tengan la propiedad de interferir con la unión de ciertos virus a dianas epiteliales (Kumar et al., 1984; Baron et al., 1989). Buen ejemplo de ello son los virus influenza A, B y C, que reconocen bien NeuAc α 2,6-Lac y NeuAc α 2,3-Lac (ambos componentes principales de la leche humana). En cuanto a los virus entéricos, la leche materna ha demostrado una capacidad protectora frente a las infecciones por rotavirus (Asensi et al., 2006), recientemente parece que una de las situaciones más plausibles donde los oligosacáridos podrían ejercer una acción protectora es en evitar la infección intestinal por NoV en los niños lactados al pecho (Morrow et al., 2005). Asimismo, se ha descrito la existencia de una interferencia de la leche materna con la unión del antígeno gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana a las moléculas CD4 sobre las células T, pero esta se debe a componentes diferentes a los oligosacáridos y glicoconjugados (Newburg et al., 1992b; 1995a).

**Tabla 18. OLIGOSACÁRIDOS DE LA LECHE MATERNA
COMO RECEPTORES MICROBIANOS (Kunz et al., 2000)**

RECEPTORES	MICROORGANISMOS
GLICANOS FUCOSILADOS	
Oligosacáridos fucosilados	<i>Escherichia coli</i> (enterotoxina estable) <i>Campylobacter jejuni</i>
Tetra y pentasacáridos fucosilados	<i>Escherichia coli</i>
Epítomos Fuc α 1,2 Gal	<i>Candida albicans</i>
GLICANOS SIALILADOS	
Glicoproteínas y sialil (α 2,3) lactosa	<i>Escherichia coli</i> (fimbria S)
Mucinas sialil (α 2,3) galactósidos	<i>Escherichia coli</i> (fimbria S)
Sialil-lactosa	<i>Streptococcus sanguis</i> <i>Helicobacter pylori</i>
Glicoproteínas sialiladas	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Poli-N-acetillactosamina sialilada	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Poli-acetil-lactosaminglicanos sialilados α 2,3	<i>Streptococcus suis</i>
Sialil (α 2,6) lactosa	Virus Influenza A
Sialil (α 2,3) lactosa	Virus Influenza B
OTROS	
Glicoproteínas que contienen manosa	<i>Escherichia coli</i> (fimbria tipo 1)
Oligosacáridos neutros (LNT, neo-LNT)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Gal (β 1,4) GlcNAc o Gal (β 1,3) GlcNAc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9-O-Ac de NeuAc (α 2,3) R	Virus Influenza C
Lactadherina	Rotavirus

4.3.4. Capacidad protectora de los oligosacáridos de la leche materna frente a las infecciones por NoV

Una de las evidencias crecientes acerca de la capacidad protectora de los oligosacáridos y glicoconjugados de la leche materna frente a las infecciones por ciertos virus entéricos es la observada frente a NoV.

Esta hipótesis parte de la observación de que existe un grupo de individuos que muestra una resistencia natural frente a las infecciones por NoV: los individuos no secretores. Estos tienen en común que carecen del gen FUT2 y por tanto de la actividad α 1,2-fucosiltransferasa. Lo que hace pensar que el epítipo α 1,2-Fuc (antígeno H tipo 1) es esencial para la unión de NoV a los enterocitos. Diversas investigaciones han apoyado esto: (a) la pérdida de la actividad de las dianas celulares para NoV tras el tratamiento con α 1,2-fucosidasa, (b) la inhibición competitiva de la unión de NoV al antígeno H por anticuerpos monoclonales de H tipo 1, glicanos que contienen fucosa en posición α 1,2 y leche materna de un secretor y (c) los resultados del ensayo de transfección del ADNc de la enzima α 1,2-fucosiltransferasa (FUT2) a las células de ovario de hámster chino, a las que NoV en condiciones normales no es capaz de unirse, permitiendo la unión de las VLPs de Norwalk (Marionneau et al., 2002).

La diferente dotación genética de los individuos determina el tipo de glicanos que expresa en las superficies celulares de sus enterocitos y en sus fluidos biológicos, como la leche materna y la saliva. Si bien el antígeno H tipo 1 es reconocido como receptor principal de NoV en los enterocitos, existen receptores menos estudiados que se unen específicamente a diferentes cepas de NoV. Esto hace que la interacción de los NoV con el huésped sea de un nivel de complejidad elevado y ciertos genes podrían determinar el perfil de susceptibilidad o resistencia de cada individuo frente a los diferentes géneros de NoV.

Dadas estas dos cuestiones, se plantea la hipótesis de que los glicanos fucosilados de la leche materna podrían ser un componente efector de inmunidad inespecífica por medio de los cuales la madre confiere unas propiedades protectoras a su niño. En caso de ser así, se esperaría encontrar en los glicanos de la leche materna tres características: (a) expresión constitutiva, es decir, serían sintetizados en la leche materna independientemente de la historia de exposición a patógenos de la madre, (b) resistencia a la digestión intestinal para poder alcanzar el sitio de infección, (c) relación entre la presencia de estos glicanos fucosilados en la leche materna y un menor riesgo de enfermedad por ciertos patógenos en los niños lactados al pecho.

4.3.4.1. Expresión constitutiva

Los individuos secretores y no secretores se definen por la presencia o ausencia del gen FUT2, que codifica la actividad α 1,2-fucosiltransferasa, y en consecuencia la presencia de glicanos con uniones α 1,2 en la leche materna y determinados receptores HBGAs celulares.

Esta variación genética y de expresión de glicanos en la leche materna ha sido establecida en términos de individuos secretores homocigotos (poseen altos niveles de glicanos con uniones α 1,2), secretores heterocigotos (muestran niveles intermedios de glicanos con uniones de α 1,2) y no secretores (no poseen glicanos con uniones de fucosa α 1,2), Grollman et al., 1969; Viverge et al., 1990. Su distribución difiere en las poblaciones según el origen étnico (Erney et al., 2000; Musumeci et al., 2006; Leo et al., 2010).

Sin embargo se ha observado que la expresión de oligosacáridos cambia durante la lactancia independientemente de la dotación genética: es el caso de los individuos no secretores que si bien carecen del gen FUT2 que codifica la producción de α 1,2-fucosiloligosacáridos, tras aproximadamente medio año de lactancia estos se convierten en los componentes principales de su leche. Además, se observa que los individuos secretores producen leche que contiene principalmente α 1,2-fucosiloligosacáridos durante todo el curso de la lactancia, pero las cantidades absolutas y relativas de estos respecto a los otros tipos (los α 1,3/4-fucosiloligosacáridos) oscilan a lo largo de las diferentes etapas de la misma: la relación de los α 1,2 y de los α 1,3/4-fucosiloligosacáridos declina exponencialmente, desde un factor cinco en el primer mes a aproximadamente una relación 1:1 al final del primer año (Coppa et al., 1993; Coppa et al., 1999; Erney et al., 2000; Chaturvedi et al., 2001a).

Los antígenos Lewis también parecen participar en la variación de la expresión de los oligosacáridos fucosilados en la leche materna así como en los HBGAs celulares. Se ha podido observar que de los individuos secretores (FUT2+) aquellos con el fenotipo sanguíneo Le a- b+ no expresan el gen FUT3 que codifica la α 1,3/4 fucosiltransferasa, mientras que los individuos del fenotipo sanguíneo Le a+ b+ sí expresan el FUT3 y esto podría relacionarse fuertemente con la expresión de fucosiloligosacáridos de su leche. De hecho, la leche de las madres FUT2⁻ FUT3⁺ (Le a+ b-) contiene más lactosa N-fucopentosa II (LNF-II) y 3-fucosilactosa (3-FL), oligosacáridos que están exclusivamente fucosilados con uniones α 1,3 o α 1,4, que las madres FUT2⁺ FUT3⁻ (Le a-b+). Estas últimas, en cambio contienen más lactosa N-fucopentosa I (LNF-I, denominado H 1) y 2-fucosilactosa (2'-FL, denominado antígeno H tipo 2), oligosacáridos que han sido exclusivamente fucosilados con uniones α 1,2 (Coppa et al., 1993; Coppa et al., 1999; Erney et al., 2000; Chaturvedi et al., 2001a).

Se ha planteado que dada la relación existente entre la dotación del gen FUT2 y el antígeno Lewis con el contenido de los oligosacáridos de la leche materna una alternativa para conocer el genotipo materno podría ser estudiar el perfil de oligosacáridos de la leche materna, evitando con ello realizar determinaciones genéticas complejas y costosas (Newburg et al., 2004). Desafortunadamente, los datos sugieren que este esquema sólo representa una pequeña aproximación a la expresión de los oligosacáridos de la leche materna debido a las variaciones

en su concentración a lo largo de la lactancia, tanto en individuos secretores como no secretores, sugiriendo una mayor complejidad a la conocida en el proceso de producción de los oligosacáridos de la leche materna y una posible intervención de otros agentes diferentes a las α 1,2/3/4 fucosiltransferasas (FUT1, 4, 5, 6, 7 y probablemente 9).

4.3.4.2. Resistencia a los enzimas digestivos

Para que la inhibición de patógenos entéricos por la leche humana sea biológicamente relevante, los glicanos deben permanecer intactos durante su tránsito a través del canal alimentario hacia las regiones intestinales donde tiene lugar la infección. Existen evidencias de que se mantienen íntegros y pueden actuar en el tracto digestivo y respiratorio: (a) algunos oligosacáridos se mantienen intactos debido a que las uniones de carbohidratos en los complejos de glicanos son completamente diferentes de aquellas encontradas en los carbohidratos que asimilamos como nutrientes, dificultando la posibilidad de digestión por los enzimas intestinales, (b) además, los componentes proteicos podrían desarrollar su función en las partes proximales del tracto digestivo y respiratorio donde las enzimas proteolíticas no se producen, (c) asimismo, el tiempo de tránsito para la leche materna digerida a través del aparato digestivo es bastante rápido, del orden de pocas horas, lo que minimiza la oportunidad para su destrucción, y (d) podrían escapar a la digestión intragástrica e intraduodenal del lactante porque existe un retraso en la producción de ácido gástrico y proteasas pancreáticas (Koldovsky et al., 1985), (e) además, la capacidad tampón de la leche humana ayudaría a proteger a algunos de sus componentes ácido-lábiles de la leche como las antiproteasas (Lindberg et al., 1982; Rudloff et al., 1992; Rudloff et al., 1993; Garofalo et al., 1995).

Una aproximación para conocer el mantenimiento de la integridad estructural de los oligosacáridos de la leche materna en el intestino podría ser su medición en la leche humana consumida y la eliminada por heces y orina del lactante. De forma que, si el patrón de oligosacáridos en las heces y en la orina fuera similar al de la leche sería esto una evidencia de que los oligosacáridos sobreviven al tránsito intestinal. El desarrollo de técnicas de cromatografía líquida de alta resolución para el estudio de los oligosacáridos neutros ha permitido analizar esto revelando una gran similitud cualitativa de los oligosacáridos de la leche materna, las heces y la orina de los niños lactados al pecho. Desde un punto de vista cuantitativo se observan grandes diferencias, pues la cantidad total de oligosacáridos es menor en orina que en leche y existen aproximadamente diez veces más en heces que en leche (Chaturvedi et al., 2001b). Este último aspecto plantea dos cuestiones: en primer lugar, si los oligosacáridos se absorben o son excretados en su totalidad por las heces y, además, el motivo por el que han alcanzado concentraciones superiores a las ingeridas.

En relación al primer aspecto, se llevaron a cabo estudios con oligosacáridos marcados con isótopos estables para conocer su destino y se demostró que sí existía una absorción parcial en el intestino (de un 9% de lo ingerido) así como un filtrado renal de aproximadamente un 1% (Obermeier et al., 1999), de forma que aproximadamente un 90% de los oligosacáridos parecían superar intactos el tránsito a través del intestino.

En referencia a la segunda cuestión, podría explicarse la mayor presencia de oligosacáridos en las heces respecto a lo ingresado con la alimentación por proceder de aquellos ingeridos y no absorbidos, así como por ser producto de la digestión de glicoconjugados durante su paso a través del canal alimentario.

4.3.4.3. Efectividad clínica de la protección de los glicanos

Un tercer aspecto es conocer si existe una correlación clínica entre la presencia de oligosacáridos con propiedades protectoras y el riesgo de infecciones intestinales dado que a pesar de que oligosacáridos y glicoconjugados específicos han demostrado su capacidad de inhibir patógenos concretos cuando son evaluados de forma aislada *in vitro*, la relevancia clínica de este hecho no ha sido analizada. Esto es fundamental pues es posible que no sean efectivos en la compleja matriz del contenido intestinal e incluso su efecto cuantitativamente irrelevante en el contexto de otros muchos componentes protectores de la leche materna.

La variación en la expresión de glicanos de la leche materna proporciona la oportunidad para evaluar la efectividad de estos inhibidores de patógenos entéricos en la población (Morrow et al., 2004; Newburg et al., 2004). Un estudio prospectivo estudió 93 parejas de madres e hijos lactantes desde su nacimiento hasta los dos años de edad, tomando datos de la alimentación del niño y la aparición de diarrea de forma semanal, asimismo se recogió una muestra de leche de estas madres en las primeras 1 a 5 semanas postparto y se analizó su contenido de oligosacáridos. Los niños que desarrollaron diarrea asociada con la toxina estable de *Escherichia coli* estaban ingiriendo leche con una ratio de fucosiloligosacáridos con uniones α 1,2 y α 1,3/4 menor que aquellos sin diarrea de este tipo. Asimismo, la diarrea por *Campylobacter* sp. ocurrió con menor frecuencia en los niños cuyas madres presentaban leche con un alto contenido de 2'-FL (fucosiloligosacárido con uniones α 1,2 que inhibe a *Campylobacter* sp.) y la diarrea por NoV afectó en menor medida a los niños cuyas madres presentaban leche con altos niveles de lactosa N-difucohexosa I (LDFH-I), un α 1,2-fucosiloligosacárido que contiene un epítipo, una fracción Lewis b, que se une a NoV *in vitro*. En conclusión, la diarrea moderada a grave por estas causas ocurrió menos frecuentemente en aquellos niños cuya leche contenía altos niveles de fucosiloligosacáridos con uniones de tipo α 1,2 respecto al contenido total de oligosacáridos, la concentración de todos los oligosacáridos con uniones α 1,2 fue un fuerte predictor de la diarrea de todas las causas y la concentración

total de fucosiloligosacáridos se relacionó de forma inversa con el riesgo de diarrea en los niños lactados al pecho. Estos resultados condujeron a la afirmación de que los fucosiloligosacáridos con uniones α 1,2 podrían unirse a patógenos específicos y evitar su unión a los receptores de sus células huésped en la mucosa intestinal protegiendo de este modo al niño de desarrollar diarrea leve a moderada (Newburg et al., 2008).

4.3.5. Efectos sistémicos de los glicanos

El hecho de que los oligosacáridos de la leche materna se absorban parcialmente intactos en el intestino delgado del lactante y aparezcan en su orina, a diferencia del niño alimentado con fórmula (Rudloff et al., 1996; Obermeier et al., 1999; Gnoth et al., 2001), es una observación relevante y proporciona las bases para dos hipótesis: (a) en primer lugar, los oligosacáridos de la leche materna podrían ejercer una acción como receptores análogos con efecto antiadherente para los patógenos urinarios; (b) en segundo lugar, a pesar de que la detección directa de oligosacáridos en la sangre no ha sido publicada por el momento, su presencia en la orina podría probar de forma indirecta su presencia en la circulación sistémica. Se estima una concentración de oligosacáridos séricos de 100 a 200 mg/l, en base a la concentración de oligosacáridos en la leche humana, la ingesta diaria media por el lactante, su volemia y la cantidad excretada en la orina (Obermeier et al., 1999).

Si asumimos que los oligosacáridos de la leche materna alcanzan la circulación general podríamos plantear que podrían intervenir en las interacciones proteína-carbohidrato a nivel sistémico. Por ejemplo, las selectinas participan en las reacciones célula-célula del sistema inmunitario (Ley et al., 2003), la P y la E-selectina median la deceleración leucocitaria en las células endoteliales activadas e inician la extravasación leucocitaria hacia los lugares de la inflamación (Springer et al., 1994), además la P-selectina también participa en la formación de los complejos plaqueta-neutrófilo, una subpoblación de neutrófilos altamente activados responsables de la adhesión, fagocitosis y producción incrementada de especies reactivas de oxígeno (Peters et al., 1999). Las selectinas se unen a oligosacáridos fucosilados y sialilados (Varki, 1997) de forma que son capaces de reducir la adhesión de los leucocitos humanos a las células endoteliales activadas, a diferencia de los oligosacáridos no fucosilados ni sialilados que carecen de estos efectos (Bode et al., 2004a). Además los oligosacáridos inhiben la formación de complejos plaqueta-neutrófilo y reducen la subsiguiente activación neutrofílica (Bode et al., 2004b).

Asimismo, se plantea la cuestión de si los efectos inmunomoduladores de los oligosacáridos de la leche materna podrían suponer un compromiso del sistema inmunitario del niño o bien una protección frente a respuestas inmunitarias exacerbadas como la enterocolitis necrosante. Es conocido que la incidencia de la enterocolitis necrosante es de hasta un 85% más

baja en los niños lactados al pecho que en los alimentados con fórmula (Lucas et al., 1990a), a pesar de que los mecanismos patogénicos de la enterocolitis necrosante no han sido del todo descifrados parece que los propios leucocitos invasores y la hiperproducción de especies reactivas de oxígeno son los responsables de la propagación de la enfermedad tras ser desencadenada por una noxa inicial (Hsueh et al., 2003). La capacidad de los oligosacáridos de inhibir la adhesión de los leucocitos en los lugares de inflamación y reducir la formación de complejos plaqueta-neutrófilo altamente activados podría explicar la protección de los niños alimentados al pecho frente a la enterocolitis necrosante y otras enfermedades inflamatorias (Lucas et al., 1990a; Kunz et al., 2000; Rudloff et al., 2002; Bode et al., 2004a; Bode et al., 2004b).

Debido a similitudes estructurales los oligosacáridos de la leche materna también podrían interferir con otras interacciones tipo proteína-carbohidrato (*tabla 19*): (a) las galectinas, lectinas que unen galactósidos, se unen a β -galactósidos y glicanos enriquecidos con poli-N-acetilactosaminas (Kunz et al., 2000) y así regulan el crecimiento celular, la proliferación y apoptosis, así como la compleja matriz de interacciones célula-célula (Perillo et al., 1998), (b) los siglecs, lectinas Ig-like que unen el ácido siálico terminal en los puntos de unión α 2,3 o α 2,6 (Cracker, 2002) y (c) DC-SIGN, célula dendrítica específica para la adhesión intercelular de la no-integrina captadora de la molécula 3, podría ser otra diana potencial de los oligosacáridos. Se expresa en las células dendríticas del intestino y de otros tejidos y participa en la captura de diferentes patógenos, incluyendo VIH, hepatitis C, Ébola, citomegalovirus, virus del dengue, *Mycobacterium* sp. y *Candida albicans* (van Kooyk et al., 2003). Además, componentes no identificados en la leche materna se unen a DC-SIGN e inhiben la transferencia del VIH a los linfocitos T CD4⁺ (Naarding et al., 2005), lo que aún requiere más estudios.

Tabla 19. INTERACCIONES PROTEÍNA-CARBOHIDRATO DE LOS GLICANOS DE LA LM

P y E-selectinas unidas a oligosacáridos fucosilados y sialilados	Reducción de la adhesión de los leucocitos humanos a células endoteliales activadas. Inhibición de la formación de complejos plaqueta-neutrófilo y activación neutrofílica.
Galectinas unidas a β-galactósidos y glicanos enriquecidos con poli-N-acetilactosaminas	Regulación del crecimiento celular e interacciones célula-célula.
Siglecs (lectinas Ig-like) unidas a ácido siálico en los puntos de unión α 2,3 o α 2,6	Son necesarios más estudios para determinar su función.
DC-SIGN unidas a oligosacáridos fucosilados	Captura de diferentes patógenos.



HIPÓTESIS

En la actualidad se asume que la leche materna es el alimento de elección para el lactante hasta los seis meses de vida, recomendándose que se ofrezca más allá de este periodo junto con la alimentación complementaria.

Las ventajas nutricionales de la lactancia materna han sido ampliamente estudiadas, si bien son menos conocidas sus propiedades defensivas. La capacidad protectora frente a la adquisición de infecciones es una propiedad que ofrece un gran beneficio al niño amamantado, especialmente frente a las infecciones producidas por *norovirus* (causa frecuente de infección intestinal en la infancia).

Entre los efectores de esta función defensiva parecen estar implicados agentes de inmunidad específica, como los anticuerpos de clase IgA, y componentes de la inmunidad inespecífica, como los factores probióticos, la lactoferrina, la lisozima, la mucina, la lactadherina, ciertos agentes antiinflamatorios, antioxidantes e inmunomoduladores, los oligosacáridos y los glicoconjugados de la leche materna.

Los oligosacáridos de la leche materna, presentes libres o conjugados como glicoproteínas o glicolípidos, presentan una gran similitud estructural con los antígenos histosanguíneos humanos que actúan como receptores de norovirus en los enterocitos. Esto podría explicar que al competir con ellos por la unión a las células diana pudieran impedir la infección por NoV.

El hecho de que los oligosacáridos de la leche materna estén codificados por genes relacionados con el grupo ABO, FUT2 y antígenos Lewis podría traducirse en una diferente capacidad protectora de la leche materna según la dotación genética de la madre. Otras características podrían también condicionar esta propiedad como, la etapa madurativa de la leche materna (calostro, transición o madura) y la duración de la gestación (parto pretérmino o a término).

OBJETIVOS

General:

Analizar la capacidad protectora de la leche materna frente a las infecciones por norovirus y los agentes responsables de ella.

Específicos:

1. Analizar la actividad bloqueante de muestras de leche humana sobre la unión de partículas pseudovíricas de norovirus a saliva.
2. Evaluar la diferente actividad bloqueante de la leche humana de madres de recién nacido pretérmino y a término. En el primer caso, analizar las diferencias existentes según la edad gestacional.
3. Relacionar la actividad bloqueante de la leche humana con la fase madurativa de la misma: calostro, transición y madura.
4. Relacionar los resultados con el grupo sanguíneo ABO, el genotipo secretor (FUT2) de la madre y los antígenos Lewis.
5. Evaluar la capacidad bloqueante de muestras de suero sobre la unión de partículas pseudovíricas de norovirus a saliva.
6. Analizar la presencia de anticuerpos específicos de norovirus en la leche y en el suero de las mujeres lactantes que puedan ser responsables de la actividad bloqueante.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO

Se ha realizado un estudio longitudinal prospectivo de muestras de leche materna recogidas secuencialmente durante los 3 periodos de lactancia (calostro, leche de transición y leche madura), así como de muestras de suero de las mismas mujeres (procedentes de los estudios que se realizan de forma sistemática durante el embarazo).

Para la realización del estudio se contó con madres puérperas hospitalizadas en la Sala de Maternidad del Hospital Clínico Universitario de Valencia y con madres cuyos hijos se trasladaron para ser tratados en el Centro Neonatal del Servicio de Pediatría del mismo hospital. Las muestras de suero y leche materna se analizaron en el Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico de Valencia.

2. MUESTRA POBLACIONAL

El estudio se ha realizado mediante la colaboración de 111 madres puérperas durante el periodo comprendido entre diciembre de 2006 y diciembre de 2009.

Las madres recibieron información escrita, completa y detallada de las características del estudio (*anexo 1*) y expresaron su interés en participar voluntariamente a través de la firma de un documento de consentimiento informado (*anexo 2*).

Para su inclusión en el estudio sólo se estableció como condición su interés en participar y una buena disposición para acudir al hospital para completar la recogida de muestras de leche materna durante el resto de la lactancia, en caso de no haberse recogido todas las muestras durante su ingreso hospitalario.

Las características de las madres participantes en el estudio se describirán en el apartado 1 de *Resultados*.

3. MUESTRAS CLÍNICAS

3.1. LECHE MATERNA

Se obtuvieron 287 muestras de leche materna en los 3 periodos de lactancia: calostro (1º - 7º día), 106 muestras; leche de transición (8º - 14º día), 98 muestras; y leche madura (15º día y sucesivos), 83 muestras.

De las 111 madres participantes en el estudio 5 no aportaron muestra de calostro por haber decidido incorporarse al estudio transcurridos los 7 primeros días después del parto. Asimismo, 13 no aportaron leche de transición por abandonar el estudio la segunda semana de lactancia. En relación a las muestras de leche madura, aportaron muestra 83 de las madres.

Los motivos por los que algunas de las madres decidieron no proseguir con el estudio fueron diversos: éxitus del niño, sectorización tras el alta de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales, interrupción de la lactancia materna o no querer trasladarse al hospital para aportar la muestra.

Para la recogida de las muestras de leche se utilizó el siguiente material: (a) sacaleches automático con regulador de vacío (Medela Symphony, Barr, Suiza), (b) embudos de succión fabricados en poliestireno y (c) frascos con cierre de rosca acoplados a los embudos de succión para la recogida directa de la leche materna. Los frascos y los embudos de succión se esterilizaron en autoclave antes de su uso.

La muestra succionada con el sacaleches se recogió en los frascos, para posteriormente ser alicuotada utilizando material estéril, y congelada a -20°C , en los congeladores destinados al almacenaje en frío de leche materna del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valencia hasta la realización de los ensayos.

3.2. SUERO

De cada madre participante se recuperó una muestra de suero obtenida durante la gestación para la determinación de Ag HBs (antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) y otros estudios que se realizan de forma sistemática durante el embarazo.

Se obtuvieron 71 muestras de suero que se almacenaron a -40°C en el laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Los motivos por los que no se obtuvo suero de 40 de las madres fueron los siguientes, en la mayoría de los casos fueron desechadas tras un tiempo de almacenamiento en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico. Otras razones fueron el rechazo de algunas madres a cualquier tipo de control serológico durante la gestación o bien la procedencia de áreas sanitarias diferentes al HCUV.

3.3. SALIVA

Se recogieron muestras de saliva de tres personas de nuestro grupo investigador. El análisis del gen FUT2 estableció que correspondían a un individuo secretor homocigoto (SeSe), a un individuo secretor heterocigoto (Sese) y a un individuo no secretor (sese), de idéntico grupo sanguíneo (B +). La tipificación de antígenos Lewis se muestra en la siguiente tabla (*tabla 20*).

Tabla 20. GENOTIPO FUT2 Y ANTÍGENOS LEWIS DE LAS MUESTRAS DE SALIVA

Genotipo FUT2	Lewis a	Lewis b	Lewis x	Lewis y
No secretor (sese)	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Secretor heterocigoto (Sese)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Secretor homocigoto (SeSe)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

4. ANTICUERPOS

4.1. ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se produjeron anticuerpos monoclonales frente a VLPs de norovirus genotipo GII.4 siguiendo los protocolos descritos por Harlow et al., 1998. El anticuerpo monoclonal resultante, denominado 4C5C10, fue producido por un hibridoma obtenido de linfocitos de un ratón BALB/c inmunizado con VLPs de genotipo GI.5 y seleccionado con VLPs de genotipo GII.4. Este anticuerpo reconoce un dominio estructural en la región P2 de la proteína VP1 de la cápside de NoV (Carmona et al., 2010). El isotipo al que corresponde es IgG1 λ .

Se emplearon anticuerpos monoclonales en los ensayos de ELISA destinados a la determinación de los antígenos Lewis en muestras de leche materna. Estos anticuerpos de origen comercial se detallan en la siguiente tabla (*tabla 21*).

Tabla 21. ANTICUERPOS MONOCLONALES EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS LEWIS

Ag Lewis a (Covance, nº de ref. SIG-3314)
Ag Lewis b (Covance, nº de ref. SIG-3315)
Ag Lewis x (Covance, nº de ref. SIG-3339)
Ag Lewis y (Covance, nº de ref. SIG-3317)

4.2. OTROS ANTICUERPOS

Se utilizaron anticuerpos conjugados con peroxidasa para la realización de los ensayos de ELISA que analizaban el bloqueo de la unión de VLPs de NoV a saliva, anticuerpos frente a NoV en leche materna y saliva y frente antígenos Lewis en leche materna. Estos anticuerpos, de origen comercial, se especifican en la siguiente tabla (*tabla 22*).

Tabla 22. ANTICUERPOS CONJUGADOS EMPLEADOS EN ENSAYOS DE BLOQUEO, DE ANÁLISIS DE ANTICUERPOS Y DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS LEWIS

IgG anti-IgG de ratón marcada con peroxidasa , producida en cabra (Sigma Immunochemicals, ref. n° A-4416)
IgG anti-IgG humana marcada con peroxidasa , producida en cabra (Sigma Immunochemicals, ref. n° G-3010)
IgG anti-IgA humana marcada con peroxidasa , producida en cabra (Sigma Immunochemicals, ref. n° A-0295)
IgG anti-IgM humana marcada con peroxidasa , producida en cabra (Sigma Immunochemicals, ref n° A-8786)

5. MÉTODOS

5.1. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDOVÍRICAS (VLPs) DE NOROVIRUS GII.4 MEDIANTE BACULOVIRUS RECOMBINANTES

Se cultivaron células Sf9 (células de insecto *Spodoptera frugiperda*) en medio Sf-900 II SFM (Gibco Invitrogen, ref. n° 10.902), sin suero bovino fetal y suplementado con penicilina, estreptomycin y fungizona (0,5%), en frascos de poliestireno (Costar) de 75 cm² de área a 27°C. Cuando la monocapa celular era confluyente se procedía a la propagación del cultivo celular de Sf9, para ello se despegaban las células golpeando el frasco suavemente para desprenderlas de su superficie interna y se repartían en nuevos frascos añadiendo medio a cada uno de ellos.

Se infectaban células Sf9 con baculovirus recombinante que expresaba la proteína VP1 (ORF 2) de NoV de genotipo GII.4 (procedente de una muestra clínica, variante 2006b), con una multiplicidad de infección de 5-10, y se mantenía el cultivo durante 5 días, según el procedimiento de Jiang et al., 1992b.

Tras despegar las células y centrifugarlas a 600g 10 min. se lisaban las células del sedimento con 100 mM de NaCl 1%, Tritón X-100 y 0,1% de inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma Immunochemicals, ref. n° P-8849) en PBS durante 30 min a 4°C en hielo. Se centrifugaba el lisado obtenido a 15.000 g durante 10 min en el rotor A-14 (Beckman).

La producción de antígeno de cápside de norovirus en las células Sf9 infectadas se confirmó por inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo monoclonal 4C5C10 (descrito en el apartado 4.1 de *Material y métodos*), como vemos en la siguiente figura.

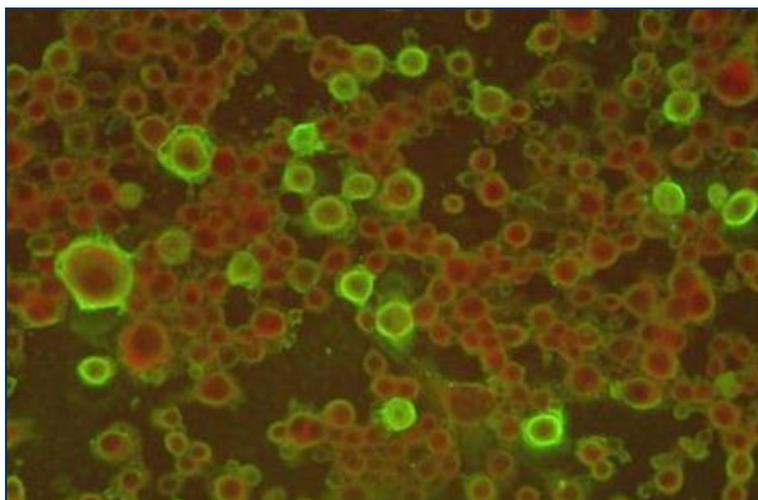


Figura 24. Detección por inmunofluorescencia de la expresión de Ag VP1 (de cápside) de NoV GII.4 en células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante.

A continuación se centrifugaba el sobrenadante sobre un colchón de sacarosa al 40% (sacarosa en PBS con 100 mM de NaCl) a 120.000 g durante 3 h a 10°C en rotor SW41Ti en ultracentrífuga Beckman y se resuspendía el sedimento en 100 µl de PBS con 100 mM de NaCl.

Eventualmente, se purificaban las VLPs en gradientes de CsCl de 0-50% (índice de refracción = 1,3678 a 33°C) en tampón Tris HCl-NaCl (pH 7,5), preparado con 4,55 mg de ClCs en 10 ml de H₂O mQ.

Tras esto, se analizaban las VLPs mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y tinción con azul de Coomassie (apartado 5.1.1 de *Material y métodos*), así como observación al microscopio electrónico tras tinción negativa con ácido fosfotúngstico pH 6,4 (apartado 5.1.2 de *Material y métodos*).

5.1.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie se empleaba para analizar el resultado de la producción y purificación de partículas pseudovíricas (VLPs) de norovirus GII.4 mediante baculovirus recombinantes. Las muestras solubilizadas se sometían a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) según el método de Laemmli et al., 1970.

Mediante esta técnica, las proteínas se desnaturalizaban a 100°C en presencia de SDS, el cual se unía a los polipéptidos convirtiéndolos en polianiones. Al adquirir todas las proteínas la

misma densidad de carga, en presencia de un campo eléctrico migraban en un gel poroso exclusivamente en función de su peso molecular.

Tabla 23. PREPARACIÓN DEL GEL PAGE INFERIOR (“RESOLVING GEL”, RG)

40% acrilamida (Bio-Rad)	1,25 ml
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,25 ml
SDS 10% (Bio-Rad)	50 µl
Temed (Bio-Rad)	4 µl
Persulfato amónico 20%	25 µl
Agua desionizada	2,42 ml

El gel superior (“stacking gel”, SG) con 5% de acrilamida, se dispensaba en segundo lugar y a través de él migraban inicialmente las proteínas para que llegasen todas al mismo tiempo al RG y así se obtuviera una mejor resolución.

Tabla 24. PREPARACIÓN DEL GEL PAGE SUPERIOR (“STACKING GEL”, SG)

Acrilamida 40% (Bio-Rad)	312 µl
Tris-HCl 1,5M (pH 6,8)	210 µl
SDS 10% (Bio-Rad)	25 µl
Temed (Bio-Rad)	2,5 µl
Persulfato amónico 20%	12,5 µl
Agua desionizada	1,94 ml

A continuación se rellenaba la cubeta con tampón de electroforesis, utilizando un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories).

Tabla 25. COMPOSICIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS (5 X)

Tris base 0,3%
Glicina 1,44%
SDS 0,1%

Se realizaba un tratamiento previo de las muestras mediante la adición de azul de bromofenol (concentración final 0,01%) y calentamiento a 100°C durante 5 minutos, seguido de centrifugación a 1.000 rpm 1 minuto. A continuación se cargaban los pocillos, incluyendo un marcador de pesos moleculares para proteínas (Pre-stained SDS-PAGE Standard, Broad Range, n° ref 72,807, Bio-Rad) con voltaje constante a 150 V durante 60 minutos (EC-105, Apparatus Corporation).

El gel se teñía con azul de Coomassie durante 5 a 10 min. en agitación constante y se sumergía en solución decolorante hasta la correcta visualización de las bandas.

<i>Tabla 26. AZUL DE COOMASSIE</i>		<i>Tabla 27. SOLUCIÓN DECOLORANTE</i>	
Coomassie Blue R-250	1 g	Metanol	100 ml
Metanol	450 ml	Ácido acético glacial	100 ml
H₂O	450 ml	H₂O	800 ml
Ácido acético glacial	100 ml		

A continuación, se transfería a una membrana de nitrocelulosa y se realizaba un Western blot para analizar la expresión de las VLPs. El revelado por quimioluminiscencia permitía observar imágenes como las mostradas en la *figura 25*.

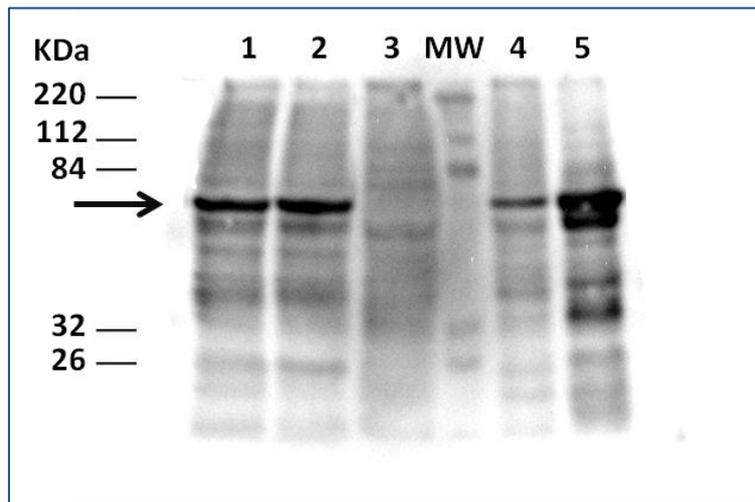


Figura 25. Western blot de VLPs de NoV GII.4 tras electroforesis de gel de poliacrilamida con SDS-PAGE y revelado por quimioluminiscencia con antisuero de conejo anti-NoV.

La flecha señala la banda correspondiente a la proteína VP1 de cápside de NoV (aprox. 55 KDa).

Carriles 1 y 2: lisados de células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante expresando VLPs de NoV GII.4.

Carril 3: células Sf9 sin infectar.

Carril 4: VLPs semipurificadas por centrifugación a través de colchón de sacarosa al 40%.

Carril 5: lisado de células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante expresando VLPs.

5.1.2. Observación al microscopio electrónico tras tinción negativa con ácido fosfotúngstico

La observación al microscopio electrónico tras tinción negativa con ácido fosfotúngstico, requería la preparación previa de rejillas de microscopía electrónica que se impregnaban con Formvar disuelto al 1% en cloroformo y se recubrían con carbono por medio de un vaporizador (Polaron P650A). A continuación las muestras se teñían con ácido fosfotúngstico al 2% en agua destilada, pH 6,7.

La visualización se realizó en el microscopio electrónico del “*Servei Central de Suport a la Investigació Experimental*” (Servicio central de apoyo a la investigación experimental, SCSIE) del Campus de Burjassot de la Universidad de Valencia. En la *figura 26* se muestra una imagen de las VLPs obtenidas.

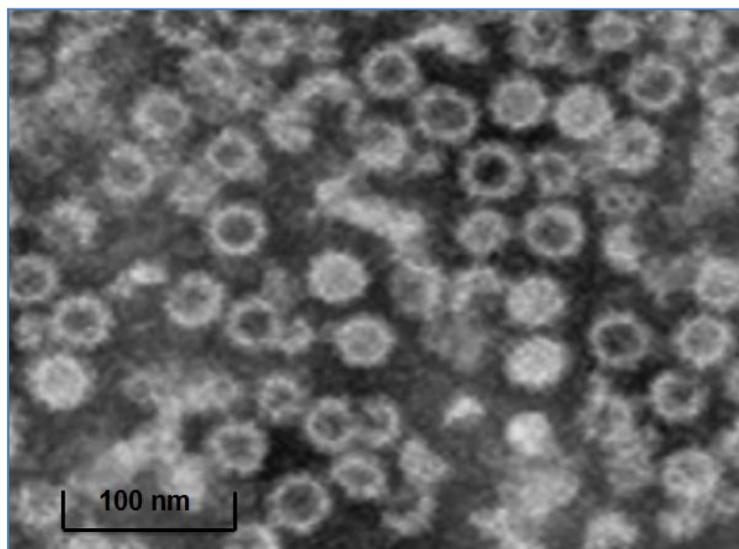


Figura 26. Imagen de VLPs de NoV GII.4 tras tinción negativa con ácido fosfotúngstico.

5.2. ENSAYOS DE UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA

Se realizaron ensayos de unión de las VLPs de NoV GII.4 a las diferentes muestras de saliva para conocer la afinidad existente entre ellas.

Las muestras de saliva se calentaban a 100°C durante 5 min y centrifugaban a 10.000 g durante 10 min. Se determinaba su concentración proteica por el método de Bradford (apartado 4.2.1 de *Material y métodos*) y se diluían a una concentración 1/500 en tampón 0,1 M carbonato-bicarbonato pH 9,6 (NaHCO₃ 0,045 M y Na₂CO₃ 0,018 M), o concentración final de 2,27 µg/ml.

Se tapizaban pocillos de placa de microtitulación con 100 µl de esta dilución de saliva, se incubaban a 37°C 2 h y durante la noche a 4°C. Se estableció un tiempo límite para su uso de hasta 10 días después de su incubación, manteniéndose siempre a 4°C.

Posteriormente, se lavaba la placa con tampón de lavado (PBS-Tween 0,01%) y se bloqueaban los pocillos con PBS-T 0,05%-seroalbúmina bovina 3% (PBS-T-BSA) a 37°C 1 h.

A continuación se añadían 100 µl por pocillo de la suspensión de VLPs a 200 µg/ml en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 (20 µg/pocillo) y se incubaba a 37°C durante 2 h.

Completadas las 2 h de incubación, se lavaba 3 veces con PBS-T 0,01%, se añadían 100 µl de anticuerpo monoclonal 4C5C10 anti-VLPs diluido 1/100 producido en nuestro laboratorio (según se describe en el apartado 4.1 de *Material y métodos*) y se incubaba a 37°C durante 1 hora.

Tras el lavado de la placa, se añadían 100 µl de IgG anti-IgG de ratón marcada con peroxidasa, producida en cabra, (Sigma Immunochemicals, ref. n° A-4416) diluida 1/2000. Tras un nuevo lavado, la reacción se revelaba con solución de OPD: 5 mg de OPD (orto-fenilenediamina dihidroclorato, Sigma Immunochemicals, ref. n° P-3804) y 50 µl de H₂O₂ 3%, en tampón citrato/fosfato pH 5 (ácido cítrico 0,47 g, Na₂HPO₄ 0,73 g y H₂O c.s.p. 100 ml) y se incubaba 15 minutos. La adición de 50 µl por pocillo de H₂SO₄ 3M permitía detener la reacción. A continuación se medía la absorbancia mediante lectura en espectrofotómetro (Multiskan FC, Thermo Scientific) a 492 nm.

Los resultados de este ensayo mostraron una mayor afinidad de las VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor, a continuación de individuo secretor homocigoto y por último de secretor heterocigoto. Motivo por el cual se seleccionaron las muestras de saliva de individuo no secretor y secretor homocigoto para los ensayos que se describen a continuación.

5. 3. ENSAYOS DE BLOQUEO DE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA

Los ensayos de bloqueo de la unión de VLPs de norovirus GII.4 a saliva se realizaron mediante técnica de ELISA. Se siguió el procedimiento descrito por Thorven et al. (2005) con modificaciones.

La preparación de las muestras de saliva y la sensibilización de las placas de microtitulación se realizó según lo descrito en el apartado previo (apartado 5.2 de *Material y métodos*).

Posteriormente, se lavaba la placa con tampón de lavado (PBS-Tween 0,01%) y se bloqueaban los pocillos con PBS-T 0,05%-seroalbúmina bovina 3% (PBS-T-BSA) a 37°C 1 h.

Simultáneamente, se incubaban 50 µl por pocillo de la suspensión de VLPs a 200 µg/ml en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 (10 µg/pocillo) con 50 µl de las diferentes muestras de leche materna (calostro, leche de transición y madura) y suero. Las muestras de leche materna se emplearon sin diluir y diluidas 1/100 en PBS, si bien las muestras de suero no se sometieron a ninguna dilución, sino que se añadieron sin diluir tras un proceso de descomplementación mediante calentamiento a 56°C durante 30 min. Tras lavar las placas de microtitulación con PBS-T 0,01% se añadían 100 µl por pocillo de estas suspensiones e incubaban a 37°C durante 2 horas.

Los valores de referencia de cada ELISA, es decir los valores máximos esperados de cada ensayo, se obtuvieron mediante la adición de 100 µl de la suspensión de VLPs (200 µg/ml) a un número de pocillos, sin preincubación con leche materna o suero (para evitar que estas muestras pudieran interferir con la unión a la saliva). Los valores mínimos de cada ensayo se obtuvieron con la adición de 100 µl de PBS-T 0,01% a otros pocillos.

Completadas las 2 h de incubación, se lavaba 3 veces con PBS-T 0,01%, se añadían 100 µl de anticuerpo monoclonal 4C5C10 anti-VLPs diluído 1/100 producido en nuestro laboratorio (según se describe en el apartado 4.1 de *Material y métodos*) y se incubaba a 37°C durante 1 hora.

Tras el lavado de la placa, se añadían 100 µl de IgG anti-IgG de ratón marcada con peroxidasa, producida en cabra, (Sigma Immunochemicals, ref. n° A-4416) diluída 1/2000. Tras un nuevo lavado, la reacción se revelaba con solución de OPD: 5 mg de OPD (orto-fenilenediamina dihidroclorato, Sigma Immunochemicals, ref. n° P-3804) y 50 µl de H₂O₂ 3%, en tampón citrato/fosfato pH 5 (ácido cítrico 0,47 g, Na₂HPO₄ 0,73 g y H₂O c.s.p. 100 ml) y se incubaba 15 minutos. La adición de 50 µl por pocillo de H₂SO₄ 3M permitía detener la reacción.

A continuación se medía la absorbancia mediante lectura en espectrofotómetro (Multiskan FC, Thermo Scientific) a 492 nm.

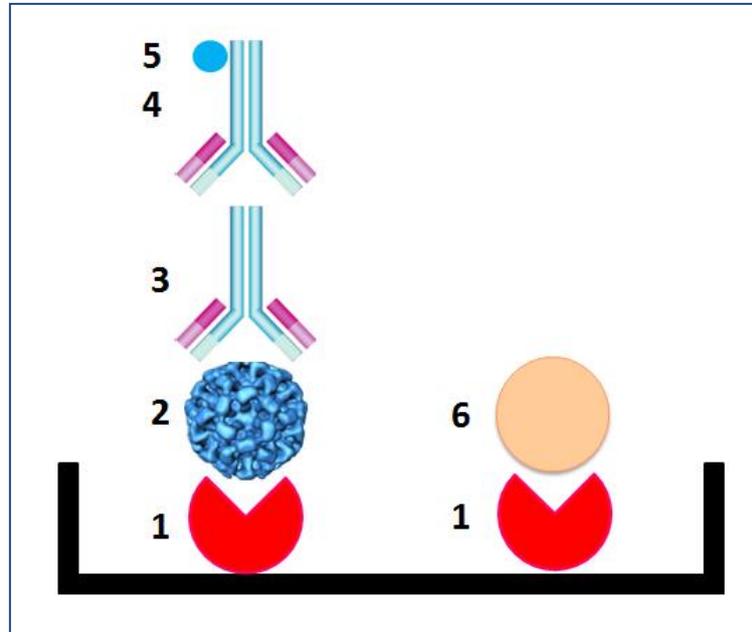


Figura 27. Esquema de los ensayos de bloqueo de la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva mediante leche materna o suero.

En la representación gráfica de la izquierda se muestra la unión de las VLPs de NoV GII.4 (2) a los receptores en saliva (1). Esta unión es detectada por el AcMo 4C5C10 anti-VLPs (3) y marcada con IgG anti-IgG de ratón marcada con peroxidasa (5), que permite su revelado con OPD.

En la representación gráfica de la derecha los receptores en saliva (1) han sido bloqueados por componentes de la leche materna o suero (6), de estructura análoga a las VLPs de NoV GII.4 (2), impidiendo su unión *in vitro*.

En espectroscopía, la absorbancia (A) es definida como:

$$A_{\lambda} = -\log_{10} (I / I_0)$$

Donde “ I_0 ” es la intensidad de la luz antes de que incida en una muestra (intensidad de la luz incidente), con una longitud de onda específica “ λ ”, e “I” es la intensidad de esta luz que pasa por dicha muestra (intensidad de la luz transmitida).

El término es frecuentemente intercambiable con densidad óptica, si bien éste último se refiere a la absorbancia por unidad de longitud. Las medidas de absorbancia son frecuentemente usadas

en química analítica ya que la absorbancia es proporcional al grosor de una muestra y la concentración de una sustancia en ella. En contraste a la transmitancia (I / I_0) que varía exponencialmente con el grosor y la concentración (Ley de Beer-Lambert, figura 30).

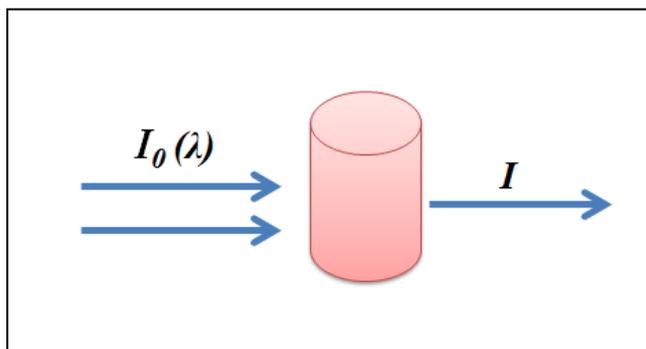


Figura 28. Ley de Beer-Lambert.

La actividad bloqueante de las muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva se determinó mediante técnica de ELISA. Se calculó a partir de una relación entre los valores de absorbancia obtenidos tras la lectura con espectrofotómetro a 492 nm de los pocillos de los ensayos de ELISA. Se creó el parámetro “porcentaje de inhibición” que relacionaba los valores de absorbancia obtenidos de cada una de las muestras problema, el valor de referencia (valor de absorbancia máximo de cada ensayo, resultante de la unión de VLPs a saliva sin leche materna que pudiera interferir en la unión) y el ruido de fondo (valor de absorbancia mínimo de cada ensayo, resultante de la adición de PBS a un pocillo tapizado con saliva), expresándose en tanto por cien (Forthal et al., 1998; Forthal et al., 2001).

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{OD_{\text{muestra}} - OD_{\text{mínima}}}{OD_{\text{referencia}} - OD_{\text{mínima}}}$$

5.3.1. Método de Bradford

Con el fin de conocer la concentración de proteínas en las muestras de saliva empleadas se aplicó el test de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories).

A partir de una solución de seroalbúmina bovina (BSA) de concentración 1,4 mg/ml, se preparaban soluciones conteniendo 1, 5, 10, 15, 20 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de BSA en suero fisiológico. De la siguiente manera:

Solución A (100 µg/ml) = 72 µl BSA + 928 µl de SF

Solución 1 (20 µg BSA/ml): 200 µl de solución A + 600 µl de SF

Solución 2 (20 µg BSA/ml): 160 µl de solución A + 640 µl de SF

Solución 3 (15 µg BSA/ml): 120 µl de solución A + 680 µl de SF

Solución 4 (10 µg BSA/ml): 80 µl de solución A + 720 µl de SF

Solución 5 (5 µg BSA/ml): 40 µl de solución A + 760 µl de SF

Solución 6 (1 µg BSA/ml): 8 µl de solución A + 792 µl de SF

Blanco (por duplicado): 800 µl de SF

A continuación, se tomaban 0,8 ml de cada una de las soluciones preparadas en tubos estériles, así como 0,8 ml de la muestra a cuantificar. Se añadía a cada tubo 0,2 ml de reactivo colorante Serva Blue G Dye[®] y se agitaba intensamente, evitando la formación de burbujas. Transcurridos 5 minutos se realizaban lecturas espectrofotométricas de los tubos a 595 nm en espectrofotómetro (UNICAM modelo Helios α), utilizando el tubo de suero fisiológico como blanco. Con las lecturas de las soluciones preparadas inicialmente se elaboraba una curva patrón y se extrapolaban los resultados obtenidos en la muestra.

Saliva FUT2 positivo (SeSe)	1.134,8 µg/ml
Saliva FUT2 negativo homocigoto (sese)	826,6 µg/ml
Saliva FUT2 negativo heterocigoto (Sese)	928,2 µg/ml

5.4. ANÁLISIS POR ELISA DE ANTICUERPOS EN LECHE MADURA/DE TRANSICIÓN Y SUERO FRENTE A NoV

La determinación de los Ac anti-NoV en leche madura/de transición y suero se realizó mediante técnica de ELISA. Se sensibilizaban placas de poliestireno de microtitulación de 96 pocillos (Costar, nº ref. 3.590) con 100 µl de una suspensión de VLPs a 200 µg/ml en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 para estudio por ELISA de anticuerpos frente a dichas VLPs (20 µg/pocillo). Para ello se incubaban a 37°C durante 2 horas y conservaban una noche a 4°C (hasta un máximo de 10 días antes de su utilización).

Se realizaron diluciones de las muestras a estudio en PBS-T 0,01%-BSA 1%. Las muestras de suero se analizaron a las siguientes diluciones: 1/50, 1/100, 1/500, 1/1.000 y

1/5.000. Las muestras de leche madura, y en caso de carecer de ella, de leche de transición, se diluyeron a 1/100, 1/500 y 1/1.000 (tabla 29).

Tabla 29. DILUCIONES DE LAS MUESTRAS DE SUERO Y LECHE MADURA PARA EL ANÁLISIS DE ANTICUERPOS FRENTE A NoV	
SUERO	LECHE MADURA
1/50	1/100
1/100	1/500
1/500	1/1.000
1/1.000	
1/5.000	

Tras vaciar los pocillos y lavar 3 veces con 200 µl de PBS-T 0,01%, se añadían 100 µl de estas diluciones de suero o leche materna e incubaban 2 horas a 37°C.

A continuación, se añadían 100 µl de dilución 1/2000 de IgG anti-IgG humana marcada con peroxidasa producida en cabra (Sigma Immunochemicals, ref. nº G-3010) para la determinación de IgG específica anti-NoV en suero y leche materna, e IgG anti-IgA humana marcada con peroxidasa producida en cabra (Sigma Immunochemicals, ref. nº A-0295) en los análisis de IgA anti-NoV en leche materna.

Se vaciaban los pocillos, se lavaban 4 veces con 200 µl de PBS-T 0,05% y revelaban con 100 µl de la solución sustrato OPD. La absorbancia se leía en espectrofotómetro (Multiskan FC, Thermo Scientific) a 492 nm.

Los valores de referencia de los ensayos, los valores máximos esperados, se diseñaron de la siguiente manera: (a) para los ensayos de determinación de IgG anti-NoV en suero y leche materna se tomó una muestra de suero de un individuo convaleciente en un brote epidémico por NoV con una titulación elevada de estos Ac, y (b) para los análisis de IgA en leche materna, se seleccionó la muestra de leche materna del primer ensayo de ELISA realizado que presentó el valor de absorbancia más elevado y así sirvió como valor de referencia en los análisis sucesivos. Los valores mínimos del ensayo se diseñaron sustituyendo la muestra problema (suero o leche materna) por PBS-T 0,05%.

Se consideraron resultados valorables aquellas mediciones de absorbancia que triplicaban el valor mínimo esperado.

El título de anticuerpos se definió como la dilución más elevada cuya absorbancia mostraba un resultado positivo.

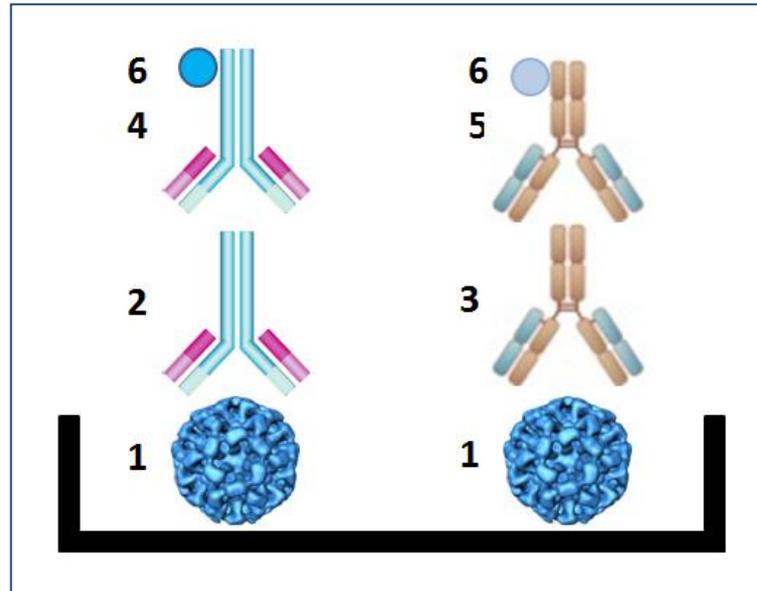


Figura 29. Esquema de los análisis por ELISA de anticuerpos en suero y leche madura frente a NoV.

El análisis por ELISA de anticuerpos IgG anti-NoV en suero y leche madura (2) e IgA anti-NoV en leche madura (3) se realiza incubando las muestras en pocillos de placas de microtitulación tapizadas con VLPS de NoV GII.4 (1).

La unión resultante se detecta mediante IgG anti-IgG humana (4) e IgG anti-IgA humana (5) marcadas con peroxidasa (6), respectivamente. El revelado se realiza con OPD.

5.5. DETERMINACIÓN POR PCR DEL GENOTIPO SECRETOR (GEN FUT2)

Para determinar el estado secretor, definido por la presencia del antígeno H tipo 1, se amplificó un fragmento del gen FUT2, codificante de la enzima α 1,2-fucosiltransferasa, siguiendo la metodología de PCR-RFLP descrita por Lindesmith et al. en 2003 y Serpa et al. en 2004, con ciertas modificaciones.

5.5.1. Extracción del ADN total de las muestras de leche materna

Se realizó mediante el método QIAamp DNA Mini (50) Kit de Qiagen (catálogo n° 51.304. Hilden, Alemania). El ADN obtenido se utilizaba posteriormente para la amplificación por PCR del gen FUT2.

Para ello, en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se añadían 20 μ l de la proteasa Qiagen (proteínasa K), 200 μ l de leche materna y 200 μ l del tampón AL del kit, mezclándolos mediante

vórtex durante 15 s. A continuación se incubaba la solución resultante a 56°C durante 10 min. Tras centrifugar brevemente el tubo, se añadían 200 µl de etanol 96% a la muestra y se mezclaba y centrifugaba nuevamente. Con cuidado se introducía la solución en una “QIAamp Mini spin column”, diseñada para realizar un filtrado de la muestra, en un tubo de colección de 2 ml y se centrifugaba a 6.000 g (8.000 rpm) durante 1 min. Tras esto, se colocaba la “QIAamp Mini spin column” en un tubo de 2 ml nuevo, descartando el tubo que contenía el filtrado resultante.

Los pasos sucesivos consistían en la adición de 500 µl de tampón AW1, 500 µl de tampón AW2 y 200 µl de tampón AE (todos ellos del kit) o agua destilada, centrifugando a 6.000 g 1 min, 20.000 g 3 min y 6.000 g 1 min tras cada adición, respectivamente, colocando la “QIAamp Mini spin column” en tubos nuevos tras cada paso y descartando el filtrado resultante.

5.5.2. Análisis por PCR del gen FUT2

Completada la extracción de ADN, el procedimiento fue el siguiente. A cada tubo de reacción se le añadieron 5 µl del ADN y 5 µl de la mezcla de tampón de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, y KCl 500 mM de Invitrogen), 2,4 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 20 pmoles de cada uno de los cebadores, 2,5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, ref. nº 10.342) y agua destilada y autoclavada (libre de ADNasas y ARNasas).

La reacción de PCR se llevó a cabo de la siguiente manera: un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 70°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 1 min, por último, un paso de extensión final a 72°C 10 min. Los cebadores o “primers” empleados se detallan en la siguiente tabla (*Tabla 30*).

Tabla 30. SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN SECRETOR HUMANO, FUT2 (LINDESMITH ET AL., 2003)

Secuencia 5'-3'	Ubicación (nt.)	Tm (°C)	Tamaño	% G C
GAGGAATACCGCCACATCCCGGGGAGTAC	403-432	72,9	30	63,3
ATGGACCCCTACAAAGGTGCCCGGCCGGCT	568-597	77,2	30	66,7

% GC: porcentaje guanina-citosina.

Los productos de amplificación de 195 pares de bases (pb), fueron observados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (Agarosa DS de Pronadisa, ref. n° 8.046) en tampón Tris-borato (TBE) con bromuro de etidio (EtBr) 0,5 µg/ml (Anexo 7). La migración electroforética se realizó a 90 voltios durante 60 min en cubetas Minicell Primo EC320. Se visualizaron y fotografiaron las bandas y se estimó su tamaño utilizando como referencia de peso molecular el marcador 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen), utilizando un equipo Gelprinter TDI.

Una vez obtenidos los productos de amplificación por PCR, fueron sometidos a una digestión enzimática empleando la enzima de restricción Ava II (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, EEUU). Un producto no digerido por la enzima define a la persona como “no secretor” o Se⁻ (sese), por el contrario, cuando ocurre la digestión, se evidencian dos fragmentos (59 pb y 136 pb) que permiten clasificar a las personas como “secretores”, homocigotos (SeSe) o heterocigotos (Sese), como muestra la *figura 30*.

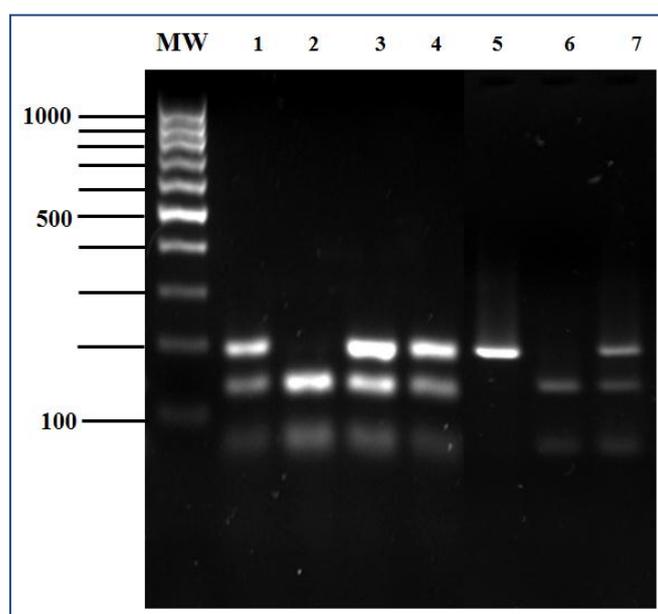


Figura 30. Imagen de electroforesis de los productos de amplificación por PCR del gen FUT2 sometidos a digestión enzimática por Ava-II.

Carril 1: marcador de pesos moleculares (MW) 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Los carriles 1, 3, 4 y 7 presentan 3 bandas de 195, 136 y 59 pb y corresponden a individuos secretores heterocigotos.

Los carriles 2 y 6 presentan 2 bandas de 136 y 59 pb y corresponden a individuos secretores homocigotos.

El carril 5 presenta una banda de 195 pb y corresponde a un individuo no secretor.

Para tal fin, se tomaron 7 µL del ADN amplificado, 1,5 µL de tampón 4 (50 mM acetato de potasio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 1 mM DTT a pH 7,9), 10 U de la enzima Ava II y H₂O miliQ c.s.p. 15 µL. Tras una incubación de 3 horas a 37°C, las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 2% teñidos con EtBr (0,5 µg/ml).

Para la preparación del gel de agarosa, se vertían 30 ml del tampón de electroforesis Tris-borato (TBE) y agarosa (Agarosa DS de Pronadisa, ref. nº 8.046) para una concentración final de 2% en un matraz. A continuación, se fundía la solución de agarosa en un microondas o placa calefactora y dejaba enfriar la suspensión hasta alcanzar unos 50°C aproximadamente. Se sellaba con cinta adhesiva el soporte donde se iba a verter el gel de agarosa y se colocaba el peine que serviría para formar los pocillos del gel.

Una vez que la solución de agarosa alcanzaba los 50°C, se le añadía bromuro de etidio para concentración final de 0,5 µg/ml y se mezclaba bien. Se vertía la solución de agarosa con bromuro de etidio en el soporte, previamente sellado y dejaba solidificar durante unos 30 minutos.

Mediante esta técnica, el ADN en presencia de un campo eléctrico migraba en un gel poroso en función de su peso molecular. La migración electroforética se realizaba a 90 voltios durante 60 min. Se visualizaban y fotografiaban las bandas y se estimaba su tamaño utilizando como referencia de peso molecular la 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, ref. nº 31.006).

En ciertas muestras, la determinación del gen FUT2 se realizó mediante la secuenciación directa de los amplicones obtenidos en la prueba de PCR. Para ello, los amplicones fueron purificados siguiendo las instrucciones del sistema QIAquick PCR purification kit (Qiagen) y se utilizó el cebador antisentido para la reacción de secuenciación, que se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Valencia.

Para determinar la homocigosidad o heterocigosidad de un individuo en relación con el gen FUT2 (mutación G428A, 385 A > T), se ubicó el polimorfismo del gen en la siguiente secuencia 5'...AAGGTCCAGGAGC...3'. El análisis del cromatograma indicó la presencia de un doble pico en la posición del polimorfismo para aquellos individuos secretores heterocigotos (*figura 31 A*), mientras que se observó un solo pico en pacientes secretores homocigotos (*figura 31 B*) y ninguno en no secretores (*figura 31 C*).

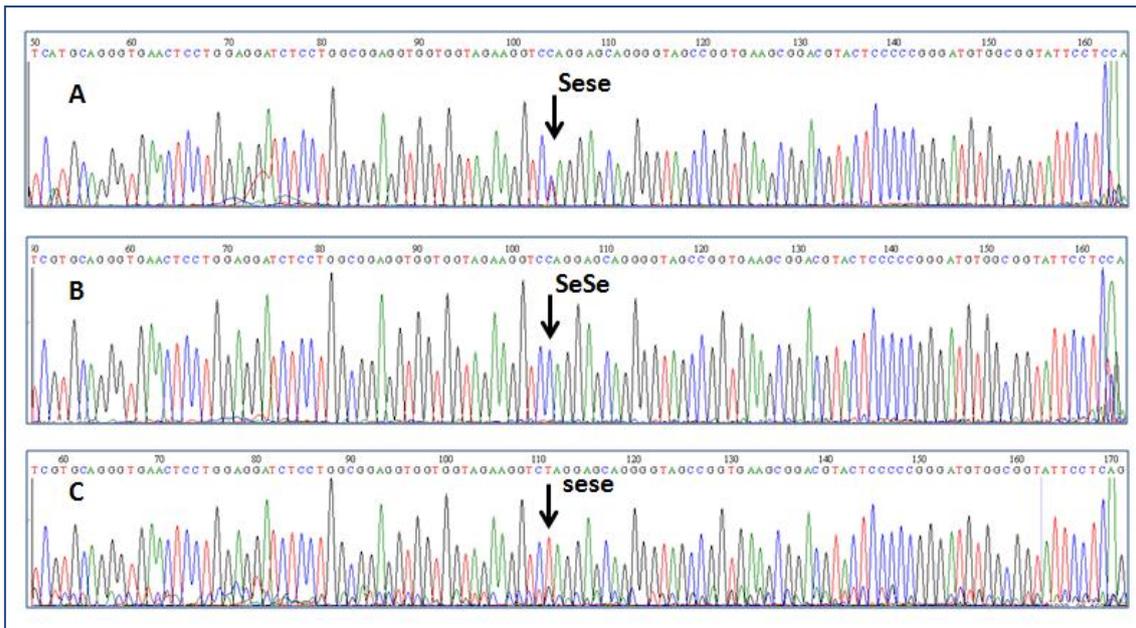


Figura 31. Cromatogramas del gen FUT2: (A) secretor heterocigoto, (B) secretor homocigoto y (C) no secretor.

5.6. DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS LEWIS

La caracterización de los antígenos Lewis se realizó en las muestras de saliva empleadas en el estudio (*tabla 20*), así como en las muestras de leche madura (y en su defecto de transición) de cada una de las madres participantes en el estudio.

Para ello se sensibilizaban pocillos de placa de microtitulación con 100 μ l de una dilución en tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6 de cada una de las muestras de saliva a una concentración de 2 μ g/ml o de leche madura (en su defecto de leche de transición) diluídas 1/10. Se incubaban las placas durante 2 horas a 37°C y guardaban a 4°C durante la noche.

Tras lavar 3 veces con tampón PBS-T 0,05%, se bloqueaban las placas con 100 μ l de PBS-T 0,05%-BSA 0,5% durante 1 hora a 37°C. Tras 3 nuevos lavados, se añadían 100 μ l de una dilución 1/100 en PBS-T 0,05%-BSA 0,5% del AcMo frente el antígeno Lewis a, b, x, y (detallados en la *tabla 21*), incubando posteriormente durante 2 h a 37°C. Los valores mínimos esperados de cada ensayo serían aquellos en los que se añadía PBS-T 0,05% en sustitución del AcMo específico.

Tras lavar de nuevo, se añadían 100 μ l de dilución 1/2000 de anti-IgG de ratón producida en cabra marcada con peroxidasa en los ensayos de determinación de Ag Lewis a/b (Sigma Immunochemicals, ref. n° G-3010) y anti-IgM de ratón producida en cabra marcada con

peroxidasa (Sigma Immunochemicals, ref. nº A-8786) en los ensayos de determinación de Ag Lewis x/y. Tras esto se incubaba nuevamente 1 hora y media.

La adición de 100 µl de solución de OPD en tampón citrato/fosfato pH 5 con H₂O, seguido de 50 µl H₂SO₄ 15 minutos después (para frenar la reacción), permitía el revelado y la lectura en espectrofotómetro a 492 nm nos proporcionaba el resultado.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En primer lugar se realizó una descripción de los resultados obtenidos. En el caso de las variables cualitativas se expresaron como número de casos y porcentaje (origen geográfico, grupo de edad gestacional, grupo sanguíneo, genotipo FUT2, antígenos Lewis y títulos de Ig) y las variables cuantitativas como nº de casos, media y desviación típica, mediana e intervalo intercuartílico, mínimo y máximo (edad materna, edad gestacional, porcentajes de inhibición de leche materna y de suero).

En cuanto al análisis estadístico se aplicó la prueba de *Chi* cuadrado para las variables cualitativas y pruebas no paramétricas en el caso de las variables cuantitativas, tras demostrar que no seguían una distribución normal con la prueba de Shapiro-Wilks. Para establecer comparaciones entre múltiples variables cuantitativas continuas independientes y variables cualitativas se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y en caso de hallar diferencias estadísticamente significativas se buscaron los pares responsables de estas diferencias con la prueba de Mann-Whitney. De forma análoga, para múltiples variables cuantitativas continuas apareadas se empleó la prueba de Friedman y la W de Wilcoxon para las comparaciones dos a dos. Realizándose una selección de datos según lista que no excluye ningún dato, con lo que no se pierde información.

En los estudios de correlación se empleó la correlación de Pearson entre variables cuantitativas continuas que no seguían una distribución normal y la correlación de Spearman si al menos una de ellas era una variable cuantitativa discreta ordenada. Realizándose una selección de datos según pareja que iguala el número de casos de cada variable, para una mayor corrección.

El nivel de significación estadística empleado en todos los análisis ha sido del 5% (*p*-valor < 0,05), excepcionalmente de 10% (*p*-valor < 0,1). En los casos en que debía aplicarse la corrección de Bonferroni el *p*-valor resultaba del cociente de 0,05 y el nº de comparaciones realizadas.

Para estos análisis se ha utilizado el software SPSS 19.0 (Lead Technologies, Inc.).

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA POBLACIONAL

Se analizaron las siguientes características generales de la muestra poblacional: edad materna en el momento del parto, edad gestacional y origen geográfico materno.

Las edades maternas en el momento del parto y las semanas de gestación se recogen en la *tabla 31*. Se expresan como nº de casos y porcentaje (%), media y desviación típica (DT), mediana e intervalo intercuartílico (I.Q.), mínimo y máximo. La edad materna promedio fue de 31 años, oscilando de 16 a 40 años. En relación con la duración de la gestación, 62 fueron gestaciones a término y 49 finalizaron de forma prematura (*figura 32*). Estas últimas se dividieron en 3 subgrupos atendiendo al grado de prematuridad, como se muestra en la *tabla 32*.

Tabla 31. EDAD EN EL MOMENTO DEL PARTO DE LAS MADRES PARTICIPANTES Y EDAD GESTACIONAL					
		N	Media	Mediana	Mínimo - máximo
		(%)	(DT)	(I.Q.: P₂₅ - P₇₅)	
EDAD MATERNA (años)		109	31 (5,6)	31,3 (27,1 – 35,2)	16,2 – 40,6
EDAD GESTACIONAL (semanas de gestación)	Todos	111	36,2 (4,6)	38 (33 – 38)	24 - 42,3
	RN a término	62 (55,9%)	39,7 (1,2)	40 (38,8 – 40,3)	37,1 - 42,3
	RN pretérmino	49 (44,1%)	31,8 (3,4)	32,4 (30 – 34,4)	24 – 36,6

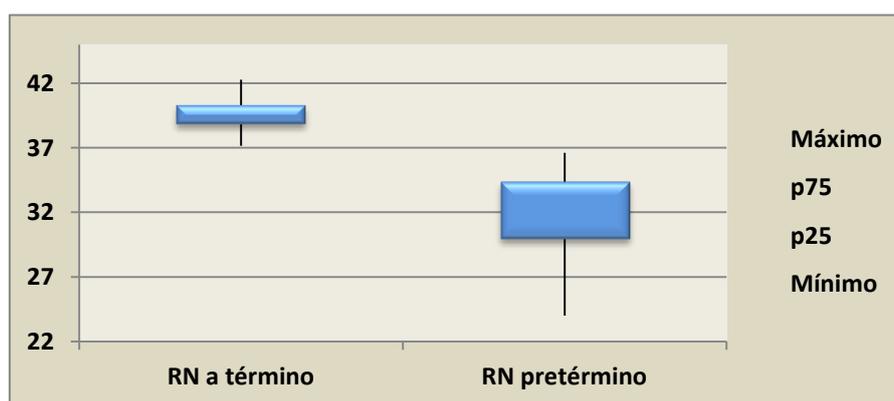


Figura 32. Mediana, intervalo intercuartílico y rango de edad gestacional (semanas de gestación) de la muestra de estudio.

Tabla 32. CARACTERÍSTICAS DE GRUPOS DE RN PRETÉRMINO (semanas de gestación)

PREMATURIDAD	N (%)	Media (DT)	Mediana (I.Q. : P ₂₅ – P ₇₅)	Mín.-máx.
Leve (≥ 32 y < 37 semanas)	33 (67,3%)	33,8 (1,6)	34 (32,4 – 35)	32,9 - 36,7
Moderada (≥ 28 y < 32 semanas)	9 (18,4%)	30,1 (1)	30 (29,6 – 31)	29 - 31,9
Extrema (< 28 semanas)	7 (14,3%)	25,9 (1,4)	26 (24,6 – 27,3)	24 - 27,7

Respecto al origen geográfico de las madres participantes, como se muestra en la *tabla 33* y en la *figura 33*, el origen español, como era esperable, fue el predominante (64,8%), seguido del origen latinoamericano (19,8%).

Tabla 33. ORIGEN GEOGRÁFICO DE LAS MADRES

ORIGEN GEOGRÁFICO	N (%)
España	72 (64,9%)
Latinoamérica	22 (19,8%)
Europa del Este	11 (9,9%)
Marruecos	5 (4,5%)
China	1 (0,9%)

Figura 33. Origen geográfico



2. GRUPOS SANGUÍNEOS, GENOTIPO FUT2 Y ANTÍGENOS LEWIS

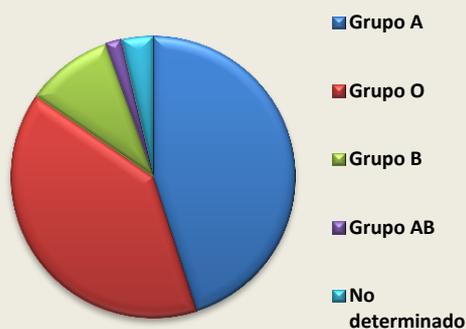
2.1. GRUPOS SANGUÍNEOS

Los grupos sanguíneos más frecuentes, A y O, representaron un 85,5% de las muestras.

Tabla 34. GRUPOS SANGUÍNEOS DE LAS MADRES

GRUPO SANGUÍNEO	N (%)
Grupo A	51 (45,9%)
Grupo O	44 (39,6%)
Grupo B	11 (9,9%)
Grupo AB	2 (1,8%)
Desconocido	3 (2,8%)

Figura 34. Grupos sanguíneos



2.2. GENOTIPO FUT2

El nº de casos y porcentaje del genotipo FUT2 de las madres participantes en el estudio se muestra en la *tabla 35* y *figura 35*. Se observa que las madres con genotipo FUT2 secretor, tanto homocigotas (SeSe) como heterocigotas (Sese) fueron un 86,5% de la totalidad, frente al 13,5% de las madres no secretoras (sese).

Analizamos la proporción de madres secretoras y no secretoras según su origen geográfico (*tabla 36*), edad gestacional (*tabla 37*) y grupo sanguíneo (*tabla 38*).

Encontramos que el grupo geográfico predominante de madres españolas presentó una proporción de mujeres secretoras (homocigotas y heterocigotas) de un 83,3 % de los casos. Además, encontramos diferencias estadísticamente significativas en la proporción de madres secretoras y no secretoras según su origen geográfico (*tabla 36*).

Tabla 35. GENOTIPO FUT2 DE LAS MADRES

GENOTIPO FUT2	N (%)
Secretor homocigoto	24 (21,6%)
Secretor heterocigoto	72 (64,9%)
No secretor	15 (13,5%)

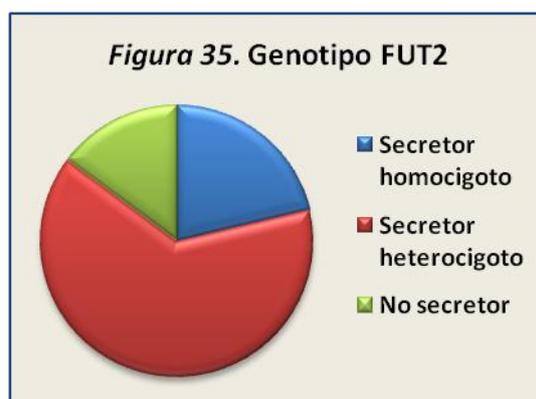


Tabla 36. GENOTIPO FUT2 SEGÚN ORIGEN GEOGRÁFICO MATERNO

	Madres no secretoras (sese)		Madres secretoras (SeSe / Sese)		Chi cuadrado*
	N	Porcentaje**	N	Porcentaje**	p-valor
España	12	16,7%	60	83,3%	0,000
Latinoamérica	2	9,1%	20	90,9%	
Europa Este	1	9,1%	10	90,9%	
Marruecos	-	-	5	100%	
China	-	-	1	100%	

** Para cada origen geográfico; * N° de casillas con valor esperado < 5 es de 0.

Los grupos de madres con partos pretérmino y a término fueron homogéneos en relación con la proporción de madres secretoras y no secretoras, como muestra la *tabla 37*.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de madres secretoras y no secretoras de los grupos sanguíneos más frecuentes: A y O (*tabla 38*).

La proporción de los diferentes antígenos Lewis (Le a/b y Le x/y) en madres secretoras y no secretoras se mostrará en el siguiente epígrafe (*tabla 42*).

Tabla 37. GENOTIPO FUT2 SEGÚN EDAD GESTACIONAL					
	Madres no secretoras (sese)		Madres secretoras (SeSe / Sese)		Chi cuadrado*
	N	Porcentaje**	N	Porcentaje**	p-valor
A término	5	7,9%	58	92,1%	0,155
Pretérmino	10	20,8%	38	79,2%	

** Para cada grupo de edad gestacional; * N° de casillas con valor esperado < 5 es de 0.

Tabla 38. GRUPOS SANGUÍNEOS DE LAS MADRES SEGÚN GENOTIPO FUT2					
	Madres no secretoras (sese)		Madres secretoras (SeSe / Sese)		Chi cuadrado*
	N	Porcentaje**	N	Porcentaje**	p-valor
Grupo A	7	13,7%	44	86,3%	0,473
Grupo O	4	9,1%	40	90,9%	
Grupo B	3	27,3%	8	72,7%	
Grupo AB	1	50%	1	50%	
Desconocido	-	-	3	100%	

** Para cada grupo sanguíneo; * N° de casillas con valor esperado < 5 es de 0.

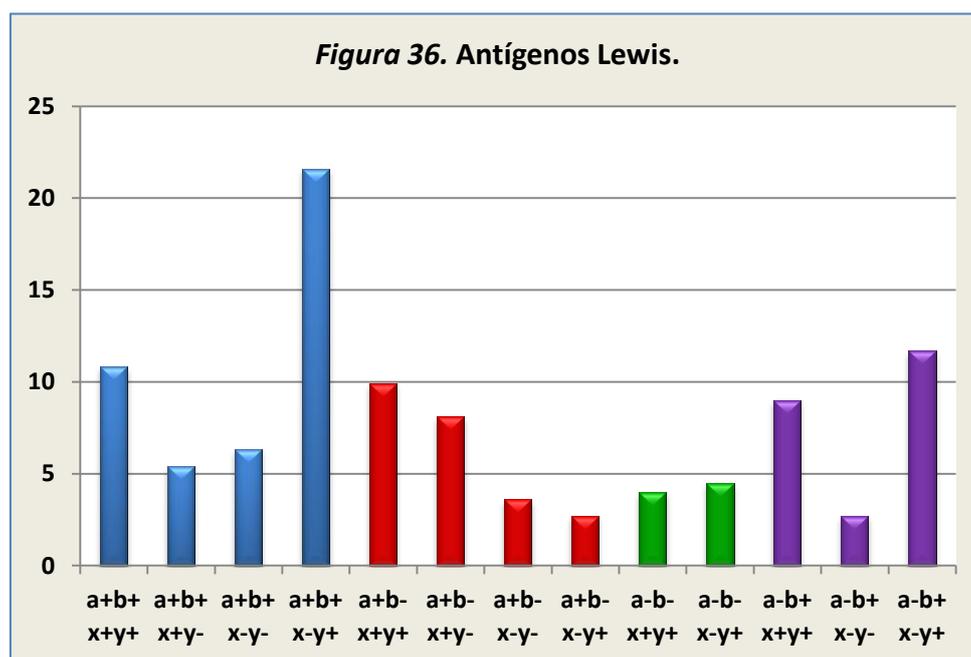
2.3. ANTÍGENOS LEWIS

Los resultados de la determinación de los antígenos Lewis se muestran a continuación: Los datos se presentan agrupados como parejas (Le a/b y Le x/y) atendiendo a la relación existente en las vías de síntesis de los mismos (según se expuso en el apartado 3.9.1 de *Introducción*).

En la siguiente tabla (tabla 39) se muestran todas las opciones posibles y el nº de mujeres integrantes de cada una de estas posibilidades.

Tabla 39. ANTÍGENOS LEWIS DE LAS MADRES				
	Le x⁺ y⁺	Le x⁺ y⁻	Le x⁻ y⁻	Le x⁻ y⁺
Le a⁺ b⁺	12 (10,8%)	6 (5,4%)	7 (6,3%)	24 (21,6%)
Le a⁺ b⁻	11 (9,9%)	9 (8,1%)	4 (3,6%)	3 (2,7%)
Le a⁻ b⁻	4 (3,6%)	0	0	5 (4,5%)
Le a⁻ b⁺	10 (9%)	0	3 (2,7%)	13 (11,8%)

Los antígenos Lewis más frecuentes fueron las combinaciones de Lewis a⁺b⁺ y Lewis x⁻y⁺ (21,6%), seguidas por Lewis a⁻b⁺ y Lewis x⁻y⁺ (11,7%) y Lewis a⁺b⁺ y Lewis x⁺y⁺ (10,8%), como se muestra en la *figura 36*.



A continuación se muestran dos tablas que recogen: el número de casos de los diferentes antígenos Lewis según su origen geográfico, edad gestacional y grupos sanguíneos maternos (*tabla 40*). Los antígenos Lewis más frecuentes en las mujeres españolas estudiadas fueron Lewis a⁺b⁺ y Lewis x⁻y⁺ (25,8%), seguidas por Lewis a⁺b⁻ y Lewis x⁻y⁺ (12,9%), a diferencia

del grupo de madres de origen latinoamericano en las que los antígenos Lewis a^+b^+ y Lewis x^+y^+ coincidieron con los Lewis a^-b^+ y Lewis x^+y^+ en la frecuencia de casos: 22,7%. En relación a la edad gestacional, en el grupo de RNPT destacaron los Lewis a^+b^+ y Lewis x^-y^+ con un 30,8% de los casos. En los RNAT fueron los Lewis a^+b^+ y Lewis x^+y^+ , junto con los Lewis a^+b^+ y Lewis x^-y^+ los más frecuentes con un 16,7% de casos cada uno. Para cada uno de los grupos sanguíneos los antígenos Lewis más frecuentes fueron muy variables, no apreciándose un predominio claro salvo en el grupo sanguíneo A donde los Lewis a^+b^+ y Lewis x^-y^- supusieron el 14,9% de los casos.

Tabla 40. ANTÍGENOS LEWIS MATERNO SEGÚN SU ORIGEN GEOGRÁFICO, GRUPO DE EDAD GESTACIONAL Y SANGUÍNEO

		Origen geográfico (N)					Edad gestacional (N)		Grupos sanguíneos (N)			
		1	2	3	4	5	RNPT	RNAT	A	O	B	AB
a^+b^+	x^+y^+	6	5	0	0	1	4	8	6	5	1	0
	x^+y^-	4	1	0	1	0	5	1	2	3	1	0
	x^-y^-	5	1	0	1	0	6	1	4	2	0	0
	x^-y^+	16	3	3	2	0	16	8	13	8	2	0
a^+b^-	x^+y^+	7	3	1	0	0	6	5	5	3	2	0
	x^+y^-	8	0	1	0	0	3	6	4	2	2	1
	x^-y^-	1	1	2	0	0	1	3	3	1	0	0
	x^-y^+	2	0	1	0	0	1	2	1	2	0	0
a^-b^-	x^+y^+	3	1	0	0	0	3	1	4	0	0	0
	x^+y^-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	x^-y^-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	x^-y^+	5	0	0	0	0	2	3	1	2	2	0
a^-b^+	x^+y^+	4	5	1	0	0	5	5	4	6	0	0
	x^+y^-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	x^-y^-	1	1	1	0	0	1	2	0	2	1	0
	x^-y^+	0	1	1	1	0	10	3	4	8	0	1

1: España; 2: Latinoamérica; 3: Europa del Este; 4: Marruecos; 5: China.

RNAT: recién nacido a término; RNPT: recién nacido pretérmino.

Dado que muchas de las opciones mostraron un valor esperado < 5 no fue posible aplicar una prueba de *Chi* cuadrado para buscar diferencias en la proporción de antígenos Lewis para cada uno de los subgrupos de cada variable. Por tanto, se aplicó un estudio de regresión logística que permitió analizar el origen geográfico y la edad gestacional al tratarse de variables dicotómicas (madres españolas y latinoamericanas; pretérmino y a término). Sin embargo, no fue posible su aplicación al estudio de los grupos sanguíneos puesto que ninguno de ellos se podía excluir para convertir la variable en dicotómica. Los antígenos Lewis se analizaron individualmente (por ej: Lewis a⁺/a⁻, b⁺/b⁻, etc.). No se hallaron diferencias en la proporción de antígenos Lewis en función de su origen geográfico ni grupo de edad gestacional, salvo en el caso del antígeno Lewis x que sí presenta diferencias en función del origen geográfico materno para *p*-valor de 0,05 (tabla 41). La prueba de *Chi* cuadrado confirmó tal diferencia.

Tabla 41. ANÁLISIS ANTÍGENOS LEWIS SEGÚN EL ORIGEN GEOGRÁFICO MATERNO Y EDAD GESTACIONAL (estudio de regresión logística)

	ORIGEN GEOGRÁFICO					EDAD GESTACIONAL				
	España (N)		Latinoamérica (N)		<i>p</i> -valor	RNPT (N)		RNAT (N)		<i>p</i> -valor
	Resultado Ag Lewis					Resultado Ag Lewis				
	+	-	+	-	+	-	+	-		
Lewis a	14	8	8	3	0,73	34	14	42	21	0,81
Lewis b	17	5	6	5	0,11	28	20	47	16	0,07
Lewis x	15	7	3	8	0,03	26	22	26	37	0,37
Lewis y	18	4	7	4	0,88	35	13	47	16	0,86

En la tabla 42 se muestra la proporción de los antígenos Lewis según el genotipo FUT2. Se observa que la gran mayoría de las madres secretoras son Lewis b⁺ (78,1% de los casos) y la totalidad de las madres no secretoras fueron Lewis b⁻. Lo que es esperable debido a que el gen FUT2 se considera imprescindible para la síntesis del antígeno Lewis b, por lo que no se aplicó ninguna prueba estadística para su valoración. Además las madres no secretoras fueron todas Lewis a⁺.

La aplicación de la prueba de regresión logística al estudio de la proporción de los diferentes antígenos Lewis en madres secretoras y no secretoras mostró diferencias en el Lewis x, lo que confirmó la prueba de *Chi* cuadrado (*p*-valor = 0). Los resultados se muestran en la tabla 43.

Tabla 42. ANTÍGENOS LEWIS DE LAS MADRES SEGÚN SU GENOTIPO FUT2

		Madres no secretoras (sese)		Madres secretoras (SeSe / Sese)	
		N	Porcentaje*	N	Porcentaje**
a⁺ b⁺	x⁺ y⁺	0	-	12	12,5 %
	x⁺ y⁻	0	-	6	6,3%
	x⁻ y⁻	0	-	7	7,3%
	x⁻ y⁺	0	-	24	25%
a⁺ b⁻	x⁺ y⁺	8	53,3%	3	3,1%
	x⁺ y⁻	6	40%	3	3,1%
	x⁻ y⁻	0	-	4	4,2%
	x⁻ y⁺	1	6,7%	2	2,1%
a⁻ b⁻	x⁺ y⁺	0	-	4	4,2%
	x⁺ y⁻	0	-	0	-
	x⁻ y⁻	0	-	0	-
	x⁻ y⁺	0	-	5	5,2%
a⁻ b⁺	x⁺ y⁺	0	-	10	10,4%
	x⁺ y⁻	0	-	0	-
	x⁻ y⁻	0	-	3	3,1%
	x⁻ y⁺	0	-	13	13,5%

* Porcentaje del grupo de madres no secretoras; ** Porcentaje del grupo de madres secretoras.

Tabla 43. ANTÍGENOS LEWIS SEGÚN EL GENOTIPO FUT2 MATERNO

(estudio de regresión logística)

	GENOTIPO FUT2				<i>p</i> -valor
	No secretoras (N)		Secretoras (N)		
	Resultado Ag Lewis				
	+	-	+	-	
Lewis a	15	0	61	35	0,1
Lewis b	0	15	75	21	*
Lewis x	14	1	38	58	0,04
Lewis y	9	6	73	23	0,26

* No aplicable.

3. ANÁLISIS REALIZADOS EN LECHE MATERNA

Se analizaron con carácter longitudinal muestras de leche materna procedentes de 111 madres, evaluadas en los 3 periodos de secreción: calostro, leche de transición y leche madura. Se recogieron un total de 287 muestras de leche materna: 106 muestras de calostro, 98 muestras de leche de transición y 83 muestras de leche madura.

En cada una de las muestras se cuantificó la actividad bloqueante sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor (sese) y secretor homocigoto (SeSe) y el título de anticuerpos específicos tipo IgA anti-NoV GII.4. Los resultados pormenorizados se exponen en los siguientes epígrafes.

Para facilitar el seguimiento de los resultados en la *figura 37* se muestra un algoritmo con el diseño del estudio y el nº de muestras empleadas en cada ensayo. Para la realización de los ensayos de bloqueo se utilizaron muestras de las 3 etapas madurativas, diseñándose ensayos frente a saliva de individuo no secretor (sese) y secretor homocigoto (SeSe). El análisis de Ac anti-NoV tipo IgA en leche materna se realizó en muestras de leche madura y, en caso de no disponerse de dicha muestra, en leche de transición.

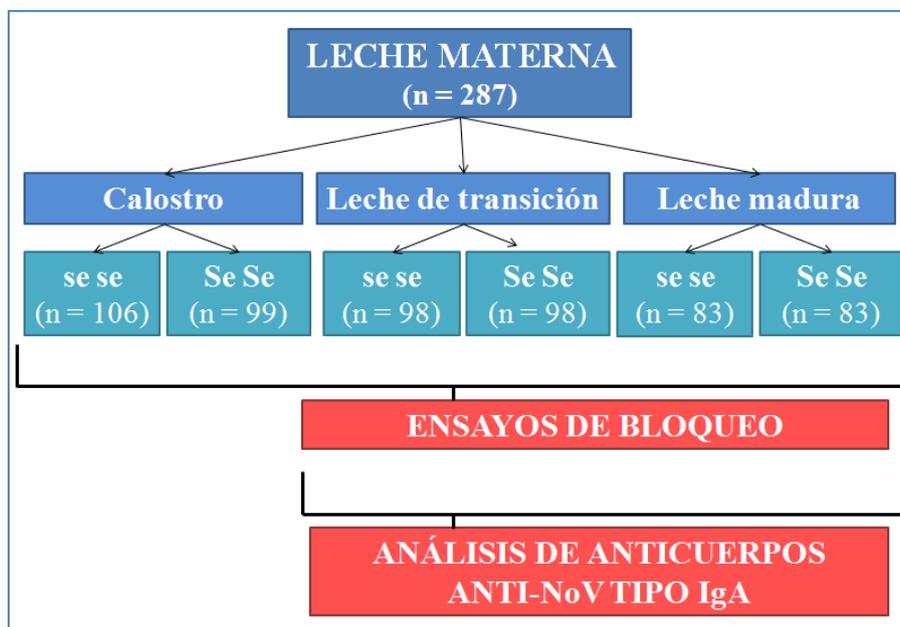


Figura 37. Algoritmo de los análisis realizados en leche materna y nº de muestras empleadas.

3.1. ACTIVIDAD BLOQUEANTE DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NOROVIRUS GII.4 A SALIVA

Los ensayos de bloqueo de la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva se realizaron mediante técnica de ELISA. A partir de ellos se calculó el porcentaje de inhibición de cada muestra, según se describe en el apartado 5.3 de *Material y métodos*.

Se estableció un valor de porcentaje de inhibición (PI) del 60% para delimitar si las muestras de leche materna presentaban capacidad bloqueante (PI > 60%) o no (PI < 60%), según referencias de Ward et al., 1990 y Coulson et al., 1990.

En el análisis de los resultados se diferenciaron los ensayos de bloqueo de la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor (sese) y de secretor homocigoto (SeSe). A su vez se subdividieron según la etapa madurativa.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

3.1.1. Ensayos de bloqueo de la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor (sese)

Los resultados de los ensayos realizados en muestras de calostro, leche de transición y madura sin diluir y diluídas 1/100 fueron los siguientes:

De las 106 muestras de calostro analizadas, 103 muestras sin diluir (97,1% del total) y 102 muestras diluídas 1/100 (96,2% del total) mostraron un PI superior al 60%.

Analizamos 98 muestras de leche de transición, de las cuales, 94 muestras sin diluir (96% del total) y 96 diluídas 1/100 (98% del total) mostraron un PI superior al 60%.

En relación con las muestras de leche madura, de las 83 muestras evaluadas, 82 sin diluir (98,7% del total) y 81 de leche diluída 1/100 (97,6% del total) mostraron capacidad inhibitoria.

Así pues, se observó que prácticamente la totalidad de las muestras de leche materna eran capaces de inhibir la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor (sese), lo que se muestra en la *tabla 44*.

Tabla 44. ACTIVIDAD BLOQUEANTE DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA DE INDIVIDUO NO SECRETOR (sese)

Etapa	Dilución	N	Muestras que inhiben	Media PI (DT) %	Mediana (I. Q.: P ₂₅ – P ₇₅)	Mínimo - máximo
Calostro	Sin diluir	106	103 (97,2%)	97 (12,4)	100 (100 – 100)	55 - 100
	1/100		102 (96,2%)	96,2 (14)	100 (100 – 100)	0 - 100
Leche de transición	Sin diluir	98	94 (95,9%)	96 (14,2)	100 (100 – 100)	0 - 100
	1/100		96 (98%)	97,7 (11,2)	100 (100 – 100)	5 - 100
Leche madura	Sin diluir	83	82 (98,8%)	98,1 (10,1)	100 (100 – 100)	19 - 100
	1/100		81 (97,6%)	97,4 (12,7)	100 (100 – 100)	0 - 100

PI: porcentaje de inhibición; DT: desviación típica; I. Q.: intervalo intercuartílico.

3.1.2. Ensayos de bloqueo de la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo secretor homocigoto (SeSe)

Estos ensayos se realizaron con muestras de calostro, leche de transición y madura exclusivamente sin diluir. La necesidad de limitar los ensayos en este sentido partió del progresivo agotamiento de las muestras y llevó a plantear una prueba W de Wilcoxon que no halló diferencias estadísticamente significativas entre los PI de leche sin diluir y leche diluída 1/100 en los ensayos de bloqueo de LM frente a saliva de no secretor, por lo que esto no supuso un menoscabo para el estudio.

Tabla 45. ANÁLISIS DE DIFERENCIAS DE PI DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NOVs GII.4 A SALIVA DE INDIVIDUO NO SECRETOR SEGÚN LA CONCENTRACIÓN (W de Wilcoxon)

COMPARACIÓN	N	MEDIANA E I. Q. DE LA DIFERENCIA DE LOS DATOS	p-VALOR
C sin diluir – C diluído 1/100	106	0 (0-0)	0,72
LT sin diluir – LT diluída 1/100	98	0 (0-0)	0,26
L Mad sin diluir – L Mad diluída 1/100	81	0 (0-0)	0,72

C: calostro; LT: leche de transición; L Mad: leche madura.

De las 99 muestras de calostro analizadas, 91 mostraron un PI superior al 60% (91,9% del total de muestras). En el caso de las muestras de leche de transición, de las 98 disponibles 74 mostraron un PI superior al 60% (75,5% del total de muestras). En cambio, sólo 21 de las 83 muestras disponibles de leche madura (25,3% del total) lo mostraron. Los resultados se muestran en la siguiente tabla (*tabla 46*).

Tabla 46. ACTIVIDAD BLOQUEANTE DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NOV GII.4 A SALIVA DE INDIVIDUO SECRETOR HOMOCIGOTO (SeSe)

Etapa	N	Muestras que inhiben (PI > 60%)	Media PI (DT), %	Mediana PI (I. Q.: P ₂₅ , P ₇₅)	Mínimo - máximo
Calostro	99	91 (91,9%)	78,3 (20)	100 (100 – 100)	0-100
Leche de transición	98	74 (75,5%)	75,3 (28)	86,2 (60,9 – 95,3)	0-100
Leche madura	83	21 (25,3%)	43,7 (26)	41,1 (27,4 – 41,1)	0-100

3.1.3. Análisis estadístico de los resultados de porcentaje de inhibición (PI) de muestras de leche humana sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según las características de las madres participantes

Se aplicó una prueba de Shapiro-Wilks para conocer si las variables cuantitativas continuas del estudio seguían una distribución normal. Dado que el *p*-valor obtenido fue menor a 0,05 en la comparación de todas las variables, se interpretó que su distribución se alejaba de la normalidad por lo que se seleccionaron pruebas no paramétricas para responder a las cuestiones estadísticas planteadas.

3.1.3.1. Diferencias del PI según la edad materna en el momento del parto

Para analizar estadísticamente si los PI de las muestras de leche materna sobre la unión de las VLPs de NoV GII.4 a saliva variaban según la edad materna en el momento del parto se aplicó una prueba de correlación de Pearson. Los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 47*.

No podemos afirmar que exista una correlación directa o inversa entre el porcentaje de inhibición de la leche materna frente a la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor o secretor homocigoto y la edad materna en el momento del parto.

Tabla 47. COMPARACIÓN PI DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV A SALIVA EN FUNCIÓN DE LA EDAD MATERNA EN EL MOMENTO DEL PARTO (prueba de correlación de Pearson)				
TIPO DE ENSAYO	MUESTRA	N	CORRELACIÓN DE PEARSON	p-VALOR
Saliva de no secretor	Calostro	104	-0,081	0,415
	Leche de transición	96	0,100	0,333
	Leche madura	83	- 0,105	0,346
Saliva de secretor homocigoto	Calostro	97	- 0,181	0,076
	Leche de transición	96	0,020	0,850
	Leche madura	83	0,130	0,242

3.1.3.2. Diferencias en el PI según la edad gestacional

Para la comparación de los PI de las muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según la edad gestacional se diferenciaron dos grupos: pretérmino y a término. El escaso número de datos incluidos en los 3 subgrupos de RN pretérmino impidió establecer comparaciones atendiendo al grado de prematuridad por lo que se analizaron juntos.

La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias estadísticamente significativas en el PI de muestras de leche materna frente a la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor ni secretor homocigoto en función de la duración de la gestación (tabla 48).

Tabla 48. COMPARACIÓN PI DE MUESTRAS DE LM SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV A SALIVA EN FUNCIÓN DE LA EDAD GESTACIONAL (prueba de Kruskal-Wallis)						
TIPO DE ENSAYO	ETAPA	N		Mediana (I. Q.: P₂₅-P₇₅)		p-VALOR
		RNPT	RNT	RNPT	RNT	
Saliva de no secretor	C	45	61	100 (100-100)	100 (100-100)	0,65
	LT	42	56	100 (100-100)	100 (100-100)	0,34
	L Mad	36	47	100 (100-100)	100 (100-100)	0,61
Saliva de secretor homocigoto	C	40	59	84,2 (76,9-92,8)	83,8 (71,5-91,4)	0,59
	LT	42	56	83,9 (63-95,3)	86,3 (51,5-96,1)	0,73
	L Mad	35	48	45,4 (30,5-59)	38,5 (26,8-73,3)	0,57

C: calostro; **LT:** leche de transición; **L Mad:** leche madura.

3.1.3.3. Diferencias en el PI según el origen geográfico materno

De igual modo se aplicó la prueba de Kruskal- Wallis para establecer si existían diferencias en el PI de LM frente a la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según el origen geográfico materno. No se incluye a China en el análisis puesto que está integrado exclusivamente por una madre.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (*tabla 49*). No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el PI de muestras de leche materna sobre la unión de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor y secretor homocigoto según su origen geográfico.

Tabla 49. COMPARACIÓN PI DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA SIN DILUIR SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV A SALIVA EN FUNCIÓN DEL ORIGEN GEOGRÁFICO MATERNO (prueba de Kruskal-Wallis)

TIPO DE ENSAYO	ETAPA	N				MEDIANA (I. Q.: P ₂₅ -P ₇₅)				p-VALOR
		1	2	3	4	1	2	3	4	
Saliva de no secretor	C	11	21	68	5	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	0,408
	LT	9	19	64	5	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (74,5-100)	0,184
	L Mad	8	12	57	5	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	0,408
Saliva de secretor homocigoto	C	9	18	66	5	79,2 (60,1-84,4)	79,8 (66,9-89,1)	85,6 (76-93,5)	82,9 (81,2-91,8)	0,206
	LT	9	19	64	5	79,8 (42,1-97,4)	76,5 (50,2-87,2)	88,7 (66-97,4)	82,3 (52-97,4)	0,309
	L Mad	8	12	57	5	59,7 (39-76,3)	33,4 (22,6-51,3)	41,1- (25,6-63,5)	41,5 (34,4-70)	0,390

1: Europa del E; 2: Latinoamérica; 3: España; 4: Marruecos.

3.1.3.4. Diferencias en el PI según el grupo sanguíneo materno

La aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis para buscar diferencias en el PI de muestras de leche materna frente a la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según el grupo sanguíneo materno

no mostró diferencias significativas (*tabla 50*). No se incluyó en las comparaciones a las madres con grupo sanguíneo AB dado que sólo eran 2 madres y no se consideró que pudieran inferirse conclusiones a partir del análisis estadístico planteado en una muestra tan pequeña.

Tabla 50. COMPARACIÓN PI DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPS DE NoV GII.4 A SALIVA EN FUNCIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO MATERNO (Kruskal-Wallis)

TIPO DE ENSAYO	MUESTRA	N				MEDIANA (I. Q.: P ₂₅ -P ₇₅)				p-VALOR
		A	O	B	AB	A	O	B	AB	
Saliva de no secretor	C sin diluir	47	43	11	2	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	0,472
	LT	46	37	10	2	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	0,826
	L Mad	42	29	8	2	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	0,408
Saliva de secretor homocigoto	C	46	40	8	2	85,7 (70,1-90)	83,8 (72,2-91,6)	79,5 (71,6-89,1)	79,2 (86,3-86,3)	0,879
	LT	46	37	10	2	89,1 (75-99)	83,2 (49,2-93,6)	70,6 (61,7-95,9)	36,7 (0-36,7)	0,202
	L Mad	42	30	7	2	42 (26,1-61)	42,3 (30,1-74,6)	30,4 (24,1-74)	34,4 (36,4-36,4)	0,893

C: calostro; LT: leche de transición; L Mad: leche madura.

3.1.3.5. Diferencias en el PI según el genotipo FUT2 materno

Los datos de PI de muestras de leche materna frente a la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor y secretor homocigoto según el genotipo FUT2 materno se muestran en la *tabla 51*. Se expresan como nº de datos, media y desviación típica, mediana e intervalo intercuartílico para cada etapa madurativa y tipo de saliva empleada en el ensayo en función del genotipo FUT2 materno. Se incorpora una columna de datos donde se especifica el nº de casos con un resultado de porcentaje de inhibición inferior al 60%, valor establecido para diferenciar las muestras con capacidad de inhibición (PI > 60%) de aquellas que carecen de dicha capacidad (PI < 60%).

Tabla 51. PI DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPS DE NoV GIL.4 A SALIVA SEGÚN EL GENOTIPO FUT2 MATERNO									
TIPO DE ENSAYO	ETAPA	MADRES NO SECRETORAS				MADRES SECRETORAS			
		(sese)				(Sese / SeSe)			
		N	Media / desviación típica (mínimo – máximo)	Mediana (P₂₅-P₇₅)	N PI < 60	N	Media / desviación típica (mínimo – máximo)	Mediana (P₂₅-P₇₅)	N PI < 60
Saliva de no secretor	C	13	92,3 / 27,7 (0-100)	100 (100-100)	1	93	97,7 / 8,5 (55,4-100)	100 (100-100)	2
	LT	13	99,7 / 1 (96,2-100)	100 (100-100)	0	85	95,4 / 14,8 (0-100)	100 (100-100)	4
	L Mad	12	100 / 0 (100-100)	100 (100-100)	0	71	97,8 / 10,9 (5,9-100)	100 (100-100)	1
Saliva de secretor homocigoto	C	13	79,6 / 25,2 (0-95,3)	88,0 (75,8-92)	2	86	78,1 / 19,8 (0-100)	83,5 (71,9-91,5)	9
	LT	13	74,8 / 28,8 (0-98,8)	86,7 (65,2-95,3)	1	85	75,3 / 28,0 (0-100)	86,2 (57-95,8)	18
	L Mad	12	46,2 / 23,8 (5,4- 92,7)	45 (29,1-63,5)	8	71	43,3 / 26,7 (0-100)	38,8 (26,6-60,2)	52

N PI<60: n° de muestras con porcentaje de inhibición < 60.

Para analizar las diferencias en función del genotipo FUT2 materno se aplicó una prueba de Mann-Whitney, los resultados se muestran en la *tabla 52*. En ella se observa que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GIL.4 a saliva de individuo no secretor o secretor homocigoto en función del genotipo FUT2 materno.

Tabla 52. COMPARACIÓN PI DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO FUT2 MATERNO

(prueba de Mann-Whitney)

TIPO DE ENSAYO	MUESTRA	N		MEDIANA (I. Q.: P ₂₅ -P ₇₅)		p-VALOR
		Madres no secretoras	Madres secretoras	Madres no secretoras	Madres secretoras	
SALIVA DE NO SECRETOR	Calostro sin diluir	13	93	100 (100-100)	100 (100-100)	0,887
	Leche de transición sin diluir	13	85	100 (100-100)	100 (100-100)	0,461
	Leche madura sin diluir	12	71	100 (100-100)	100 (100-100)	0,299
SALIVA DE SECRETOR HOMOCIGOTO	Calostro	13	86	88 (75,8-92)	83,5 (71,9-91,5)	0,459
	Leche de transición	13	85	86,7 (65,1-95,3)	86,2 (57-95,8)	0,797
	Leche madura	12	71	45 (29,1-63,5)	38,8 (26,6-60,2)	0,736

3.1.3.6. Diferencias en el PI según los antígenos Lewis maternos

Los datos relativos al PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de no secretor y secretor en función de los antígenos Lewis se muestran en la siguiente tabla (*tabla 53*). Para conocer si existen diferencias se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis.

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas del PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor o secretor homocigoto en función de los antígenos Lewis.

Tabla 53. DESCRIPCIÓN Y COMPARACIÓN PI DE MUESTRAS DE LM SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GIL4 A SALIVA SEGÚN LOS ANTÍGENOS LEWIS (Kruskal-Wallis)

ANTÍGENOS LEWIS		SALIVA DE NO SECRETOR			SALIVA DE SECRETOR HOMOCIGOTO		
		N: mediana (I. Q.)			N, mediana (I. Q.)		
		C	LT	L Mad	C	LT	L Mad
a⁺ b⁺	x⁺ y⁺	12: 100 (100-100)	12: 100 (100-100)	10: 100 (98,6-100)	10: 85,2 (75,7-94,4)	12: 83,9 (65,4-89,7)	10: 37,9 (30,4-47,7)
	x⁺ y⁻	6: 100 (100-100)	3: 55,9 (100-100)	4: 100 (100-100)	6: 49,8 (39,5-74,6)	3: 86,4 (100-100)	4: 39,8 (18,2-51)
	x⁻ y⁻	7: 100 (100-100)	7: 100 (100-100)	7: 100 (100-100)	7: 87,6 (82,9-93,7)	7: 94,7 (89,3-106,3)	7: 35,5 (24,6-69,7)
	x⁻ y⁺	24: 100 (100-100)	22: 100 (98,3-100)	19: 100 (100-100)	22: 81,1 (68,9-91,1)	22: 79,2 (37-95,7)	19: 42,8 (22,1-81,8)
a⁺ b⁻	x⁺ y⁺	9: 100 (100-100)	8: 100 (100-100)	6: 100 (100-100)	9: 86,7 (71,7-94,6)	8: 67,1 (8,9-91,5)	6: 47,9 (19,5-67,4)
	x⁺ y⁻	8: 100 (100-100)	9: 100 (100-100)	8: 100 (100-100)	9: 89,1 (79,1-92)	9: 77,8 (46,4-95,3)	8: 34,7 (29,1-63)
	x⁻ y⁻	4: 100 (100-100)	4: 100 (76,5-100)	3: 100 (61,3-100)	4: 93,6 (86,1-98,5)	4: 86,6 (80,4-97,4)	3: 35,4 (18,6-35,4)
	x⁻ y⁺	2: 100 (100-100)	3: 100 (73,5-100)	3: 100 (100-100)	2: 87,7 (85,1-87,7)	3: 88,4 (84,8-88,4)	3: 47,7 (7,9-47,7)
a⁻ b⁻	x⁺ y⁺	3: 100 (100-100)	4: 100 (100-100)	2: 100 (100-100)	3: 86,4 (0-86,4)	4: 92,2 (57,7-99,4)	2: 25,4 (0-25,4)
	x⁺ y⁻	-	-	-	-	-	-
	x⁻ y⁻	-	-	-	-	-	-
	x⁻ y⁺	5: 100 (81,7-100)	4: 100 (86,8-100)	4: 100 (83,3-100)	3: 72,8 (53,4-72,8)	4: 71,2 (59,7-81,4)	3: 81,9 (48,4-81,9)
a⁻ b⁺	x⁺ y⁺	10: 100 (100-100)	8: 100 (100-100)	6: 100 (100-100)	10: 80,1 (56,7-87)	8: 89,1 (56,7-87)	6: 33,4 (10,3-77,9)
	x⁺ y⁻	-	-	-	-	-	-
	x⁻ y⁻	3: 100 (83,2-100)	3: 100 (100-100)	2: 100 (100-100)	2: 93,3 (87,1-93,3)	3: 95,1 (48,1-95,1)	2: 74,9 (74,7-74,9)
	x⁻ y⁺	3: 100 (83,3-100)	3: 100 (100-100)	2: 100 (100-100)	2: 93,3 (87,1-93,3)	3: 95,1 (48,1-95,1)	2: 74,8 (74,7-74,8)
p-valor		0,924	0,738	0,499	0,055	0,348	0,728

Además, se planteó un análisis multivariante mediante un estudio de regresión lineal (con selección de variables hacia atrás o método de Wald), para buscar posibles influencias de las covariables genotipo FUT2 y antígenos Lewis maternos en los PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor y secretor homocigoto, si bien no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa (*tabla 54*).

Tabla 54. COMPARACIÓN GENOTIPO FUT2 Y ANTÍGENOS LEWIS MATERNOS CON PI DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA DE NO SECRETOR Y SECRETOR HOMOCIGOTO

(estudio de regresión logística)

TIPO DE ENSAYO	ETAPA	FUT2 (p-valor)	Le a (p-valor)	Le b (p-valor)	Le x (p-valor)	Le y (p-valor)
Saliva de no secretor	Calostro	0,15	0,98	0,65	0,59	0,22
	Leche de transición	0,31	0,65	0,85	0,54	0,89
	Leche madura	0,47	0,40	0,58	0,26	0,73
Saliva de secretor	Calostro	0,81	0,19	0,41	0,12	0,64
	Leche de transición	0,47	0,16	0,24	0,64	0,10
	Leche madura	0,35	0,51	0,97	0,21	0,88

3.1.3.7. Diferencias según la etapa madurativa de la leche materna

Para valorar diferencias en el PI de las muestras de leche materna frente a la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor y secretor homocigoto según la etapa madurativa de la leche se aplicó una prueba de Friedman. Los resultados se muestran en la *tabla 55*. Mostraron la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los valores de PI de calostro, leche de transición y madura en los ensayos realizados con saliva de individuo secretor; no así en los ensayos realizados con saliva de no secretor.

Por este motivo se realizó una prueba W de Wilcoxon para encontrar cuáles eran las muestras de leche responsables de dichas diferencias, lo que se muestra en la *tabla 56*. Para interpretar los resultados obtenidos aplicamos previamente la corrección de Bonferroni obteniendo un resultado de 0,017, debido a que se realizaron 3 comparaciones. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la leche madura y las otras etapas de la leche materna: calostro y leche de transición.

Tabla 55. COMPARACIÓN PI LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs de NoV GII.4 A SALIVA SEGÚN LA ETAPA MADURATIVA DE LA LECHE (Friedman)

TIPO DE ENSAYO	MUESTRA	N	MEDIANA (I. Q.)	p-VALOR
Saliva de no secretor	Calostro sin diluir	106	100 (100-100)	0,53
	Leche de transición sin diluir	98	100 (100-100)	
	Leche madura sin diluir	83	100 (100-100)	
Saliva de secretor homocigoto	Calostro	99	83,8 (72,1-91,7)	0,000
	Leche de transición	98	86,2 (61-95,3)	
	Leche madura	83	41,1 (27,4-60,2)	

Tabla 56. COMPARACIÓN PI LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPS DE NOV GII.4 A SALIVA DE SECRETOR SEGÚN LA ETAPA MADURATIVA DE LA LECHE

(prueba W de Wilcoxon)

COMPARACIÓN	N	MEDIANA (I. Q.)	p-VALOR
Calostro-leche de transición	99-98	83,8 (72,1-91,7) - 86,2 (61-95,3)	0,283
Leche de transición-madura	98-83	86,2 (61-95,3) - 41,1 (27,4-60,2)	0,000
Calostro-leche madura	99-83	83,8 (72,1-91,7) - 41,1 (27,4-60,2)	0,000

3.1.3.8. Diferencias en el PI según el tipo de saliva empleada

Para conocer si existían diferencias entre los PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según esta fuera de individuo no secretor o secretor homocigoto, se aplicó una prueba de Friedman. Los resultados se muestran en la *tabla 57*. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según si esta procedía de un individuo no secretor o secretor homocigoto.

Por este motivo se aplicó la W de Wilcoxon para realizar comparaciones dos a dos que nos permitieran conocer las parejas responsables de estas diferencias. Los resultados obtenidos se muestran en la *tabla 58*. Para la interpretación de los resultados ha de considerarse que el punto de corte del *p*-valor precisa la corrección de Bonferroni, por lo que es el resultado del cociente entre 0,05 y el nº de comparaciones realizadas. En este caso se realizaron 3 comparaciones lo que implica que el *p*-valor para considerar que existen diferencias estadísticamente significativas es de 0,017. Hallamos diferencias estadísticamente significativas para todas las etapas madurativas de la LM al comparar los PI en ensayos realizados con saliva de no secretor y secretor homocigoto, independientemente del genotipo secretor de la madre.

Tabla 57. COMPARACIÓN PI DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GIL.4 A SALIVA SEGÚN EL TIPO DE SALIVA EMPLEADA

(prueba de Friedman)

		SALIVA DE NO SECRETOR		SALIVA DE SECRETOR HOMOCIGOTO		<i>p</i> -VALOR*
		N	Mediana (I. Q.)	N	Mediana (I. Q.)	
C	Madres no secretoras	13	100 (100-100)	13	88 (75,8-92)	0,000
	Madres secretoras	93	100 (100-100)	86	83,5 (71,9-91,5)	
LT	Madres no secretoras	13	100 (100-100)	13	86,7 (65,1-95,3)	0,000
	Madres secretoras	85	100 (100-100)	85	86,2 (57-95,8)	
L mad	Madres no secretoras	12	100 (100-100)	12	45 (29,1-63,5)	0,000
	Madres secretoras	71	100 (100-100)	71	38,8 (26,6-60,2)	

C: calostro; LT: leche de transición; L Mad: leche madura.

Tabla 58. COMPARACIÓN PI DE LECHE MATERNA SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GIL.4 A SALIVA SEGÚN EL TIPO DE SALIVA EMPLEADA (W de Wilcoxon)

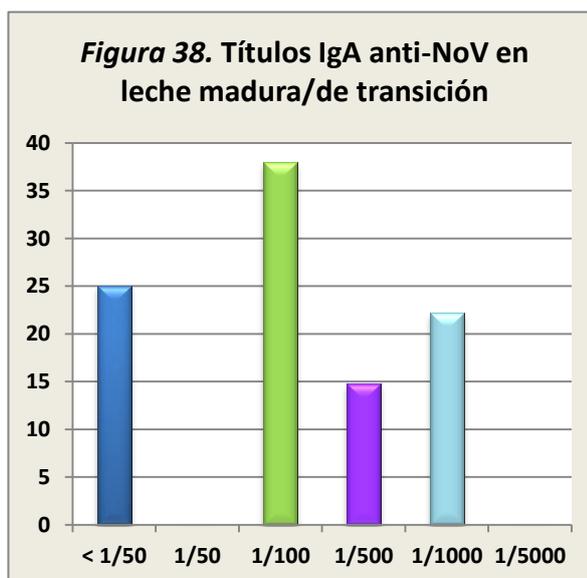
COMPARACIÓN	MADRES NO SECRETORAS (sese)		MADRES SECRETORAS (SeSe / Sese)	
	N	<i>p</i> -VALOR*	N	<i>p</i> -VALOR*
PI C sin diluir saliva sese - PI C saliva SeSe	12	0,019	78	0,000
PI LT sin diluir saliva sese - PI LT saliva SeSe	12	0,002	65	0,000
PI L Mad saliva sese-PI L Mad saliva SeSe	12	0,002	68	0,000

* Los resultados obtenidos no difieren si no se divide a las madres según su genotipo FUT2.

C: calostro; LT: leche de transición; L Mad: leche madura.

3.2. DETERMINACIÓN DE IgA ANTI NoV EN LM MADURA/TRANSICIÓN

La cuantificación de IgA en LM se realizó mediante técnica de ELISA (apartado 5.4 de *Material y métodos*) en 83 muestras de leche madura. En caso de haberse agotado este tipo de muestra y en aquellas madres que no aportaron leche madura se empleó la muestra de leche de transición, por su mayor similitud a la leche madura que el calostro, con lo que sumamos un total de 108 muestras.



Consideramos resultado negativo un título de IgA anti-NoV en leche materna inferior a 1/50, de forma que de las 108 muestras de leche materna analizadas, 81 (75%) contenían títulos significativos de IgA anti-NoV. Los resultados obtenidos se detallan en la *figura 38* y *tabla 59*.

Tabla 59. TÍTULOS DE IgA ANTI-NoV EN LECHE MADURA/DE TRANSICIÓN

TÍTULOS	N	PORCENTAJE (%)
< 1/50	27	25
1/50	0	0
1/100	41	38
1/500	16	14,8
1/1000	24	22,2
1/5000	0	0

3.2.1. Descripción y análisis estadístico del PI de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 en función del título de IgA anti-NoV láctea

En la siguiente tabla (*tabla 60*) se muestran los datos de mediana e intervalo intercuartílico del PI de LM sobre la unión de VLPs NoV GII.4 a saliva de no secretor y secretor homocigoto en función del título de IgA anti-NoV en leche madura o de transición.

Se incluyen los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis que no hallaron diferencias estadísticamente significativas en el PI en función del contenido de IgA anti-NoV.

Tabla 60. COMPARACIÓN DE PI DE LM SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA EN FUNCIÓN DEL TÍTULO DE IgA ANTI-NoV EN LECHE MADURA/DE TRANSICIÓN (prueba de Kruskal-Wallis)

		< 1/50		1/100		1/500		1/1000		P-VALOR
		N	Mediana (I. Q.)	N	Mediana (I. Q.)	N	Mediana (I. Q.)	N	Mediana (I. Q.)	
Ensayos con saliva de no secretor	C	26	100 (100-100)	40	100 (100-100)	14	100 (100-100)	22	100 (100-100)	0,377
	LT	25	100 (100-100)	38	100 (100-100)	13	100 (100-100)	20	100 (100-100)	0,696
	L Mad	23	100 (100-100)	29	100 (100-100)	12	100 (100-100)	17	100 (100-100)	0,172
Ensayos con saliva de secretor	C	26	85,4 (72-94)	37	83,1 (74,8-90,1)	13	72,1 (64,1-91,6)	19	86,9 (77,1-91,7)	0,589
	LT	25	88,9 (80,6-99,2)	38	86,8 (59-97,9)	13	79,3 (51,1-92,1)	20	78,1 (38,3-95,2)	0,266
	L Mad	23	41,1 (30,5-75)	29	34,4 (20,4-51,2)	12	57,4 (33-78,8)	16	40,5 (24,6-47,4)	0,136

3.2.2. Descripción y análisis estadístico del origen geográfico, edad gestacional, grupo sanguíneo, genotipo FUT2 y antígenos Lewis maternos en función del título de IgA anti-NoV láctea

La prueba de *Chi* cuadrado no halló diferencias estadísticamente significativas en el contenido de IgA anti-NoV en función del origen geográfico, la edad gestacional, el grupo sanguíneo ni el genotipo FUT2 materno (*tabla 61*).

Para el análisis de los antígenos Lewis se empleó un análisis de regresión logística que comparó la proporción de antígenos Lewis en las muestras de leche materna en función de si contenían (título > 1/50) o no (título < 1/50) IgA anti-NoV. Los resultados no mostraron diferencias significativas (*tabla 62*).

Tabla 61. COMPARACIÓN ORIGEN GEOGRÁFICO, GRUPO DE EDAD GESTACIONAL, GRUPO SANGUÍNEO Y GENOTIPO FUT2 MATERNOS EN FUNCIÓN DEL TÍTULO DE IgA ANTI-NoV EN L Mad/LT (Chi cuadrado)

TÍTULOS IgA ANTI-NoV EN Lm/LT	< 1/50	1/100	1/500	1/1000	Chi cuadrado	
ORIGEN GEOGRÁFICO**						
Europa del Este	2 (18,2%)	5 (45,4%)	3 (27,3%)	1 (9,1%)	0,242	
Latinoamérica	4 (18,2%)	11(50%)	5 (22,7%)	2 (9,1%)		
España	19 (27,5%)	22 (31,9%)	8 (11,6%)	20 (29%)		
Marruecos	1 (25%)	3 (75%)	0	0		
China	1 (100%)	0	0	0		
EDAD GESTACIONAL**						
RN a término	15 (25%)	23 (38,3%)	7 (11,7%)	15 (25%)	0,175	
RN pretérmino	12 (25,5%)	18 (38,3%)	9 (19,1%)	8 (17,1%)		
GRUPO SANGUÍNEO**						
Grupo A	12 (23,5%)	19 (37,3%)	8 (15,7%)	12 (23,5%)	0,924	
Grupo O	13 (31%)	16 (38,1%)	6 (14,3%)	7 (16,6%)		
Grupo B	2 (20%)	5 (50%)	2 (20%)	1 (10%)		
Grupo AB	0	1 (100%)	0	0		
GENOTIPO FUT2**						
Secretor	25 (26,9%)	36 (38,7%)	13 (14%)	19 (20,4%)	0,655	
No secretor	2 (14,3%)	5 (35,7%)	3 (21,4%)	4 (28,6%)		
ANTÍGENOS LEWIS						
a ⁺ b ⁺	x ⁺ y ⁺	3	0	5	2	*
	x ⁻ y ⁺	2	0	3	1	
	x ⁻ y ⁻	1	0	2	1	
	x ⁺ y ⁻	5	0	10	7	
a ⁻ b ⁺	x ⁺ y ⁺	1	0	2	3	
	x ⁻ y ⁺	3	0	4	1	
	x ⁻ y ⁻	3	0	1	0	
	x ⁺ y ⁻	0	0	0	2	
a ⁻ b ⁻	x ⁺ y ⁺	0	0	3	1	
	x ⁻ y ⁺	0	0	0	0	
	x ⁻ y ⁻	0	0	0	0	
	x ⁺ y ⁻	4	0	0	1	
a ⁺ b ⁻	x ⁺ y ⁺	3	0	5	1	
	x ⁻ y ⁺	0	0	0	0	
	x ⁻ y ⁻	2	0	1	0	
	x ⁺ y ⁻	0	0	5	3	

Nº de casillas con valor esperado < 5 = 0. * No es posible aplicar la prueba de Chi cuadrado.

** Porcentaje para cada grupo.

Tabla 62. COMPARACIÓN ANTÍGENOS LEWIS SEGÚN EL CONTENIDO DE IgA EN LM MADURA/DE TRANSICIÓN (estudio de regresión logística)

	IgA en LM (<i>p</i> -valor)
Lewis a	0,415
Lewis b	0,495
Lewis x	0,431
Lewis y	0,07

3.2.3. Estudios de correlación del título de IgA anti-NoV en leche madura/de transición, la edad materna y PI de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva

Para conocer si existía una correlación entre el título de IgA anti-NoV en leche materna y la IgA e IgG anti-NoV en suero, la edad materna y el PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva se aplicó un estudio de correlación de Spearman (*tabla 63*).

Tabla 63. COMPARACIÓN TÍTULOS IgA ANTI-NoV EN LECHE MADURA/DE TRANSICIÓN CON EDAD MATERNA EN EL MOMENTO DEL PARTO Y PI MUESTRAS LM SOBRE LA UNIÓN DE NoV GII.4 A MUESTRAS DE SALIVA (prueba de correlación de Spearman)

COMPARACIÓN		N	Rho DE SPEARMAN	<i>p</i> -VALOR
IgA anti-NoV en suero		68	0,427	0,000
IgG anti-NoV en suero		69	0,005	0,967
Edad materna en el parto		105	-0,085	0,390
Ensayos saliva de no secretor	C sin diluir	102	0,155	0,119
	LT sin diluir	96	-0,071	0,494
	Lmad sin diluir	81	0,178	0,111
Ensayos saliva de secretor homocigoto	Calostro	95	0,077	0,459
	LT	96	-0,197	0,055
	Lmad	80	-0,057	0,617

C: calostro; LT: leche de transición; L Mad: leche madura.

Se aprecia una correlación directa entre la IgA anti-NoV en leche materna y suero. No así entre la IgA anti-NoV en leche madura/de transición y la IgG anti-NoV en suero, la edad materna ni el PI de muestras de LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva.

4. ANÁLISIS REALIZADOS EN SUERO

Se obtuvieron 71 muestras de suero de las 111 madres participantes en el estudio procedentes de los estudios de inmunidad realizados en los controles obstétricos.

En estas muestras se cuantificó la actividad bloqueante sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor (sese) y el título de anticuerpos específicos tipo IgG e IgA frente a NoV GII.4. Los resultados pormenorizados se exponen en los siguientes epígrafes. Para facilitar su valoración en la *figura 39* se muestra un algoritmo con el diseño del estudio y el nº de muestras empleadas en cada ensayo.



Figura 39. Algoritmo de los análisis realizados en suero y nº de muestras empleadas.

4.1. ACTIVIDAD BLOQUEANTE DE MUESTRAS DE SUERO FRENTE A LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA

El PI de muestras de suero sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva se realizó mediante técnica de ELISA, según se describe en el apartado 5.3 de *Material y métodos*. Se emplearon muestras de suero sin diluir y se ensayaron sólo frente a saliva de individuo no secretor.

Tabla 64. ACTIVIDAD BLOQUEANTE DE MUESTRAS DE SUERO DE LA UNIÓN DE VLPs DE NOV GII.4 A SALIVA DE NO SECRETOR				
Muestras analizadas	Muestras que inhiben	Promedio PI (DT, %)	Mediana (I. Q.)	Mínimo-máximo
71	64 (90,1%)	88,9 (18,8)	100 (79,93-100)	23,5 - 100

4.2. DETERMINACIÓN DE IgG ESPECÍFICA ANTI-NoV GII.4 EN SUERO MATERNO

La cuantificación de IgG en suero se realizó mediante la técnica de ELISA en 71 muestras según se describe en el apartado 5.4 de *Material y métodos*. Los títulos obtenidos se detallan en la *tabla 65* y *figura 40*. Cuarenta de los 71 sueros (56,3%) mostraron la presencia de IgG anti-NoV.

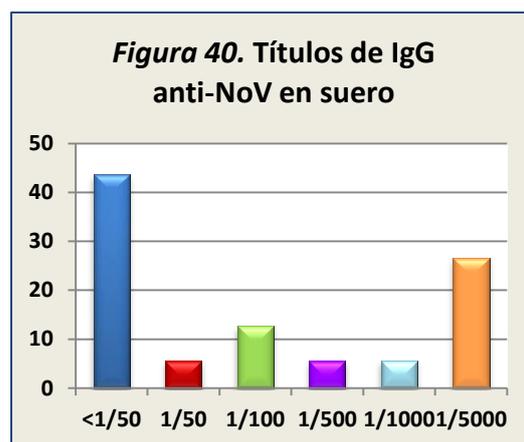


Tabla 65. FRECUENCIA Y PORCENTAJE DE TÍTULOS DE IgG ANTI-NoV EN SUERO

TÍTULOS	N	PORCENTAJE (%)
< 1/50	31	43,7%
1/50	4	5,6%
1/100	9	12,7%
1/500	4	5,6%
1/1000	4	5,6%
1/5000	19	26,8%

4.2.1. Descripción y análisis estadístico del PI de suero y de la leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 en función del título de IgG anti-NoV en suero

Los valores de PI del suero y de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de no secretor y secretor homocigoto en función del contenido de IgG anti-NoV en suero se muestran en la *tabla 66*.

La prueba de Kruskal-Wallis encuentra diferencias estadísticamente significativas entre el PI de leche de transición frente a saliva de individuo no secretor, así como el PI de leche madura frente a saliva de individuo secretor en función del título de IgG en suero. No así en el resto de grupos.

Tabla 66. COMPARACIÓN DE EDAD MATERNA EN EL PARTO, EDAD GESTACIONAL Y PI DE SUERO Y LM SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GIL4 A SALIVA EN FUNCIÓN DEL TÍTULO DE IgG ANTI-NoV EN SUERO (prueba de Kruskal-Wallis)

TÍTULOS IgG ANTI-NoV EN SUERO		< 1/50		1/50		1/100		1/500		1/1000		1/5000		p-valor
		N	M (I. Q.)	N	M (I. Q.)	N	M (I. Q.)	N	M (I. Q.)	N	M (I. Q.)	N	M (I. Q.)	
PI suero		28	100 (81,4-100)	6	97,6 (67,7-100)	9	100 (100-100)	4	100 (100-100)	4	79,2 (67,5-96,4)	19	100 (74,4-100)	0,13
Ensayos con saliva de no secretor	C	26	100 (100-100)	6	100 (100-100)	9	100 (100-100)	4	100 (100-100)	4	100 (72,5-100)	19	100 (100-100)	0,72
	LT	24	100 (100-100)	5	100 (100-100)	8	100 (100-100)	4	100 (100-100)	4	100 (86,8-100)	18	100 (85-100)	0,01
	L Mad	18	100 (100-100)	3	88,8 (100-100)	8	100 (100-100)	4	100 (100-100)	4	100 (100-100)	16	100 (100-100)	0,37
Ensayos con saliva de secretor	C	25	88,8 (67,8-94,4)	5	89,1 (69,5-93,6)	9	72,8 (69,2-81,7)	3	75,6 (55,6-75,6)	4	79,7 (59,5-82,9)	19	87,2 (79-94,1)	0,15
	LT	24	83,6 (63,4-97,5)	5	73,4 (49,9-100)	8	90,9 (82,5-97,3)	4	86,8 (63,2-100)	4	90,7 (72,7-100)	18	88 (42,8-95,3)	0,62
	L Mad	18	38,7 (25,9-54,4)	3	30,5 (27,8-30,5)	8	35,8 (25,7-66,3)	4	30,3 (16,1-62)	4	50,5 (11,3-75,3)	16	60,3 (34,4-85,5)	0,03

4.2.2. Descripción y análisis estadístico del origen geográfico, edad gestacional, grupos sanguíneos, genotipo FUT2 y antígenos Lewis en función del título de IgG anti-NoV en suero

En la *tabla 67* se muestra las características de origen geográfico, edad gestacional, grupos sanguíneos, genotipo FUT2 y antígenos Lewis según el contenido de IgG anti-NoV en suero. Aplicando una prueba de *Chi-cuadrado* se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de IgG en suero según el origen geográfico, no así según la edad gestacional, grupos sanguíneos ni genotipo FUT2. No fue posible su aplicación al estudio de los antígenos Lewis, debido al elevado número de opciones con un valor esperado < 5. Como alternativa se aplicó un estudio de regresión logística comparando la proporción de antígenos Lewis de las madres según su suero contuviera (título > 1/50) o no (título < 1/50) IgG anti-NoV no encontrando diferencias entre ambos (*tabla 68*).

Tabla 67. COMPARACIÓN ORIGEN GEOGRÁFICO, GRUPO DE EDAD GESTACIONAL, GRUPO SANGUÍNEO Y GENOTIPO FUT2 MATERNOS EN FUNCIÓN DEL TÍTULO DE IgG ANTI-NoV EN SUERO (Chi CUADRADO)

TÍTULOS IgA ANTI-NoV EN Lm/LT	< 1/50	1/50	1/100	1/500	1/1000	1/5000	Chi cuadrado	
ORIGEN GEOGRÁFICO**								
Europa del Este	1 (25%)	1 (25%)	0	0	0	2 (50%)	0,037	
Latinoamérica	8 (50%)	0	3 (18,8%)	3(18,8%)	0	2 (12,4%)		
España	20 (44,4%)	3 (6,7%)	4 (8,9%)	1 (2,2%)	4 (8,9%)	13 (28,9%)		
Marruecos	0	1 (20%)	2 (40%)	0	0	2 (40%)		
China	0	1 (100%)	0	0	0	0		
EDAD GESTACIONAL**								
RN pretérmino	11 (52,4%)	2 (9,5%)	2 (9,5%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)	3 (14,3%)	0,575	
RN a término	18 (36%)	4(8%)	7 (14%)	3 (6%)	2 (4%)	16 (32%)		
GRUPOS SANGUÍNEOS**								
Grupo A	13 (39,3%)	2 (6,1%)	2 (6,1%)	3 (9,1%)	3 (9,1%)	10 (30,3%)	0,137	
Grupo O	13 (44,8%)	2 (6,9%)	5 (17,2%)	0	1 (3,5%)	8 (27,6%)		
Grupo B	3 (42,8%)	1 (14,3%)	2 (28,6%)	1 (14,3%)	0	0		
Grupo AB	0	1 (100%)	0	0	0	0		
GENOTIPO FUT2**								
No secretor	4 (66,6%)	0	1 (16,7%)	0	0	1 (16,7%)	0,747	
Secretor	25 (38,5%)	6 (9,2%)	8 (12,3%)	4 (6,1%)	4 (6,1%)	18 (27,7%)		
ANTÍGENOS LEWIS								
a⁺ b⁺	x ⁺ y ⁺	3	2	0	1	1	1	*
	x ⁻ y ⁺	1	0	1	1	0	1	
	x ⁻ y ⁻	1	0	1	1	0	2	
	x ⁺ y ⁻	5	0	3	1	1	8	
a⁻ b⁺	x ⁺ y ⁺	2	1	1	0	0	1	
	x ⁻ y ⁺	2	1	0	0	0	1	
	x ⁻ y ⁻	2	0	0	0	0	0	
	x ⁺ y ⁻	2	0	0	0	0	1	
a⁻ b⁻	x ⁺ y ⁺	1	0	0	0	0	1	
	x ⁻ y ⁺	0	0	0	0	0	0	
	x ⁻ y ⁻	0	0	0	0	0	0	
	x ⁺ y ⁻	0	0	1	0	1	0	
a⁺ b⁻	x ⁺ y ⁺	5	0	1	0	0	1	
	x ⁻ y ⁺	0	0	0	0	0	0	
	x ⁻ y ⁻	2	0	0	0	0	0	
	x ⁺ y ⁻	3	2	1	0	1	2	

Casillas con valor esperado < 5 = 0; * No es posible aplicar la prueba de Chi cuadrado; ** % para cada grupo.

Tabla 68. COMPARACIÓN ANTÍGENOS LEWIS MATERNOS EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE IgG ANTI-NoV EN SUERO (estudio de regresión logística)	
	IgG ANTI-NoV EN SUERO
Lewis a	0,295
Lewis b	0,298
Lewis x	0,514
Lewis y	0,439

4.2.3. Estudios de correlación del título de IgG anti-NoV en suero con la edad materna en el momento del parto, el PI del suero y de la leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva

Tabla 69. COMPARACIÓN TÍTULOS IgG ANTI-NoV EN SUERO CON EDAD MATERNA EN EL MOMENTO DEL PARTO Y PI MUESTRAS LM SOBRE LA UNIÓN DE NoV GII.4 A MUESTRAS DE SALIVA (prueba de correlación de Spearman)				
COMPARACIÓN		N	Rho DE SPEARMAN	p-VALOR
Edad materna en el parto		71	0,173	0,149
PI suero		70	-0,181	0,133
Ensayos sobre saliva de no secretor	C sin diluir	68	0,042	0,731
	LT sin diluir	63	-0,404	0,01
	Lm sin diluir	53	-0,123	0,380
Ensayos sobre saliva de secretor	C	65	0,178	0,155
	LT	63	-0,063	0,625
	L mad	53	0,301	0,029

C: calostro; LT: leche de transición; L Mad: leche madura.

Si bien los resultados de la correlación entre el título de IgG anti-NoV en suero y el PI de leche de transición sobre saliva de individuo no secretor y de leche madura sobre saliva de secretor son estadísticamente significativos, la correlación es débil y no permite extraer conclusiones plausibles desde el punto de vista biológico.

4.3. DETERMINACIÓN IgA ESPECÍFICA ANTI-NoV EN SUERO

La cuantificación de IgA en suero se realizó mediante la técnica de ELISA en 71 muestras de suero según se describe en el apartado 5.4 de *Material y métodos*. Los títulos obtenidos se detallan en la *tabla 70* y *figura 41*. Cuarenta y cuatro de los 71 sueros analizados (62%) mostraron la presencia de IgA anti-NoV GII.4.

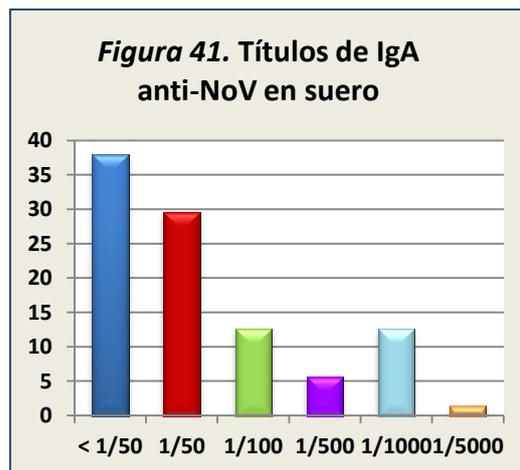


Tabla 70. N° DE CASOS Y PORCENTAJE DE TÍTULOS DE IgA ANTI-NoV SUERO

TÍTULOS	N	PORCENTAJE (%)
< 1/50	27	38%
1/50	21	29,6%
1/100	9	12,7%
1/500	4	5,6%
1/1000	9	12,7%
1/5000	1	1,4%

4.3.1. Descripción y análisis estadístico de la edad materna en el momento del parto, edad gestacional y PI de suero y leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 en función del título de IgA anti-NoV en suero

En la *tabla 71* se muestran los valores de PI del suero y PI de muestras de leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de no secretor y secretor homocigoto en función del contenido de IgA anti-NoV en suero. Se incluye el resultado de la prueba de Kruskal-Wallis que no fue capaz de apreciar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 71. COMPARACIÓN DE EDAD MATERNA EN EL PARTO, EDAD GESTACIONAL Y PI DE SUERO Y LM SOBRE LA UNIÓN DE VLPs DE NoV GII.4 A SALIVA EN FUNCIÓN DEL TÍTULO DE IgA ANTI-NoV EN SUERO (prueba de Kruskal-Wallis)

TÍTULOS IgA ANTI- NoV EN SUERO		< 1/50		1/50		1/100		1/500		1/1000		1/5000		p-valor
		N	M (I. Q.)	N	M (I. Q.)	N	M (I. Q.)	N	M (I. Q.)	N	M (I. Q.)	N	M (I. Q.)	
PI suero		26	100 (95,4- 100)	20	86,2 (66,5- 100)	10	100 (74,6- 100)	4	100 (80,8- 100)	9	100 (92,8- 100)	1	100 (100- 100)	0,218
Ensayos con saliva de no secretor	C	25	100 (100- 100)	20	100 (100- 100)	10	100 (100- 100)	4	100 (100- 100)	7	100 (100- 100)	1	100 (100- 100)	0,955
	L T	25	100 (100- 100)	17	100 (95,6- 100)	9	100 (100- 100)	3	100 (84,2- 100)	7	100 (100- 100)	0	-	0,773
	L m a d	25	100 (100- 100)	15	100 (100- 100)	8	100 (100- 100)	3	100 (100- 100)	6	100 (100- 100)	0	-	0,898
Ensayos con saliva de secretor	C	25	88,9 (75,4- 94,1)	17	84,8 (71,2- 90,8)	10	77,2 (65,8- 90,2)	4	77,9 (62- 95,3)	7	83,3 (53,4- 89,1)	1	100 (100- 100)	0,323
	L T	25	85,5 (71,4- 96,1)	17	84,8 (37,8- 94,8)	9	96,4 (86,8- 99,9)	3	55,5 (0- 55,5)	7	82,2 (72,5- 88,4)	0	-	0,317
	L m a d	20	46,3 (30,4- 84,5)	15	41,5 (27,9- 66,3)	8	24,6 (16,6- 40,5)	3	69,7 (38,8- 69,7)	6	44,4 (30,4- 56,2)	0	-	0,217

4.3.2. Descripción y análisis estadístico del origen geográfico, edad gestacional, grupos sanguíneos, genotipo FUT2 y antígenos Lewis en función del título de IgA anti-NoV en suero

Los datos y resultados se muestran en la *tabla 72*.

Tabla 72. COMPARACIÓN ORIGEN GEOGRÁFICO, GRUPO DE EDAD GESTACIONAL, GRUPO SANGUÍNEO Y GENOTIPO FUT2 MATERNOS EN FUNCIÓN DEL TÍTULO DE IgA ANTI-NoV EN SUERO (Chi cuadrado)

TÍTULOS IgA ANTI-NoV EN Lm/LT	< 1/50	1/50	1/100	1/500	1/1000	1/5000	Chi cuadrado	
ORIGEN GEOGRÁFICO								
Europa del Este	1 (100%)	0	0	0	0	0	0,364	
Sudamérica	0	3 (75%)	0	1 (25%)	0	0		
España	8 (50%)	3 (18,8%)	2 (12,3%)	1 (6,3%)	1 (6,3%)	1 (6,3%)		
Marruecos	13 (40,6%)	13(40,6%)	8 (18,2%)	2 (4,5%)	8 (18,2%)	0		
China	4 (80%)	1 (20%)	0	0	0	0		
EDAD GESTACIONAL								
RN pretérmino	5 (25%)	5 (25%)	4 (20%)	1 (5%)	4 (20%)	1 (5%)	0,357	
RN a término	21 (42%)	15 (30%)	6 (12%)	3 (6%)	5 (10%)	0		
GRUPOS SANGUÍNEOS								
Grupo A	6 (18,8%)	8 (25%)	7 (21,9%)	4 (12,5%)	6 (18,8%)	1 (3%)	0,182	
Grupo O	15 (51,7%)	11 (37,9%)	1 (3,4%)	0	2 (7%)	0		
Grupo B	4 (57,1%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)	0	1 (14,3%)	0		
Grupo AB	1 (100%)	0	0	0	0	0		
GENOTIPO FUT2								
No secretor	1 (16,7%)	0	1 (16,7%)	0	4 (66,7%)	0	0,075	
Secretor	25 (39,1%)	20 (31,3%)	9 (14,1%)	4 (6,3%)	5 (7,7%)	1 (1,5%)		
ANTÍGENOS LEWIS								
a ⁺ b ⁺	x ⁺ y ⁺	2	3	2	0	1	0	*
	x ⁻ y ⁺	1	2	2	0	0	0	
	x ⁻ y ⁻	1	2	1	1	0	0	
	x ⁺ y ⁻	6	4	3	2	2	0	
a ⁺ b ⁻	x ⁺ y ⁺	1	1	1	0	2	0	
	x ⁻ y ⁺	3	0	0	0	1	0	
	x ⁻ y ⁻	2	0	0	0	0	0	
	x ⁺ y ⁻	0	2	0	0	1	0	
a ⁻ b ⁻	x ⁺ y ⁺	1	1	0	0	0	0	
	x ⁻ y ⁺	0	0	0	0	0	0	
	x ⁻ y ⁻	0	0	0	0	0	0	
	x ⁺ y ⁻	1	0	0	0	1	0	
a ⁻ b ⁺	x ⁺ y ⁺	3	1	0	0	1	1	
	x ⁻ y ⁺	0	0	0	0	0	0	
	x ⁻ y ⁻	1	1	0	0	0	0	
	x ⁺ y ⁻	4	3	1	1	0	0	

En la *tabla 73* se muestran las características de origen geográfico, edad gestacional, grupo sanguíneo, genotipo FUT2 y antígenos Lewis según el contenido de IgA anti-NoV en suero.

Se incluye el resultado de la prueba de *Chi* cuadrado que busca diferencias entre los grupos. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el contenido de IgG en suero según el genotipo FUT2 materno. No es posible su aplicación al estudio de los antígenos Lewis, debido al elevado número de opciones con un valor esperado < 5. Como alternativa se aplica un estudio de regresión logística que compara la proporción de antígenos Lewis de las madres según su suero contenga (título > 1/50) o no (título < 1/50) IgG anti-NoV (*tabla 74*), el cual no muestra diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 73. COMPARACIÓN ANTÍGENOS LEWIS MATERNOS EN FUNCIÓN DEL CONTENIDO DE IgA ANTI-NoV EN SUERO (estudio de regresión logística)	
	IgG ANTI-NoV EN SUERO
Lewis a	0,196
Lewis b	0,562
Lewis x	0,963
Lewis y	0,407

4.3.3. Estudios de correlación del título de IgG anti-NoV en suero con la edad materna en el momento del parto, el PI del suero y de la leche materna sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva

Los resultados muestran una débil correlación inversa entre el título de IgA anti-NoV en suero y el PI de muestras de calostro sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo secretor, de lo cual no se pueden extraer conclusiones plausibles biológicamente. No se observa la existencia de correlación entre los restantes parámetros.

Tabla 74. COMPARACIÓN TÍTULOS IgA ANTI-N_oV EN SUERO CON EDAD MATERNA EN EL MOMENTO DEL PARTO, PI SUERO Y PI MUESTRAS LM SOBRE LA UNIÓN DE N_oV GIL.4 A MUESTRAS DE SALIVA (prueba de correlación de Spearman)

COMPARACIÓN		N	<i>Rho</i> DE SPEARMAN	<i>p</i> -VALOR
Edad materna en el parto		70	0,164	0,174
PI suero		70	-0,001	0,996
Ensayos sobre saliva de no secretor	C sin diluir	67	-0,015	0,905
	LT sin diluir	61	-0,055	0,673
	Lm sin diluir	52	0,091	0,520
Ensayos sobre saliva de secretor	Calostro	64	-0,258	0,040
	LT	61	0,018	0,888
	Lmad	52	-0,125	0,377



DISCUSIÓN

Dado el extraordinario interés que suscita la observación de propiedades defensivas de la LM y el desconocimiento de muchos de los agentes responsables de las mismas, nuestra investigación dirigida a conocer su capacidad protectora frente a una de las infecciones más frecuentes del lactante resulta de plena actualidad.

Entre las primeras referencias acerca de la idoneidad de la LM en la alimentación del lactante encontramos a Avicena (985-1036), filósofo y médico persa, que en el *Canon* proponía que en caso de no disponer de LM la única alternativa adecuada era recurrir a las amas de cría (Avicena citado por Ptempio, 1658). En la segunda mitad del siglo XVIII y principios del siglo XIX esta práctica fue muy popular, sin embargo, la falta de acceso a las amas de cría de los sectores más desfavorecidos de la población y la incorporación masiva de las mujeres al trabajo con la Revolución industrial llevaron a la sustitución de la lactancia materna por la alimentación con leche de vaca o cabra a las que se añadían cereales, azúcar y miel. Estas preparaciones no sólo no cubrían las necesidades nutricionales del lactante, sino que su elevada osmolaridad suponía una carga renal excesiva que derivó en un incremento de la mortalidad infantil debida a desnutrición y deshidratación ligada a infecciones intestinales. Este hecho planteó el enorme reto de crear sustitutos de la LM seguros y con una calidad nutricional suficiente.

En 1865 se presentó la “sopa para lactantes” de Justus von Liebig, profesor de química de la Universidad de Munich que analizó por primera vez la composición de la LM (von Liebig, J., 1865). Posteriormente aparecieron numerosas formulaciones como la del farmacéutico Heinrich Nestle en 1867 (Peiper, A., 1992). En 1891 Paul von Ehrlich publicó las primeras evidencias de que la LM podía conferir una protección inmunitaria al lactante insustituible por dichos sucedáneos (Von Ehrlich., 1891, citado por Cheeda et al., 1998), lo que corroboraron Woodbury y Grulee a principios del siglo XX al observar una menor incidencia y gravedad de las enfermedades diarreicas en los niños lactados al pecho frente a aquellos alimentados con fórmulas artificiales (Woodbury., 1922; Grulee et al., 1934; Grulee et al., 1935). Además, la generalización del uso de estas nuevas fórmulas en los años 50 ofreció la oportunidad de observar a gran escala una mayor morbi-mortalidad debido a diarrea aguda vírica y bacteriana en los lactantes alimentados artificialmente en comparación con los que recibían LM (Wyatt et al., 1969; Mata et al., 1969b; Glass et al., 1976; Clemens et al., 1986; McLean et al., 1986; Glass et al., 1989).

En la actualidad, existe una amplia gama de fórmulas adaptadas cuya composición nutricional se asemeja al promedio de la LM y que ofrecen una garantía de seguridad para el lactante, si bien estas preparaciones carecen de los agentes funcionales de la LM a los que se atribuyen propiedades beneficiosas. Entre ellos podrían mencionarse numerosos elementos que participan en la inmunidad tanto específica o mediada por IgA, como inespecífica mediada por

lactoferrina, lisozima, mucina, lactadherina, factores antiinflamatorios, antioxidantes e inmunomoduladores, probióticos, oligosacáridos y glicoconjugados. De esta forma el objetivo actual que se plantea para la mejora de las fórmulas artificiales es imitar sus propiedades añadiendo algunos de estos biocomponentes.

Se ha ensayado la adición de prebióticos (Sherman, P. et al., 2009), probióticos (Arboleya, S. et al., 2011), nucleótidos (Gill, B.D. et al., 2007) y aminoácidos esenciales (Agostoni, C. et al., 2000), sin embargo no se conocen con exactitud sus efectos *in vivo* ni las cantidades necesarias para que resulten eficaces. Además no han podido ser determinados los agentes implicados en algunas de las propiedades de la LM, lo que hace que estas funciones resulten por el momento inimitables. En este último punto se centra nuestra investigación, pues la observación de que la LM confiere una capacidad protectora frente a las infecciones intestinales por NoV al lactante ha sido referida por diversos autores (Newburg et al., 1995b; Jiang et al., 2004a; 2004b; Morrow et al., 2005; Newburg et al., 2005a; 2005b; Marionneau et al., 2005; Newburg et al., 2009), si bien los agentes responsables de dicha propiedad son desconocidos.

Hemos de recordar que las infecciones intestinales son la segunda causa, tras las respiratorias, de morbilidad en la infancia tanto en países en desarrollo como en desarrollados afectando a casi 1,8 millones de niños menores de 5 años (WHO, 2008b). Los fallecimientos por diarrea aguda suponen un 21% de la mortalidad en los menores de 5 años en los países más pobres (Kosek et al., 2003), donde se ha demostrado que una de las estrategias más efectivas en la lucha contra esta enfermedad ha sido el apoyo a la lactancia materna (Battacharaya et al., 1995).

En nuestro medio son enormes los costes directos e indirectos por la elevada prevalencia de la enfermedad (Tucker et al., 1998). Rotavirus es el principal agente causal de diarrea aguda infecciosa en niños entre los 6 y 24 meses, siendo responsable de un 30 a un 50% de los episodios en los países desarrollados (Lynch et al., 2003; Dormitzer et al., 2005). NoV son los segundos en frecuencia (Moreno-Espinosa et al., 2004; Treanor et al., 2005), alcanzando hasta un 17,3% de los casos en los niños menores de 5 años (Junquera et al., 2009). La reciente aplicación de técnicas de RT-PCR ha permitido la identificación de un número creciente de nuevos diagnósticos, como la asociación con enterocolitis necrosante (Stuart et al., 2010) y apneas (Kalmaludden et al., 2009) en el periodo neonatal.

Actualmente no existe ningún cultivo celular para lograr el aislamiento de NoV (Duizer et al., 2004b), tampoco hay un modelo animal disponible (Chaudry et al., 2007), aspectos que han dificultado su estudio. Si bien la clonación del virus Norwalk (GI.1), prototipo del género *Norovirus*, a partir de viriones parcialmente purificados de material fecal humano (Jiang et al., 1990) permitió aplicar las técnicas de RT-PCR y de secuenciación al estudio de estos virus. Basándose en estas técnicas, se ha llegado a la actual clasificación taxonómica de *Norovirus* en

cinco genogrupos con 29 genotipos o clusters (Zheng et al., 2006; Buesa et al., 2008).

Otro de los grandes avances en la investigación de los NoV lo constituye la replicación de la VP1 de la cápside en sistemas de expresión como la producción de VLPs en células de insecto Sf9 con baculovirus recombinantes (Jiang et al., 1992b), proceso que no requiere ni ARN (Jiang et al., 1992b) ni la proteína de la cápside VP2 (Laurent et al., 1994; Leite et al., 1996). Las VLPs muestran una morfología (Prasad et al., 1994a; 1994b) y antigenicidad (Green et al., 1993) similares a las del virión infeccioso, por lo que han demostrado su utilidad en métodos diagnósticos (Jiang et al., 2000) y en el análisis de la unión con el receptor (White et al., 1996; Marionneau et al., 2002; Hutson et al., 2003).

El medio de transmisión más importante de los NoV es la ruta fecal-oral, además los NoV poseen una serie de características que facilitan su propagación en brotes epidémicos: su dosis infectiva es muy baja, la excreción viral suele ser muy intensa durante un periodo de tiempo prolongado, la resistencia medioambiental de sus viriones es muy alta y una persona puede sufrir múltiples reinfecciones (Parashar et al., 2001; Evans et al., 2002; Marks et al., 2003). Respecto a este último aspecto, se ha observado que en algunas epidemias por NoV más de un 80% de los voluntarios adultos resultan enfermos (Kaplan et al., 1982b) y aproximadamente un 50% desarrollan repetidamente enfermedad tras varias exposiciones a NoV, sugiriendo que la respuesta inmunitaria desarrollada en los contactos previos proporciona una protección escasa. Además, existe un porcentaje de la población que no es susceptible a la infección por NoV tras el primer contacto ni los sucesivos (Dolin et al., 1972; Wyatt et al., 1974; Steinhoff et al., 1980; Blacklow et al., 1982). Ambas observaciones demuestran que la respuesta inmunitaria frente a estos virus no sigue el patrón tradicional.

Los efectores de la respuesta inmunitaria frente a los NoV no se conocen con detalle, parece que los receptores “Toll-like” TLR 7 y 8 intervienen en la respuesta innata frente a los virus ARN de cadena única (Lund et al., 2004; Heil et al., 2004; Diebold et al., 2004). También se ha observado una respuesta celular de predominio Th-1 de producción de citoquinas (Tackett et al., 2003; Lindesmith et al., 2005). En relación con la respuesta humoral, los individuos susceptibles a la infección por NoV presentan niveles mayores de anticuerpos séricos que aquellos que se muestran resistentes a la infección (Johnson et al., 1990; Graham et al., 1994; Lindesmith et al., 2003). Esta discrepancia clínico-serológica llevó durante años a plantear la hipótesis de la existencia de un factor constitucional, determinado genéticamente, que pudiera condicionar la susceptibilidad o resistencia frente a las infecciones por NoV (Parrino et al., 1977; Blacklow et al., 1982; Koopmans et al., 1982; Baron et al., 1984; Cukor et al., 1984).

El estudio inicial que profundizó en esta hipótesis fue publicado por Ruvoen-Clouet et al. en el año 2000, describen cómo los virus de la enfermedad hemorrágica del conejo y sus VLPs recombinantes son capaces de unirse a los antígenos histosanguíneos (HBGAs). Estos son carbohidratos complejos presentes en la parte más protruyente de muchas glicoproteínas o glicolípidos de la superficie de los hematíes y del epitelio mucoso del tracto digestivo, respiratorio y genito-urinario humanos (Ravn et al., 2002; Le Pendu et al., 2004), también están presentes como oligosacáridos libres en fluidos biológicos como la LM, la saliva, el contenido intestinal y la sangre.

Los determinantes antigénicos HBGAs parten de cuatro tipos principales de estructuras sacarídicas precursoras sobre las cuales actúan las fucosiltransferasas 1 y 2 (FUT1 y FUT2) y las glicosiltransferasas A y B. En la superficie de los enterocitos el gen FUT2 sintetiza la enzima que permite la expresión del antígeno H tipo 1, el ligando principal para la unión de las VLPs recombinantes a las células epiteliales intestinales (Marionneau et al., 2002) y el receptor principal del virus Norwalk. También actúa junto con FUT3 en la síntesis de los antígenos Le a y Le b a partir del precursor tipo 1, presente en el tracto digestivo y el aparato respiratorio (*figura 19*) y junto FUT1 en la síntesis del antígeno H tipo 2 y los antígenos Lewis x e y a partir del precursor tipo 2, en la superficie de los eritrocitos (*figura 20*). Las glucosiltransferasas A y B definirán los grupos sanguíneos permitiendo la adición de los epítomos A y B al antígeno H (*figura 21*).

Los NoV difieren enormemente en su capacidad de reconocimiento de los receptores HBGAs humanos. Se ha propuesto un modelo de interacción del NoV al HBGA que asume que la proteína de la cápside de cada genotipo tiene una superficie de unión que puede acoplar uno o dos epítomos de los tres HBGAs mayores (ABO, H o Lewis), como muestra la *figura 23*. De forma que cada epítomo podría unirse a esta superficie de forma independiente y la participación de ambos en la unión podría resultar en una ampliación de las especificidades del huésped para los diferentes genotipos (Huang et al., 2005; Tan et al., 2004).

En relación a los componentes de la LM implicados en la protección frente a las infecciones por NoV, se consideran de primer orden los oligosacáridos y glicoconjugados (Kunz et al., 2000). Los oligosacáridos son sintetizados por los mismos tipos de fucosil y glicosiltransferasas responsables de la síntesis de los HBGAs de las superficies celulares, que emplean la mayoría de los patógenos entéricos para la unión a los enterocitos. Dada la analogía estructural de ambas moléculas se planteó que los oligosacáridos de la LM podrían actuar competitivamente con los receptores de las células intestinales impidiendo la internalización de los patógenos y, por tanto, protegiendo al niño lactado de ciertas infecciones (Holmgren et al., 1981; Cleary et al., 1983; Otnaess et al., 1986; Andersson et al., 1986; Laegreid et al., 1986a; 1986b; Holmgren et al., 1987; Laegreid et al., 1987; Newburg et al., 1990; Newburg et al., 1991; Oatness et al., 1982; Cleary et

al., 1983; Nerwburg et al., 1990).

El hecho de que los oligosacáridos de la LM estén codificados por genes relacionados con el grupo ABO, el genotipo FUT2 y los antígenos Lewis podría explicar una diferente capacidad protectora de la LM según la dotación genética de la madre. Otras características podrían también condicionar esta propiedad como la etapa madurativa de la LM (calostro, leche de transición o madura) y la duración de la gestación (parto pretérmino o a término).

Dados estos preceptos, el interés principal de nuestra investigación se centró en analizar si la LM presenta una capacidad protectora frente a las infecciones por NoV e investigar los factores responsables de la misma. Se estudió esta propiedad en función de características como la edad materna, su origen geográfico, la duración de la gestación y la etapa madurativa de la LM. En relación con la posible intervención de agentes de inmunidad inespecífica se correlacionaron los hallazgos con características de las madres como el grupo sanguíneo, el genotipo FUT2 y la composición de oligosacáridos fucosilados en la LM. También se estudió la participación de la inmunidad específica de la LM y el suero, estudiando si este último presentaba esta propiedad inhibitoria y la presencia de Ig específicas anti-NoV GII.4 en ambos fluidos biológicos.

En los siguientes epígrafes se discutirán los resultados obtenidos y compararán con la literatura actual del tema. El texto se estructurará en cinco apartados: Características de la muestra poblacional; grupos sanguíneos, genotipo FUT2 y antígenos Lewis; análisis realizados en leche materna; análisis realizados en suero y conclusiones.

1. Características de la muestra poblacional

El diseño longitudinal prospectivo del presente estudio en el que participaron 111 madres aportando una muestra de suero durante la gestación y tres muestras de LM de cada una de las etapas de secreción láctea, junto con el hecho de que las gestaciones a término y pretérmino se encontraran representadas por igual en la muestra (*tabla 31*) y que estas últimas abarcaran todo el rango de prematuridad (*tabla 32*), la convierten en una muestra relevante y esto confiere gran valor al presente estudio.

La obtención de 287 muestras de LM demuestra una alta colaboración (*figura 37*). Las razones por las que se perdieron muestras fueron, por orden de frecuencia: éxitus del niño, sectorización tras el alta de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales, interrupción de la lactancia materna o negativa a trasladarse al hospital para aportar la muestra. Además se consiguieron recuperar 71 muestras de suero (*figura 39*), no siendo posible en caso de tratarse de muestras antiguas desechadas por el laboratorio de Microbiología del HCUV, madres que no se sometieron a los controles serológicos habituales durante la gestación o bien procedentes de áreas

sanitarias no dependientes del HCUV.

En relación con la edad (*tabla 31*) y la procedencia geográfica de las participantes (*tabla 33*), su variabilidad reflejó las características sociodemográficas de las madres de nuestro medio, incluyéndose madres desde 16 hasta 40 años de edad, mayoritariamente de origen español y latinoamericano.

2. Grupos sanguíneos, genotipo FUT2 y antígenos Lewis

La distribución de los diferentes **grupos sanguíneos** maternos fue similar a la referida para nuestra región por la Federación Nacional de Donantes de Sangre <www.donantesdesangre.net>, siendo los más frecuentes el A y el O (*tabla 34*). En relación a las madres latinoamericanas y de Europa del Este los grupos sanguíneos observados coincidieron con los más frecuentes publicados para sus países de origen <www.bloodbook.com>.

En relación al estudio de las características de **genotipo FUT2** de las madres participantes (*tabla 35*), los resultados obtenidos se consideran muy novedosos en nuestro país. Concretamente para el genotipo FUT2, se han publicado estudios de pequeñas muestras poblacionales de muy diferentes orígenes geográficos como Portugal (Serpa et al., 2004), Suecia (Thorven et al., 2005), Turquía y Mongolia (Soejima et al., 2008), Ghana (Soejima et al., 2007), Vietnam (Soejima et al., 2011), China (Tian et al., 2001; Storry et al., 2006; Yan et al., 2005) y Corea (Park et al., 2005). Más reciente es un amplio estudio multiétnico que incluye 732 individuos procedentes de 32 orígenes geográficos diferentes en los que analiza el genotipo secretor y las mutaciones del gen FUT2 responsables del estado de no secretor. La principal conclusión del trabajo es la gran similitud de las frecuencias del genotipo secretor y no secretor en casi todos los grupos humanos, 80 y 20% respectivamente, a pesar de las diferencias existentes en las mutaciones inactivadoras del gen FUT2 (Ferrer-Admetlla et al., 2009).

En el estudio de Ferrer-Admetlla se analizan 121 individuos europeos, de los cuales, solamente 20 son españoles (todos procedentes del País Vasco). Los dos grupos geográficos más numerosos que hemos analizado fueron el de las madres españolas y de origen latinoamericano (los grupos de madres de Europa del Este, magrebíes y chinas fueron demasiado pequeños para poder realizar comparaciones). En ellas observamos pequeñas diferencias en la proporción de madres secretoras y no secretoras, siendo el genotipo secretor ligeramente más frecuente en el grupo de madres latinoamericanas (*tabla 36*). En concreto comprobamos que un 83,3% de mujeres autóctonas fueron secretoras (16,7% del total de españolas fueron secretoras homocigotas y un 66,6% secretoras heterocigotas), lo que guarda una proporción similar a lo comunicado en individuos europeos. Asimismo, aportamos datos del genotipo secretor de un grupo de 22 mujeres latinoamericanas en las que detectamos un porcentaje levemente superior de secretoras (90,9%) en

comparación con las españolas. En ninguno de los estudios de prevalencia del estado secretor se relaciona esta característica con el sexo, por tanto hay que considerar que nosotros hemos analizado sólo mujeres.

Por otra parte, en el estudio de Ferrer-Admetlla se plantea que dos polimorfismos son las causas más comunes del fenotipo no secretor: (a) el alelo no funcionante se^{428} , que expresa un codón de parada en la posición 143 y es responsable del fenotipo no secretor de europeos, persas y africanos, y (b) el se^{385} , que es la causa más frecuente del fenotipo no secretor en el Sudeste asiático debido a una mutación en el codón 129.

Dado que la gran mayoría de la población estudiada es europea, lo que nosotros estudiamos con la digestión por la endonucleasa *AvaII* de los amplificadores por PCR del gen *FUT2* fue la mutación G428A que genera un codón de parada y por tanto una enzima no funcional en los individuos homocigotos para esta mutación (no secretores).

La secuencia 5'...AAGGTCCAGGAGC...3' que detectamos en el cromatograma de las secuencias no refleja directamente esta mutación G428A, pero sí el polimorfismo de este gen y se correlaciona muy bien con los genotipos de secretores homocigotos (SeSe) y heterocigotos (Sese).

Analizando otras variables como la duración de la gestación, hemos comprobado que la población estudiada fue homogénea en la proporción de madres secretoras y no secretoras en los grupos de recién nacidos a término y pretérmino (*tabla 37*). Además, al comparar madres secretoras y no secretoras no observamos diferencias para cada grupo sanguíneo (*tabla 38*).

El estudio sistemático de los **antígenos Lewis** a/b y x/y en LM mediante técnica de ELISA realizado se puede considerar inédito. Existen muchas publicaciones acerca de la composición de oligosacáridos de la LM, si bien ofrecen resultados muy dispares debido a causas relacionadas con el procedimiento (Coppa et al., 1990; Thurl et al., 1996; Nakhla et al., 1999; Erney et al., 2000). En primer lugar las técnicas empleadas para la separación de los oligosacáridos de la LM son muy heterogéneas, por ej. cromatografía por intercambio iónico o filtración en gel. Además, en algunas publicaciones no se especifica el método empleado por lo que no se puede averiguar si toda o parte de la lactosa se ha eliminado de la fracción de oligosacáridos, lo que modifica ampliamente los resultados. Por último, los residuos proteicos pueden contaminar fracciones con oligosacáridos neutros o ácidos y esto no se ha considerado en muchos de los estudios. Dados los resultados imprecisos de estas técnicas, que además requieren grandes volúmenes de LM para su estudio, se decidió la determinación directa de los Ag Lewis en muestras de LM mediante AcMo de origen comercial cuyo uso se había descrito para el estudio de antígenos Lewis en saliva (Marionneau et al., 2005b), sangre (Sakamoto et al., 1984) y tejidos (Engelstaedter, 2012).

Los resultados obtenidos de la determinación de los antígenos Lewis en LM se presentan agrupados en a/b y x/y, en función de la relación existente en las vías de síntesis descritas a partir

de los precursores 1 y 2, respectivamente (ver *figuras 19 y 20*). Las combinaciones más frecuentes fueron Le a⁺ b⁺ y Le x⁻ y⁺, presentes en un 25,8% de las madres españolas, y Le a⁻ b⁺ y Le x⁺ y⁺, que hallamos en un 22,7% de las madres latinoamericanas (*tabla 40*). La diferencia observada entre ambos grupos fue estadísticamente significativa para Le x reflejando un mayor contenido del Ag Le x en la LM de las madres latinoamericanas (*tabla 41*). Esta diferencia en el contenido de Le x también se apreció al comparar las madres secretoras y no secretoras (*tabla 43*), las madres secretoras presentaron una mayor proporción de Le x, sugiriendo la asociación de FUT2⁺ y FUT3⁺ en ellas (ver *figura 20*).

Por otra parte, los grupos de gestaciones pretérmino y a término fueron homogéneos en el contenido de antígenos Lewis (*tabla 41*), lo que coincide con las escasas publicaciones que existen acerca de la influencia de la edad gestacional en composición de oligosacáridos en la LM (Kunz et al., 2000).

A pesar de las limitaciones metodológicas en el estudio de la concentración de los oligosacáridos de la LM planteadas previamente, se ha logrado una aproximación a su composición. Se plantea que el oligosacárido principal de la LM de las madres FUT2⁺ es la 2'-fucosil-lactosa (2'-Fuc-Lac), a diferencia de las madres FUT3⁺ en las que predomina la lacto-N-fucopentosa II. En caso de que ambos genes estén presentes la lacto-N-difucohexosa I será el oligosacárido principal y, si carecen de ambos genes, será la lacto-N-fucopentosa III (Kindberg et al., 2007). Es decir, las madres FUT2⁺ tendrán de forma predominante en su LM oligosacáridos con uniones tipo α 1,2 y las madres FUT3⁺ de tipo α 1,3. Desafortunadamente, las publicaciones relacionadas demuestran que este esquema es sólo una aproximación a la expresión de los oligosacáridos de la LM sugiriendo una mayor complejidad en su producción y la posible intervención de otros factores (Newburg et al., 2004).

Nosotros hemos constatado una correlación casi completa entre el gen FUT2⁺ y el antígeno Le b⁺, un 78,1% de las madres secretoras son Le b⁺, si bien todas las madres no secretoras son Le b⁻ (*tabla 42*). Conviene aclarar que, en relación a FUT1 y FUT3 no es fácil deducir su fenotipo en función de los antígenos Lewis detectados en LM.

Por ej. son necesarios los genes FUT2 y FUT3 para sintetizar el antígeno Le b a partir del precursor tipo 1, pero sólo es necesario FUT3 para producir al antígenos Le a a partir del precursor tipo 1 (*figura 19*). Sin embargo un 27% de las muestras fueron Le b⁺ y Le a⁻ (*tabla 42*). De forma análoga, es necesaria la acción de las fucosiltransferasas codificadas por los genes FUT1 y FUT3 sobre el precursor tipo 2 para producir Le y. Además la acción directa del FUT3 sobre el precursor tipo 2 permite la síntesis de Le x (*figura 20*). Sin embargo, un 45,8% de las muestras fueron Le y⁺ y Le x⁻ y un 9,4% fueron Le x⁺ Le y⁻ (*tabla 42*).

Dados estos resultados planteamos que no se puede establecer una correlación directa entre los antígenos Lewis hallados en LM y los genes que codifican para las fucosiltransferasas que permiten su síntesis. Podemos afirmar que la presencia de un antígeno Lewis indica que el gen FUT que codifica la enzima necesaria para su síntesis está presente, pero la ausencia de un antígeno Lewis no descarta la presencia del gen FUT requerido (Newburg et al., 2004). Esto nos impide comparar nuestros resultados con los datos de prevalencia descritos para los genes FUT1 y FUT3. Se ha descrito la presencia de mutaciones recesivas para FUT1 en un 10^{-5} a un 10^{-6} de la población; en relación con el FUT3, la mutación inactivadora se encuentra en un 10% de los individuos (Marionneau et al., 2001).

Sí hemos constatado una correlación clara entre el genotipo FUT2 y la presencia de Le b en la saliva de los donantes. La muestra procedente de individuo no secretor fue Le b⁻, a diferencia de las muestras de individuos secretores que fueron Le b⁺ (*tabla 20*), lo que coincide con lo descrito por Koda et al., 2001.

3. Análisis realizados en leche materna

Se diseñó un ensayo de ELISA para valorar la capacidad de bloqueo de la LM sobre la unión de los NoV a sus receptores específicos, eje central de nuestra investigación (*figura 27*).

Para ello se tapizaron pocillos de placas de microtitulación con una dilución de saliva procedente de un individuo no secretor y de un individuo secretor homocigoto. Como ensayo preliminar, se estudió la unión de las VLPs de NoV GII.4 variante 2006b a saliva procedente de los donantes encontrando una mayor afinidad de las VLPs de NoV GII.4 a la saliva de individuo no secretor, a continuación de secretor homocigoto y por último de secretor heterocigoto.

Aunque la afinidad de los NoV por los HBGAs se ha desarrollado ampliamente en el apartado 3.9 de *Introducción*, sería importante recordar dos aspectos fundamentales: a) la identificación del dominio P2 de VP1 como sitio de unión con los receptores en las células del huésped (Green, 2007), y b) la especificidad de unión de los diferentes genotipos de NoV a uno o varios HBGAs (Huang et al., 2005; Tan et al., 2004).

Con estos conceptos se han planteado diversas aproximaciones al estudio de la interacción de los NoV y los HBGA. Los primeros ensayos publicados emplearon paneles con muestras de saliva procedente de individuos de diferentes grupos sanguíneos, genotipo FUT2 y antígenos Lewis, lo que permitió definir los primeros patrones de unión de NoV a los HBGA (Harrington et al., 2002; Huang et al., 2003; Harrington et al., 2004; Huang et al., 2005; Marionneau et al., 2005b). Posteriormente se logró la producción de oligosacáridos sintéticos análogos a los HBGAs,

lo que permitió el estudio de muchas más interacciones (Huang et al., 2005).

La observación de que el virus Norwalk (NoV GI.1), considerado prototipo del género *Norovirus* y primer genotipo de NoV estudiado, era capaz infectar a individuos secretores pero no a individuos no secretores constituyó el punto de partida para la hipótesis acerca de la unión de los NoV a los HBGAs planteada por Ruvoen-Clouet en el año 2000. Esta afinidad de unión se ha confirmado posteriormente por medio de ensayos con oligosacáridos sintéticos donde se demuestra su capacidad de unirse a saliva de individuos secretores A y O, pero no a la saliva de secretores B y no secretores (*tabla 9*).

En relación con el NoV GII.4, la primera variante estudiada fue VA387 que demostró su capacidad de unión a saliva de secretores A, B y O, pero muy excepcionalmente a saliva de no secretores (*tabla 9*). Los resultados obtenidos con nuestra variante, NoV GII.4-2006b (procedente de una muestra clínica obtenida en 2006), difieren de forma absoluta del comportamiento descrito para VA387, pues presentó una mayor afinidad en la unión a saliva de individuo no secretor que en la unión a saliva de individuo secretor.

El sorprendente hallazgo de que NoV es capaz de unirse a los HBGAs presentes en saliva de individuo no secretor ha sido publicado por de Rougemont recientemente (de Rougemont et al., 2011), en dicho estudio analiza la unión de 6 variantes de VLPs de NoV GII.4 (Bristol, US95/96, Hunter, Yerseke, Den Haag y Osaka) a muestras fenotipadas de saliva y a oligosacáridos sintéticos. Las seis variantes estudiadas fueron capaces de unirse a saliva de individuos secretores, independientemente del grupo sanguíneo ABO. Además, las variantes Den Hagg y Osaka se unieron a los HBGAs presentes en saliva de individuos no secretores con Ag Lewis positivos (de Rougemont et al., 2011). Estos hallazgos sugieren la adquisición de una habilidad de unión de las variantes de NoV posteriores al año 2006, esta capacidad de ampliar el espectro de unión de NoV a más receptores supone un mecanismo adaptativo que permitiría su persistencia infectando a más individuos.

Un estudio muy reciente publicado por Shanker en el año 2011 profundiza en esta teoría. En él describe cambios en la secuencia de aminoácidos y en la conformación tridimensional de la región correspondiente al dominio P2 de la cápside en genotipos de NoV que se suceden en brotes epidémicos durante varios años consecutivos. Estas modificaciones tienen como resultado nuevas posibilidades de unión a los receptores HBGAs. El análisis de los patrones de unión de los genotipos estudiados muestra una evolución de los NoV que supone una ventaja adaptativa al adquirir la capacidad de infectar a nuevos individuos (Shanker et al., 2011).

Asimismo, ha de destacarse que, a diferencia de la débil capacidad de unión del virus Norwalk a saliva de individuos de grupo sanguíneo B (Marionneau et al., 2005b) y la capacidad de

unión de VA387 a la saliva de grupo sanguíneo B limitada a individuos secretores y no a no secretores (Huang et al., 2005), la variante 2006b de NoV GII.4 mostró su capacidad de unión a las tres muestras de saliva empleadas, todas ellas de grupo sanguíneo B, de forma independiente al genotipo secretor.

Una alternativa posible al empleo de muestras de saliva que potencialmente contienen HBGAs para el presente estudio, es tapizar los pocillos con células Caco-2 (Murakami et al., 2010). Durante el cultivo de estas células se polarizan y adoptan una disposición de enterocitos maduros. Sin embargo, al largo tiempo necesario para su cultivo (15 días) unido a la dificultad que observamos para conseguir una monocapa celular llevó a la utilización de muestras de saliva para nuestra investigación.

El siguiente paso en el ensayo diseñado para analizar la capacidad de bloqueo de la LM sobre la unión de NoV a sus receptores en saliva, fue la adición de suspensiones de VLPs de NoV GII.4 producidas mediante baculovirus recombinantes. Se seleccionó este genotipo por tratarse del más prevalente tanto a nivel mundial (Lindesmith et al., 2008) como en nuestro país (Buesa et al., 2008). Para ello se produjeron VLPs de NoV GII.4 mediante baculovirus recombinantes según el procedimiento descrito para Norwalk por Jiang et al. en 1992 (Jiang et al., 1992b). El resultado de esta expresión se comprobó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), así como observación al microscopio electrónico tras tinción negativa con ácido fosfotúngstico (*figuras 25 y 26*).

Estas VLPs se preincubaron con las muestras de LM a estudio para valorar si alguno de sus componentes eran capaces de interferir con la unión de las VLPs de NoV a los HBGAs de saliva, imitando la competición por la unión al receptor que enfrentaría a los oligosacáridos de la LM y a los NoV *in vivo*.

La unión fue detectada por medio del AcMo 4C5C10, producido en nuestro laboratorio por medio de un hibridoma obtenido de linfocitos de un ratón BALB/c inmunizado con VLPs de NoV GI.5 y seleccionado con VLPs de NoV GII.4. Este anticuerpo monoclonal era capaz de reconocer un dominio conformacional de la región P2 de la proteína VP1 de la cápside de NoV (Carmona et al., 2010).

Por medio de este ensayo se estudió **la actividad bloqueante de muestras de LM sobre la unión de VLPs de norovirus GII.4 a saliva.**

En relación con los ensayos de bloqueo de muestras de LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo no secretor (sese), se observó que prácticamente la totalidad de las muestras de LM eran capaces de inhibir esta unión (*tabla 44*). Esta propiedad apareció con una intensidad máxima en más del 95% del total de muestras de cada grupo. El hecho de que las

muestras de LM se ensayaran sin diluir y diluídas 1/100, permitió observar que la intensidad de este bloqueo no variaba al disminuir la concentración de LM por pocillo, lo que sugiere una capacidad inhibitoria muy intensa (*tabla 45*). Además esta actividad se mantuvo en todas las etapas de la secreción láctea con la misma intensidad y en un número de muestras similar.

Metodológicamente el cálculo del parámetro “porcentaje de inhibición” (P.I.) resultó de gran utilidad en la comparación de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de ELISA. La conversión de los valores absolutos de absorbancia de cada muestra de LM, ensayadas en fechas diferentes y con distintos factores que podían influir en los resultados, en un valor relativo al valor de referencia permitió unificar y establecer comparaciones.

La obtención de valores de inhibición máxima en casi la totalidad de las muestras de LM en los ensayos con saliva de individuo no secretor constituyó un resultado inesperado. Sin embargo dos aspectos confirieron fiabilidad a lo hallado a pesar de su uniformidad: a) en primer lugar la reproducibilidad de los mismos, pues se repitieron las determinaciones en un 25% de las muestras obteniéndose iguales resultados, y b) en segundo lugar, la obtención de resultados adecuados en los valores de referencia de los controles positivos (pocillos a los que se añadía la suspensión de VLPs sin LM que pudiera interferir su unión con la saliva) pues, como mínimo, triplicaban los valores de absorbancia de los pocillos indicativos del ruido de fondo o controles negativos (pocillos tapizados con saliva a los que se añadía PBS exclusivamente).

En los ensayos de bloqueo de muestras de LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de individuo secretor homocigoto, se observó también que la LM presentaba una capacidad de bloqueo muy intensa y en casi la totalidad de muestras de calostro. Sin embargo, fue disminuyendo la intensidad y el número de muestras con esta propiedad en las siguientes fases de la lactancia (*tabla 46*).

Se analizó si la capacidad inhibitoria de las muestras de LM se veía modificada por alguna de las características clínicas de las madres. Para ello se aplicó un estudio de correlación de los valores obtenidos en estos ensayos con la edad materna en el momento del parto. La hipótesis que se planteaba era que las madres de mayor edad podrían tener una mayor concentración de anticuerpos específicos frente a NoV por haber padecido la infección previamente y por tanto conferirían mayor protección en el bloqueo de la unión de las VLPs a sus receptores. En un estudio sobre seroprevalencia de anticuerpos IgG frente a NoV en 443 individuos de distintas edades en Valencia, se encontraron anticuerpos en el 99% de las muestras de suero, incrementándose los títulos en relación directa con la edad (Carmona et al., 2011). También pretendía valorarse si la capacidad de inhibición de las muestras de LM disminuía con la edad, circunstancia que observaríamos en caso de que esta propiedad dependiera de un factor expresado constitutivamente y que esta síntesis disminuyera en las mujeres con la madurez. No obstante no

observamos una correlación directa ni inversa entre ambas variables (*tabla 47*).

En segundo lugar, se estudiaron las diferencias en el porcentaje de inhibición de las muestras de LM según procedieran de gestaciones a término o finalizadas de forma prematura. Conocidas las diferencias en la composición nutricional de la LM procedente de gestaciones pretérmino y a término, tal vez podrían existir diferencias en los componentes de la LM responsables de la propiedad protectora frente a las infecciones por NoV en función de la duración de la gestación. No obstante nuestros resultados demostraron que no existen tales diferencias.

Por último, se realizó un análisis comparativo de la capacidad inhibitoria de la LM en función del origen geográfico de las madres. Planteando que mujeres de diferentes nacionalidades pudieran tener una historia de exposición diferente a NoV y, por tanto, mayor o menor concentración de anticuerpos específicos que pudieran implicar diferencias en esta propiedad. Si bien no hallamos diferencias significativas (*tabla 49*).

La relación entre la capacidad protectora de la LM frente a las infecciones por NoV y estos datos clínicos de las madres no ha sido analizada en ningún estudio previo. Si bien ninguna de las hipótesis planteadas han sido demostradas, los resultados son muy relevantes, pues demuestran que la capacidad de inhibición de muestras de LM frente a las infecciones por NoV se mantiene durante un amplio rango de edad con la misma intensidad, no varía entre las diferentes poblaciones o razas y la poseen incluso las madres que han presentado partos extremadamente prematuros.

El análisis de la capacidad de inhibición de muestras calostro, leche de transición y madura recogidas de forma longitudinal de las mismas mujeres resulta inédito y nos ofrece la oportunidad de observar que esta propiedad se mantiene con la misma intensidad durante todas las fases de la secreción láctea en los ensayos de bloqueo con saliva de no secretor. No obstante, la inhibición disminuye en intensidad y en el número de muestras implicadas en los ensayos de bloqueo frente a saliva de secretor (diferencia que resulta estadísticamente significativa como muestran las *tablas 55 y 56*). En los ensayos de bloqueo realizados por Jiang et al. se emplearon muestras de la primera semana de lactancia (Jiang et al., 2004a). En este mismo artículo se estudia la concentración de los antígenos Le a y Le b durante las primeras 18 semanas de lactancia no apreciándose oscilaciones significativas en los resultados lo que, en caso de ser los responsables de la inhibición, explicaría los resultados observados con saliva de no secretor, no así los resultados con saliva de secretor.

Para conocer la participación de los anticuerpos específicos de la LM en esta actividad se estudiaron los grupos sanguíneos, el genotipo FUT2 y los antígenos Lewis en LM de las madres. En las comparaciones establecidas entre los diferentes grupos sanguíneos se excluyó al grupo

sanguíneo AB por estar formado por un número insuficiente de madres. En relación a los restantes grupos no se observaron diferencias en los valores de porcentaje de inhibición de muestras de LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 2006b a saliva (*tabla 50*).

Los estudios acerca de la unión de VLPs de NoV de diferentes genotipos a muestras de saliva clasificadas según el grupo sanguíneo demuestran que este es un factor determinante de especificidad (Huang et al., 2005; Marionneau et al., 2005b; de Rougemont et al., 2011), si bien parece secundario en los ensayos de bloqueo por muestras de LM. Esto coincide con los resultados publicados por Jiang et al., quienes analizan el bloqueo de la unión de cuatro variantes de NoV (VA387, MOH, Norwalk y VA207) a saliva por muestras de LM. En ellas se observó que el genotipo FUT2 de las madres y los antígenos Lewis de las muestras de LM son los principales factores que influyen en esta actividad bloqueante, mientras que el grupo sanguíneo no resulta decisivo sugiriendo que los antígenos A y B no se expresan en la LM (Jiang et al., 2004a).

La hipótesis planteada tiene relación con la gran inmunogenicidad de estos antígenos como constatan los casos de anemia hemolítica del RN por incompatibilidad materno-filial o de transfusiones con hemoderivados de grupos sanguíneos no compatibles entre donante y receptor. La inhibición de la producción del antígeno A, B o ambos en la LM podría suponer una protección al recién nacido por motivos obvios (Jiang et al., 2004a). Sabharwal et al. encontraron grandes cantidades de antígenos de grupo A en muestras fecales de lactantes alimentados con LM, y en base a la hipótesis previa, estudiaron los grupos sanguíneos de madres y de niños lactados al pecho así como el contenido de antígeno A en LM. Observaron que sólo los lactantes de grupo A o AB con madres que eran A o AB presentaban precursores del antígeno A en LM, planteando que estos podrían sufrir una transformación a nivel digestivo que los convertiría en los tetrasacáridos que se identificaron en heces (Sabharwal et al., 1991). Esta observación apoyaría que los antígenos de grupo sólo aparecerían en LM de madres y lactantes del mismo grupo.

De forma contraria a lo que cabría esperar, no se hallaron diferencias en la capacidad de inhibición de muestras de LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva según el genotipo FUT2 materno (*tabla 52*). La mayor capacidad protectora de la LM de madres FUT2+ frente a las infecciones por NoV, se ha estudiado desde diferentes perspectivas. Desde un punto de vista clínico se ha observado que la LM con un mayor contenido de oligosacáridos con uniones α 1,2 se relaciona con una menor incidencia de diarrea por calicivirus en los niños lactados al pecho respecto a los niños alimentados con fórmulas artificiales (Morrow et al., 2004). En dicho estudio se identificó un mayor contenido de lacto-N-difucohexosa en las muestras de LM, oligosacárido fucosilado que tiene como epítipo el antígeno Lewis b (de Rougemont et al., 2011). En relación con los estudios de laboratorio, en el estudio de Jiang se analizó la capacidad de unión de VLPs de NoV de 4 genotipos diferentes (VA387, Norwalk, VA207 y MOH) a receptores específicos y su

bloqueo por 60 muestras de LM de las que se conoce el grupo sanguíneo, el genotipo FUT2 y los antígenos Lewis. Todos los genotipos de NoV fueron capaces de unirse a saliva de individuo secretor y solamente VA207 (GII.9) fue capaz de unirse a saliva de no secretor. Asimismo, la LM procedente de madres secretoras y no secretoras mostró capacidad de bloqueo sobre la unión de las VLPs de VA207 a saliva, si bien sólo la LM procedente de madres secretoras interfirió en la unión del resto de genotipos a saliva (Jiang et al., 2004a).

El comportamiento observado en nuestro estudio de las VLPs de NoV GII.4 variante 2006b en los ensayos de unión a saliva, demostrando su capacidad de unión tanto a saliva de individuo secretor como de no secretor, podría asemejarse a lo descrito por Jiang para VA207, sugiriendo que estos genotipos se unen a HBGAs diferentes a los antígenos H tipo 1 y Le b en saliva, codificados por FUT2.

Es importante conocer esto pues la especificidad de unión de una variante de NoV a los HBGAs determina cuáles son las muestras de LM que pueden interferir con su unión a receptores y es necesaria una interacción molecular entre los componentes de la LM y los receptores HBGAs de saliva para competir por la unión al virus. Por este motivo tanto con las VLPs de NoV GII.4 variante 2006b como con VA207 se observa que las muestras de LM procedente de madres secretoras y no secretoras son capaces de bloquear su unión a saliva, lo que sugiere que los componentes de la LM responsables de dicha inhibición son independientes de los oligosacáridos fucosilados dependientes del gen FUT2 (el antígeno H tipo 1 y el antígeno Lewis b).

Para conocer con mayor detalle la posible intervención de los oligosacáridos fucosilados de la LM se analizó la correlación entre los Ag Le a/b y x/y y el porcentaje de inhibición de muestras de LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva. No se apreciaron diferencias significativas para ninguno de los grupos (*tabla 53*). El hecho de comparar el porcentaje de inhibición de las muestras de LM con su composición de Ag Lewis a/b y x/y podría requerir un mayor número de muestras de las analizadas puesto que las combinaciones posibles son 16 y esto dificulta el análisis estadístico. Además, analizar los antígenos Lewis de forma individual podría resultar incorrecto pues no contemplaría las interrelaciones entre ellos. Para superar esta limitación se realizó un análisis multivariante que proporcionó el mismo resultado.

Para confirmar la supuesta independencia de la capacidad de inhibición de las muestras de LM de su contenido de los antígenos Lewis fucosilados serían necesarios más estudios. Sería útil diseñar ensayos de bloqueo de la unión de VLPs de NoV GII.4 a salivas fenotipadas por medio de oligosacáridos sintéticos como se describe en Marionneau et al., 2002 y Huang et al., 2003. Con ello conoceríamos con exactitud los HBGAs responsables de dicho bloqueo y podríamos ampliar el estudio a muchos otros componentes de la LM.

Al relevante hallazgo de que el genotipo FUT2 materno no determina la mayor o menor capacidad de bloqueo de las muestras de LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva, se une el resultado de que el genotipo FUT2 de los individuos de los que proceden las muestras de saliva influye de manera determinante en la mayor o menor capacidad inhibitoria de la leche humana para todas las etapas de la secreción láctea (*tablas 57 y 58*).

Una vez comprobada la afinidad de las VLPs estudiadas por las tres muestras de saliva empleadas (que se unen más intensamente a saliva de no secretor que de secretor), la hipótesis planteada para explicar las diferencias observadas en los ensayos de bloqueo por muestras de LM según el tipo de saliva empleada se expone a continuación. La mayor capacidad de bloqueo de las muestras de LM sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva de no secretor podría deberse a la existencia en esta saliva de un receptor muy afín al NoV GII.4, a su vez presente en la LM de forma generalizada permitiendo así la propiedad observada. Por otra parte la saliva de individuo secretor podría tener un receptor diferente con menor afinidad por esta variante de NoV y por ello la unión sería menos intensa. Además, las muestras de LM no presentarían componentes con una analogía estructural suficiente para competir con los receptores en saliva de secretor y por ello tendrían una capacidad de inhibición menor. Hay que recordar que la inhibición frente a saliva de secretor es mayor en las muestras de calostro y menor en leche de transición y madura, tanto en intensidad como en número de muestras que bloquean, lo que sugiere que ese componente disminuye a medida que avanzan las diferentes etapas de la secreción láctea.

También analizamos la **IgA específica anti-NoV en leche** madura y, en caso de carecer de dicha muestra, en leche de transición mediante técnica de ELISA.

Si bien existen publicaciones acerca del contenido de IgA total en LM (Asensi et al., 2006), los resultados obtenidos en la identificación de IgA específica anti-NoV en LM son prácticamente inéditos. Constituye el segundo estudio realizado sobre la presencia de IgA anti-NoV en leche humana, según las búsquedas bibliográficas realizadas por nosotros en Pubmed, y el primero llevado a cabo en nuestro medio y con esta variante de NoV. En la publicación de Makita et al. (2007) se analizaron mediante ELISA 239 muestras de LM y se encontró IgA anti-NoV en un 13% de ellas. La mayoría de estas muestras contenían IgA anti-NoV frente a GII.6 y encontraron IgA anti-NoV frente a diferentes genotipos en una misma muestra de LM (Makita et al., 2007). En nuestro estudio analizamos 287 muestras de LM para identificar IgA-anti NoV exclusivamente de genotipo II.4 variante 2006b. Nosotros encontramos una prevalencia de IgA anti-NoV en LM más elevada, pues el 75% de las muestras analizadas contenían títulos superiores a 1/100 (*figura 38 y tabla 59*).

Con la finalidad de estudiar posibles factores condicionantes de la concentración de IgA

anti-NoV en LM estudiamos su correlación con diversas características de las madres, tales como la edad materna (*tabla 63*), el origen geográfico y la duración de la gestación (*tabla 61*). No hallamos diferencias en los títulos de IgA anti-NoV en LM en función de estas variables. Tampoco encontramos diferencias en el contenido de IgA anti-NoV en LM según el grupo sanguíneo y el genotipo FUT2 maternos (*tabla 61*) ni los antígenos Lewis detectados en LM (*tablas 61 y 62*).

El hecho de que sólo un 75% de las muestras de LM analizadas contuvieran IgA anti-NoV contrasta con la actividad inhibitoria observada en casi el 100% de las muestras de LM de leche de transición y madura en los ensayos frente a saliva de no secretor, sugiriendo que los anticuerpos anti-NoV en LM no son responsables por completo de esta propiedad. Además se compararon los títulos de IgA anti-NoV con el PI de la LM y no se encontró correlación entre ambos (*tablas 60 y 63*), lo que apoya esta teoría.

4. Análisis realizados en suero

El **porcentaje de inhibición de muestras de suero sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 variante 2006b a saliva** se calculó según los valores de absorbancia obtenidos en los ensayos de bloqueo realizados mediante técnica de ELISA. Se emplearon muestras de suero descomplementadas y se ensayaron sólo frente a saliva de no secretor.

Este es el primer estudio en el que se diseña un ensayo de bloqueo de la unión de VLPs de NoV a saliva empleando muestras de suero. Los resultados obtenidos mostraron que un 90,1% de las muestras presentaron actividad inhibitoria en la unión de VLPs de NoV GII.4 sobre saliva de no secretor (*tabla 64*).

Al analizar la concentración de **IgG específica anti-NoV en suero**, solamente identificamos títulos significativos en un 56,3% de las muestras (*figura 40 y tabla 65*). Además, no hallamos correlación entre el contenido de IgG anti-NoV en suero y el porcentaje de inhibición de dichas muestras sobre la unión de VLPs de NoV GII.4 a saliva (*tablas 66 y 69*), lo que también se observó en relación con los anticuerpos IgA anti-NoV en suero (*tabla 71*). Estos hallazgos sugieren que podrían existir otros componentes en el suero implicados en esta actividad.

La seroprevalencia de IgG anti-NoV en las mujeres estudiadas difiere de la descrita por Carmona et al. en un estudio de seroprevalencia de anticuerpos frente a NoV GII.4 en Valencia. En este trabajo un 99,5% de las muestras fueron positivas y se observó un incremento de los niveles de anticuerpos de forma gradual con la edad alcanzándose el máximo título de anticuerpos IgG anti-NoV en la década de 41-50 años (Carmona et al., 2011). Si bien este estudio presenta un aspecto diferencial que podría explicar la disparidad de nuestros resultados, ya que empleó como

antígenos el dominio P2 de VP1 de NoV GII.4-2008 expresado en *E.coli* como proteína recombinante. Este antígeno probablemente tenía algunos determinantes conservados en diferentes cepas del genotipo GII.4 lo que explicaría una reactividad cruzada frente a otras variantes y a seroprevalencia tan generalizada hallada.

De forma análoga a los estudios realizados con IgA anti-NoV en LM se investigó si existía alguna correlación entre la edad materna en el momento del parto (*tabla 69*), el origen geográfico de las madres y la duración de su gestación (*tabla 67*). El único hallazgo relevante fue la observación de diferencias en los títulos de IgG anti-NoV en sueros de mujeres españolas y de mujeres latinoamericanas, lo que hipotéticamente podría reflejar una diferente exposición al virus.

En relación al grupo sanguíneo y al genotipo FUT2 materno (*tabla 67*) y a los antígenos Lewis en LM (*tabla 68*) no se encontraron diferencias según el contenido de IgG anti-NoV en suero.

La cuantificación de **IgA anti-NoV en suero** se realizó mediante técnica de ELISA. Se identificó IgA anti-NoV en un 62% de las muestras de suero (*figura 41* y *tabla 70*).

No se encontraron diferencias en los títulos de IgA anti-NoV en suero en función del origen geográfico de las madres ni de la duración de la gestación (*tabla 72*). El grupo sanguíneo, el genotipo FUT2 y los antígenos Lewis tampoco explicaron el diferente contenido de IgA anti-NoV en suero (*tabla 72*).

Un hallazgo relevante fue la marcada correlación encontrada entre la concentración de IgA anti-NoV en LM y en suero (*tabla 63*), indicando que la concentración de IgA anti-NoV en suero probablemente determina la concentración de IgA anti-NoV en LM. A pesar de que sólo un 62% de las muestras de suero contenían IgA anti-NoV se hallaron títulos superiores a 1/100 en las muestras de LM analizadas, lo que sugiere que la IgA láctea no procede exclusivamente de la difundida pasivamente del suero y que deberán existir mecanismos adicionales que contribuyan a la concentración de IgA en LM. Resultados similares obtienen Asensi et al. al estudiar las concentraciones de IgA anti-rotavirus en LM y suero, exponiendo tres posibles explicaciones: a) el acúmulo de células secretoras de IgA en la glándula mamaria, b) un transporte activo local del suero a la LM favorecido por la ingurgitación mamaria, y c) un mecanismo de difusión facilitada por el componente secretor de la molécula de IgA (Asensi et al., 2006).

5. Conclusiones

La leche humana es un fluido enormemente complejo, aspecto que sustenta el hecho de que han sido necesarios dos siglos para lograr fórmulas que supongan una alternativa válida. No

obstante, sólo hemos logrado imitar su composición nutricional y ha sido imposible emular sus ventajas defensivas.

Nosotros hemos demostrado que la LM presenta una capacidad protectora frente a las infecciones por NoV GII.4, segunda causa de gastroenteritis en la infancia, observando esta propiedad en madres de distintas edades, de diferentes orígenes geográficos e incluso en caso de parto extremadamente pretérmino, durante todas las etapas de la lactancia.

Entre los agentes responsables de esta actividad se encuentra la IgA específica anti-NoV que identificamos en un 75% de las muestras de LM analizadas, si bien no se correlacionan con la capacidad protectora de la leche humana sugiriendo la intervención de otros factores.

El bloqueo de la unión de los NoV al receptor por los oligosacáridos de la LM es una hipótesis plausible que podría explicar esta propiedad. Nosotros no observamos diferencias en relación con los distintos grupos sanguíneos o con el genotipo secretor de las madres, si bien sí que existieron en función del genotipo secretor del receptor, representado en nuestro ensayo de inhibición del “binding” por la saliva. Respecto a la participación de los antígenos Lewis son necesarios más estudios para llegar a una conclusión definitiva.

Son también necesarios más estudios para conocer mejor el comportamiento de otras variantes de NoV GII.4 y de otros genotipos en relación a los grupos sanguíneos, al genotipo FUT2 materno y del receptor y a los antígenos Lewis. Recientemente se ha descubierto que los rotavirus reconocen antígenos histosanguíneos, HBGAs, (H tipo 1 y Le b) y se han identificado los oligosacáridos en la LM responsables de la interacción de las partículas víricas de rotavirus con el receptor (Huang et al., 2012).

Es también importante aclarar la participación de otros oligosacáridos (sialilados y sialil-fucosilados) y glicoconjugados de la LM (lactoferrina, κ -caseína, mucina, lactadherina...) en esta actividad.

La identificación de los componentes de la LM responsables de estas propiedades, permitiría la implementación de una nueva generación de agentes antimicrobianos con propiedades preventivas y terapéuticas frente a las infecciones intestinales que podrían beneficiar a lactantes alimentados con fórmula artificial o a niños que han finalizado el periodo de lactancia.



CONCLUSIONES

1. Las muestras de leche materna analizadas inhiben la unión de partículas pseudovíricas (VLPs) de norovirus de genotipo GII.4-2006b a saliva de individuo no secretor. Esta actividad se mantiene constante durante las tres etapas de la lactancia. Sin embargo, la inhibición es menos intensa sobre la unión de VLPs a saliva de individuo secretor y disminuye progresivamente a lo largo de la lactancia.
2. La inhibición de la unión de las partículas pseudovíricas de norovirus GII.4-2006b a saliva es independiente de la edad materna, el origen geográfico y la duración de la gestación.
3. Los grupos sanguíneos A, B y O maternos no influyen en la capacidad inhibitoria de la leche materna sobre la unión de VLPs de norovirus GII.4-2006b.
4. Las VLPs de norovirus GII.4-2006b son capaces de unirse a saliva de individuos no secretores, mostrando incluso mayor intensidad en esta interacción que con saliva de individuos secretores.
5. La inhibición de la unión de VLPs de norovirus GII.4-2006b a saliva es independiente del genotipo FUT2 de la madre y por tanto de los antígenos H tipo 1 y Le b. Serían necesarios más estudios para conocer la intervención de los antígenos Le a y Le x/y.
6. El 75% de las muestras de leche madura analizadas contienen títulos de $\geq 1/100$ de anticuerpos de IgA específicos anti-norovirus.
7. Las concentraciones de IgA anti-norovirus en leche materna se correlacionan directamente con los niveles de IgA en suero.
8. El porcentaje de inhibición de la leche materna sobre la unión de VLPs a saliva de individuo secretor y no secretor no se correlaciona con su concentración de IgA anti-norovirus.
9. Existen anticuerpos IgG e IgA frente a norovirus GII.4-2006b en el 56 y el 62% de las muestras de suero analizadas, respectivamente.
10. El porcentaje de inhibición de la leche materna sobre la unión de VLPs a saliva de individuo secretor y no secretor no se correlaciona con la concentración de anticuerpos séricos anti-NoV.



ANEXOS

1. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado “*Capacidad protectora de la leche materna frente a las infecciones por norovirus*” que está siendo dirigido por la Dra. Cecilia Martínez Costa, especialista en Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (Servicio de Pediatría), y el Dr. Javier Buesa Gómez, especialista en Microbiología (Servicio de Microbiología), y que ha sido evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

La leche materna es considerada el nutriente de referencia para el recién nacido y el lactante por todas las sociedades científicas pediátricas y se afirma que los niños lactados al pecho tienen una menor incidencia de enfermedades digestivas (enterocolitis necrosante en recién nacidos prematuros, infecciones por rotavirus...) y respiratorias (bronquiolitis...). Sin embargo, no han sido evaluadas las propiedades protectoras de la leche materna frente a las infecciones por norovirus (uno de los agentes principales de gastroenteritis agudas en la infancia).

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Su participación en este estudio permitirá ampliar los fundamentos científicos para la recomendación de la leche materna a todos los recién nacidos y lactantes. Asimismo, podremos valorar la importancia de su administración en aquellos con unas necesidades especiales, como son los recién nacidos prematuros.

¿En qué consiste su participación y qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se necesitará una muestra de leche materna de 5 ml en cada uno de sus estadios madurativos (calostro, transición y madura), para cuya recogida dispondrá de la ayuda del personal médico y/o sanitario del Servicio de Pediatría. Además, se empleará parte de la muestra de suero del cribado inmune realizado durante su embarazo para estudiar determinadas características de su grupo sanguíneo y sus anticuerpos frente a este agente infeccioso, en su defecto necesitaremos una muestra de saliva que obtendremos de una forma sencilla de la mucosa bucal.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

La participación en este estudio no conlleva la realización de ninguna prueba sobre su hijo ni ninguna prueba invasiva sobre usted, por lo que está carente de riesgos.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

La participación en estos estudios es importante porque permitirá conocer las características defensivas de la leche materna frente a estos virus gastrointestinales y las propiedades distintivas de la leche humana en caso de parto prematuro.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

La participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato ni el seguimiento que recibe su hijo del equipo médico ni del resto del personal sanitario. Asimismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación. Asimismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre todos los aspectos del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo, contactando con los investigadores del proyecto: Dra. Cecilia Martínez Costa y Dra. Parisá Khodayar Pardo en el teléfono 963987653.

Confidencialidad

Todos los datos, así como toda la información médica relacionada con usted o su hijo, serán tratados con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Asimismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación. Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Durante su participación en este estudio, se le obtendrán tres muestras de leche materna y se recuperará una muestra de suero o bien se le solicitará una muestra de saliva. Estas muestras serán siempre utilizadas con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza, en el marco de otros proyectos de investigación que tengan objetivos derivados de este y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital. Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

2. DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto

“Capacidad protectora de la leche materna frente a las infecciones por norovirus”

Investigador

Servicio de Pediatría y de Microbiología Hospital Clínico de Valencia

Yo, he sido informado por la Dra. Parisá Khodayar Pardo, investigadora del proyecto arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la hoja de información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Autorizo a que las muestras obtenidas durante el proyecto de investigación sean utilizadas con fines científicos en otros proyectos de investigación que tengan por objeto el estudio de mi enfermedad y que hayan sido aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia: Sí No

Quiero que se me pida autorización previa para utilizar mis muestras biológicas para futuros proyectos de investigación: Sí No

Con esto, doy mi conformidad para participar en este estudio.

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Fecha:



BIBLIOGRAFÍA

1. Adak, G. K., Meakins, S. M., Yip, H., Lopman, B. A., O'Brien, S. J. (2005). Diseases Risks from Foods, England and Wales, 1996-2000. *Emerg Infect Dis* **11** (3): 365-72.
2. Adderson, E. E., Johnston, J. M., Shackelford, P. G., Carroll, W. L. (1992). Development of the human antibody repertoire. *Pediatr Res* **32** (3): 257-63.
3. Adler, J., Zickl, R. (1969). Winter vomiting disease. *J Infect Dis* **119** (6): 668-73.
4. Aerde, J. E. (1991). Acute respiratory failure and bronchopulmonary dysplasia. En "Neonatal Nutrition and Metabolism". 1ª ed. (Hay, W. W., ed). Chicago, Mosby Year Book Inc.; 467-506.
5. Agostoni, C., Carratú, B., Boniglia, C., Riva, E., Sanzini, E. (2000). Free amino acid content in standard infant formulas: comparison with human milk. *J Am Coll Nutr* **19** (4): 434-8.
6. Agus, S. G., Dolin, R., Wyatt, R. G., Tousimis, A. J., Northrup, R. S. (1973). Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Hystologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Ann Intern Med* **79** (1): 18-25.
7. Ali, S. A., Hill, D. R. (2003). Giardia intestinalis. *Curr Opin Infect Dis* **16** (5): 453-60.
8. Alzina, V., Puig, M., de Echániz, L., Villa, I., da Cunha Ferreira, R. (1986). Prostaglandins in human milk. *Biol Neonate* **50** (4): 200-4.
9. Amano, J., Oshima, M. (1999). Expression of the H type 1 blood group antigen during enterocytic differentiation of Caco-2 cells. *J Biol Chem* **274** (21): 209-16.
10. Ambert-Balay, K., Bon, F., Le Guyader, F., Pothier, P., Kohli, E. (2005). Characterization of new recombinant noroviruses. *J Clin Microbiol* **43** (10): 5179-86.
11. Anasaka, M., Atmar, R., Ruvolo, V., Crawford, S. E., Neill, F. H., Estes, M. K. (2005). Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** (29): 10327-32.
12. Anderson, B. F., Baker, H. M., Dodson, E. J., Norris, G. E., Rumball, S. V., Waters, J. M., Baker, E. M. (1987). Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (7): 769-771.
13. Anderson, B. Porras, O., Hanson, L. A., Lagergard, T., Svanborg-Eden, C., (1986). Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J Infect Dis* **153** (2): 232-7.
14. Anderson, D. C., Abbasi, O., Kishimoto, T. K., Koenig, J. M., McIntire, L. V., Smith, C. W. (1991). Diminished lectin, epidermal growth factor, complement binding domain-cell adhesion molecule-1 on neonatal neutrophils underlies their impaired CD18-independent adhesion to endothelial cells *in vitro*. *J Immunol* **146** (10): 3372-9.

-
15. Ando, T., Monroe, S. S., Gentsch, J., Jin, Q., Lewis, D. C., Glass, R. I. (1995). Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and Southern hybridization. *J Clin Microbiol* **33** (1): 64-71.
 16. Ando, T., Noel, J. S., Fankhauser, R. L. (2000). Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *The J of Infect Dis* **181** (2): 336-48.
 17. Arboleya, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Gueimonde, M. (2011). Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast milk. *Int J Food Microbiol* **149** (1): 28-36.
 18. Armon, K., Stephenson, T., MacFaul, R., Eccleston, P., Werneke, U. (2001). An evidence and consensus based guideline for acute diarrhoea management. *Arch Dis Child* **85** (2): 132-42.
 19. Arnold, R. R., Bewer, M., Gauthier, J. J. (1977). A bactericidal effect of lactoferrin. *Science* **197** (4300): 263-5.
 20. Arvola, T., Ruuska, T., Keränen, J., Hyöty, H., Salminen, S., Isolauri, E. (2006). Rectal bleeding in infancy: Clinical, allergological, and microbiological examination. *Pediatrics* **117** (4): e760-8.
 21. Asensi, M. T., Martínez-Costa, C., Buesa, J. (2006) Anti-rotavirus antibodies in human milk: quantification and neutralization activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **42** (5): 560-7.
 22. Ashkenazi, S., Danzinger, Y., Varsano, Y., Peilan, J., Mimouni, M. (1987). Treatment of *Campylobacter* gastroenteritis. *Arch Dis Child* **62** (1): 84-5.
 23. Atmar, R. L., Estes, M. K. (2001). Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* **14** (1): 15-37.
 24. Atmar, R. L., Neil, F. H., Woodley, C. M., Manger, R., Fout, G. S., Burkhardt, W., Leja, L., McGovern, E. R., Le Guyader, F., Metclaf, T. G., Estes, M. K. (1996). Collaborative evaluation of a method for detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62** (1): 254-8.
 25. Atmar, R. L., Neill, F. H., Woodley, Romalde, J. L., Le Guyader, F., Woodley, C. M., Metclaf, T. G., Estes, M. K. (1995). Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol* **61** (8): 3014-8.
 26. Bagci, S., Eis-Hübinger, A. M., Yassin, A. F., Simon, A., Bartman, P., Franz, A. R., Mueller, A. (2010). Clinical characteristics of viral intestinal infection of preterm and term neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29** (9): 1079-84.
 27. Bahl, R. (2001). Effect of zinc supplementation on clinical course of acute diarrhea. Report of a Meeting, New Dehli, 7-8 May 2001. *J Health Pop Nutr* **19** (4): 338-46.
 28. Bailey, D., Karakasiliotis, I., Vashist, S., Chung, L. M., Reese, J., Mc Fadden, N., Benson, A., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Goodfellow, I. (2010). Functional analysis of RNA structures

-
- present at the 3' extremity of the murine norovirus genome: the variable polypyrimidine tract plays a role in viral influence. *J Virol* **84** (6): 2859-70.
29. Bailey, D., Thackray, L. B., Goodfellow, I. G. (2008). A single amino acid substitution in the murine norovirus capsid protein is sufficient for attenuation in vivo. *J Virol* **82** (15): 7725-8.
 30. Bakos, M. A., Kurosky, A., Goldblum, R. M. (1991). Characterization of a critical binding site for human polymeric Ig on secretory component. *J Immunol* **147** (10): 3419-26.
 31. Ball, J. M., Graham, D. Y., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Guerrero, R. A., Estes, M. K. (1999). Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology* **117** (1): 40-8.
 32. Ballow, M., Fang, F., Good, R. A., Day, N. K. (1974). Developmental aspects of complement components in the newborn. The presence of complement components and C3 proactivator (properdin factor B) in human colostrum. *Clin Exp Immunol* **18** (2): 257-66.
 33. Baqui, A. H., Black, R. E., Yunus, M., Hoque, A. R., Chowdury, H. R., Sack, R. B. (1991). Methodological issues in diarrhoeal diseases epidemiology: definition of diarrhoeal episodes. *Int J Epidemiol* **20** (4): 1057-63.
 34. Baqui, A. H., Sack, R. B., Black, R. E., Chowdury, H. R., Yunus, M., Siddique, A. K. (1993). Cell-mediated immune deficiency and malnutrition are independent risk factors for persistent diarrhea in Bangladesh children. *Am J Clin Nutr* **58** (4): 543-8.
 35. Barker, J., Vipond, I. B., Bloomfield, S. F. (2004). Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect* **58** (1): 42-9.
 36. Barness, L. A. (1994). Dietary sources of nucleotides- from breast milk to weaning. *J Nutr* **124** (1): 128-130.
 37. Baron, R. C., Greenberg, H. B., Cukor, G., Blacklow, N. R. (1984). Serological responses among teenagers after natural exposure to Norwalk virus. *J infect Dis* **150** (4): 531-4.
 38. Baron, S., Niesel, D., Singh, I. P., McKerlie, L., Poast, J., Chopra, A., Antonelli, G., Dianzani, F., Coppenhaver, D. H. (1989). Recently described innate broad spectrum virus inhibitors. *Microb Pathog* **7** (4): 237-47.
 39. Barry, H., Rockx, G., Vennema, H., Hoebe, C. J., Duizer, E., Koopmans, M. P. (2005). Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus Infections. *The J of Infect Dis* **191** (5): 749-54.
 40. Bass, D. M., Estes, M. K. (2004). Viral infections. En "Pediatric Gastrointestinal Disease". 4^a ed. (Walker, W. A., Goulet, O., Kleinman, R. E., Sherman, P. M., Schneider, B. L., Sanderson, I. R., eds). Hamilton, Ontario: BC Decker; 666-678.

-
41. Battacharaya, S. K., Battacharaya, M. K., Manna, B., Dutta, D., Deb, A., Dutta, P., Goswami, A. G., Dutta, A., Sarkar, S., Mukhopadaya, A. (1995). Risk factors for development of dehydration in young children with acute watery diarrhoea: a case control study. *Acta Paediatr* **84** (2): 160-4.
 42. Bauer, S. Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (16): 9237-42.
 43. Baum, S. G. (2005). Adenovirus. En "Principles and Practice of Infectious Diseases". 6^a ed. (Mandell, G. L., Bennet, J., Dollin, R., eds.). New York: Churchill Livingstone; 1835-40.
 44. Beagley, K. W., Fujihashi, K., Aicher, W., Xu, J., Kiyono, H., Eldridge, J. H., Bruce, M. G., Taquchi, T., Green, D. R., Singh, B. (1989). Mucosal homeostasis: role of interleukins, isotype-specific factors and contrasupression in the IgA response. *Immunol Invest* **18** (1-4): 77-89.
 45. Beards, G. M., Brown, W. G., Green, J., Flewett, T. H. (1986). An enveloped virus in stools of children and adults with gastroenteritis that resembles the Breda virus of calves. *J Med Virol* **20** (13): 67-78.
 46. Beisel, W. R. (1982). Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr* **35** (2): 417-68.
 47. Bellamy, W. (1993). Killing of *Candida Albicans* by lactoferrin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal región of bovine lactoferrin. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **182** (2): 97-105.
 48. Beller, M., Ellis, A., Lee, S. H., Drebot, M. A., Jenkerson, S. A., Funk, E., Sobsey, M. D., Simmons, O. D., Monroe, S. S., Ando, T., Noel, J., Petric, M., Middaugh, J. P., Spika, J. S. (1997). Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences. *JAMA* **278** (7): 563-8.
 49. Belliot, G., Noel, J. S., Li, J. F., Seto, Y., Humphrey, C. D., Ando, T., Glass, R. I., Monroe, S. S. (2001). Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of "Norwalk-like viruses". *J Clin Microbiol* **39** (12): 4288-95.
 50. Bengmark, S. (1998). Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* **42** (1): 2-7.
 51. Bennish, M. L., Khan, W. A., Begum, M., Bridges, E. A., Ahmed, S., Saha, D., Salam, M. A., Acheson, D., Ryan, E. T. (2006). Low risk of hemolytic-uremic syndrome after early effective antimicrobial therapy for *Shigella dysenteriae* type 1 infection in Bangladesh. *Clin Infect Dis* **42** (3): 356-62.
 52. Bennish, M. L., Salam, M. A., Haider, R., Barza, M. (1990). Therapy for Shigellosis. Randomised, double blind comparison of ciprofloxacin and ampicilin. *J Infect Dis* **162** (3): 711-6.

-
53. Berke, T, Golding, B., Jiang, X., Cubitt, D. W., Wolfaardt, M, Smith, A. W. Matson, D. O. (1997). Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. *J Med Virol* **52** (4): 419-24.
 54. Bern, C., Martines, J., de Zoysa, I., Glass, R. I. (1992). The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ* **70** (6): 705-14.
 55. Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M, Estes, M. K. (2003). The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* **77** (21): 11603-15.
 56. Bertolotti-Ciarlet, A., White, L. J., Chen, R., Venkataram Prasad, B. V., Estes, M. K. (2002). Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol* **76** (8): 4044-55.
 57. Bertotto, A. (1990). Human breast milk T cells display the phenotype and functional characteristics of memory T cells. *Eur J Immunol* **20** (8): 1877-80.
 58. Bezkorovainy, A., Grohlich, D., Nichols, J. H. (1979). Isolation of a glycopeptide fraction with *Lactobacillus bifidus* subspecies *Pennsylvanicus* growth-promoting activity from whole human milk casein. *Am J Clin Nutr* **32** (7): 1428-32.
 59. Bezkorovainy, A., Topuzian, N. (1981). *Bifidobacterium bifidus* var. *Pennsylvanicus* growth promoting activity of human milk casein and its derivatives. *Int J Biochem* **13** (5): 585-90.
 60. Bhan, M. K., Bhandari, N. (1998). The Role of Zinc and Vitamin A in Persistent Diarrhea among Infants and Young Children. *J of Ped Gastroenterol Nutr* **26** (4): 446-53.
 61. Bhandari, N., Bhan, M., Sazawal, S. (1992). Mortality associated with acute watery diarrhea, dysentery and protracted diarrhea in rural North India. *Acta Pediatr* **81** (381): 3-6.
 62. Bhandari, N., Sazawal, S., Clemens, J. D., Kashiap, D. K., Dhingra, U., Bhan, M. K. (1994). Association between diarrheal duration and nutritional status decline: implications for an empirically validated definition of persistent diarrhea. *Indian J Pediatr* **61** (5): 559-66.
 63. Bhutta, Z. A., Bird, S. M., Black, R. E., Brown, K. H., Gardner, J. M., Hidayat, A., Khatun, F., Martorell, R., Ninh, N. X., Penny, M. E., Rosado, J. L., Roy, S. K., Ruel, M., Sazawal, S., Shankar, A. (2000). Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhoea in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* **72** (6): 1516-22.
 64. Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., Ruck, B. J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral enteritis. *Lancet* **2** (7841): 1281-3.
 65. Black, R. (2008). Time to tackle undernutrition. *Lancet* **371** (9608): 197.
 66. Black, R. E., Greenberg, H. B., Kapikian, A. Z., Brown, K. H., Becker, S. (1982). Acquisition of serum antibody to Norwalk virus and rotavirus and relation to diarrhea in a longitudinal study of young children in rural Bangladesh. *J Infect Dis* **145** (4): 483-9.

-
67. Black, R. E., Sazawal, S. (2001). Zinc and childhood infectious disease morbidity and mortality. *Br J Nutr* **85** (2): 125-9.
68. Blacklow, N. R., Cukor, G. (1982). Norwalk virus: a major cause of epidemic gastroenteritis. *Am J Public Health* **72** (12): 1303-21.
69. Blacklow, N. R., Cukor, G., Bedigian, M. K., Echeverria, P., Greenberg, H. B., Schreiber, D. S., Trier, J. S. (1979). Immune response and prevalence of antibody to Norwalk enteritis virus as determined by radioimmunoassay. *J Clin Microbiol* **10** (6): 903-9.
70. Blacklow, N. R., Dolin, R., Fedson, D. S. (1972). Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. A combined clinical staff conference at the Clinical Center of The National Institutes of Health. *Ann Intern Med* **76** (6): 993-1008.
71. Blacklow, N. R., Hermann, J. E., Cubitt, W. D. (1987). Immunobiology of Norwalk virus. *Ciba Found Symp* **128**: 144-161.
72. Blanton, L. H., Adams, S. H., Beard, R. S., Wei, G., Bulens, S. N., Widdowson, M. A., Glass, R. I., Monroe, S. S. (2006). Epidemiologic and molecular trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J Infect Dis* **193** (3): 413-21.
73. Blau, H., Passwell, J. H., Levanon, M., Davidson, J., Kohen, F., Ramot, B. (1983). Studies on human milk macrophages: effect of activation on phagocytosis and secretion of prostaglandin E₂ and lysozyme. *Pediatr Res* **17** (4): 241-5.
74. Boat, T. F., Kleinerman, J. I., Faranoff, A. A., Stren, R. C. (1977). Human tracheobronchial secretions: Development of mucous glycoprotein and lysozyme-secreting systems. *Pediatr Res* **11** (9): 977-80.
75. Bocci, V., von Bremen, K., Corradeschi, F., Franchi, F., Luzzi, E., Paulesu, L. (1993). Presence of interferon-gamma and interleukin-6 in colostrums of normal women. *Lymphkine Cytokine Res* **12** (1): 21-4.
76. Bode, L., Kunz, C., Muhly-Reinholz, M., Mayer, K., Seeger, W., Rudloff, S. (2004a). Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thromb Haemost* **92** (6): 1402-10.
77. Bode, L., Rudloff, S., Kunz, C., Strobel, S., Klein, N. (2004b). Human milk oligosaccharides reduce platelet-neutrophil complex formation leading to a decrease in neutrophil beta 2 integrin expression. *J Leukoc Biol* **76** (4): 820-6.
78. Boga, J. A., Melon, S., Nicieza, Y., De Diego, I., Villar, M., Parra, F., De Oña, M. (2004). Etiology of sporadic cases of pediatric acute gastroenteritis in Asturias, Spain, genotyping and characterization of norovirus strains involved. *J Clin Microbiol* **42** (6): 2668-74.

-
79. Boniotti, B., Wirblich, C., Sibilía, M., Meyers, G., Thiel, H. J., Rossi, C. (1994). Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol* **68** (8): 6487-95.
80. Boot, H. J., Ter Huurne, A. A., Peeters, B. P., Gielkens, A. L. (1999). Efficient rescue of infectious bursal disease virus from cloned cDNA: evidence for involvement of the 3'-terminal sequence in genome replication. *Virology* **265** (2): 330-341.
81. Boran, P., Tokuc, G., Vagas, E., Oktem, S., Gokduman, M. K. (2006). Impact of zinc supplementation in children with acute diarrhea in Turkey. *Arch. Dis Child* **91** (4): 296-9.
82. Borges, A. M., Teixeira, J. M., and Costa, P. S., Giugliano, L. G., Fiaccadori, F. S., Franco, R., C., Brito, W. M., Leite, J. P., Cardoso, D. D. (2006). Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101** (7): 721-4.
83. Bosch A. (1998). Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol* **1** (3): 191-6.
84. Bosch, A., Pinto, R., Abad, F. X. (2006). Survival and transport in the environment. En "Viruses in Food". 1ª ed. (Goyal, S. M., ed.). New York: Springer; 151-87.
85. Boschi-Pinto, C., Velebit, L., Shibuya, K. (2008). Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ* **86** (9): 710-7.
86. Brand Miller, J., Mc Veagh, P. (1999). Human milk oligosaccharides: 130 reasons to breast feed. *Br J Nutr* **82** (5): 333-5.
87. Brandt, C.D., Kim, H. W., Rodriguez, W. J., Thomas, L., Yolken, R. H., Arrobio, J., Kapikian, A. Z., Parrott, R. H., Chanock, R. M. (1981). Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J Clin Microbiol* **13** (5): 976-81.
88. Brandtzaeg, P. (1978). Polymeric IgA is complexed with secretory component (SC) on the surface of human intestinal epithelial cells. *Scand J Immunol* **8** (1): 39-52.
89. Brantl, V. (1985). Novel opioid peptides derived from human-beta-casein: human-betacasmorphins. *Eur J Pharmacol* **106** (1): 213-4.
90. Breese, J. R., Widdowson, M. A., Monroe, S. S., Glass, R. I. (2002). Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities. *Clin Infect Dis* **35**: 748-53.
91. Brignon, G., Chtorou, A., Ribadeau-Dumas, B. (1985). Preparation and amino-acid sequence of human kappa-casein. *FEBS Lett* **188** (1): 48-54.
92. Brines, R. D., Brock, J. H. (1983). The effect of trypsin and chymotrypsin on the *in vitro* antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrum. *Biochem Biophys Acta* **759** (3): 229-35.

-
93. Brown, K. H. (1991). Dietary management of acute childhood diarrhea: optimal timing of feeding and appropriate use of milks and mixed diets. *J Pediatr* **118**: 92-98.
94. Brown, K. H. (1994a). Dietary management of acute diarrheal disease: contemporary scientific issues. *J Nutr* **124** (8): 1455-60.
95. Brown, K. H., Peerson, J. M., Fontaine, O. (1994b). Use of nonhuman milks in the dietary management of young children with acute diarrhea: a metaanalysis of clinical trials. *Pediatrics* **93** (1): 17-27.
96. Brown, M., Grydsuk, J. D., Fortsas, E., Petric, M. (1996). Structural features unique to enteric adenoviruses. *Arch Virol Suppl* **12**: 301-7.
97. Brown, W. R., Isobe, Y., Nakane, P. K. (1976). Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. II. Immunoelectron microscopic localization of immunoglobulins and secretory component in human intestinal mucosa. *Gastroenterology* **71** (6): 985-95.
98. Buesa, J., Collado, B., López-Andújar, P., Abu-Mallouh, R., Rodriguez-Diaz, J. (2002). Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol* **40** (8): 2854-9.
99. Buesa, J., Montava, R., Abu-Mallouh, R., Fos, M., Ribes, J. M., Bartolomé, R., Vanaclocha, H., Torner, N., Domínguez, A. (2008). Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. *J Med Virol* **80** (7): 1288-95.
100. Buescher, E. S. (1991). The effects of colostrums on neutrophil function: decreased deformability with increased cytoskeletal-associated actin. En "Immunology of Milk and Neonate". 1ª ed. (Mestecky, J., Blair, C., Ogra, P., eds.). New York: Plenum Press; 131-6.
101. Buescher, E. S., Pickering, L. K. (1986). Polymorphonuclear leukocytes in human colostrums and milk. En "Human infant nutrition and health". 1ª ed. (Howell, R., R., Morris, F. H. Jr., Pickering, L. K., eds.). Springfield, Charles C. Thomas; 160-73.
102. Buescher, S. E., McIlheran, S. M. (1992). Colostral antioxidants: separation and characterization of two activities in human colostrum. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **14** (1): 47-56.
103. Bullen, J. J., Rogers, H. J., Leigh, L. (1972). Iron-binding proteins in milk and resistance of *Escherichia coli* infection in infants. *Br Med J* **1** (5792): 69-75.
104. Burgio, G. R., ed. (1987). En "Immunology of the Neonate". 1ª ed. Vienna: Springer; 188.
105. Butte, N. F., Goldblum, R. M., Fehl, L. M., Loftin, K., Smith, E. O., Garza, C., Goldman, A. S. (1984). Daily ingestion of immunologic components in human milk during the first four months of life. *Acta Paediatr Scand* **73** (3): 296-301.

-
106. Cairo, M. S., Suen, Y., Knoppel, E., Dana, R., Park, L., Clark, S., van de Ven, C., Sender, L. (1992). Decreased G-CSF and IL-3 production and gene expression from mononuclear cells of newborn infants. *Pediatr Res* **31** (6): 574-8.
107. Cairo, M. S., Suen, Y., Knoppel, E., van de Ven, C., Nguyen, A., Sender, L. (1991). Decreased stimulated GM-CSF expression and GM-CSF gene expression but normal numbers of GM-CSF receptors in human term newborns as compared with adults. *Pediatr Res* **30** (4): 362-7.
108. Cannon, R. O., Poliner, J. R., Hirschhorn, R.B., Rodeheaver, D. C., Silverman, P. R., Brown, E. A., Talbot, G. H., Stine, S. E., Monroe, S. S., Dennis, D. T. (1991). A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. *J Infect Dis* **164** (5): 860-3.
109. Cao, S., Lou, Z., Tan, M., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Zhang, X. C., Jiang, X., Li, X., Rao, Z. (2007). Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* **81** (11): 5949-57.
110. Caplan, M. S., Hsueh, W., Kelly, A., Donovan, M. (1990). Serum PAF acetylhydrolase increases during neonatal maturation. *Prostaglandins* **39** (6): 705-14.
111. Caplan, M. S., Kelly, A., Hsueh, W. (1992). Endotoxin and hypoxia-induced intestinal necrosis in rats: the role of platelet activating factor. *Pediatr Res* **31** (5): 428-34.
112. Caprioli, A., Pezzella, C., Morelli, R., Giammanco, A., Arista, S., Crotti, D., Facchini, M., Guglielmetti, P., Piersimoni, C., Luzzi, I. (1996). Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. The Italian Study Group on Gastrointestinal Infections. *Pediatr Infect Dis J* **15** (10): 876-83.
113. Carlsson, B., Kindberg, E., Buesa, J., Rydell, G. E., Lidon, M. F., Montava, R., Abu Mallouh, R., Grahn, A., Rodríguez-Díaz, J., Bellido, J., Arnedo, A., Larson, G., Svensson, L., . (2009). The G428A nonsense mutation in FUT 2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 Norovirus infection. *PLoS ONE* **4** (5): 5593e.
114. Carmona Vicente, N., Fernández Jiménez, M., Rodríguez Díaz, J., Buesa Gómez, J. (2011). Identificación del epítipo reconocido por un anticuerpo monoclonal frente a norovirus GII.4. Comunicación CP/223 al XI Congreso Nacional de Virología, Granada 29/V-1/VI/2011. *Virología* **14** (1): 289-90.
115. Carmona Vicente, N., Fernández-Jiménez, M., Ribes Fernández, J. M., Téllez castillo, C. J., Buesa Gómez, J. (2011). Seroprevalencia de anticuerpos frente a norovirus GII.4 en Valencia. *Virología* **14** (1): 293.
116. Carpenter, G. (1980). Epidermal growth factor is a major growth-promoting agent in human milk. *Science* **210** (4466): 198-9.
117. Carter, M. J., Milton, I. D., Meanger, J., Bennett, M., Gaskell, R. M., Turner, R. C. (1992). The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology* **190** (1): 443-8.

-
118. Carver, J. D., Cox, W. I., Barness, L. A. (1990). Dietary nucleotide effects upon murine natural killer cell activity and macrophage activation. *J Parenteral Enteral Nutr* **14** (1): 18-22.
119. Casais, R., Thiel, V., Siddell, S. G., Cavanagh, D., Britton, P. (2001). Reverse genetic system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* **75** (24): 12359-69.
120. Cash, R. A., Forrest, J. N., Nalin, D. R., Abrutyn, E. (1970). Rapid correction of acidosis and dehydration of cholera with oral electrolyte and glucose solution. *Lancet* **2** (7672): 549-50.
121. Caul, E. O. (1994). Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* **343** (8908): 1240-42.
122. Caul, E. O., Appleton, H. (1982). The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol* **9** (4): 257-265.
123. Caul, E. O., Ashley, C., Pether, J. V. (1979). Norwalk-like particles in the epidemic gastroenteritis in the UK. *Lancet* **2** (8155): 1292.
124. Centers for Disease Control and Prevention and National Center for Health Statistics. National Nursing Home Survey. (1999). Selected years (1973-1999). Disponible en URL: <<http://www.cdc.gov/nchs/data/nhhd>>. [Acceso 1 julio, 2010]
125. Centers for Disease Control and Prevention. Multisite outbreak of norovirus associated with a franchise restaurant-Kent County, Michigan, May 2005. (2006). *Morb Mort Weekley Rep* **55** (14): 395-7.
126. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus outbreak among evacuees from hurricane Katrina-Houston, Texas, September 2005. (2005). *Morb Mort Weekley Rep* **54** (40): 1016-8.
127. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of acute gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses among British military personnel. Afghanistan, May 2002. (2002). *Morb Mort Weekley Rep* **51** (22): 477-9.
128. Chachu, K. A., LoBue, A. D., Strong, D. W., Baric, R. S., Virgin, H. W. (2008). Immune mechanisms responsible for vaccination against and clearance of mucosal and lymphatic norovirus infection. *PLoS Pathog* **4** (12): 1000236e.
129. Chadry, Y., Skinner, M. A., Goodfellow, I. G. (2007). Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. *J of Gen Virol* **88** (Pt 8): 2091-100.
130. Chadwick, P. R., Beards, G., Brown, D., Caul, E. O., Cheesbrough, J., Clarke, I., Curry, A., O'Brien, S., Quigley, K., Sellwood, J., Westmoreland, D. (2000). Management of hospital outbreaks of gastroenteritis due to small round, structured viruses. *J Hosp Infect* **45** (1): 1-10.

-
131. Chadwick, P. R., McCann R. (1994). Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Hosp Infect* **26** (3): 251-59.
132. Chakravarty, S., Hutson, A. M., Estes, M. K., Prasad, B. V. (2005). Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *J Virol* **79** (1): 554-68.
133. Chandan, R. C., Shahani, K. M., Holly, R. (1964). Lysozyme content of human milk. *Nature* **204**: 76.
134. Chang, K. O., Kim, Y., Green, K. Y., Saif, L. J. (2002). Cell-culture propagation of porcine enteric calicivirus mediated by intestinal contents is dependent on the cyclic AMP signaling pathway. *Virology* **304** (2): 302-10.
135. Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Kim, Y., Saif, L. J., Green, K. Y. (2004). Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** (23): 8733-38.
136. Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Kim, Y., Saif, L. J., Green, K. Y. (2005). Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus, a prototype sapovirus in the Caliciviridae. *J Virol* **79** (3): 1409-16.
137. Chapel, J. E., Clandinin, M. T., Barbe, G. J., Armstrong, D. T. (1983). Prostanoid content of human milk: relationships to milk fatty acid content. *Endocrinol Exp* **17** (3-4): 351-8.
138. Chapell, J. E., Francis, T., Clandinin, M. T. (1985). Vitamin A and E content of human milk at early stages of lactation. *Early Hum Dev* **11** (2): 157-67.
139. Chaturvedi, P., Warren, C. D., Altaye, M., Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G., Pickering, L. K., Newburg, D. S. (2001a). Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiol* **11** (5): 365-72.
140. Chaturvedi, P., Warren, C. D., Buescher, C. R., Pickering, L. K., Newburg, D. S. (2001b). Survival of human milk oligosaccharides in the intestine of infants. *Adv Exp Med Biol* **501**: 513-23.
141. Chaudry, Y., Skinner, M. A., Goodfellow, I. G. (2007). Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. *J Gen Virol* **88** (8): 2091-100.
142. Cheda, S., Palkowetz, K. H., Rassin, D. K., Goldman, A. S. (1996). Deficient quantitative expression of CD45 isoforms on CD4⁺ and CD8⁺ T cells subpopulations and subsets of CD45RA (low) CD45RO (low) T cells in newborn blood. *Biol Neonate* **69** (2): 128-32.
143. Cheesbrough, J. S., Green, Y., Gallimore, C. I., Wright, P. A., Brown, D. W. (2000). Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiol Infect* **125** (1): 93-8.

-
144. Cheetham, S., Souza, M., Meulia, T., Grimes, S., Han, M. G., Saif, L. J. (2006). Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J of Virol* **80** (21): 10372-81.
145. Chen, R., Neil, J. D., Noel, J. S., Hutson, A. M., Glass, R. I., Estes, M. K., Prasad, B. V. (2004). Inter and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol* **78** (12): 6469-79.
146. Chen, S. Y., Tsai, C. N., Lai, M. W., Chen, C. Y., Lin, K. L., Lin, T. Y., Chiu, C. H. (2009). Norovirus infection as a cause of diarrhea-associated benign infantile seizures. *Clin Infect Dis* **48** (7): 849-55.
147. Chew, F., Penna, F. J., Perte-Filho, L. A., Quan, C., Lopes, M. C., Mota, J. A. (1993). Is dilution of cow's milk formula necessary for dietary management of acute diarrhoea in infants aged less than 6 months? *Lancet* **341** (8839): 194-7.
148. Cheeda, S., Keeney, S. E., Goldman, A. S. (1998). Immunology of human milk and host immunity. En: "Fetal and Neonatal Physiology". 2^a ed. (Polin, R. A., Fox, W. W., eds.). Philadelphia, Saunders Company: 2022-32.
149. Chiba, Y., Minagawa, T., Mito, K. (1987). Effect of breast feeding on responses of systemic interferon and virus-specific lymphocyte transformation in infants with respiratory syncytial virus infection. *J Med Virol* **21** (1): 7-14.
150. Chipman, D. M., Sharon, N. (1969). Mechanism of lysozyme action. *Science* **165** (3982): 454-65.
151. Christ, M., McCartney-Francis, N. L., Kulkarni, A. B., Ward, J. M., Mizel, D. E., Mackall, C. L., Gress, R. E., Hines, K. L., Tian, H., Karlsson, S. (1994). Immune dysregulation in TGF-beta1-deficient mice. *J Immunol* **153** (5): 1936-46.
152. Chu, S. W., Walker, W. A. (1986). Developmental changes in the activities of sialyl- and fucosyltransferases in the rat intestine. *Biochem Biophys Acta* **883** (3): 496-500.
153. Chung, L. A.W., Viscorova, B. (1948). The effect of oral feeding versus early oral starvation on the course of infantile diarrhea. *J Pediatr* **33** (1): 14-22.
154. Clausen, H., Levery, S. B., Kannagi, R., Hakomori, S. (1986a). Novel blood group H glycolipid antigens exclusively expressed in group A and AB erythrocytes (type 3 chain H). Isolation and chemical characterization. *J Biol Chem* **261** (3): 1380-87.
155. Clausen, H., Levery, S.B., Kannagi, R., Hakomori, S. (1986b). Novel blood group H glycolipid antigens exclusively expressed in blood group A and AB erythrocytes (type 3 chain H). Differential conversion of different H substrates by A 1 and A 2 enzymes, and type 3 chain H expression in relation to secretor status. *J Biol Chem* **261** (3): 1388-92.
156. Cleary, T. G., Chambers, J. P., Pickering, L. K. (1983). Protection of suckling mice from the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* by human milk. *J Infect Dis* **148** (1983): 1114-1119.

-
157. Clemens, J. B., Stanton, B., Stoll, B., Shahid, N. S., Banu, H., Chowdury, A. K. (1986). Breast-feeding as a determinant of severity in shigellosis: evidence for protection throughout the first three years of life in Bangladeshi children. *Am J Epidemiol* **123** (4): 710-20.
158. Cliver, D. O., Matsui, S. M., Casteel, M. (2006). Infections with viruses and prions. En "Foodborne infections and intoxications". 3^a ed. (Rienmann, H. P., Cliver, D. O., eds). Amsterdam: Elsevier; 367-448.
159. Cohen, J., West, A., Bini, E. J. (2001). Infectious diarrhea in human immunodeficiency virus. *Gastroenterol Clin North Am* **30** (3): 637-64.
160. Coppa, G. V., Gabrielli, O., Giorgi, P., Catassi, C., Montanari, M., Varaldo PE, Nichols BL. (1990). Preliminary study of breast feeding and bacterial adhesion to uroepithelial cells. *Lancet* **335** (8689): 569-71.
161. Coppa, G. V., Gabrielli, O., Pierani, P., Catassi, C., Carlucci, A., Giorgi, P. L. (1993). Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics* **91** (3): 637-41.
162. Coppa, G. V., Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A., Gabrielli, O. (1999). Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr Suppl* **88** (430): 89-94.
163. Coulson, B., and Masendycz, P. J. (1990). Measurement of rotavirus-neutralizing copronatibody in children by fluorescent focus reduction assay. *J of Clin Microbiol* **28** (7): 1652-54.
164. Cowden, J. M. (2002). Foodborne infectious risks: do we need a wide system of data collection and survey? The lessons learned from the study of infectious intestinal disease in England. *Rev Epidemiol Sante Publique* **50** (1): 89-92.
165. Crago, S. S., Kulhavy, R., Prince, S. J., Mestecky, J. (1978). Secretory component on epithelial cells is a surface receptor for polymeric immunoglobulins. *J Exp Med* **147** (6): 1832-7.
166. Crago, S. S., Prince, S. J., Pretlow, T. G., McGhee, J. R., Mestecky, J. (1979). Human colostral cells. I. Separation and characterization. *Clin Exp Immunol* **38** (3): 585-97.
167. Craig, W., Osterholm, H., Osterholm, M. T. (1993). Outbreaks of Food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev* **6** (3): 199-210.
168. Cravioto, A., Tello, A., Villafan, H., Ruiz, J., del Vedovo, S., Neeser, J. R. (1991). Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to Hep-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis* **163** (6): 1247-55
169. Crocker, P. R. (2002). Siglecs: acid sialic-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signaling. *Cur Opin Struct Biol* **12** (5): 609-15.
170. Cubitt, W. D., Jiang, X. J., Wang, J., Estes, M. K. (1994). Sequence similarity of human caliciviruses and small round structured viruses. *J Med Virol* **43** (3): 252-8.

-
171. Cubitt, W. D., McSwiggam, D. A., Moore, W. (1979). Winter vomiting disease caused by caliciviruses. *J Clin Pathol* **32** (8): 786-93.
172. Cukor, G., Blacklow, N. R. (1984). Human viral gastroenteritis. *Microbiol Rev* **48** (2): 157-79.
173. Cukor, G., Nowak, N. A., Blacklow, N. R. (1982). Immunoglobulin M responses to the Norwalk virus of gastroenteritis. *Infect Immun* **37** (2): 463-8.
174. Curry, A., Riordan, T., Craske, J., Caul, E. O. (1987). Small round structured viruses and persistence of infectivity in food handlers. *Lancet* **2** (8563): 864-5.
175. D'Andamo, P. J., Kelly, G. C. (2001). Metabolic and immunologic consequences of ABH secretor and Lewis subtype status. *Altern Med Rev* **6** (4): 390-405.
176. Dai, Y. C., Nie, J., Zhang, X. F., Li, Z. F., Bai, Y., Zeng, Z. R., Yu, S. Y., Farkas, T., Jiang, X.. (2004). Seroprevalence of antibodies against noroviruses among students in a Chinese military medical university. *J Clin Microbiol* **42** (10): 4615-9.
177. Dalton, R. M., Roman, E. R., Negrodo, A. A., Wilhelmi, I. D., Glass, R. I., Sanchez-Fauquier, A. (2002). Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. *Pediatr Infect Dis J* **21** (11): 1038-41.
178. Das, S. C., Baron, M. D., Skinner, M. A., Barrett, T. (2000). Improved technique for transient expression and negative strand virus rescue using fowlpox T7 recombinant virus in mammalian cells. *J Virol Methods* **89** (1-2): 119-27.
179. Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W. (2003). The genome linked protein VPg of the Norwalk virus binds IF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* **22**: 2852-59.
180. Davidson, G., Barnes, G., Bass, D., Cohen, M., Fasano, A., Fontaine, O., Guandalini, S. (2002). Infectious diarrhea in children: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **35** (2): 143-50.
181. Davidson, L. A., Lönnerdal, B. (1987). The persistence of human milk proteins in the breast-fed infant. *Acta Paediatr Scand* **76** (5): 733-40.
182. Davis, M. K., Savitz, D. A., Graubard, B. I. (1988). Infant feeding in childhood cancer. *Lancet* **2** (8607): 365-8.
183. De Leon, R., Matsui, S. M., Baric, R. S., Herrman, J. E., Blacklow, N. R., Greenberg, H. B., Sobsey, M. D. (1992). Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse-transcriptase-polymerase chain reaction and nonreactive oligoprobes. *J Clin Microbiol* **30** (12): 3151-7.
184. de Rougemont, A., Ruvoen-Clouet, N., Simon, B., Estienney, M., Elie-Callie, C., Aho, S., Pothier, P., Le Pendu, J., Boireu, W., Belliot, G. (2011). Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J Virol* **85** (9): 4057-70.

-
185. De Wit, M. A., Koopmans, M. P., Kortbeek, L. M., van Leeuwen, N. J., Vinjé, J., van Duynhoven, Y. T. (2001a). Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in the Netherlands. *Clin Infect Dis* **33** (3): 280-8.
186. De Wit, M. A., Koopmans, M. P., Kortbeek, L. M., Wannet, W. J., Vinjé, J., van Leusden, F., Bartelds, A. I., van Duynhoven, Y. T. (2001b). Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* **154** (7): 666-74.
187. Dennehy, P. H., Nelson, S. M., Spangenberg, S., Noel, J. S., Monroe, S. S., Glass, I. R. (2001). A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized young children. *J Infect Dis* **184** (1): 10-5.
188. Desjeux, J. F., Briend, A., Butzner, J. D. (1997). Oral rehydration solution in the year 2000: pathophysiology, efficacy and effectiveness. *Baillieres Clin Gastroenterol* **11** (3): 509-27.
189. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303** (5663): 1529-31.
190. Doane, F. W. (1994). Electron microscopy for the detection of gastroenteritis viruses. En "Viral infections of the gastrointestinal tract". 2nd ed. (Kapikian, A. Z., ed.). New York: Marcel Dekker, Inc.; 101-130.
191. Dohlsten, M., Sjögren, H. O., Carlsson, R. (1988). Two subsets of CD4+ T helper cells differing in kinetics and capacities to produce interleukin 2 and interferon-gamma can be defined by the Leu-18 and UCHL1 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* **18** (8): 1173.
192. Dolin, R., Blacklow, N. R., Du Pont, H., Buscho, R. F., Wyatt, R. G., Kasel, J. A., Hornick, R., Chanock, R. M. (1972). Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* **140** (2): 578-83.
193. Dolin, R., Blacklow, N. R., Du Pont, H., Formal, S., Bushcko, R. F., Kasel, J. A., Chames, R. P., Hornick, R., Chanock, R. M. (1971). Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* **123** (3): 307-12.
194. Dolin, R., Reichman, R. C., Roessner, K. D., Tralka, T. S., Schooley, R. T., Gary, W., Morens, D. (1982). Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* **146** (2): 184-9.
195. Dolin, R., Roessner, K. D., Treanor, J. J., Reichman, R. C., Phillips, M., Madore, H. P. (1986). Radioimmunoassay for the detection of the Snow Mountain agent of viral gastroenteritis. *J Med Virol* **19** (1): 11-18.
196. Dominguez, A., Torner, N., Ruiz, L., Martinez, A., Barrabeig, I., Camps, N., Godoy, P., Minguell, S., Parrón, I., Pumarés, A., Sala, M. R., Bartolomé, R., Pérez, U., de Simón, M.,

-
- Montava, R., Buesa, J. (2008). Aetiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004-2005. *J Clin Virol* **43** (1): 126-31.
197. Donaldson, E. F., Lindesmith, L. C., Lobue, A. D., Baric, R. S. (2008). Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* **225** (1): 190-211.
198. Donné, A. (1837). Du Lait en particulier de nourrices, considéré sous le rapport de ses bonnes et de ses mauvaises qualités nutritives et de ses altérations. Paris, Rue de Condé, N° 15; Les Libraires de Médecine, Ch. Chevalier, opticien, Palais Royal, N° 163.
199. Dormitzer, P. R. (2005). Rotavirus. En "Principles and Practice of Infectious Diseases". 6th ed. (Mandell, G. L., Bennet, J. E., Dolin, R., eds.). Philadelphia: Elsevier; 1902-13.
200. Downham, M. A., Scott, R., Sims, D. G., Webb, J. K., Gradner, P. S. (1976). Breast-feeding protects against respiratory syncytial virus infections. *Br Med J* **2** (6030): 274-6.
201. Doyle, A., Barataud, D., Gallay, A., Thillet, J. M., Le Guyaquer, S., Kohli, E., Vaillant, V. (2004). Norovirus foodborne outbreaks associated with the consumption of oysters from the Etang de Thau, France. December 2002. *Euro Surveill* **9** (3): 24-6.
202. Duffy, L. C., Riepenhoff-Talty, M., Byers, T. E., La Scolea, L. J., Zielesny, M. A., Dryja, D. M., Ogra, P. L. (1986). Modulation of rotavirus enteritis during breast-feeding. *Am J Dis Child* **140** (11): 1164-8.
203. Dugdale, A., Lovell, S., Gibbs, V., Ball, D. (1982). Refeeding after acute gastroenteritis: a controlled study. *Arch Dis Child* **57** (1): 76-79.
204. Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., de Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M. (2004a). Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* **70** (8): 4538-43.
205. Duizer, E., Schab, K. J., Neil, F. H., Atmar, R. L., Koopmans, M. P., Estes, M. K. (2004b). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* **85** (1): 79-87.
206. Duncan, B. S., Wood, J. (1997). The Evaluation of delayed-type hypersensitivity responsiveness and nutritional status as predictors of gastro-intestinal and acute respiratory infection: a prospective field study among traditional nomadic Kenyan children. *Journal of Tropical Pediatrics* **43** (1): 25-32.
207. Dunham, D. M., Jiang, X., Berke, T., Smith, A. W., Matson, D. O. (1998). Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch Virol* **143** (12): 2421-2430.
208. DuPont, H. L. (1997). Lactobacillus GG in prevention of traveler's diarrhoea encouraging first step. *J Travel Med* **4** (1): 1-2.
209. Egge, H. (1993). The diversity of oligosaccharides in human milk. Renner, B., Sawatzki, G. (eds). En "New perspectives in infant nutrition". 1st ed. Stuttgart: Georg Thieme; 12-26.

-
210. Eibl, M. M., Wolf, H. M., Fürkranz, H., Rosenkranz, A. (1988). Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by IgG-IgA feeding. *N Engl J Med* **319** (1): 1-7.
211. Elliot, E. J., Cunha-Ferreira, R., Walker-Smith, J. A., Farthing, M. J. (1989). Sodium concentration of oral rehydration solutions: a reappraisal. *Gut* **30** (11): 1610-21.
212. Enab, B., Mogilner, J., Jaffe, M., Shaoul, R. (2002). Acute appendicitis presenting as secretory diarrhea. *J Pediatr Surg* **37** (6): 928-9.
213. Engelstaedter, V., Fluegel, B., Kunze, S., Mayr, D., Friese, K., Jeschke, U., Bergauer, F. (2012). Expression of the carbohydrate tumour marker Sialyl Lewis A, Sialyl Lewis X, Lewis Y and Thomsen-Friedenreich antigen in normal squamous epithelium of the uterine cervix, cervical dysplasia and cervical cancer. *Histol Histopathol* **27** (4): 507-14.
214. Engfer, M. B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., Daniel, H. (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* **71** (6): 1589-96.
215. Enserik, M. (2006). Infectious diseases. Gastrointestinal virus strikes European cruise ships. *Science* **313** (5788): 747.
216. Erle, D. J., Briskin, M. J., Butcher, E. C., Garcia-Pardo, A., Lazarovits, A. I., Tidswell, M. (1994). Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4beta 7, on human leukocytes. *J Immunol* **153** (2): 517-28.
217. Erney, R. M., Malone, W. T., Skelding, M. B., Marcon, A. A., Kleman-Leyer, K. M., O'Ryan, M. L., Ruiz-Palacios, G., Hilty, M. D. (2000). Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30** (2): 181-92.
218. Espul, C., Martinez, N., Noel, J. S. (2004). Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J Med Virol* **72** (1): 75-82.
219. Estes, M. K., Ball, J. M., Guerrero, R. A., Cuello, H., Abrile, C., Grucci, S., Glass, R., Berke, T., Matson, D. O. (2000). Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* **181** (2): 367-73.
220. Evans, M. R., Meldrum, R., Lane, W., Gardner, D., Ribeiro, C. D., Galimore, C. I., Westmoreland, D. (2002). An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall. *Epidemiol Infect* **129** (2): 355-60.
221. Faden, H., Ogr, P. L. (1981). Breast milk as an immunologic vehicle for transport of immunocompetence. En "Textbook of Gastroenterology and Nutrition in infancy". 1^a ed. (Lebenthal, E., ed.). New York, Raven Press; 355-61.
222. Fankhauser, R. L., Monroe, S. S., Noel, J. S., Humphrey, C. D., Bresee, J.S., Parashar, U. D., Ando, T., Glass, R. I. (2002). Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* **186** (1): 1-7.

-
223. Farkas, T., Jiang, X. I. (2007). Rotaviruses, caliciviruses, astroviruses, enteric adenoviruses, and other diarrheic viruses. En "Manual of Clinical Microbiology". 9ª ed. (Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Pfaller, M. A., eds.). Washington: ASM Press; 999-1004.
224. Farkas, T., Nakajima, S., Sugieda, M., Deng, X., Zhong, W., Jiang, X. (2005). Seroprevalence of Norovirus in Swine. *J Clin Microbiol* **43** (2): 657-61.
225. Farkas, T., Thornton, S. A., Wilton, N., Zhong, W., Altaye, M., Jiang, X. (2003). Homologous versus heterologous immune responses to Norwalk-like viruses among crew members after acute gastroenteritis outbreaks on 2 US navy vessels. *J Infect Dis* **187** (2): 187-93.
226. Farthing, M. J. (1999). Enkephalinase inhibition: a rational approach to antisecretory therapy for acute diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* **13** (6): 1-2.
227. Fauveau, V., Yunus, M., Zaman, K., Chakraborty, J., Sarder, A. M. (1991). Diarrhea mortality in rural Bangladeshi children. *J Trop Pediatr* **37** (1): 31-6.
228. Federación Nacional de donantes de sangre. Disponible en URL: <www.donantes.net>. [Acceso 30 marzo, 2012].
229. Ferrer-Admetlla, A., Sikora, M., Laayouni, H., Esteve, A., Roubinet, F., Blancher, A., Calafell, F., Bertranpetit, J., Casals, F. (2009). A natural history of FUT2 polymorphism in humans. *Mol Biol Evol* **26** (9): 1993-2003.
230. Field, M., Rao, M. C., Chang, E. B. (1989). Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease. *N Engl J Med* **321** (13): 879-83.
231. Fishaut, M., Murphy, D., Neifert, M., McIntosh, K., Ogra, P. L. (1981). Broncho-mammary axis in the immune response to respiratory syncytial virus. *J Pediatr* **99** (2): 186-91.
232. Flewett, T. H., Davies, H. (1976). Caliciviruses in man. *Lancet* **1** (7954): 311.
233. Flynn, W. T., Saif, L. J. (1988a). Serial propagation of porcine enteric calicivirus-like virus in primary porcine kidney cell cultures. *J Clin Microbiol* **26** (2): 206-12.
234. Flynn, W. T., Saif, L. J., Moorhead, P. D. (1988b). Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* **49** (6): 819-25.
235. Fomon, S. J., ed. (1995). Leche humana y lactancia materna. En "Nutrición del Lactante". 1ª ed. Mosby, Madrid; 400-414.
236. Forsberg, B. C., Petzold, M.G., Tomson, G., Allebeck, P. (2007). Diarrhoea case management in low- and middle-income countries: an unfinished agenda. *Bull World Health Organisation* **85** (1): 42-8.
237. Forthal, D. N., Landucci, G. (1998). In vitro reduction of virus infectivity by antibody-dependent cell-mediated immunity. *J Immunol Meth* **220**: 129-38.

-
238. Forthal, D. N., Landucci, G., Daar, E. S. (2001). Antibody from patients with acute human immunodeficiency virus (HIV) infection inhibits primary strains of HIV type 1 in the presence of natural-killer effector cells. *J Virol* **75** (15): 6953-61.
239. Fransson, G. B., Lonnerdal, B. (1980). Iron in human milk. *J Pediatr* **96** (1980): 380.
240. Fretz, R., Svoboda, P., Schorr, D., Tanner, M., Baumgartner, A. (2005). Risk factors for infections with Norovirus gastrointestinal illness in Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24** (4): 256-61.
241. Friss, H. E., Rubin, L. G., Carsons, S., Baranowski, J., Lipsitz, P. J. (1988). Plasma fibronectin concentrations in breast fed and formula fed neonates. *Arch Dis Child* **63** (5): 528-32.
242. Fujita, T., Onoguchi, K., Onomoto, K., Hirai, R., Yoneyama, M. (2007). Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie* **89** (6-7): 754-60.
243. Fukumi, H., Nakaya, R., Hatta, S., Noriki, H., Yunoki, H., Akagi, K., Saito, T., Uchiyama, K., Kobari, K., Nakanishi, R. (1957). An indication to identity between the infectious diarrhea in Japan and the afebrile infectious nonbacterial gastroenteritis by human volunteer experiments. *Jpn J Med Sci Biol* **10** (1): 1-17.
244. Furmanski, P., Li, Z. P., Fortuna, M. B., Swamy, C. V., Das, M. R. (1989). Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrin that possesses ribonuclease activity and lacks iron binding capacity. *J Exp Med* **170** (2): 415-29.
245. Furukawa, M., Narahara, H., Yasuda, K., Johnston, J. M. (1993). Presence of platelet activating factor-acetyl-hydrolase in milk. *J Lipid Res* **34** (9): 1603-9.
246. Galera Castilho, J., Munford, V., Reis Resque, H., Fagundes-Neto, U., Vinjé, J., Rácz, M. L. (2006). Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in Sao Paulo State, Brasil. *J Clin Microbiol* **44** (11): 3947-53.
247. Gallimore, C. I., Cubitt, D., du Plessis, N., Gray, J. J. (2004). Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* **42** (5): 2271-4.
248. Gallimore, C. I., Iturriza-Gomara, M., Xerry, J., Adigwe, J., Gray, J. J. (2007). Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: emergence and selection of virus variants. *Arch Virol* **152** (7): 1295-303.
249. Garcia, M. A., Meurs, E. F., Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89** (6-7): 799-811.
250. Garofalo, R., Chheda, S., Mei, F., Palkowetz, K. H., Rudloff, H. E., Schmalstieg, F. C., Rassin, D. K., Goldman, A. S. (1995). Interleukin-10 in human milk. *Pediatr Res* **37** (4): 444-9.
251. Gaulin, C., Frigon, M., Poirier, D., Fournier, C. (1999). Transmission of calicivirus by a food handler in the pre-symptomatic phase of illness. *Epidemiol Infect* **123**(3): 475-8.

-
252. Geme, J. W., Hodes, H. L., Marcy, S. M., Pickering, L. K., Rodriguez, W. J., MacCracken, G. H. Jr., Nelson, J. D. (1988). Consensus management of Salmonella infection in the first year of life. *Pediatr Infect Dis J* **7** (9): 615-21.
253. Gerrard, J. W., MacKenzie, J. W., Goluboff, N., Garson, J. Z., Maningas, C. S. (1973). Cow's milk allergy: prevalence and manifestations in an unselected series of newborns. *Acta Paediatr Scand* **234**: 1-21.
254. Gilbert, J. V., Plaut, A. G., Longmaid, B., Lamm, M. E. (1983). Inhibition of bacterial IgA proteases by human secretory IgA and serum. *Ann NY Acad Sci* **409**: 625-36.
255. Gill, B.D., Indyk, H.E. (2007). Determination of nucleotides and nucleosides in milk and pediatric formulas: a review. *JAOAC Int* **90**(5): 1354-64.
256. Gillin, F. D., Reiner, D. S., Gault, M. J. (1985). Cholate-dependent killing of *Giardia lamblia* by human milk. *Infect Immun* **47** (3): 619-22.
257. Gilmore, H. S. (1994). Human milk contains granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Eur J Clin Nutr* **48**: 222-224.
258. Glass, P. J., White, L. J., Ball, J. M., Leparac-Goffart, I., Hardy, M. E., Estes, M. K. (2000). Norwalk virus ORF3 encodes a minor structural protein. *J Virol* **74** (14): 6581-91.
259. Glass, P. J., Zeng, C. Q., Estes, M. K. (2003). Two non-overlapping domains on the Norwalk virus open Reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. *J Virol* **77** (6): 3569-77.
260. Glass, R. I., Breese, J. S., Parashar, U., Miller, M., Gentsch, J. R. (1997). Rotavirus vaccines at the threshold. *Nat Med* **3** (12): 1324-5.
261. Glass, R. I., Lew, J. F., Gangarosa, R. E., Le Baron, C. W., Ho, M. S. (1991). Estimates of morbidity and mortality rates for diarrheal diseases in American children. *J Pediatr* **118** (4-2): 27-33.
262. Glass, R. I., Noel, J., Ando, T., Fankhauser, R., Belliot, G., Mounts, A., Parashar, U. D., Breese, J. S., Monroe, S. S. (2000). The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* **181** (2): 254-61.
263. Glass, R. I., Noel, J., Mitchell, D., Herrmann, J. E., Blacklow, N. R., Pickering, L. K., Denehy, P., Ruiz-Palacios, G, de Guerrero, M. L., Monroe, S. S. (1996). The changing epidemiology of astrovirus-associated enteritis: a review. *Arch Virol Suppl* **12**: 287-300.
264. Glass, R. I., Stoll, B. J. (1989). The protective effect of human milk against diarrhea: a review of studies from Bangladesh. *Acta Paediatr Scand* **351**: 131-6.
265. Glass, R. I., Svennerholm, A. M., Stoll, B. J., Khan, M. R., Hossain, K. M., Huq, M. I., Holmgren, J. (1983). Protection against cholera in breast-fed children by antibodies in breast milk. *N Engl J Med* **308** (23): 1389-92.

-
266. Glass, R., Breese, J., Parashar, U. (1997). Rotavirus vaccines at the threshold. *Nat Med* **3** (12): 1324-5.
267. Gnoth, M. J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E., Rudloff, S. (2000). Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *J Nutr* **130** (12): 3014-20.
268. Gnoth, M. J., Rudloff, S., Kunz, C., Kinne, R. K. (2001). Investigations of the *in vitro* transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Biol Chem* **276** (37): 34363-70.
269. Goldblum, R. M., Ahlstedt, S., Carlsson, B., Hanson, L. A., Jodal, U., Lidin-Janson, G., Sohl-Akerlund, A. (1975). Antibody forming cells in human colostrum after oral immunisation. *Nature* **257** (5529): 797-8.
270. Goldblum, R. M., Goldman, A. S., Garza, C., Johnson, C. A., Nichols, B. L. (1982). Human milk banking II. Relative stability of immunologic factors in stored colostrum. *Acta Paediatr Scand* **71** (1): 143-4.
271. Goldblum, R. M., Schanler, R. J., Garza, C., Goldman, A. S. (1989). Human milk feeding enhances the urinary excretion of immunologic factors in low birth weight infants. *Pediatr Res* **25** (2): 184-8.
272. Golding, J., Emmett, P. M., Rogers, I. S. (1997). Gastroenteritis, diarrhoea and breast feeding. *Early Hum Dev* **29** (49): 83-103.
273. Goldman, A. S., Garza, C., Nichols, B. L., Goldblum, R. M. (1982). Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. *J Pediatr* **100** (4): 563-7.
274. Goldman, A. S., Garza, C., Nichols, B., Johnson, C. A., Smith, E. O. (1982). Effects of prematurity upon the immunologic system in human milk. *J Pediatr* **101** (6): 901-5.
275. Goldman, A. S., Garza, C., Schanler, R. J., Goldblum, R. M. (1990). Molecular forms of lactoferrin in stool and urine from infants fed human milk. *Pediatr Res* **27** (3): 252-5.
276. Goldman, A. S., Goldblum, R. M. (1989). Immunoglobulins in human milk. En "Protein and Non-protein Nitrogen in Human Milk". 1st ed. (Atkinson, S. A., Lonnerdal, B., eds.). Boca Raton, Florida, CRC Press; 43-51.
277. Goldman, A. S., Goldblum, R. M. (1985). Protective properties of human milk. En "Nutrition in Pediatrics, basic science and clinical application". 1st ed. (Walker, W. A., Watkins, J. B., eds.). Boston, Little Brown; 819-28.
278. Goldman, A. S., Goldblum, R. M., Garza, C. (1983). Immunologic components in human milk during the second year of lactation. *Acta Paediatr Scand* **72** (3): 461-2.
279. Goldman, A. S., Smith, C. W. (1973). Host resistance factors in human milk. *J Pediatr* **82** (6): 1082-90.

-
280. Goller, J. L., Dimitriadis, A., Tan, A., Kelly, H., Marshall JA. (2004). Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly. *J Hosp Infect* **58** (4): 286-91.
281. Gomes, K. A., Stupka, J. A., Gomez, J., Parra, G. I. (2007). Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol* **79** (11): 1703-9.
282. Goodfellow, I., Chaudry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberté, J. F., Roberts, L. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and IF4. *EMBO Rep* **6** (10): 969-972.
283. Goodgame, R. (2006). Norovirus gastroenteritis. *Curr Gastroenterol Rep* **8** (5): 401-8.
284. Gordon, I., Ingraham, H. S., Korn, R. F. (1947). Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J Exp Med* **86** (5): 409-22.
285. Gotz, H., de Jong, B., Lindbäck, J., Parment, P. A., Hedlund, K.O., Torvén, M., Ekdal, K. (2002). Epidemiological investigation of a food-borne gastroenteritis outbreak caused by Norwalk-like virus in 30 day-care centres. *Scand J Infect Dis* **34** (2): 115-21.
286. Gracey, M., Cullity, G. J., Suharjono, S. (1977). The stomach in malnutrition. *Arch Dis Child* **52** (4): 325-7.
287. Gracey, M., Stone, D. E. (1972). Small intestinal microflora in Australian aboriginal with chronic diarrhea. *Aust N Z J Med* **2** (3): 215-9.
288. Graham, D. Y., Jiang, X., Tanaka, T., Opekun, A. R., Madore, H. P., Estes, M. K. (1994). Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis* **170** (1): 34-43.
289. Gray, J. J., Jiang, X., Morgan-Capner, P., Desselberger, U., Estes, M. K. (1993). Prevalence of antibodies to Norwalk virus in England: detection by enzyme-linked immunosorbent assay using baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen. (1993). *J Clin Microbiol* **31** (4): 1022-5.
290. Gray, J. J., Kohli, E., Ruggeri, F. M., Vennema, H., Sanchez-Fauquier, A., Schreier, E., Gallimore, C. I., Iturriza-Gomara, M., Giraudon, H., Pothier, P., di Bartoli, I., Inglese, N., de Bruin, E., van der Beer, V., Moreno, S., Montero, V., de Llano, M. C., Höhne, M., Diedrich, S. M. (2007). European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigens in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol* **14** (10): 1349-55.
291. Green, Y. (2007). Caliciviridae: The noroviruses. En "Fields virology". 5^a ed. (Knipe, D. M., Howley, P. M., eds.). Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams&Wilkins; 949-79.
292. Green, J., Gallimore, C. I., Norcott, J. P., Lewis, D., Brown, D. W. G., Lees, D. N. (1995). Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction in the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* **47**: 392-8.

-
- 293.Green, J., Gallimore, C. I., Shore, J., Sellwood, J., Brown, D. W. (2004). Application of the heteroduplex mobility assay (HMA) for the investigation of the genomic diversity among noroviruses in environmental samples. *J Virol Methods* **120** (1): 59-67.
- 294.Green, J., Hensilwood, K., Gallimore, C. I., Brown, D. G. W., Lees, N. (1998). A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small-round structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Applied and Environment Microbiol* **1**: 858-63.
- 295.Green, J., Vinje, J., Gallimore, C. I., Koopmans, M., Hale, A., Brown, D. W., Cleqq, J. C., Chamberlain, J. (2000). Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses. *Virus Genes* **20** (3): 227-36.
- 296.Green, J., Wright, P. A., Gallimore, C. I., Mitchell, O., Morgan-Capner, P., Brown, D. W. (1998). The role of environmental contamination of small round structured viruses in a hospital outbreak investigated by reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay. *J Hosp Infect* **39** (1): 39-45.
- 297.Green, K. Y., Belliot, G., Taylor, J. L., Valdesuso, J., Lew, J. F., Kapikian, A. Z., Lin, F. Y. (2002). A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J Infect Dis* **185** (2): 133-46.
- 298.Green, K. Y., Lew, J. F., Jiang, X., Kapikian, A. Z., Estes, M. K. (1993). 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 epidemiological observations. *J Clin Microbiol* **31** (8): 2185-91.
- 299.Green, S. M., Lambden, P. R., Caul, E. O., Clarke, I. N. (1997). Capsid sequence diversity in small round structured viruses from recent UK outbreaks of gastroenteritis. *J Med Virol* **52** (1): 14-19.
- 300.Greenberg, H. B., Kapikian, A. Z. (1978a). Detection of Norwalk agent antibody and antigen by solid-phase radioimmunoassay and immune adherence hemagglutination assay. *J Am Vet Med Assoc* **173** (3-2): 620-3.
- 301.Greenberg, H. B., Matsui, S. M. (1992). Astroviruses and Caliciviruses: emerging enteric pathogens. *Infect Agents Dis* **1** (2): 71-91.
- 302.Greenberg, H. B., Valdesuso, J. R., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., McAuliffe, V. J., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M. (1981). Proteins of Norwalk virus. *J Virol* **37** (3): 994-99.
- 303.Greenberg, H. B., Valdesuso, J., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M., Wyatt, R. G., Szmuness, W., Larrick, J., Kaplan, J., Gilman, R. H., Sack, D. A. (1979). Prevalence of antibody to the Norwalk virus in various countries. *Infect Immun* **26** (1): 270-3.
- 304.Greenberg, H. B., Valdesuso, J., Yolken, R. H., Gangarosa, E., Gary, W., Wyatt, R. G., Konno, T., Suzuki, H., Channock, R. M., Kapikian, A. Z. (1979). Role of Norwalk virus in outbreaks of nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis* **139** (5): 564-8.

-
- 305.Greenberg, H. B., Wyatt, R. G., Kalica, A. R. (1981). New insights in viral gastroenteritis. En "Perspectives in Virology XI". (Pollard, M., ed.). 1ª ed. New York: Alan R. Liss; 163-87.
- 306.Greenberg, H. B., Wyatt, R. G., Kapikian, A. Z. (1979). Norwalk virus in vomitus. *Lancet* **1** (8106): 55.
- 307.Greenberg, H. B., Wyatt, R. G., Valdesuso, J., Kalica, A. R., London, W. T., Chanock, R. M., Kapikian, A. Z. (1978b). Solid-phase microtiter radioimmunoassay for detection of the Norwalk strain of acute nonbacterial, epidemic gastroenteritis virus and its antibodies. *J Med Virol* **2** (2): 97-108.
- 308.Grohmann, G., Glass, R. I., Gold, J., James, M., Edwards, P., Borg, T., Stine, S. E., Goldsmith, C., Monroe, S. S. (1991). Outbreak of human calicivirus gastroenteritis in a day care center in Sydney, Australia. *J Clin Microbiol* **29** (3): 544-50.
- 309.Grollman, E. F., Kobata, A., Ginsburg, V. (1969). An enzymatic basis for Lewis blood types in man. *J Clin Invest* **48** (8): 1489-94.
- 310.Grönberg, G., Lipniunas, P., Lundgren, T., Lindh, F., Nilsson, B. (1992). Structural analysis of five monosialylated oligosaccharides from human milk. *Arch Biochem Biophys* **296** (2): 597-610.
- 311.Grosvenor, C. E., Picciano, M. F., Baumrucker, C. R. (1993). Hormones and growth factors in human milk. *Endocr Rev* **14** (6): 710-28.
- 312.Grulee, C. G., Sanford, H. N., Swarchtz, H. (1934). Breast and artificially-fed infants. A study of the age incidence in the morbidity and mortality in twenty thousand cases. *JAMA* **103** (1934): 735-8.
- 313.Grupo de Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico de Norovirus. (2004). Brotes de gastroenteritis por norovirus en España 1999-2002. *Bol Epidemiol Sem* **12**: 1-4.
- 314.Grupo de Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico de Norovirus. (2005). Brotes de gastroenteritis por norovirus en España, 2003. *Bol Epidemiol Sem* **13**: 241-52.
- 315.Guandalini, S. (2004). Acte diarrea. En "Pediatric Gastrointestinal Disease" 4ª ed. Hamilton. (Walker, W. A., Goulet, O., Kleinman, R. E., Sherman, P. M., Schneider, B. L., Sanderson, I. R., eds.). Hamilton, Ontario: BC Decker; 166-79.
- 316.Guandalini, S., Gupta, P., eds. (2002). The role of probiotics in gastrointestinal disorders in infancy and childhood. En "Infant formula: closer to the reference". 1ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 29-45.
- 317.Guandalini, S., Mazzarella, G., Fontana, M. (1988). Childhood acute diarrhoea in Italy. *Pediatr Res* **24**: 414.

-
318. Guandalini, S., Migiavacca, M., de Campora, E., Rubino, A. (1982). Cyclic guanosine monophosphate effects on nutrients and electrolyte transport in rabbit ileum. *Gastroenterology* **83** (1-1): 15-21.
319. Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M. A., Dias, J. A., Casali, L. G., Hoekstra, H., Holacek, S., Massar, K., Micetic-Turk, D., Papadopoulou, A., de Sousa, J. S., Sandhu, B., Szajewska, H., Weizman, Z. (2000). *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30** (1): 54-60.
320. Guarino, A., Albano, F., Askenazi, S., Gendrel, D., Hoekstra, J. H., Shamir, R., Szajewska, H. (2008). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases. Evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. *J Ped Gastroenterol Nutr* **46** (2): 81-122.
321. Guarino, A., Alessio, M., Tarallo, L., Fontana, M., Iacono, G., Gobio Casali, L., Guandalini, S. (1989). Heat-stable enterotoxin produced by *Escherichia coli* in acute diarrhea. *Arch Dis Child* **64** (6): 808-13.
322. Guarino, A., Canani, N. B., Spagnuolo, M. I., Albano, F., di Benedetto, L. (1997). Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhoea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **25** (5): 516-9.
323. Guarner, F., Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. *Int J Food Microbiol* **39**: 237-8.
324. Guerrant, D. I., Moore, S. R., Lima, A. A. M., Patrick, P., Schorling, J. B., Guerrant, R. L. (1999a). Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in Northeast Brazil. *Am J of Trop Med Hyg* **61** (5): 707-13.
325. Guerrant, R. L., Hughes, J. M., Lima, N. L., Crane, J. (1990). Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev Infect Dis* **12** (1): 41-50.
326. Guerrant, R. L., Steiner, T. S., Lima, A. A., Bobak, D. A. (1999b). How intestinal bacteria cause disease. *J Infect Dis* **179** (2): 331-7.
327. Guix, S., Anasaka, M., Katayama, K., Crawford, S. E., Neill, F. H., Atmat, R. L., Estes, M. K. (2007). Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol* **81** (22): 12238-48.
328. Guix, S., Caballero, S., Villena, C., Bartolomé, R., Latorre, C., Rabella, N., Simó, M., Bosch, A., Pintó, R. M. (2002). Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J of Clin Microbiol* **40** (1): 133-9.
329. Gunson, R. N., Carman, W. F. (2005). Comparison of two real-time PCR methods for diagnosis of norovirus infection in outbreak and community settings. *J Clin Microbiol* **43** (4): 2030-1.

-
330. Guntapong, R., Hansman, G. S., Oka, T., Ogawa, S., Kageyama, T., Pongsuwanna, Y., Katayama, K. (2004). Norovirus and sapovirus infections in Thailand. *Jpn J Infect Dis* **57** (6): 276-8.
331. Gustafsson, L., Boiers, C., Hallgren, O., Mossberg, A. K., Petterson, J., Fischer, W., Aronson, A., Svanborg, C. (2005). HAMLET kills tumor cells by apoptosis: structure, cellular mechanisms, and therapy. *J Nutr* **135** (5): 1301-5.
332. Gutierrez-Escolano, A. L., Brito, Z. U., del Angel, R. M., Jiang, X. (2000). Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol* **74** (18): 8558-62.
333. Gutierrez-Escolano, A. L., Vazquez-Ochoa, M., Escobar-Herrera, J., Hernandez-Acosta, J. (2003). PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun* **311** (3): 759-66.
334. Gyorgy, P., Jeanloz, R. W., von Nicolai, H., Zilliken, F. (1974). Undialyzable growth factors for *Lactobacillus bifidus* var. *pennsilvanicus*. Protective effect of sialic acid bound to glycoproteins and oligosaccharides against bacterial degradation. *Eur J Biochem* **43** (1): 29-33.
335. György, P., Norris, R. F., Rose, C. S. (1954). Bifidus factor I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch Biochem Biophys* **48** (1): 193-201.
336. Häfliger, D., Gilgen, M., Lüthy, J., Hübner, P. (1997). Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int J Food Microbiol* **37** (1): 27-36.
337. Hahn, S., Kim, Y., Garner, P. (2001). Reduced osmolarity oral rehydration solution for treating dehydration due to diarrhoea in children: systematic review. *BMJ* **323**: 81-5.
338. Hahn-Zoric, M., Carlsson, B., Jeansson, S., Ekre, H. P., Osterhaus, A. D., Robertson, D., Hanson, L. A. (1993). Anti-idiotypic antibodies to polio virus in commercial immunoglobulins preparations, human serum, and milk. *Pediatr Res* **33** (5): 475-80.
339. Hale, A. D., Crawford, S. E., Ciarlet, M., Green, J., Gallimore, C. I., Brown, D. W. G., Jiang, X., Estes, M. K. (1999). Expression and self-assembly of Grimsby virus: antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses. *Clin Diagn Lab Immunol* **6** (1): 142-6.
340. Hale, A. D., Lewis, D. C., Jiang, X., Brown, D. W. (1998). Homotypic and heterotypic response by Ig G and Ig M after Norovirus infection. *J Med Virol* **54** (4): 305-12.
341. Hale, A. D., Tanaka, T. N., Kitamoto, N., Ciarlet, M., Jiang, X., Takeda, N., Brown, D. W., Estes, M. K. (2000). Identification of an epitope common to genogroup 1 "Norwalk-like viruses". *J Clin Microbiol* **38** (4): 1656-60.
342. Haltalin, K. C., Nelson, J. D., Ring, R., Sladoje, M., Hinton, L. V. (1967). Double-blind treatment study of shigellosis comparing ampicillin, sulfadiazine, and placebo. *J Pediatr* **70** (6): 970-81.

-
343. Hamano, M., Kuzuya, M., Fujii, R., Ogura, H., Yamada, M. (2005). Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by noroviruses in Okayama, Japan. *J Med Virol* **77** (2): 282-9.
344. Hamosh, M., Bitman, J., Wood, L., Hamosh, P., Mehta, N. R. (1985). Lipids in milk in the first steps in their digestion. *Pediatrics* **75** (1-2): 146-50.
345. Hamosh, M., ed. (1991). En "Infant Outcomes. Nutrition during lactation". 1^a ed. Washington D. C., National Academy Press: 153-96.
346. Han, M. G., Cheetham, S., Azevedo, M., Thomas, C., Saif, L. J. (2006). Immune responses to bovine norovirus-like particles with various adjuvants and analysis of protection in gnotobiotic calves. *Vaccine* **24** (3): 317-26.
347. Hansman, G. S., Natori, K., Shirato-Horikoshi, H., Ogawa, S., Oka, T., Katayama, K., Tanaka, T., Miyoshi, T., Sakae, K., Kobayashi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Sakurai, N., Shinozaki, N., Okada, M., Seto, Y., Kamata, Y., Nagata, N., Tanaka, K., Miyamura, T., Takeda, N. (2006). Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* **87** (4): 909-19.
348. Hanson, L. A. (1961). Comparative immunological studies of the immune globulins of human milk and blood serum. *Int Arch Allergy Immunol* **18**: 241-67.
349. Hanson, L. A., Adlerbert, I., Carlson, B. (1989). Immunology of breast-feeding. En: "Nutrition in preventive pediatrics". 1^a ed. (Di Toro, R., ed.). Basilea, Karger, 22: 10-9.
350. Hanson, L. A., Jalil, F., Ashraf, R., Bernini, S., Carlsson, B., Cruz, J. R., Gonzalez, T., Hahn-Zoric, M., Mellandre, L., Minoli, Y., Moro, G., Nave, F., Zaman, S., Mata, L., Karlberg, J., Lindbland, B. S. (1991). Characteristics of human milk antibodies and their effects in relation to the epidemiology of breastfeeding and infections in a developing country. *Adv Exp Med Biol* **310**: 1-15.
351. Hanson, L. A., Johansson, B. G. (1962). Immunological characterization of chromatographically separated protein fractions from human colostrums. *Int Arch Allergy Immunol* **20**: 65-79.
352. Hara, T., Irie, K., Saito, S., Ichijo, M., Yamada, M., Yanai, N., Miyazaki, S. (1995). Identification of macrophage colony-stimulating factor in human milk and mammary epithelial cells. *Pediatr Res* **37** (4-1): 437-43.
353. Hardy, M. E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Letters* **253** (1): 1-8.
354. Hardy, M. E., Tanaka, T. N., Kitamoto, N., White, L. J., Ball, J. M., Jiang, X., Estes, M. K. (1996). Antigenic mapping of the recombinant Norwalk virus capsid protein using monoclonal antibodies. *Virology* **217** (1): 252-61.
355. Hardy, S. B., ed. (1999). En "Mother Nature". 1^a ed. New York: Random House.

-
356. Harlow, E. y Lane, D., eds. (1998). "Antibodies: a Laboratory Manual". 1^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
357. Harrington, P. R., Lindesmith, L., Yount, B., Moe, C. L., Baric, R. S. (2002). Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigen is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol* **76** (23): 12335-43.
358. Harrington, P. R., Vinjé, J., Moe, C. L., Baric, R. S. (2004). Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. *J Virol* **78** (6): 3035-45.
359. Hayward, A. R., Lee, J., Beverley, P. C. L. (1989). Ontogeny of expression of UCHL1 antigen on TcR-1+ (CD4/8) and TcR^δ+ T cells. *Eur J Immunol* **19** (4): 771-3.
360. Head, J. R., Beer, A. E., Billingham, R. E. (1977). Significance of the cellular component of the maternal immunologic endowment in milk. *Transplant Proc* **9** (2): 1465-71.
361. Hedberg, C. W., Osterholm, M. T. (1993). Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev* **6** (3): 199-210.
362. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303** (5663): 1526-9.
363. Heird, W. C., Schwarz, S. M., Hansen, I. H. (1984). Colostrum-induced enteric mucosal growth in beagle puppies. *Pediatr Res* **18**: 512-5.
364. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408** (6813): 740-5.
365. Herbert, T. P., Brierly, I., Brown, T. D. (1996). Detection of the ORF3 polypeptide of the feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally, bicistronic, subgenomic mRNA. *J Gen Virol* **77** (1): 123-27.
366. Herbert, T. P., Brierly, I., Brown, T. D. (1997). Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of a feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* **78** (5): 1033-1040.
367. Herbst-Kralovetz, M., Mason, H. S., Chen, Q. (2010). Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Rev Vaccines* **9** (3): 299-307.
368. Hermann, J. E., Blacklow, N. R., Perron, H. D., Clements, E., Taylor, D. N., Echeverria, P. (1988). Incidence of enteric adenoviruses among children in Thailand and the significance of these viruses in enteritis. *J Clin Microbiol* **26** (9): 1783-6.
369. Hermann, J. E., Nowak, N. A., Blacklow, N. R. (1985). Detection of Norwalk virus in stools by enzyme immunoassay. *J Med Virol* **17** (2): 127-133.

-
370. Herrman, J. E., Blacklow, N. R., Matsui, S. M., Lewis, T. L., Estes, M. K., Ball, J. M., Brinker, J. P. (1995). Monoclonal antibodies for detection of Norwalk virus antigen in stools. *J Clin Microbiol* **33** (9): 2511-3.
371. Hi, E., Kolakowski, P., Singer, C., Smith, M. (1997). Efficacy of *Lactobacillus GG* as a diarrhoeal preventive in travelers. *J Travel Med* **4** (1): 41-3.
372. Hines, K. L., Kulkarni, A. B., McCarthy, J. B., Tian, H., Ward, Jerrold M.; Christ, M., McCartney-Francis, N. L., Furcht, L. T., Karlsson, S., Wahl, S. M. (1994). Synthetic fibronectin peptides interrupt inflammatory cell infiltrations in transforming growth factor beta-1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** (11): 5187-91.
373. Hirschhorn, N., Kinzie, J. L., Sachar, D. B., Northrup, R. S., Taylor, J. O., Ahmad, S. Z., Phillips, R. A. (1968). Decrease in net stool output in cholera during intestinal perfusion with glucose containing solutions. *N Engl J Med* **279** (4): 176-81.
374. Ho, M. S., Glass, R. I., Pinsky, P. F., Young-Okoh, N. C., Sappenfield, W. M., Buehler, J. W., Gunter, N., Anderson, N. J. (1988). Diarrheal deaths in American children. Are they preventable? *JAMA* **260** (22): 3281-85.
375. Holmgren, J. (1987). Inhibition of bacterial adhesion and toxin binding by glycoconjugate and oligosaccharide receptor analogues in human milk. En "Human Lactation 3: The effects of human milk on the recipient infant". 1^a ed. (Goldman, A., S., Atkinson, S. A., Hanson, L. A., eds.). New York London: Plenum Press; 251-9.
376. Holmgren, J., Svennerholm, A. M., Ahrén, C (1981). Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemagglutination) and enterotoxin binding of *Escherichiae coli* and *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **33** (1): 136-41.
377. Hooton, J. W. L., Pabst, H. F., Spady, D. W., Paetkau, V. (1991). Human colostrum contains an activity that inhibits the production of IL-2. *Clin Exp Immunol* **86** (3): 520-4.
378. Horne, C. H., Armstrong, S. S., Thomson, A. W., Thomson W. D. (1983). Detection of pregnancy associated alpha-2 glycoprotein (alpha-PAG) in IgA producing plasma cells and in body secretion. *Clin Exp Immunol* **51** (3): 631-8.
379. Hornung, V., Ellegst, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S., Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314** (5801): 994-7.
380. Howie, P. W., Forsyth, J. S., Ogston, S. A., Clark, A., du V Florey, C. (1990). Protective effect of breast-feeding against infection. *Br Med J* **300** (6716): 11-16.
381. Hsueh, W., Caplan, M. S., Qu, X. W., Tan, X. D., De Plaen, I. G., Gonzalez-Crussi, F. (2003). Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* **6** (1): 6-23.

-
- 382.Huang, J. S., Bousvaros, A., Lee, J. W., Diaz, A., Davidson, E. J. (2002). Efficacy of probiotic use in acute diarrhoea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* **47** (11): 2625-34.
- 383.Huang, P, Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A., and Jiang, X. (2012). Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J. Virol* **86** (9): 4833.
- 384.Huang, P., Farkas, T., Marionneau, S., Zhong, W., Ruvouen-Clouet, N., Morrow, A. L., Altaye, M., Pickering, L. K., Newburg, D. S., LePendou, J., Jiang, X. (2003). Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis* **188** (1): 19-31.
- 385.Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A. L., Jiang, X. (2005). Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J Virol* **79** (11): 6714-22.
- 386.Hutchens, T. W., Henry, J. F., Yip, T. T., Hachey, D. L., Schanler, R. J., Motil, K. J., Garza, C. (1991). Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human milk-fed preterm infants. Evaluation of stable isotopic enrichment. *Pediatr Res* **29** (3): 243-50.
- 387.Hutson, A. M., Airaud, F., LePendou, J., Estes, M. K., Atmar, R. L. (2005). Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. *J Med Virol* **77** (1): 116-20.
- 388.Hutson, A. M., Atmar, R. L., Estes, M. K. (2004). Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* **12** (6): 279-87.
- 389.Hutson, A. M., Atmar, R. L., Graham, D. Y., Estes, M. K. (2002). Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* **185**: 1335-7.
- 390.Hutson, A. M., Atmar, R. L., Marcus, D. M., Estes, M. K. (2003). Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to histo-blood group antigens. *J Virol* **77** (1): 405-15.
- 391.Infante, R. M., Ericsson, C. D., Jiang, Z. D., Ke, S., Steffen, R., Riopel, L., Sack, D. A., DuPont, H. L. (2004). Enteroreggregative *Escherichia coli* diarrhea in travelers: response to rifaximin therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2** (2): 135-8.
- 392.Inouye, S., Yamashita, K., Yamadera, S., Yoshikawa, M., Kato, N., Okabe, N. (2000). Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J Infect Dis* **181** (2): 270-4.
- 393.International Study Group on Reduced Osmolality ORS. (1995). Multicenter Evaluation of reduced osmolality oral rehydration salt solution. *Lancet* **345** (8945): 282-5.
- 394.Iritani, N., Seto, T., Hattori, H., Natori, K., Takeda, N., Kubo, H., Yamano, T., Ayata, M., Ogura, H., Seto, Y. (2007). Humoral immune responses against norovirus infections of children. *J Med Virol* **79** (8): 1187-93.

-
395. Isaacs, C. (2005). Human milk inactivates pathogens individually, additively, synergistically. *J Nutr* **135** (5): 1288-90.
396. Isaacs, C. E., Thormar, H. (1990). Human milk in lipids inactivate enveloped viruses. In "Breastfeeding, nutrition, infection, and infant growth in developed and emerging countries". 1st ed. (Atkinson, S. A., Hanson, L. A., Chandra, R. K., eds.). St. John's Newfoundland, Canada, ARTS Biomedical Publishers and Distributors; 161-74.
397. Isakbaeva, E. T., Widdowson, M. A., Beard, R. S., Bulens, S. N., Mullins, J., Monroe, S. S., Bresee, J., Sassano, P., Cramer, E. H., Glass, R. I. (2005). Norovirus transmission on cruise ship. *Emerg Infect Dis* **11** (1): 154-8.
398. Ish-Horowicz, M., Korman, S. H., Shapiro, M., Har-Even, U., Tamir, I., Strauss, N., Deckelbaum, R. J. (1989). Asymptomatic giardiasis in children. *Pediatr Infect Dis J* **89** (8): 773-9.
399. Isolauri, E., Juntunen, M., Wiren, S., Vuorinen, P., Koivula, T. (1989). Intestinal permeability changes in acute gastroenteritis: effects of clinical factors and nutritional management. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **8** (4): 466-73.
400. Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., Koivula, T. (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus GG*) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* **88** (1): 90-7.
401. Isolauri, E., Kaila, M., Mykkanen, H., Ling, W. H., Salminen, S. (1994). Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig Dis Sci* **39** (12): 2595-600.
402. Isolauri, E., Kalia, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., Koivula, T. (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. *Pediatrics* **88** (1): 90-7.
403. Isolauri, E., Vesikari, T. (1985). Oral rehydration, rapid versus gradual refeeding after acute gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **4**: 366-74.
404. Isolauri, E., Vesikari, T., Saha, P., Viander, M. (1986). Milk versus no milk in rapid refeeding after acute gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **5** (2): 254-261.
405. Issacs, C. E., Thormar, H., Pessolano, T. (1986). Membrane-disruptive effect of human milk: Inactivation of enveloped viruses. *J Infect Dis* **154** (6): 966-71.
406. Iwasaki, A., Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5** (10): 987-95.
407. Jain, L., Vidyasagar, D., Xanthou, M., Ghai, V., Shimada, S., Blend, M. (1989). In vivo distribution of human milk leukocytes after ingestion by newborn baboons. *Arch Dis Child* **64** (7): 930-3.

-
408. Janas, M., Picciano, M. F. (1992). The nucleotide profile of human milk. *Pediatr Res* **16** (8): 659-62.
409. Jatsyk, G. V., Kuvaeva, I. B., Gribakin, S. G. (1985). Immunologic protection of the neonatal gastrointestinal tract. The importance of breast-feeding. *Acta Paediatr Scand* **74** (2): 246-9.
410. Jenkins, S., Horman, J., Israel, E., Cukor, G., Blacklow, N. R. (1985). An outbreak of Norwalk-related enteritis at boy's camp. *Am J Dis Child* **139** (8): 787-9.
411. Jiang, B., McClure, H. M., Fankhauser, R. L., Monroe, S. S., Glass, R. I. (2004). Prevalence of rotavirus and norovirus antibodies in non-human primates. *J Med Primatol* **33** (1): 30-3.
412. Jiang, X. (2003). Development of serological and molecular tests for the diagnosis of calicivirus infections. En "Viral gastroenteritis" 1^a ed. (Desselberg, U., Gray, J., eds.). Amsterdam: Elsevier Science BV; 505-22.
413. Jiang, X., Cubitt, D., Hu, J., Dai, X., Treanor, J., Matson, D. O., Pickering, L. K. (1995a). Development of an ELISA to detect MX virus, a human calicivirus in the Snow Mountain agent genogroup. *J Gen Virol* **76** (11): 2739-47.
414. Jiang, X., Graham, D. Y., Wang, K., Estes, M. K. (1990). Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* **250** (4987): 1580-3.
415. Jiang, X., Huang, P. W., Zhong, W. M., Farkas, T., Cubitt, D. W., Matson, D. O. (1999). Designs and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* **83** (1-2): 145-54.
416. Jiang, X., Huang, P., Zhong, W., Tan, M., Farkas, T., Morrow, A. L., Newburg, D. S., Ruiz-Palacios, G. M., Pickering, L. K. (2004a). Human milk contains elements that block binding of noroviruses to human histo-blood group antigens in saliva. *J Infect Dis* **190** (10): 1850-9.
417. Jiang, X., Huang, P., Zhong, W., Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Pickering, L. K. (2004b). Human milk contains elements that block binding of noroviruses to histo-blood group antigens in saliva. *Adv Exp Med Biol* **554**: 447-50.
418. Jiang, X., Matson, D. O., Ruiz-Palacios, G. M., Hu, J., Treanor, T., Pickering, L. K. (1995b). Expression, self-assembly and Antigenicity of a Snow Mountain Agent-like Calicivirus Capsid Protein. *J of Clinical Microbiol* **33** (6): 1452-55.
419. Jiang, X., Matson, D. O., Cubitt, W. D., Estes, M. K. (1996). Genetic and antigenic diversity of human caliciviruses (HuCVs) using RT-PCR and new EIAs. *Arch Virol Suppl* **12**: 251-62.
420. Jiang, X., Wang, J., Estes, M. K. (1995c). Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. *Arch Virol* **140** (2): 363-74.
421. Jiang, X., Wang, J., Graham, D. Y., Estes, M. K. (1992a). Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30** (10): 2529-34.

-
- 422.Jiang, X., Wang, M., Graham, D. Y., Estes, M. K. (1992b). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* **66** (11): 6527-32.
- 423.Jiang, X., Wilton, N., Zhong, W. M., Farkas, T., Huang, P. W., Barrett, E., Guerrero, M., Ruiz-Palacios, G., Green, K. Y., Green, J., Hale, A. D., Estes, M. K., Pickering, L. K., Matson, D. O. (2000). Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis* **181** (2): 349-59.
- 424.Johnson, P. C., Mathewson, J. J., DuPont, H. L., Greenberg, H. B. (1990). Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in the U.S. adults. *J Infect Dis* **161** (1): 18-21.
- 425.Jolles, J., Jolles, P. (1967). Human tear, human milk lysozimes. *Biochemistry* **6** (2): 411.
- 426.Jones, T. F., Gerber, D. E. (2001). Perceived etiology of foodborne illness among public health personnel. *Emerg Infect Dis* **7** (5): 904-5.
- 427.Jordan, J. R., Gordon, I., Dorrance, W. R. (1953). A study of illness in a group of Cleveland families. Transmission of acute nonbacterial gastroenteritis to volunteers: evidence for two different etiological agents. *J Exp Med* **98** (5): 461-75.
- 428.Jothikumar, N., Lowther, J. A., Henshilwood, K., Lees, D. N., Hill, V. R., Vinjé, J. (2005). Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assay and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl Environm Microbiol* **71** (4): 1870-5.
- 429.Junquera, C. G., De Baranda, C. S., Mialdea, O. G., Serrano, E. B., Sánchez-Fauquier, A. (2009). Prevalence and clinical characteristics of norovirus gastroenteritis among hospitalized children in Spain. *Pediatr Infect Dis J* **28** (7): 604-7.
- 430.Jyonouchi, H., Zhang-Shanbhag, L., Georgieff, M., Tomita, Y. (1993). Immunomodulating actions of nucleotides: enhancement of immunoglobulin production by human cord blood lymphocytes. *Pediatr Res* **34** (5): 565.
- 431.Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N., Katayama, K. (2003). Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* **41** (4): 1548-57.
- 432.Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K. (2004). Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol* **42** (7): 2988-95.
- 433.Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., Arvilommi, H. (1992). Enhancing of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain. *Pediatr Res* **32** (2): 141-4.

-
434. Kaiser, W. J., Chadhry, H., Sosnovtsev, S. V., Goodfellow, I. G. (2006). Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J Gen Virol* **87**: 363-68.
435. Kalmaluddeen, M., Lodha, A., Akierman, A. (2009). Non-rotavirus infection causing apnoea in neonate. *Indian J Pediatr* **76** (10): 1051-2.
436. Kamata, K., Shinozaki, K., Okada M., Seto, Y., Kobayashi, S., Sakae, K., Oseto, M., Natori, K., Shirato-Horikoshi, H., Katayama, K., Tanaka, T., Takeda, N., Taniguchi, K. (2005). Expression and antigenicity of virus-like particles of norovirus and their application for detection of noroviruses in stool samples. *J Med Virol* **76** (1): 129-36.
437. Kantor, F. S. (1975). Infection, anergy and cell-mediated immunity. *N Engl J Med* **292** (12): 629-34.
438. Kapikian, A. Z. (1996). Overview of viral gastroenteritis. *Arch Virol Suppl* **12**: 7-19.
439. Kapikian, A. Z., Dienstag, J. L., Purcell, R. H. (1980). Immune electron microscopy as a method for the detection, identification and characterization of agents non cultivatable in an *in vitro* system. En "Manual of Clinical Immunology", 2^a ed. (Rose, N. R., Fielman, H., eds.). Washington, D. C.: American Society of Microbiology; 70-83.
440. Kapikian, A. Z., Estes, M. K., Chanock, R. M. (1996). Norwalk group of viruses. En "Fields Virology". 3^a ed. (Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., eds.). New York Raven Press; 783-810.
441. Kapikian, A. Z., Greenberg, H. B., Cline, W. L., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., James, H. D., Lloyd, N. L., Chanock, R. M., Ryder, R. W., Kim, H. W. (1978). Prevalence of antibody to Norwalk agent by a newly developed immune adherence hemagglutination assay. *J Med Virol* **26** (1): 281-94.
442. Kapikian, A. Z., Kim, H. W., Wyatt, R. G., Rodriguez, W. J., Ross, S., Cline, W. L., Parrott, R. H., Chanock, R. M. (1974). Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* **185** (156): 1049-53.
443. Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., Chanock, R. M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* **10** (5): 1075-81.
444. Kaplan, J. E., Feldman, R., Campbell, D. S., Lookabaugh, C., Gary, G. W. (1982a). The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health* **72** (12): 1329-32.
445. Kaplan, J. E., Gary, G. W., Baron, R. C., Singh, N., Schonberger, L. B., Feldman, R., Greenberg, H. B. (1982b). Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med* **96** (6-1): 756-61.

-
446. Kappus, K. D., Marks, J. S., Holman, R. C., Bryant, J. K., Baker, C., Gary, G. W., Greenberg, H. B. (1982). An outbreak of Norwalk gastroenteritis associated with swimming in a pool and secondary person-to-person transmission. *Am J Epidemiol* **116** (5): 834-9.
447. Karlsson, K. A. (1995). Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* **5** (5): 622-35.
448. Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J., Virgin, H. W. (2003). STAT-1 dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* **299** (5612): 1575-8.
449. Katayama, K., Hansman, G. S., Oka, T., Ogawa, S., Takeda, N. (2006). Investigation of Norovirus replication in human cell line. *Arch Virol* **151** (7): 1291-308.
450. Kauffman, C. A., Linnenman, C. C., Schiff, G. M., Phair, J. P. (1976). Effect of viral bacterial pneumonias on cell-mediated immunity in humans. *Infect Immun* **13** (1): 78-83.
451. Kauffman, S. S., Chatterjee, N. K., Fuschino, M. E., Magid, M. S., Gordon, R. E., Morse, D. L., Herold, B. C., LeLeiko, N. S., Tschernia, A., Florman, S. S., Gondolesi, G. E., Fishbein, T. M. (2003). Calicivirus enteritis in an intestinal transplant recipient. *Am J Transplant* **3** (6): 764-8.
452. Keeney, S. E., Schmalstieg, F. C., Palkowetz, K. H., Rudloff, H.E., Le, B. M., Goldman, A. S. (1993). Activated neutrophils and neutrophil activators in human milk. Increased expression of CD11b and decreased expression of L-selectin. *J Leukoc Biol* **54** (2) 97-104.
453. Keller, M. A. (1987). Transfer of tuberculin immunity from mother to infant. En "Human Lactation 3: The effects of human milk on the recipient infant". 1^a ed. (Goldman, A. S., Atkinson, S. A., Hanson, L. A. eds.). New York London: Plenum Press; 261-7.
454. Keller, M. A., Heiner, D. C., Kidd, R. M., Myers, A. S. (1983). Local production of Ig G4 in human colostrum. *J Immunol* **130** (4): 1654-7.
455. Keller, M. A., Henner, D. C., Myers, A. S., Reisinger, D. M. (1984). IgD a mucosal immunoglobulin? *Pediatr Res* **18** (4): 258.
456. Keller, M. A., Kidd, R. M., Bryson, Y. J., Turner, J. L., Carter, J. (1981). Lymphokine production by human milk lymphocytes. *Infect Immun* **32** (2): 632-6.
457. Kemp, A. S., Cripps, A. W., Brown, S. (1980). Suppression of leukocyte chemokinesis and chemotaxis by human IgA. *Clin Exp Immunol* **40** (2): 388-95.
458. Kenney, S. E., Schmalstieg, F. C., Palkowetz, K. H., Rudloff, H. E., Le, B. M., Goldman, A. S. (1993). Activated neutrophils and neutrophil activation in human milk. Increased expression of CD11b and decreased expression of L-selectin. *J Leukoc Biol* **54** (2): 97.
459. Khamrin, P., Maneekarn, N., Peerakome, S., Tonusin, S., Malasao, R., Mizuguchi, M., Okitsu, S., Ushijima, H. (2007). Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol* **79** (12): 1921-6.

-
460. Khamrin, P., Takanashi, S., Chan-It, W., Kobayashi, M., Nishimura, S., Katsumata, N., Okitsu, S., Maneekarn, N., Nishio, O., Ushijima, H. (2009). Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods* **157** (2): 219-22.
461. Khan, A. S., Moe, C. L., Glass, R. I., Monroe, S. S., Estes, M. K., Chapman, L. E., Jiang, X., Humphrey, C., Pon, E., Iskander, J. K., Schonberger, L. B. (1994). Norwalk Virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: comparison and application of molecular method-based assays. *J of Clin Microbiol* **32** (2): 318-22.
462. Khan, R. R., Lawson, A. D., Minnich, L. L., Martin, K., Nasir, A., Emmett, M. K., Welch, C. A., Udall, J. N. Jr. (2009). Gastrointestinal norovirus infection associated with exacerbation of inflammatory bowel disease. *J of Pediatr Gastroenterol Nutr* **48** (3): 328-33.
463. Kijlstra, A., Jeurissen, S. H. M. (1982). Modulation of classical C3 convertase of complement by tear lactoferrin. *Immunology* **47**: 263-70.
464. Kilgore, P. E., Belay, E. D., Hamlin, D. M., Noel, J. S., Humphrey, C. D., Gary, H. E. Jr, Ando, T., Monroe, S. S., Kludt, P. E., Rosenthal, D. S., Freeman, J., Glass, R. I. (1996). A university outbreak of gastroenteritis due to a small round-structured virus. Application of molecular diagnostics to identify the etiologic agent patterns of transmission. *J Infect Dis* **173** (4): 787-93.
465. Kindberg, E., Akerlind, B., Johnsen, C., Knudsen, J. D., Heltberg, O., Larsson, G., Böttiger, B., Svensson, L. (2007). Host Genetic Resistance to Symptomatic Norovirus (GGII.4) Infections in Denmark. *J Clin Microbiol* **45** (8): 2720-2722.
466. Kitamoto, N., Tanaka, T., Natori, K., Takeda, N., Nakata, S., Jiang, X., Estes, M. K. (2002). Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J Clin Microbiol* **40** (7): 2459-65.
467. Koda, Y., Soejima, M., Kimura, H. (2001) The polymorphisms of fucosyltransferases. *Legal Med* **3**: 2-14.
468. Kogawa, K., Nakata, S., Ukae, S., Adachi, N., Numata, K., Matson, D. O., Estes, M. K., Chiba, S. (1996). Dot blot hybridization with a cDNA probe derived from the human calicivirus Sapporo 1982 strain. *Arch Virol* **141** (10): 1949-59.
469. Kohl, S., Pickering, L. K., Cleary, T. G., Steinmetz, K. D., Loo, L. S. (1980). Human colostral cytotoxicity. II. Relative defects in colostral leukocyte cytotoxicity and inhibition of peripheral blood leukocyte cytotoxicity by colostrum. *J Infect Dis* **142** (6): 884-91.
470. Kojima, S., Fukumi, H., Kusama, H. (1948). Studies on the causative agent of the infectious diarrhea: records of the experiments on human volunteers. *Jpn Med J* **1**: 467-76.
471. Koldovsky, O. (1985). Digestion and absorption of carbohydrates, protein, and fat in infants and children. En "Nutrition in Pediatrics, Basic Science and Clinical Application". 1st ed. (Walker, W. A., Watkins, J. B., eds.). Boston Toronto, Little, Brown and Company; 253-77.

-
472. Koletzko, S., Sherman, P., Corey, M., Griffiths, A., Smith, C. (1989). Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *BMJ* **298** (6688): 1617-8.
473. König, M., Thiel, H. J., Meyers, G. (1998). Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus capsid. *J Virol* **72** (5): 4492-7.
474. Kono, Y. L., Beagley, K. W., Fujihashi, K., McGhee, J. R., Taga, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Kiyono, H. (1991). Cytokine regulation of localized inflammation. Induction of activated B cells and IL-6 mediated polyclonal IgG and IgA synthesis in inflamed human gingiva. *J Immunol* **146** (6): 1812-21.
475. Koopmans, J. S., Eckert, E. A., Greenberg, H. B., Strohm, B. C., Isaacson, R. E., Monto, A. S. (1982). Norwalk virus enteric illness acquired by swimming exposure. *Am J Epidemiol* **115** (2): 173-7.
476. Koopmans, M., Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* **90** (1): 23-41.
477. Koopmans, M., Harris, J., Verhoef, H., Depoortere, E., Takkinen, J., Coulumbier, D. (2006). European investigation into recent norovirus outbreaks on cruise ships: update. *Euro Surveill* **11** (7): E060706.5
478. Koppel, R., Han, R. N., Cox, D., Tanswell, A. K., Rabinovitch, M. (1994). Alpha-1-antitrypsin protects neonatal rats from pulmonary vascular and parenchymal effects of oxygen toxicity. *Pediatr Res* **36** (6): 763-70.
479. Kosek, M., Bern, C., Guerrant, R. L. (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* **81** (3): 197-204.
480. Kotloff, K. L., Losonky, G. A., Morris, J. G. Jr, Wasserman, S. S., Singh-Naz, N., Levin, M. M. (1989). Enteric adenovirus infection in childhood diarrhea: epidemic study in three clinical settings. *Pediatrics* **84** (2): 219-25.
481. Kramer, M. S. (1988). Infant feeding, infection and public health. *Pediatrics* **81** (1): 164-6.
482. Kramer, M. S., Chalmers, B., Hodnett, E. D., Sevkovskaya, Z., Dzikovich, I., Shapiro, S., Collet, J. P., Vanilovich, I., Mezen, I., Ducruet, T., Shishko, G., Zubovich, V., Mknuk, D., Gluchanina, E., Dombrovskiy, V., Ustinovitch, A., Kot, T., Bogdanovich, N., Ovchinkova, L., Helsing, E. (2001). Promotion of Breastfeeding Intervention Trial (PROBIT): a randomized trial in the Republic of Belarus. *JAMA* **285** (4): 413-20.
483. Kramer, M. S., Guo, T., Platt, R. W., Shapiro, S., Collet, J. P., Chalmers, B., Hodnett, E., Sevkovskaya, Z., Dzikovich, I., Vanilovich, I. (2002). Breastfeeding and infant growth: biology or bias? *Pediatrics* **110** (2-1): 343-7.

-
484. Kreutz, L. C., Seal, B. S., Mengeling, W. L. (1994). Early interaction of feline calicivirus with cells in culture. *Arch Virol* **136** (1-2): 19-34.
485. Kroneman, A., Vennema, H., Harris, J., Reuter, G., von Bonsdorff, C. H., Hedlund, K. O., Vainio, K., Jackson, V., Pothier, P., Koch, J., Schreier, E., Böttiger, B. E., Koopmans, M. (2006). Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill* **11** (12): 612-14.
486. Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Böttiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., von Bonsdorff, C. H., Maunula, L., Kuusi, M., Pothier, P., Gallay, A., Schreier, E., Höhne, M., Koch, J., Szücs, G., Reuter, G., Krisztalovics, K., Lynch, M., McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F. M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Grom, A. H., Mijovski, J. Z., Bosch, A., Buesa, J., Fauquier, A. S., Hernández-Pezzi, G., Hedlund, K. O., Koopmans, M. (2008). Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol* **46** (9): 2959-65.
487. Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75** (2): 263-74.
488. Kukurozovic, R. H., Brewster, D. R. (2002). Small bowel intestinal permeability in Australian aboriginal children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **35** (2): 206-12.
489. Kulkarni, A. B., Ward, J. M., Yaswen, L., Mackall, C. L., Bauer, S. R., Huh, C. G., Gress, R. E., Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta-1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* **90** (2): 770-4.
490. Kulski, J. K., Hartmann, P. E. (1981). Changes in the concentration of cortisol in milk during different stages of human lactation. *Aust J Exp Biol Med Sci* **59** (6): 769-78.
491. Kumar, S., McKerlie, M. L., Albrecht, T. B., Goldman, A. S., Baron, S. (1984). A broadly active viral inhibitor in human and animal organ extracts and body fluids. *Proc Soc Exp Biol Med* **177** (1): 104-11.
492. Kunz, C., Rudloff, S., Baie, W., Klein, N., Strobel, S. (2000). Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* **20**: 699-722.
493. Kunzelmann, K., Mall, M. (2002). Electrolytic transport in the mammalian colon: mechanisms and implication for disease. *Physiol Rev* **82**: 245-89.
494. Lacroix, C., Berthier, M., Agius, G., Bonneau, D., Pallu, B., Jacquemin, J. L. (1987). Cryptosporidium oocysts in immunocompetent children: epidemiologic investigations in the day-care centers of Poitiers, France. *Eur J Epidemiol* **3** (4): 381-5.
495. Laegreid, A., Kolsto Otnaess, A. B. (1987). Trace amounts of ganglioside GM1 in human milk inhibit enterotoxins from *Vibrio cholera* and *Escherichia coli*. *Life Sci* **40** (1): 55-62.

-
- 496.Laegreid, A., Kolsto Otnaess, A. B., Bryn, K. (1986a). Purification of human milk gangliosides by silica gel chromatography and analysis of trifluoroacetate derivatives by gas chromatography. *J Chromatogr* **377**: 59-67.
- 497.Laegreid, A., Kolsto Otnaess, A. B., Fuglesang, J. (1986b). Human and bovine milk: comparison of ganglioside composition and enterotoxin-inhibitory activity. *Pediatr Res* **20** (5): 416-21.
- 498.Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680-685.
- 499.Laurent, S., Vautherot, J. F., Madelaine, M. F., Le Gall, G., Rasschaert, D. (1994). Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into virus-like particles and induces protection. *J Virol* **68** (10): 6794-98.
- 500.Lizzerini, M. Ronfani, L. (2008). Oral zinc for treating diarrhoea in children. *Int J of Epidemiol* **37** (3): 938-40.
- 501.Le Guyader, F. S, Loisy, F., Atmar, R. L., Hutson, A. N., Estes, M. K., Ruvoën-Clouet, N., Pommeuy, M., Le Pendu, J. (2006). Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Em Infect Dis* **12** (6): 931-6.
- 502.Le Guyader, F. S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommeuy, M., Atmar, R. L. (2009). Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl Environm Microbiol* **75** (3): 618-24.
- 503.Le Guyader, F., Estes, M. K., Hardy, M. E., Neill, F. H., Green, J., Brown, D., Atmar, R. L. (1996). Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch Virol* **141** (11): 2225-35.
- 504.Le Pendu, J. (2004). Histo-blood group antigen and human milk oligosaccharides: genetic polymorphism and risk for infectious diseases. *Adv Exp Med Biol* **554**: 135-43.
- 505.Leffler, H., Svanborg Edén, C. (1986). Glycolipids as receptors for Escherichia coli lectins or adhesions. En "Microbial lectins and agglutinins: properties and biological activities". 1^a ed. (Mirelman, D., ed.). New York, Wiley; 83.
- 506.Leite, J. P., Ando, T., Noel, J. S., Jiang, B., Humphrey, C. D., Lew, J. F., Green, K. Y., Glass, R. I., Monroe, S. S. (1996). Characterization of Toronto virus capsid protein expressed in baculovirus. *Arch Virol* **141** (5): 865-75.
- 507.Leo, F., Asakuma, S, Fukuda, K., Senda, A., Urashima, T. (2010). Determination of sialyl and neutral oligosaccharide levels in transition and mature milks of Samoan women, using anthranilic derivatization followed by reverse phase high performance liquid chromatography. *Biosci Biotechnol Biochem* **74** (2): 298-303.

-
508. Letterio, J. J., Geiser, A. G., Kulkarni, A. B., Roche, N. S., Sporn, M. B., Roberts, A. B. (1994). Maternal rescue of transforming growth factor- β 1 null mice. *Science* **264** (5167): 1936-8.
509. Levy, A. G., Widerlite, L., Schwartz, C. J., Dolin, R., Blacklow, N. R., Gardner, J. D., Kimberg, D. V., Trier, J. S. (1976). Jejunal adenylate cyclase activity in human subjects during viral gastroenteritis. *Gastroenterology* **70** (3): 321-5.
510. Lew, J. F., Kapikian, A. Z., Jiang, X., Estes, M. K., Green, K. Y. (1994a). Molecular characterization and expression of the capsid protein of a Norwalk-like virus recovered from a Desert Shield troop with gastroenteritis. *Virology* **200**: 319-325.
511. Lew, J. F., Kapikian, A. Z., Valdeuso, J., Green, K. Y. (1994b). Molecular characterization of Hawaii virus and other Norwalk-like viruses: evidence for genetic polymorphism among human caliciviruses. *J Infect Dis* **170** (3): 535-42.
512. Lew, J. F., Petric, M., Kapikian, A. Z., Jiang, X., Estes, M. K., Green, K. Y. (1994c). Identification of minireovirus as Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J Virol* **68** (5): 3391-6.
513. Lewis, D. B., Yu, C. C., Meyer, J., English, B. K., Kahn, S. J., Wilson, C. B. (1991). Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin 4 and interferon-gamma production by neonatal T cells. *J Clin Invest* **87** (1): 194-202.
514. Ley, K. (2003). The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* **9** (6): 263-8.
515. Lindberg, T., Ohlsson, K., Weström, B. (1982). Protease inhibitors and their relation to protease activity in human milk. *Pediatr Res* **16** (6): 479-83.
516. Lindesmith, L. C., Donaldson, E. F., Baric, R. S. (2011). Norovirus GII.4 strain antigenic variation. *J of Virol* **85** (1): 231-42.
517. Lindesmith, L. C., Donaldson, E. F., Lobue, A. D., Cannon, J. L., Zheng, D. P., Vinje, J., Baric, R. S. (2008). Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* **5** (2): e31.
518. Lindesmith, L. C., Donaldson, E., Leon, L., Moe, C. L., Frelinger, J. A., Johnston, R. E., Ewber, D. J., Baric, R. S. (2010). Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection. *J of Virol* **84** (4): 1800-15.
519. Lindesmith, L., Moe, C., Lependu, J., Frelinger, J. A., Treanor, J., Baric, R. S. (2005). Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J Virol* **79** (5): 2900-09.
520. Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., LePendu, J., Baric, R. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* **9** (5): 548-53.
521. Lindh, E. (1985). Increased resistance of immunoglobulin dimers to proteolytic degradation after binding of secretory component. *J Immunol* **114** (1-2): 284-6.

-
- 522.Liu, B. L., Lambden, P. R., Gunther, H., Otto, P., Elschner, M., Clarke, I. N. (1999a). Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* **73** (1): 819-25.
- 523.Liu, B. L., Viljoen, G. J., Clarke, I. N., Lambden, P. R. (1999b). Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in *E. coli*. *J Gen Virol* **80** (2): 291-96.
- 524.Liu, B., Clarke, I. N., Lambden, P. R. (1996). Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by *in vitro* mutagenesis. *J Virol* **70** (4): 2605-10.
- 525.LoBue, A. D., Lindesmith, L., Yount, B., Harrington, P. R., Thompson, J. M., Johnston, R. E., Moe, C. L., Baric, R. S. (2006). Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking antibodies against multiple strains. *Vaccine* **24** (24): 5220-34.
- 526.Lochridge, V. P., Jutila, K. L., Graff, J. W., Hardy, M. E. (2005). Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J Gen Virol* **86** (10): 2799-06.
- 527.Lönerdal, B. (2003). Nutritional and physiological significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* **77** (6): 1537-43.
- 528.Lopman, B. A., Adak, G. K., Reacher, M. H., Brown, D. W. (2003a). Two epidemiological patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis* **9** (1): 71-7.
- 529.Lopman, B. A., Reacher, M. H., Van Duynhoven, Y., Hanon, F. X., Brown, D., Koopmans, M. (2003b). Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* **9** (1): 90-6.
- 530.Lopman, B. A., Reacher, M. H., Vipond, I. B., Hill, D., Perry, C., Halladay, T., Brown, D. W., Edmunds, W. J., Sarangi, J. (2004a). Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis. Avon England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis* **10** (10): 1827-34.
- 531.Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K. O., Torvén, M., von Bonsdorff, C. H., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szücs, G., Melegh, B., Svennson, L., van Duynhoven, Y., Koopmans, M. (2004b). Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* **363** (9410): 682-8.
- 532.Lucas, A., Cole, T. J. (1990a). Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* **336** (8730): 1519-23.
- 533.Lucas, A., Morley, R. (1990b). Early diet of preterm infants and the development of allergic or atopic disease: randomized prospective study. *Br Med J* **300** (6728): 837-40.

-
534. Lukacik, M., Thomas, R. L., Aranda, J. V. (2008). A meta-analysis of the effects of oral zinc in the treatment of acute and persistent diarrhea. *Pediatrics* **121** (2): 326-36.
535. Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A., Flavell, R. A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptors 7. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** (15): 5598-603.
536. Lynch, M., Painter, J., Woodruff, R., Braden, C. (2006). Surveillance for foodborne disease outbreaks. United States, 1998-2002. *Morb Mort Weekly Rep* **55** (10): 1-42.
537. Lynch, M., Sieh, W. J., Tatti, K., Gentsch, J. R., Ferebee-Harris, T., Jiang, B., Guarner, J., Bresee, J. S., Greenwald, M., Cullen, S., Davies, H. D., Trevenen, C., Zaki, S. R., Glass, R. I. (2003). The pathology of rotavirus-associated deaths, using new molecular diagnostics. *Clin Infect Dis* **37** (10): 1327-33.
538. Maccario, R., Chirico, G., Mingrat, G., Aricò, M., Lanfranchi, A., Montagna, D., Moretta, A., Rondini, G. (1993). Expression of CD45RO antigen on the surface of resting and activated neonatal T lymphocyte subsets. *Biol Neonate* **64** (6): 346-53.
539. Macfarlane, G. T., Macfarlane, S. (1997). Human colonic microbiota: Ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand J Gastroenterol* **222**: 3-9.
540. Madeley, C. R. (1979). Comparison of the features of astroviruses and caliciviruses seen in samples of feces by electron microscopy. *J Infect Dis* **139** (5): 519-23.
541. Madeley, C. R., Cosgrove, B. P. (1975). 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* **2** (7932): 451-2.
542. Madeley, C. R., Cosgrove, B. P. (1976). Caliciviruses in man. *Lancet* **307** (7952): 199-200.
543. Madore, H. P., Treanor, J. J., Buja, R., Dolin, R. (1990). Antigenic relatedness among the Norwalk-like agents by serum antibody rises. *J Med Virol* **32** (2): 96-101.
544. Maeda, Y., Tohya, Y., Matsuura, Y., Mochizuki, M., Sugimura, T. (2002). Early interactions of canine calicivirus in cells is the major determinant for its cells tropism *in vitro*. *Vet Microbiol* **87** (4): 291-300.
545. Mahalanabis D. (1996). Current status of oral rehydration as a strategy for the control of diarrhoeal diseases. *Indian J Med Res* **104**: 115-24.
546. Malathi, K., Dong, B., Gale, M. Jr., Silverman, R. H. (2007). Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448** (7155): 816-819.
547. Malloy, M. H., Graubard, B. (1994). Predictors of rehospitalization among very low birth weight infants. *Clin Res* **41** (4): 791.
548. Maltezou, H. C., Zatiropoulou, A., Mavrikou, N., Bozavoutoglou, E., Liapi, G., Foustoukou, M., Kafetzis, D. A. (2001). Acute diarrhea in children treated in an outpatient setting in Athens, Greece. *J Infect Dis* **43** (2): 122-7.

-
549. Marie-Cardine, A., Gourlain, K., Mouterde, O., Castignolles, N., Hellet, M., Mallet, E., Buffet-Janvresse, B. (2002). Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Rouen, France. *Clin Infect Dis* **34** (9): 1170-8.
550. Marionneau, S., Airaud, F., Bovin, N.V., Le Pendu, J., Ruvoën-Clouet, N. (2005b). Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. *J Infect Dis* **192** (6):1071-7.
551. Marionneau, S., Airaud, F., Bovin, N. V., Le Pendu, J., Ruvoën-Clouet, N. (2005). Influence of the combined ABO, FUT2 and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. *J Infect Dis* **192** (6): 1071-7.
552. Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvouen, N., Clément, M., Le Pendu, J. (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochemistry* **83** (7): 565-73.
553. Marionneau, S., Ruvoen, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacios, G., Huang, P., Jiang, X., Le Pendu, J. (2002). Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* **122** (7): 1967-77.
554. Marks, P. J., Vipond, I. B., Carlisle, D., Deakin, D., Fey, R. E., Caul, E. O. (2000). Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect* **124** (3): 481-7.
555. Marks, P. J., Vipond, I. B., Regan, F. M., Wegwood, K., Fey, R. E., Caul, E. O. (2003). A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect* **131**(1): 727-36.
556. Marshall, J. A., Dimitriadis, A., Wright, P. J. (2005). Molecular and epidemiological features of norovirus-associated gastroenteritis outbreaks in Victoria, Australia in 2001. *J Med Virol* **75** (2): 321-31.
557. Martín-Sosa, S., Martín, M. J., García-Pardo, L. A., Hueso, P. (2004). Distribution of sialic acids in the milk of Spanish mothers of full term infants during lactation. *J of Pediatr Gastroenterol Nutr* **39** (5): 499-503.
558. Mata, L. J., Jiménez, F., Córdón, M., Rosales, R. (1972). Gastrointestinal flora of children with protein-calorie malnutrition. *Am J Clin Nutr* **25**: 1118-26.
559. Mata, L. J., Urrutia, J. J., García, B., Fernández, R., Béhar, M. (1969a). Shigella infection in breast-fed Guatemalan Indian neonates. *Am J Dis Child* **117** (2): 142-6.
560. Mata, L. J., Urrutia, J. J., Gordon, J. E. (1969b). Diarrhoeal disease in a cohort of Guatemalan village children observed from birth to age of two years. *Trop Geogr Med* **19**: 247-57.
561. Mata, L. J., Wyatt, R. G. (1971). Host resistance to infections. *Am J Clin Nutr* **24** (8): 976-86.

-
562. Matheson, A. J., Noble, S. (2000). Racecadotril. *Drugs* **14** (1): 75-9.
563. Matson, D. O., Estes, M. K., Tanaka, T., Bartlett, A. V., Pickering, L. K. (1990). Asymptomatic human calicivirus infection in a day care center. *Pediatr Infect Dis J* **9** (3): 190-6.
564. Matson, D. O., Zhong, W. M., Nakata, S., Numata, K., Jiang, X., Pickering, L. K., Chiba, S., Estes, M. K. (1995). Molecular characterization of a human calicivirus with closer sequence relatedness to animal caliciviruses than other known human caliciviruses. *J Med Virol* **45** (2): 215-222.
565. Matsui, S. M., Greenberg, H. B. (2000). Immunity to calicivirus infection. *J Infect Dis* **181** (2): 331-5.
566. Matsui, S. M., Kim, J. P., Greenberg, H. B., Su, W., Sun, Q., Johnson, P. C., DuPont, H. L., Oshiro, L. S., Reyes, G. R. (1991). The isolation and characterization of a Norwalk virus-specific cDNA. *J Clin Invest* **87** (4): 1456-61.
567. Mattner, F., Sohr, D., Heim, A., Gastmeier, P., Vennema, H., Koopmans, M. (2006). Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* **12** (1): 69-74.
568. Maunula, L., Piparinen, H., von Bonsdorff, C. H. (1999). Confirmation of Norwalk-like virus amplicons after RT-PCR by microplate hybridization and direct sequencing. *J Virol Methods* **83** (1-2): 125-34.
569. Maunula, L., von Bonsdorff, C. H. (2005). Norovirus genotypes causing gastroenteritis outbreaks in Finland 1998-2002. *J Clin Virol* **34** (3): 186-94.
570. Mc Cartney, S. A., Thackray, L. B., Gitlin, L., Gilfillan, S., Virgin, H. W., Colonna, M. (2008). MDA-5 recognition of a murine norovirus. *PLoS Pathog* **4** (7): e1000108.
571. Mc Clelland, D. B. L., Mc Grath, J., Samson, R. R. (1978). Antimicrobial factors in human milk. Studies of concentration and transfer to the infant during the early stages of lactation. *Acta Paediatr Scand* **67** (271): 1.
572. Mc Evoy, M., Blake, W., Brown, D., Green, J., Cartwright, R (1996). An outbreak of viral gastroenteritis on a cruise ship. *Commun Dis Rep* **6** (13): 188-92.
573. Mcfarland, L. V., Brandmarker, S. A., Guandalini, S. (2000). Pediatric Clostridium difficile: a phantom menace or clinical reality? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **31** (3): 220-31.
574. McLean, B. S., Holmes, I. H. (1981). Effects of antibodies, trypsin and trypsin inhibitors on susceptibility of neonates to rotavirus infections. *J Clin Microbiol* **13** (1): 22-9.
575. Mead, P. S., Slutker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* **5** (5): 607-25.

-
576. Meeroff, J. C., Schreiber, D. S., Trier, J. S., Blacklow, N. R. (1980). Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann Intern Med* **92** (3): 370-73.
577. Mendez, M., Arias, C. F. (2007). Astroviruses. En "Fields Virology". 5^a ed. (Kinippe, D. M., Howley, P. M., eds.). Philadelphia, Walter Kluwer&Lippincott William&Wilkins; 982-99.
578. Meyer, E. J., Hamman, R. F., Gay, E. C., Lezotte, D. Z., Savitz, D. A., Klingsmith, G. J. (1988). Reduced risk of IDDM among breast fed children. The Colorado IDDM Registry. *Diabetes* **37** (12): 1625-32.
579. Meyer, E., Ebner, W., Scholz, R., Dettenkoffer, M., Daschner, F. D. (2004). Nosocomial outbreak of norovirus gastroenteritis and investigation of ABO histo-blood group type in infected staff and patients. *J Infect Dis* **56** (1): 64-6.
580. Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H. J. (1991). Genomic and subgenomic RNA of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* **184** (2): 677-86.
581. Millard, J., Appleton, H., Parry, J. V. (1987). Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. Part 1. Procedures for infection and recovery of virus from laboratory-maintained cockles. *Epidemiol Infect* **98** (3): 397-414.
582. Miller, L. C., Isa, S., LoPreste, G., Schaller, J. G., Dinarello, C. A. (1990). Neonatal interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor: cord blood levels and cellular production. *J Pediatr* **117** (6): 961-5.
583. Mirelaman, D. (1986). "Microbial lectins and agglutinins: properties and biological activities". 1^a ed. (Mirelaman, D., ed.). New York, Wiley; 123-7.
584. Mishu, B., Blaser, M. J. (1993). Role of infection due to *Campylobacter jejuni* in the initiation of Guillain-Barré syndrome. *Clin Infect Dis* **17** (1): 104-8.
585. Miyoshi, M., Yoshizumi, S., Kanda, N., Karino, T., Nagano, H., Kudo, S., Okano, M., Ishida, S. (2010). Different genotypic sapoviruses detected in two simultaneous outbreaks of gastroenteritis among schoolchildren in the same school district in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* **63** (1): 75-8.
586. Moe, C. L., Gentsch, J., Ando, T., Grohman, G., Monroe, S. S., Jiang, X., Wang, J., Estes, M. K., Seto, Y., Humphrey, C., Stine, S., Glass, R. I. (1994). Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* **32** (3): 642-8.
587. Monroe, S. S., Stine, E., Jiang, X., Estes, M. K., Glass, R. I. (1993). Detection of antibody to recombinant Norwalk virus antigen in specimens from outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* **31** (11): 2866-72.

-
588. Morales, M., Barcena, J., Ramirez, M. A., Boga, J. A., Parra, F., Torres, J. M. (2004). Synthesis *in vitro* of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (-) sense genomic RNA: mapping of a subgenomic promoter. *J Biol Chem* **279** (17): 17013-8.
589. Moreno-Espinosa, S., Farkas, T., Jiang, X. (2004). Human calicivirus and pediatric gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis* **15** (4): 237-45.
590. Morgan, O. S., Bankay, J., Quash, G. A. (1975). The effect of lactoferrin, an iron-binding protein or complement activity. *West Indian Med J* **24** (1): 46-54.
591. Morgan, W. T., Watkins, W. M. (2000). Unravelling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity. *Glycoconj J* **17** (7-9): 501-30.
592. Morotti, R. A., Kauffman, S. S., Fishbein, T. M., Chatterjee, N. K., Fuschino, M. E., Morse, D. L., Magid, M. S. (2004). Calicivirus infection in pediatric small intestine transplant recipients: pathological considerations. *Human Pathol* **35** (10): 1236-40.
593. Morris, C. A., Flewett, T. H., Byrden, A. S., Davies, H. (1975). Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet* **1** (7897): 4-5.
594. Morrow, A. L., Guerrero, M. L., Shults, J., Calva, J. J., Lutter, C., Bravo, J., Ruiz-Palacios, G., Morrow, R. C., Butterfoss, F. D. (1999). Efficacy of home-based peer counseling to promote exclusive breastfeeding: a randomized controlled trial. *Lancet* **353** (9160): 1226-31.
595. Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Jiang, X., Newburg, D. S. (2005). Human milk glycans that inhibit pathogens binding protect breastfeeding infants against infectious diarrhea. *J Nutr* **135** (5): 1304-7.
596. Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Altaye, M., Jiang, X., Guerrero, M. L., Meinen-Derr, J. K., Farkas, T., Chaturvedi, P., Pickering, L. K., Newburg, D. S. (2004). Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr* **145** (3): 297-303.
597. Mortari, F., Wang, J. Y., Schroeder, H. W. Jr. (1993). Human cord blood antibody repertoire. Mixed population of VH gene segments and CDR3 distribution in the expression of C alpha and C gamma repertoires. *J Immunol* **150** (4): 1348-57.
598. Morton, V., Jean, J., Farber, J., Mattison, K. (2009). Detection of noroviruses in ready-to-eat foods by using carbohydrate-coated magnetic beads. *Appl Environ Microbiol* **75** (13): 4641-3.
599. Mostov, K. E., Blobel, G. A. (1982). A transmembrane precursor of secretory component. The receptor of transcellular transport of polymeric immunoglobulins. *J Biol Chem* **257** (19): 11816-21.
600. Mounts, A. W., Ando, T., Koopmans, M., Breese, J. S., Noel, J., Glass, R. I. (2000). Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* **181** (2): 284-7.

-
601. Mumphrey, S. M., Changotha, H., Moore, T. N., Heimann-Nichols, E. R., Wobus, C. E., Michael, J. (2007). Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J Virol* **81** (7): 3251-63.
602. Munoz, C., Endres, S., van der Meer, J., Schlesinger, L., Arevalo, M., Dinarello, C. (1990). Interleukin-1beta in human colostrum. *Res Immunol* **141**: 501-13.
603. Murakami, K., Suzuki, S., Aoki, N., Okajima, T., Nadano, D., Uchida, K., Yamashita, K., Oka, T., Katayama, K., Takeda, N., Matsuda, T. (2010). Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Biosci Biotechnol Biochem* **74** (3):541-7.
604. Murata, T., Katsushima, N., Mizuta, K., Muraki, Y., Hongo, S., Matsuzaki, Y., (2007). Prolonged norovirus shedding in infants < or = 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* **26** (1): 46-9.
605. Murphy, C., Hahn, S. Volmink, J. (2004). Reduced osmolarity oral rehydration solution for treating cholera. *Cochrane Database Syst Rev* **CD003754**.
606. Mushtaha, A. A., Schmalstieg, F. C., Hughes, T. K. Jr., Rajaraman, S., Rudloff, H. E., Goldman, A. S. (1989). Chemokinetic agents for monocytes in human milk: possible role of tumor necrosis factor- α . *Pediatr Res* **25** (6): 629-33.
607. Musumeci, M., Simpoie, J., D'Agata, A., Sotgiu, S., Musumeci, S. (2006). Oligosaccharides in colostrum of Italian and Burkina women. *J of Pediatr Gastroenterol Nutr* **43** (3): 372-8.
608. Myers, K. E. C., Schulman, S., Kaplan, B. S. (1997). Principles of the treatment of Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: pay meticulous attention to detail, and do not harm. In "Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin producing E. coli strains". 1st ed. (Kaper, J. B., O'Brian, A. D., eds.). Washington D. C.: ASM Press; 364-73.
609. Myrmel, M., Rimstad, E., Estes, M., Skjerve, E., Wasteson, Y. (1996). Prevalence of serum antibodies to Norwalk virus among Norwegian military recruits. *Int J Food Microbiol* **29** (2-3): 233-40.
610. Naarding, M. A., Ludwig, I. S., Groot, F., Bekhout, B., Geijtenbeek, T. B., Pollakis, G., Paxton, W. A. (2005). Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD 4 + T lymphocytes. *J Clin Invest* **115** (11): 3256-64.
611. Nachamkin, I., Allos, B. M., Ho, T. (1998). *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. *Clin Microbiol Rev* **11** (3): 555-67.
612. Nakajima, S., Baba, A. S., Tamura, N. (1977). Complement system in human colostrum: presence of nine complement components and factors of alternative pathway in human colostrums. *Int Arch Allergy Immunol* **54** (5): 428-33.

-
613. Nakata, S., Chiba, S., Terashima, H., Sakuma, Y., Kogasaka, R., Nakao, T. (1983). Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of human calicivirus in stools. *J Clin Microbiol* **17** (2): 198-201.
614. Nakata, S., Chiba, S., Terashima, H., Yokoyama, T., Nakao, T. (1985). Humoral Immunity in infants with gastroenteritis caused by human calicivirus. *J Infect Dis* **152** (2): 274-9.
615. Nakata, S., Kogawa, K., Numata, K., Ukae, S., Adachi, N., Matson, D. O., Estes, M. K., Chiba S. (1996). The epidemiology of human calicivirus/Sapporo/82/Japan. *Arch Virol* **12**: 263-70.
616. Nakhla, T., Fu, D., Zopf, D., Brosky, N. L., Hurt, H. (1999). Neutral oligosaccharides content of preterm human milk. *Br J Nutr* **82** (5): 361-7.
617. Nanulescu, M., Condor, M., Popa, M., Muresan, M., Panta, P., Ionac, S., Popescu, L., Sarb, S., Suci, D., Corduneanu, D. (1995). Early re-feeding in the management of acute diarrhea in infants 0-1 year of age. *Acta Paediatr* **84** (9): 1002-1006.
618. Narayanam, I., Prakash, K., Bala, S., Verma, R. K., Gujral, V. V. (1980). Partial supplementation with expressed breast-milk for prevention of infection in low-birth-weight infants. *Lancet* **316** (8194): 561-3.
619. Neil, J. D. (1990). Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. *Virus Res* **17** (3): 145-160.
620. Neil, J. D., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y. (2000). Recovery and altered neutralization specificities of chimeric viruses containing capsid protein domain exchanges from antigenically distinct strains of feline calicivirus. *J Virol* **74** (3): 1079-84.
621. Neill, J. D. (2002). The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res* **87** (1): 89-93.
622. Neill, J. D., Mengeling, W. L. (1998). Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res* **11** (1): 59-72.
623. Neu, J., Wu-Wang, C. Y., Measel, C. P., Gimotty, P. (1988). Prostaglandin concentrations in human milk. *Am J Clin Nutr* **47** (4): 649-52.
624. Newburg, D. S. (1997). Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria? *J Nutr* **127** (5): 980-4.
625. Newburg, D. S. (1999). Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Curr Med Chem* **6** (2): 117-27.
626. Newburg, D. S. (2005a). Innate immunity and human milk. *J Nutr* **135** (5): 1308-12.
627. Newburg, D. S. (2009). Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *J Anim Sci* **87** (13): 26-34.

-
628. Newburg, D. S., Chaturvedi, P. (1992a). Neutral glycolipids of human and bovine milk. *Lipids* **27** (11): 923-7.
629. Newburg, D. S., Daniel, P. F., O'Neil, N. E., Mc Cluer, R. H. (1986). High performance liquid chromatography of oligosaccharides from human milk and colostrum. En "Human Lactation 2: Material and environmental factors". 1^a ed. (Hamosh, M., Goldman, A. S., eds.). New York: Plenum; 581-8.
630. Newburg, D. S., Linhardt, R. J., Ampofo, S. A., Yolken, R. H. (1995a). Human milk glycosaminoglycans inhibit HIV glycoprotein gp120 binding to its host cell CD4 receptor. *J Nutr* **125** (3): 419-24.
631. Newburg, D. S., Neubauer, S. H. (1995b). Carbohydrates in milk. En "Handbook of milk composition". 1^a ed. (Jensen, R. G., ed.). San Diego, Academic Press; 273-9.
632. Newburg, D. S., Peterson, J. A., Ruiz-Palacios, G. M., Matson, D. O., Morrow, A. L., Shults, J., Guerrero, M. L., Chaturvedi, P., Newburg, S. O., Scallan, C. D., Taylor, M. R., Ceriani, R. L., Pickering, L. K. (1998). Role of human milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* **351** (9110): 1160-4.
633. Newburg, D. S., Pickering, L. K., McCluer, R. H., Cleary, T. G. (1990). Fucosylated oligosaccharides of human milk protect suckling mice from heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **162** (5): 1075-80.
634. Newburg, D. S., Ruiz-Palacios, G. M., Altaye, M., Chaturvedi, P., Meinzen-Derr, J, Guerrero, M., L., Morrow, A. L. (2004). Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology* **14** (3): 253-63.
635. Newburg, D. S., Ruiz-Palacios, G. M., Morrow, A. L. (2005b). Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr* **25**: 37-58.
636. Newburg, D. S., Viscidi, R. P., Ruff, A., Yolken, R. H. (1992b). A human milk factor inhibits binding of human immunodeficiency virus to the CD4 receptor. *Pediatr Res* **31** (1): 22-8.
637. Nguyen, T. A., Khamrin, P., Takanashi, S., Le Hoang, P., Pham Ie, D., Hoang, K. T., Satou, K., Masuoka, Y., Okitsu, S., Ushijima, H. (2007a). Evaluation of immunochromatography tests for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J Trop Pediatr* **53** (4): 264-9.
638. Nguyen, T. A., Yagy, F., Okame, M., Phan, T. G., Trinh, Q. D., Yan, H., Hoang, K. T., Cao, A. T., Le Hoang, P., Okitsu, S., Ushijima, H. (2007b). Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Mihn City, Vietnam. *J Med Virol* **79** (5): 582-90.
639. Nichols, B. L., McKee, K. S., Henry, J. F., Putman, M. (1987). Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr Res* **21** (6): 563-7.

-
640. Nichols, J. H., Bezkorovainy, A., Paque, R. (1975). Isolation and characterization of several glycoproteins from human colostrum whey. *Biochem Biophys Acta* **412** (1): 99-108.
641. Nilsson, M., Hedlund, K. O., Thorhagen, M., Larson, G., Johansen, K., Ekspong, A., Svensson, L. (2003). Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol* **77** (24): 13117-24.
642. No authors listed. (1987). What has happened to carbohydrate intolerance following gastroenteritis? *Lancet* **1** (8523): 23-4.
643. No authors listed. (1992). Recommendations for composition of oral rehydration solutions for the children of Europe of an ESPGHAN Working Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **14** (1): 113-5.
644. Noda, K., Umeda, M., Ono, T. (1984). Transforming growth factor activity in human colostrum. *Gann* **75** (2): 109-12.
645. Noel, J. S., Ando, T., Leite, J. P., Green, K. Y., Dingle, K. E., Estes, M. K., Seto, Y., Monroe, S. S., Glass, R. I. (1997). The correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J Med Virol* **53** (4): 372-83.
646. Noel, J. S., Fankhauser, R. L., Ando, T., Monroe, S. S., Glass, R. I. (1999). Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis* **179** (6): 1334-44.
647. Oatness, A. B., Laegreid, A., Ertresvag, K. (1983). Inhibition of enterotoxin from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* by gangliosides from human milk. *Infect Immun* **40** (2): 563-69.
648. Oatness, A. B., Svennerholm, A. M. (1982). Non-immunoglobulin fraction of human milk protects against enterotoxin-induced intestinal fluid secretion. *Infect Immun* **35** (2): 738-40.
649. Oberhelman, R. A., Javier de la Cabada, F., Vasquez-Garibay, E., Bitsura, J. A., DuPont, H. L. (1987). Efficacy of thrimetropim-sulfamethoxazole in treatment of acute diarrhea in a Mexican pediatric population. *J Pediatr* **110** (6): 960-5.
650. Obermeier, S., Rudloff, S., Pohlentz, G., Lentze, M. J. Kunz, C. (1999). Secretion of 13-labelled oligosaccharides into human milk and infant's urine after an oral [13C] galactose load. *Isotopes Environ Health Stud* **35** (1-2): 119-25.
651. Ofek, I., Sharon, N. (1990). Adhesins as lectins: specificity and role in infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **151**: 91-113.
652. Ohyama, T., Yoshizumi, S., Sawada, H., Uchiyama, Y., Katoh, Y., Hamakoa, N., Utagawa, E. (1999). Detection and nucleotide sequence analysis of human caliciviruses (HuCVs) from

-
- samples in non-bacterial gastroenteritis outbreaks in Hokkaido, Japan. *Microbiol Immunol* **43** (6): 543-50.
653. Oka, T., Katayama, K., Ogawa, S., Hansman, G. S., Kageyama, T., Ushijima, H., Miyamura, T., Takeda, N. (2005). Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol* **79** (12): 7283-90.
654. Okada, M., Tanaka, T., Oseto, M., Takeda, N., Shinozaki, K. (2006). Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* **151** (8):1635-41.
655. Okhuysen, P. C., Jiang, X., Ye, L., Johnson, P. C., Estes, M. K. (1995). Viral shedding and fecal IgA response after Norwalk virus infection. *J Infect Dis* **171** (3): 566-69.
656. Oksenberg, J. R., Persitz, E., Brautbar, C. (1985). Cellular immunity in human milk. *Am J Reprod Immunol Microbiol* **8** (4): 125-9.
657. Olesen, B., Neimann, J., Bottinger, B., Ethelberg, S., Schiellerup, P., Jensen, C., Helms, M., Scheutz, F., Olsen, K. E., Krogh, K., Petersen, E., Molbak, K., Gerner-Smidt, P. (2005). Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. *J Clin Microbiol* **43** (8): 3636-41.
658. Oliver, S. L., Brown, D. W., Green, J., Bridger, J. C. (2004). A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the norovirus genus of the Caliciviridae. *Virology* **326** (2): 231-9.
659. Olsen, S. J., MacKinnon, L. C., Goulding, J. S., Bean, N. H., Slutsker, L. (2000). Surveillance for foodborne disease outbreaks. United States, 1993-1997. *Morb Mort Weekly Rep* **49** (1): 1-62.
660. Ostrea, E. M. Jr., Balun, J. E., Winkler, R., Porter, T. (1986). Influence of breast-feeding on the restoration of the low serum concentration of vitamin E and beta-carotene in the newborn infant. *Am J Obstet Gynecol* **154** (5): 1014-7.
661. Otnaess, A. B., Svennerholm, A. M. (1986). Non-immunoglobulin fraction of human milk protects against enterotoxin-induced intestinal fluid secretion. *Infect Immun* **35** (2): 738-40.
662. OzFoodNet Network. (2004). Foodborne Disease investigation across Australia. Annual report 2003. *Commun Dis Intell* **28** (3): 359-89.
663. Özkarağoz, F., Rudloff, H. B., Rajaraman, S., Mushtaha, A. A., Schmalstieg, F. C., Goldman, A. S. (1988). The motility of human milk macrophages in collagen gels. *Pediatr Res* **23** (5): 449-52.
664. Pabst, H. F., Grace, M., Godel, J., Cho, H., Spady, D. (1989). Effect of breast-feeding on immune response to BCG vaccination. *Lancet* **1** (8663): 295-7.
665. Pabst, H. F., Spady, D. W. (1990). Effect of breast-feeding on antibody response to conjugate vaccine. *Lancet* **336** (8710): 269-70.

-
666. Palkowetz, K. H., Royer, C. L., Garofalo, R., Rudloff, H. E., Schmalstieg, F. C. Jr., Goldman, A. S. (1994). Production of interleukin-6 and interleukin-8 by human mammary gland epithelial cells. *J Reprod Immunol* **26** (1): 57-64.
667. Pang, K., Bresson, J. L., Walker, W. A. (1983). Development of the gastrointestinal mucosal barrier. III. Evidence for structural differences in microvillus membranes from newborn and adult rabbits. *Biochem Biophys Acta* **727** (1): 201-8.
668. Pang, X. L., Honma, S., Nakata, S., Vesikari, T. (2000). Human caliciviruses in acute enteritis of young children in the community. *J Infect Dis* **181** (2): 288-94.
669. Pang, X. L., Joensuu, J., Vesikari, T. (1999). Human calicivirus-associated sporadic enteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Pediatr Infect Dis J* **18**: 420-6.
670. Parashar U. D., Breese J. S., Glass, R. I. (2003a). The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bull of the World Health Organ* **81** (4): 236.
671. Parashar, U. D., Dow, L., Fankhauser, R. L., Humphrey, C. D., Miller, J., Ando, T., Williams, K. S., Eddy, C. R., Noel, J. S., Ingram, T., Breese, J. S., Monroe, S. S., Glass, R. I. (1998). An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiol Infect* **121** (3): 615-21.
672. Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Breese J. S., Miller, M. A., Glass, R. I. (2003b). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* **9** (5): 565-72.
673. Parashar, U., Quiroz, E. S., Mounts, A. W., Monroe, S. S., Fankhauser, R. L., Ando, T. (2001). "Norwalk-like viruses". Public Health consequences and outbreak management. *Morb Mort Weekley Rep* **50** (9): 1-17.
674. Park, K.U., Song, J., Han, K.S., Kim, J.Q. (2005). The fusion allele of the FUT2 (secretor type alpha(1,2)-fucosyltransferase) gene at a high frequency and a new se385 allele in a Korean population. *Ann Hematol* **84** (10): 656-60.
675. Parker, T. D., Kitamoto, N., Tanaka, T., Hutson, A. M., Estes, M. K. (2005). Identification of Genogroup I Genogroup II broadly reactive epitopes on the norovirus capsid. *J Virol* **79**: 7402-09.
676. Parkkinen, J., Finne, J., Achtman, M., Vaisanen, V., Korhonen, T. K. (1983). Escherichia coli strains binding neuraminidase 2,3 galactosides. *Biochem Biophys Res Commun* **111**: 456-61.
677. Parrino, T. A., Schreiber, D. S., Trier, J. S., Kapikian, A. Z., Blacklow, N. R. (1977). Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* **297** (2): 86-89.
678. Parshionikar, S. U., Cashdollar, J., Fout, G. S. (2004). Development of homologous internal controls for use in RT-PCR assays of waterborne enteric viruses. *J Virol Methods* **121** (1): 39-48.

-
679. Patel, M. M., Hall, A. J., Vinje, J., Parashar, U. D. (2009). Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* **44** (1): 1-8.
680. Patel, M. M., Widdowson, M. A., Glass, R. I., Akazawa, K., Vinje, J., Parashar, U. D. (2008). Systematic review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* **14** (8): 1224-31.
681. Paterson, W., Haswell, P., Fryers, P. T., Green, J. (1997). Outbreak of small round structured virus gastroenteritis arose after kitchen assistant vomited. *Commun Dis Rep* **7**: 101-3.
682. Peeters, B. P., de Leeuw, O. S., Koch, G., Gielkens, A. L. (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* **73** (6): 5001-9.
683. Peiper, A. (1992). *Chronik der Kinderheilkunde*. Ed. Thieme.
684. Peitersen, B., Bohn, L., Andersen, H. (1975). Quantitative determination of immunoglobulins, lysozyme, and certain electrolytes during a 24-hour period, and in milk from the individual mammary gland. *Acta Paediatr Scand* **64** (5): 709-17.
685. Pelligrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochim Biophys Acta* **1426** (3): 439-48.
686. Peltola, H., Käyhty, H., Virtanen, M., Mäkelä, P. H. (1994). Prevention of Haemophilus influenzae type b bacterial infections with the capsular polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* **310**: 1561-6.
687. Perillo, N. L., Marcus, M. E., Baum, L. G. (1998). Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med* **76** (6): 402-12.
688. Peters, M. J., Dixon, G., Kotowicz, K. T., Hatxch, D. J., Heyderman, R. S., Klein, N. J. (1999). Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br J Haematol* **106** (2): 391-9.
689. Phadke, S. M., Deslouches, B., Hileman, S. E., Montelaro, R. C., Wiesenfeld, H. C., Mietzner, T. A. (2005). Antimicrobial peptides in mucosal secretions: the importance of local secretions in mitigating infection. *J Nutr* **135** (5): 1289-93.
690. Philipson, J., Peterson, U., Lindberg, U., eds. (1975). *Molecular Biology of Adenoviruses*. En "Virology Monographs". 1^a ed. New York, Springer Publishing; 14.
691. Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F., Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314** (5801): 997-1001.
692. Pichlmair, A., Reis e Sousa, C. (2007). Innate recognition of viruses. *Immunity* **27** (3): 370-83.

-
693. Pickering, L. K., Woodward, W. E., Du Pont, H. L., Sullivan, P. (1984). Occurrence of *Giardia lamblia* in children in day care centers. *J Pediatr* **104** (4): 522-6.
694. Powers, G. F. (1926). A comprehensive plan of treatment for the so-called intestinal intoxication of infants. *J Dis Child* **32** (2): 232-57.
695. Prasad, B. V., Crawford, S., Lawton, J. A., Pesavento, J., Hardy, M., Estes, M. K. (2001). Structural studies on gastroenteritis viruses. *Novartis Found Symp* **238**: 26-37.
696. Prasad, B. V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G., Estes, M. K. (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286** (5438): 287-90.
697. Prasad, B. V., Hardy, M. E., Jiang, X., Estes, M. K. (1996). Structure of Norwalk virus. *Arch Virol Suppl* **12**: 237-42.
698. Prasad, B. V., Matson, D. O, Smith, A. W. (1994a). Three dimensional structure of calicivirus. *J Mol Biol* **240** (3): 256-64.
699. Prasad, B. V., Rothnagel, R., Jiang, X., Estes, M. K. (1994b). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk-virus capsids. *J Virol* **68** (8): 5117-25.
700. Prentice, A. (1987). Breast feeding increases concentrations of IgA in infant's urine. *Arch Dis Child* **62** (8): 792-5.
701. Provisional Comité on Quality Improvement Subcomité of Acute gastroenteritis. (1996). The management of acute gastroenteritis in young children. *Pediatrics* **97**: 423-36.
702. Ptempio, V. F. (1658). *Avicenna Canon Medicus* **1** (3):1-4.
703. Pullan, C. R., Toms, G. L., Martin, A. J., Gardner, P. S., Webb, J. K. G., Appleton, D. R. (1990). Breast-feeding and respiratory syncytial virus infection. *Br Med J* **281**: 1034-6.
704. Racial and ethnic distribution of ABO blood types. Disponible en URL <<http://www.bloodbook.com/world-abo.html>>. [Acceso 28 de marzo, 2012].
705. Ravn, V., Dabelsteen, E. (2000). Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* **108** (1): 1-28.
706. Red Book. Report of the Comitee on Infectious Diseases 2000. American Academy of Pediatrics. Pickering, L. K., Peter, G., Baker, C. J., Gerber, M. A., Mc Donald, N. E., (eds). American Academy of Pediatrics. III: 202-3, 500-4, 516-7, 653-8.
707. Rees, L., Brook, C. G. D. (1979). Gradual reintroduction of full strength milk after acute gastroenteritis in children. *Lancet* **7**: 770-1.
708. Reid, B., Smith, H., Friedman, Z. (1980). Prostaglandins in human milk: relationships to milk fatty acid content. *Pediatrics* **66**: 870-2.

-
- 709.Reid, J. A., Caul, E. O., White, D. G., Palmer, S. R. (1988). Role of infected food handler in hotel outbreak of Norwalk-like viral gastroenteritis: implications for control. *Lancet* **2** (8606): 321-3.
- 710.Reinman, H. A., Price, A. H., Hodges, J. H. (1945). The cause of epidemic diarrhea, nausea and vomiting. Viral dysentery? *Proc Soc Experiment Biol Med* **59**: 8-9.
- 711.Reinmann, H. A., Hodges, J. H., Price, A. H. (1945). Epidemic diarrhea, nausea and vomiting of unknown cause. *JAMA* **127** (1): 1-6.
- 712.Reiter, B. (1978). The lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide antibacterium system. *Ciba Found Symp* **65** (6-8): 285-94.
- 713.Resta, S., Luby, J.P., Rosenfeld, C. R., Siegel, J. D. (1985). Isolation and propagation of a human enteric coronavirus. *Science* **229** (4714): 978-81.
- 714.Ribes, J. M., Montava, R., Téllez-Castillo, C. J., Fernández-Jiménez, M., Buesa, J. (2010). Seroprevalence of Aichi Virus in a Spanish Population from 2007 to 2008. *Clin Vacc Immun* **17** (4): 545-9.
- 715.Rockx, B. H., Bogers, W. M., Heeney, J. L., van Amerongen, G., Koopmans, M. P. (2005a). Experimental norovirus infections in non-human primates. *J Med Virol* **75** (2): 313-20.
- 716.Rockx, B. H., Vennema, H., Hoebe, C. J., Duizer, E., Koopmans, M. P. (2005b). Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis* **191** (5): 749-54.
- 717.Rockx, B., Baric, R. S., de Grijs, I., Duizer, E., Koopmans, M. P. (2005c). Characterization of the homo-and heterotypic immune responses after natural norovirus infection. *J Med Virol* **77** (3): 439-46.
- 718.Rockx, B., De Wit, M., Vennema, H., Vinjé J, De Bruin, E., Van Duynhoven, Y., Koopmans, M. (2002). Natural history of human calicivirus infection a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* **35** (3): 246-53.
- 719.Rognum, T. O., Thrane, S., Stoltenberg, L., Vege, A., Brandtzaeg, P. (1992). Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months. *Pediatr Res* **32** (2): 145-9.
- 720.Romain, N., Dandri-fosse, G., Jeusette, F., Forget, P. (1992). Polyamine concentration in rat milk and food, human milk, and infant formula. *Pediatr Res* **32** (1): 58-63.
- 721.Román, E., Negrodo, A., Dalton, R. M., Wilhelmi, I., Sánchez-Fauquier, A. (2002). Molecular detection of human calicivirus among Spanish children with acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol* **40** (10): 3857-9.

-
722. Román, E., Wilhelmi, I., Cilleruelo, M. I., Calvo, C., García García, M. L., Sánchez-Fauquier, A. (2004). Nosocomial acute gastroenteritis and asymptomatic infection by rotavirus and astrovirus in hospitalized children. *Anal Pediat (Barc)* **60** (4): 337-43.
723. Rooney, R. M., Cramer, E. H., Mantha, S., Nichols, G., Bartram, J. K., Farber, J. M., Benembarek, P. K. (2004). A review of outbreaks of foodborne disease associated with passenger ships: evidence for risk management. *Public Health Rep* **119** (4): 427-34.
724. Roux, M. E., McWilliams, M., Philips-Quagliata, J. M., Weisz-Carrington, P., Lamm, M. E. (1978). Origin of IgA secretory plasma cells in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* **75** (6): 2928.
725. Roy, S., Tomkins, A., Akramuzzaman, S., Behrens, R. H., Haider, R., Mahalanabis, D., Fuchs, G. (1997). Randomised controlled trial of zinc supplementation in malnourished Bangladeshi children with acute diarrhoea. *Arch Dis Child* **77** (3): 196-200.
726. Rudloff, H. E. (1993). Interleukin-6 in human milk. *J Reprod Immunol* **23** (1): 13-20.
727. Rudloff, H. E., Schmalstieg, F. C. Jr., Mushtaha, A. A., Palkowetz, K. H., Liu, S. K., Goldman, A. S. (1992). Tumor necrosis factor- α in human milk. *Pediatr Res* **31** (1): 29-33.
728. Rudloff, S., Pohlentz, G., Diekmann, L., Egge, H., Kunz, C. (1996). Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. *Acta Paediatr* **85** (5): 598-603.
729. Ruuska, T., Vesikari, T. (1990). Rotavirus disease in Finnish children: Use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* **22** (3): 259 -67.
730. Ruvoen-Clouet, N., Ganiere, J. P., Andre-Fontaine, G., Blanchard, D., Le Pendu, J. (2000). Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol* **74** (24): 11950-54.
731. Ruvoen-Clouet, N., Mas, E., Marionneau, S., Guillon, P., Lombardo, D., Le Pendu, J. (2006). Bile-salt stimulated lipase and mucins from milk of "secretor" mothers inhibit the binding of Norwalk virus capsids to their carbohydrate ligands. *Biochem J* **393** (3): 627-34.
732. Sabharwal, H., Sjöblad, S., Lundblad, A. (1991). Affinity chromatographic identification and quantitation of blood group A-active oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **12** (4): 474-9.
733. Sachdev, H. P. S., Mittal, N. K., Mittal, S. K., Yadav, H. S. (1988). A controlled trial on utility of oral zinc supplementation in acute dehydrating diarrhea in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **7** (6): 877-81.
734. Saito, S. (1991). Detection of IL-6 in human milk and its involvement in IgA production. *J Reprod Immunol* **20** (3): 267-76.

-
- 735.Saito, S., Maruyama, M., Kato, Y., Moriyama, I., Ichijo, M. (1993). Transforming growth factor-beta (TGF- β) in human milk. *Clin Exp Immunol* **94** (1): 220-4.
- 736.Sakai, Y., Nakata, S., Honma, S., Tatsumi, M., Numata-Kinoshita, K., Chiba, S. (2001). Clinical severity of Norwalk virus Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J* **20** (9): 849-53.
- 737.Sakamoto, J., Yin, B.W.T., Lloyd, K. O. (1984). Analysis of the expression of H, Lewis, X, Y and precursor blood group determinants in saliva and red cells using a panel of mouse monoclonal antibodies. *Mol Immunol* **21**: 1093-8.
- 738.Sala, M. R., Cardeñosa, N., Arias, C., Llovet, T., Recasens, A., Dominguez, A., Buesa, J., Salleras, L. (2005). An outbreak of food poisoning due to a genogroup I norovirus. *Epidemiol Infect* **133** (1): 187-91.
- 739.Salazar-Lindo, E., Sack, R. B., Chea-Woo, E., Kay, B. A., Piscocya, Z. A., Leon-Barua, R., Yi, A. (1986). Early treatment with erythromycin of *Campylobacter jejuni* associated dysentery in children. *J Pediatr* **109** (2): 355-60.
- 740.Salazar-Lindo, E., Santisteban-Ponce, J., Chea-Woo, E., Gutierrez, M. (2000). Racecadotril in the treatment of acute watery diarrhea in children. *N Engl J Med* **343** (7): 463-467.
- 741.Salminen, S. J., Gueimonde, M., Isolauri, E. (2005). Probiotics that modify disease risk. *J Nutr* **135** (5): 1296-8.
- 742.Samson, R. R., Mirtle, C., McClelland, D. B. L. (1980). The effect of digestive enzymes upon the binding and bacteriostatic properties of lactoferrin and vitamin B12 binder in human milk. *Acta Paediatr Scand* **69**: 517.
- 743.Sandhu, B. K. European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Working Group on Acute Diarrhoea. (2001). Rationale for early feeding in childhood gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **33** (2): 13-6.
- 744.Sandhu, B. K., Cristobal, F. I., Brueton, M. J. (1989). Optimising oral rehydration solution composition in model systems: studies in normal mammalian small intestine. *Acta Paediatr Scand* **364**: 17-22.
- 745.Sanguansermi, J., György, P., Zilliken, F. (1974). Polyamines in human and cow's milk. *Am J Clin Nutr* **27**: 859-65.
- 746.Sazawal, S., Black, R. E., Bhan, M. K., Bhandari, N., Sinha, A., Jalla, S. (1995). Zinc supplementation in young children with acute diarrhea in India. *N Engl J Med* **333** (13): 839-44.
- 747.Scahnler, R. J., Goldblum, R. M., Garza, C., Goldman, A. S. (1986). Enhanced fecal excretion of selected immune factors in very low birth weight infants fed fortified human milk. *Pediatr Res* **20** (8): 711-5.

-
- 748.Schaffer, F. L., Soeregel, M. E., Black, J. W., Skilling, D. E., Smith, A. W., Cubbitt, W. D. (1985). Characterization of a new Calicivirus isolated from feces of a dog. *Arch Virol* **84** (3-4): 181-95.
- 749.Schaffer, F. L., Zeresmann, D. W., Fretz, M. K., Soergel, M. I. (1980). A protein VPg covalently linked to 36S calicivirus RNA. *J Gen Virol* **47**: 215-20.
- 750.Schanler, R. J., Goldblum, R. M., Garza, C., Goldman, A. S. (1986). Enhanced fecal excretion of selected immune factors in very low birth weight infants fed fortified human milk. *Pediatr Res* **20** (8): 711-5.
- 751.Schierer, S. H. (2003). Clinical aspects of gastrointestinal food allergy in childhood. *Pediatrics* **111** (6): 1609-16.
- 752.Schnorr, K. L., Pearson, L. D. (1984). Intestinal absorption of maternal leukocytes by newborn lambs. *J Reprod Immunol* **6** (5): 329-37.
- 753.Schreiber, D. S., Blacklow, N. R., Trier, J. S. (1973). The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med* **288** (25): 1318-23.
- 754.Schreiber, D. S., Blacklow, N. R., Trier, J. S. (1974). The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis* **129** (6): 705-8.
- 755.Schultz, C. L., Coffman, R. L. (1991). Control of isotype switching by T cells and cytokines. *Curr Opin Immunol* **3** (3): 350-4.
- 756.Schwab, K. J., Estes, M. K., Atmar, R. L. (2000). Norwalk and other human caliciviruses: molecular characterization, epidemiology and pathogenesis. En "Microbial foodborne diseases: mechanisms of pathogenicity and toxin synthesis". 1^a ed. (Cary, J. W., Linz, J. E., Bhatnagar, D. eds.). Lancaster, Pa: Technomic Publishing Company, Inc; 469-93.
- 757.Schwab, K. J., Estes, M. K., Neil, F. H., Atmar, R. L. (1997). Use of heat release and internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples. *J Clin Microbiol* **35** (2): 511-4.
- 758.Scott, K. J., Salter, D. N., Finglass, P. (1990). A possible physiologic role for the milk folate binding protein in the nutrition of the neonate. *Colloque INSERM* **197**: 483-7.
- 759.Scroten, H., Hanisch, F. G., Plogmann, R., Hacker, J., Uhlenbruck, G., Nobis-Bosch, R, Wahn, V. (1992). Inhibition of adhesion of S-fimbriated Escherichia coli to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. *Pediatr Res* **60** (7): 2893-9.
- 760.Sder, Q. W., Lewis, D., Price, E. H. (1986). Norwalk-like viruses: study of an outbreak. *Arch Dis Child* **61**: 142-7.
- 761.Seah, E. L., Gunsekere, I. C., Marshall, J. A., Wright, P. J. (1999). Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-viruses. *Arch Virol* **144** (5): 1007-14.

-
762. Seas, C., DuPont, H., Valdez, L., Gotuzzo E. (1996). WHO position paper on Oral Rehydration Salts to reduce mortality on cholera. Practical guidelines for the treatment of cholera. *Drugs* **51**: 966-73.
763. Serpa, J., Lunet, N., Mendes, N., Barros, H., David, L. (2004). Lewis and secretor status and *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Infect* **132** (5): 997-8.
764. Serpa, J., Mendes, N., Reis, C.A., Santos-Silva, L.F., Almeida, R., Le Pendu, J., David, L. (2004). Two new FUT2 (fucosyltransferase 2 gene) missense polymorphisms, 739G-->A and 839T-->C, are partly responsible for non-secretor status in a Caucasian population from Northern Portugal. *Biochem J*. **383** (3): 469-74.
765. Sfadar, N., Said, A., Gangnon, R. E., Maki, D. G. (2002). Risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of Escherichia coli O157:H7 enteritis: a meta-analysis. *JAMA* **288** (8): 996-1001.
766. Shanker, S., Choi, J. M., Sankaran, B., Atmar, R.L., Estes, M.K., Prasad, B.V. (2011). Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: implications for epochal evolution. *J Virol* **85** (17): 8635-45.
767. Shastri, S., Doane, A. M., Gonzales, J., Upadhyayula, U., Bass, D. M. (1998). Prevalence of astroviruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol* **36** (9): 2571-4.
768. Sherman, P. M., Cabana, M., Gibson, G. R., Koletzko, B. V., Neu, J., Veereman-Wauters, G., Ziegler, E. E., Walker, W. A. (2009). Potential roles and clinical utility of prebiotics in newborns, infants, and children: proceedings from a global prebiotic Summit meeting, New York City, June 27-28, 2008. *J Pediatr* **155** (5): 61-70.
769. Shimizu, T., Yamashiro, Y., Yabuta, K. (1992). Prostaglandin E1, E2 and F2a in human milk and plasma. *Biol Neonate* **61** (4): 222-5.
770. Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N., Doetschman, T. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359** (6397): 693-9.
771. Siebenga, J. J., Vennema, H., Duizer, E., Koopmans, M. P. (2007). Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4. The Netherlands, 1994-2005. *Emerg Infect Dis* **13** (1): 144-6.
772. Simmonds, P., Karakasiliotis, I., Bailey, D., Chaudry, Y., Evans, D. J., Goodfellow, I. G. (2008). Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res* **36** (8): 2530-46.
773. Simmons, G., Greening, G., Gao, W., Campbell, D. (2001). Raw oyster consumption and outbreaks of viral gastroenteritis in New Zealand: evidence for risk to the public's health. *Aust N Z Public Health* **25** (3): 234-40.

-
- 774.Simon, A., Schildgen, O., Eis-Habinger, M., Hasan, C., Bode, U., Buderus, S., Engelhart, S., Fleischack, G. (2006). Norovirus outbreak in a Pediatric Oncology Unit. *Scand J Gastroenterol* **41** (6): 693-9.
- 775.Sirinavin, S. Garner, P. (2000). Antibiotics for treating salmonella gut infections. *Cochrane Database Syst Rev* **1**: CD001167.
- 776.Sjazewska, H., Hoekstra, J. H., Shandu, B. The Working Group on Acute Diarrhoea of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (2000). Management of acute gastroenteritis in Europe and the impact of the new recommendations: a multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30** (5): 522-7.
- 777.Sjazewska, H., Murkovicz, J. Z. (2001). Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **33** (2): 17-25.
- 778.Skansén-Saphir, U., Lindfors, A., Andersson, U. (1993). Cytokine production in mononuclear cells of human milk studied at the single-cell level. *Pediatr Res* **34** (2): 213-6.
- 779.Slade, H. B., Schwartz, S. A. (1987). Mucosal immunity: the immunology of breast milk. *J Allergy Clin Immunol* **80** (3-1): 348-58.
- 780.Smiley, J. R., Chang, K. O., Hayes, J., Vinjé, J, Saif, L. J. (2002). Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J Virol* **76** (20): 10089-98.
- 781.Smith, A. W., Skilling, D. E., Cherry, N., Mead, J. H., Matson, D. O. (1998). Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements. *Emerg Infect Dis* **4** (1): 13-20.
- 782.Smith, C. W., Goldman, A. S. (1968). The cells of human colostrum. I. *In vitro* studies of morphology and functions. *Pediatr Res* **2** (2): 103-9.
- 783.Smolinski, M. S., Hamburg, M. A., Lederberg, J., eds. (2003). "Microbial threats to health: Emergence, detection and response". 1st ed. Washington: National Academic Press; 281-312.
- 784.Soejima, M., Fujimoto, R., Agusa, T., Iwata, H., Fujihara, J., Takeshita, H., Minh, T. B., Trang, P. T., Viet, P. H., Nakajima, T., Yoshimoto, J., Tanabe, S., Koda, Y. (2011). Genetic variation of FUT2 in a Vietnamese population: identification of two novel Se enzyme-inactivating mutations. *Transfusion* **21**.
- 785.Soejima, M., Nakajima, T., Fujihara, J., Takeshita, H., Koda, Y. (2008). Genetic variation of FUT2 in Ovambos, Turks, and Mongolians. *Transfusion* **48** (7):1423-31.
- 786.Soejima, M., Pang, H., Koda, Y. (2007). Genetic variation of FUT2 in a Ghanaian population: identification of four novel mutations and inference of balancing selection. *Ann Hematol* **86** (3):199-204.

-
- 787.Sommer, C., Mueller, W., Resch, B. (2009). Two norovirus noscomial outbreaks in the neonatal intensive and intermediate care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28** (9): 1133-6.
- 788.Sorea, S., Dabadie, A., Bridoux-Henno, L., Balançon-Morival, M., Jouan, H., Le Gall, E. (2003). Colite hémorragique chez le nourrissons an allaitement maternel exclusif. *Arch Pediatr* **3003** (10): 772-5.
- 789.Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Onwudiwe, O., Green, K. Y. (2005). Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol* **79** (7): 4012-24.
- 790.Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Prikhodko, V. G., Thackray, L. B., Wobus, C. E., Karst, S. M., Virgin, H. W., Green, K. Y. (2006). Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* **80** (16): 7816-31.
- 791.Sosnovtsev, S. V., Garfield, M., Green K. (2002). Processing map and essential cleavage sites of nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol* **76** (14): 7060-72.
- 792.Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y. (2000). Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* **277** (1): 193-203.
- 793.Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, S. A., Green, K. Y. (1998). Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J Virol* **72** (4): 3051-59.
- 794.Sosnovtsev, S., Green, K. Y. (1995). RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VPg for infectivity. *Virology* **210** (2): 383-90.
- 795.Sosnovtseva, S. A, Sosnovtsev, S. V, Green, K. Y. (1999). Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol* **73** (8): 6626-33.
- 796.Spik, G., Brunet, B., Mazurier-Dehaine, C., Fontaine, G., Montreuil, J. (1982). Characterization and properties of the human and bovine lactotransferrins extracted from the feces of newborn infants. *Acta Paediatr Scand* **71** (6): 979-85.
- 797.Spik, G., Cheron, A., Monteul, J., Dolby, J. M. (1978). Bacterostasis of a milk.sensitive strain of Escherichia coli by immunoglobulins and iron-binding proteins in association. *Immunology* **35** (4): 663-71.
- 798.Spik, G., Montreuil, J. (1966). Etudes comparatives de la structure de la transferrine de la lactotransferrine humaines. Fingerprinting des hydrolites proteasiques des deux glycoproteides. *CR Seances Soc Biol Paris* **160**: 94.
- 799.Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76** (2): 301-14.

-
800. Stahl, B., Thurl, S., Zeng, J., Karas, M., Hillenkamp, F., Steup, M., Sawatzki, G. (1994). Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* **223** (2): 218-26.
801. Stanley, P., Cummings, R. D. Structures common in glycans. (2008). En "Essentials of Glycobiology". 2^a ed. (Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., Etzler, M. E., eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbors. New York: 179-86.
802. Steinhoff, M. C., Douglas Jr., R. G., Greenberg, H. B., Callahan, D. R. (1980). Bismuth subsalicylate therapy of viral gastroenteritis. *Gastroenterology* **78** (6): 1495-99.
803. Stenberg, K., Johns, B., Scherpbier, R. W., Tan-Torres Edejer, T. (2007). A financial road map to scaling up essential child health interventions in 75 countries. *Bull of the World Health Organ* **85** (4): 305-314.
804. Stephens, S. (1986a). Development of secretory immunity in breast fed and bottle fed infants. *Arch Dis Child* **61** (3): 263-9.
805. Stephens, S., Dolby, J. M., Monteruil, J., Spik, G. (1980). Differences in inhibition of the growth of commensal and enteropathogenic strains of *Escherichia coli* by lactoferrin and secretory immunoglobulin A isolated from human milk. *Immunology* **41**: 597.
806. Stephens, S., Kennedy, C. R., Lakhani, P. K., Brenner, M. K. (1986b). In-vivo immune responses of breast- and bottle-fed infants to tetanus toxoid antigen and to normal gut flora. *Acta Paediatr Scand* **73** (4): 426-32.
807. Stigbrand, T. (1976). Biochemistry and properties of the immunosuppressive pregnancy zone protein (PZ). *Prot Biol Fluids* **24**: 181-8.
808. Storry, J.R., Johannesson, J.S., Poole, J., Strindberg, J., Rodrigues, M.J., Yahalom, V., Levene, C., Fujita, C., Castilho, L., Hustinx, H., Olsson, M.L. (2006). Identification of six new alleles at the FUT1 and FUT2 loci in ethnically diverse individuals with Bombay and Para-Bombay phenotypes. *Transfusion* **46** (12): 2149-55.
809. Straub, T. M., Honer zu, B. K., Orosz-Coghlan, P., Dohnalkova, A., Mayer, B. K., Bartholomew, R. A., Valdez, C. O., Bruckner-Lea, C. J., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M., Nickerson, C. A. (2007). *In vitro* cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis* **13** (3): 396-403.
810. Streeter, P. R., Berg, E. L., Rouse, B. T., Bargatze, R. F., Butcher, E. C. (1988). A tissue specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* **331** (6151): 41-6.
811. Strömquist, M., Falk, P., Bergström, S., Hansson, L., Lonnerdal, B., Normark, S., Hernell, O. (1995). Human milk κ -casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **21** (3): 288-96.

-
812. Stuart, J., Norrell, S., Harrington, J. P. (1984). Kinetic effect of human lactoferrin on the growth of *Escherichia coli*. *J Biochem* **16** (10): 1043-7.
813. Stuart, R. L., Tan, K., Mahar, J. E., Kirkwood, C. D., Ramsden, A. C., Andranopoulos, N., Jolley, D., Bawden K., Doherty, R., Kotsanas, D., Bradford, J., Buttery, J. P. (2010). An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. *Pediatr Infect Dis* **29** (7): 644-7.
814. Subekti, D. S., Tjaniadi, P., Lesmana, M., McArdle, J., Iskandriati, D., Budiarsa, I. N., Walujo, P., Suparto, I. H., Winoto, I., Campbell, J. R., Porter, K. R., Sajuthi, D., Ansari, A. A., Oyoyo, B. A. (2002). Experimental infection of *Macaca nemestrina* with a Toronto Norwalk-like virus of epidemic viral gastroenteritis. *J Med Virol* **66** (3): 400-6.
815. Sugieda, M., Nagaoka, H., Kakishima, Y., Ohshita, T., Nakamura, S., Nakajima, S. (1998). Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum content of pigs. *Arch Virol* **143** (6): 1215-21.
816. Sugieda, M., Nakajima, K., Nakajima, S. (1996). Outbreaks of Norwalk-like viruses associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiol Infect* **116** (3): 339-46.
817. Sumpter, R. Jr., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M., Gale, M. Jr. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* **79** (5): 2689-99.
818. Svraka, S., Vennema, H., van der Veer, B., Hedlund, K., Thorhagen, M., Siebenga, J., Duizer, E., Koopmans, M. (2010). Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. *J of Clin Microbiol* **41** (8): 2191-98.
819. Szajewska, H., Setty, M., Mrukowicz, J., Guandalini, S. (2006). Probiotics in Gastrointestinal Diseases in Children: Hard and Not-So-Hard Evidence of efficacy. *J of Pediatr Gastroenterol Nutr* **42** (5): 454-75.
820. Szajewska, H., Skorka, A., Ruszczyński, M., Gieruszczak-Bialek, D., Dylag, M. (2007). Meta-analysis: *Lactobacillus GG* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacology Therapeutics* **25** (3): 257-64.
821. Tacket, C. O., Mason, H. S., Losonsky, G., Estes, M. K., Levine, M. M., Arntzen, C. J. (2000). Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J of Infect Dis* **182** (1): 302-5.
822. Tacket, C. O., Sztein, M. B., Losonky, G. A., Wasserman, S. S., Estes, M. K. (2003). Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol* **108** (3): 241-7.
823. Takeuchi, O., Akira, S. (2007). Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev* **220**: 214-224.

-
824. Takkinen, J. (2006). Recent norovirus outbreaks on river and seagoing cruise ships in Europe. *Euro Surveill* **11** (7): E060706.5.
825. Tamura, M., Natori, K., Kobayashi, M., Miyamura, T., Takeda, N. (2004). Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J Virol* **78** (8): 3817-26.
826. Tamura, M., Natori, K., Kobayashi, M., Miyamura, T., Takeda, N. (2000). Interaction of recombinant Norwalk virus particles with the 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. *J Virol* **74** (24): 11589-97.
827. Tan, M., Huang, P., Meller, J., Zhong, W., Farkas, T., Jiang, X. (2003). Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol* **77** (23): 12562-71.
828. Tan, M., Jiang, X. (2005a). Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis* **191** (5): 749-54.
829. Tan, M., Jiang, X. (2005b). Norovirus and histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* **13** (6): 285-93.
830. Tan, M., Jiang, X. (2005c). The P domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* **79** (22): 14017-30.
831. Tan, M., Meller, J., Jiang, X. (2006). C-terminal arginine cluster is essential for receptor binding of norovirus capsid protein. *J Virol* **80** (15): 7322-31.
832. Tan, M., Xia, M., Chen, Y., Bu, W., Hedge, R. S., Meller, J., Li, X. (2009). Conservation of carbohydrate binding interfaces evidence of human HBGA selection in norovirus. *PLoS ONE* **4** (4): e5058.
833. Tan, M., Zhong, W., Song, D., Thornton, S., Jiang, X. (2004). E. coli-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *J Med Virol* **74** (4): 641-9.
834. Teichberg, S., Wapnir, R. A., Moyses, J., Lifshitz, F. (1992). Development of the neonatal rat small intestine barrier to nonspecific macromolecular absorption. II. Role of dietary corticosterone. *Pediatr Res* **32** (1): 50-7.
835. Ternhag, A., Asikainen, T., Giesecke, J., Ekdahl, K. (2007). A meta-analysis on the effects of antibiotic treatment on duration of symptoms caused by infection with *Campylobacter* species. *Clin Infect Dis* **44** (5): 696-700.
836. Thillainayagam, A., Hunt, J., Farthing, M. (1998). Enhancing clinical efficacy of oral rehydration therapy: is low osmolality the key? *Gastroenterol* **114** (1): 197-210.

-
837. Thoren, A., Wolde-Mariam, T., Stintzing, G., Wadström, T., Habte, D. (1980). Antibiotics in the treatment of gastroenteritis caused by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **141** (1): 27-31.
838. Thormar, H., Isaacs, C. E., Brown, H. R., Barshatzky, M. R., Pessolano, T. (1987). Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Am Soc Microbiol* **31** (1): 27-31.
839. Thornhill, T. S., Kalica, A. R., Wyatt, R. G., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M. (1975). Pattern of shedding of the Norwalk particle in stools during experimentally induced gastroenteritis in volunteers as determined by immune electron microscopy. *J Infect Dis* **132** (1): 28-34.
840. Thornhill, T. S., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Dolin, R., Chanock, R. M., Kapikian, A. Z. (1977). Detection by immune electron microscopy of 26 to 27-nm virus-like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* **135** (1): 20-7.
841. Thorpe, L. W., Rudloff, H. E., Powell, L. C., Goldman, A. S. (1986). Decreased response of human milk leukocytes to chemoattractant peptides. *Pediatr Res* **20** (4): 373-7.
842. Thorven, M., Grahn, A., Hedlund, K.O., Johansson, H., Wahlfrid, C., Larson, G., Svensson, L. (2005). A homozygous nonsense mutation (428G-A) in the human secretor (FUT 2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J of Virol* **79** (24): 15351-5.
843. Thumfart, J. O., Meyers, G. (2002). Feline Calicivirus: recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of cRNA or cDNA constructs. *J Virol* **76** (12): 6398-407.
844. Thurl, S., Henker, J., Siegel, M., Tovar, K., Sawatzki, G. (1997). Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides. *Glycoconj J* **14** (7): 795-99.
845. Thurl, S., Werner, B. M., Sawatzki, G. (1996). Quantification of individual oligosaccharides compounds from human milk using high-pH anion exchange chromatography. *Ann Biochem* **235** (2): 202-6.
846. Tian, X.F., Li, Z.J., Wang, B.J., Ding, M., Xuan, J.F., Xing, J.X., Li, C.M., Pang, H.Fa. (2009). Polymorphic distribution of FUT2/01 in northern Han Chinese population. *Yi Xue Za Zhi* **25** (5):345-7.
847. Tissier, H. (1905). Repartition des microbes dans l'intestin du nourisson. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **19** (15-17): 109-23.
848. Toivanen, P., Rossi, T., Hirvonen, T. (1969). Immunoglobulins in human fetal sera at different stages of gestation. *Experimentia* **25** (5): 527-28.
849. Tompkins, D. S., Hudson, M. J., Smith, H. R., Eglin, R. P., Wheeler, J. G., Brett, M. M., Owen, R. J., Brazier, J. S., Cumberland, P., King, V., Cook, P. E. (1992). A study of infectious intestinal

-
- disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Commun Dis Public Health* **2**: 108-13.
850. Tong, M. J., Martin, D. G., Cunningham, J. J., Gunning, J. J. (1970). Clinical and bacteriological evaluation of antibiotic in Shigellosis. *JAMA* **214** (10): 1841-4.
851. Totterdell, B. M., Chrystie, I. L., Banatvala, J. E. (1976). Rotavirus infection in a maternity unit. *Arch Dis Child* **51**: 924.
852. Treanor, J. J., Dolin, R. (2005). Noroviruses and other Caliciviruses. En "Principles and Practice of Infectious Diseases". 6^a ed. (Mandell, G. L., Benett, J. E., Dolin, R., eds.). Philadelphia: Churchill Livingstones; 2194-9.
853. Treanor, J. J., Jiang, X., Madore, H. P., Estes, M. K. (1993). Subclass specific serum antibody responses to recombinant Norwalk virus capsid antigen (rNV) in adults infected with Norwalk, Snow Mountain, or Hawaii virus. *J Clin Microbiol* **31** (6): 1630-4.
854. Treanor, J. J., Madore, H. P., Dolin, R. (1986). Development of a monoclonal antibody to the Snow Mountain agent of gastroenteritis (abstract 109). En "Program and Abstracts of the 26th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy". Washington, DC: American Society for Microbiology.
855. Treviño, M., Prieto, E., Peñalver, M. D., Aguilera, A., García-Zabarte, A., García-Riestra, C., Regueiro, B. J. (2001). Diarrea por adenovirus y astrovirus en pacientes inmunodeficientes hospitalizados. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **19** (1): 7-10.
856. Tsuda, H., Dickey, W. D., Goldman, A. S. (1984a). Separation of human colostrum macrophages and neutrophils on gelatin and collagen-serum substrata. *Cell Struct Funct* **8** (4): 367-71.
857. Tsuda, H., Takeshige, K., Shibata, Y., Minakami, S. (1984b). Oxygen metabolism of human colostrum macrophages. *J Biochem* **95**: 1237.
858. Tsugawa, T., Numata-Kinoshita, K., Honma, S., Nakata, S., Tatsumi, M., Sakai, Y., Natori, K., Takeda, N., Kobayashi, S., Tstsumi, H., Sakai, Y., Natori, K., Takeda, N., Kobayashi, S., Tsutsumi, H. (2006). Virological, serological, and clinical features of an outbreak of acute gastroenteritis due to recombinant genogroup II norovirus in an infant home. *J of Clin Microbiol* **44** (1): 177-182.
859. Tu, E. T., Nguyen, T., Lee, P. Bull, R. A., Musto, J., Hansman, G., White, P. A., Rawlinson, W. D., McIver, C. J. (2007). Norovirus GII.4 strains and outbreaks, Australia. *Emerg Infect Dis* **13** (7): 1128-30.
860. Tucker, A. W., Haddix, A. C., Breese, J. S., Holman, R. C., Parashar, U. D., Glass, R. I. (1998). Cost effectiveness analysis of rotavirus immunization program in the United States. *JAMA* **279**: 1371-76.

-
861. Turcios, R. M., Widdowson, M. A., Sulka, A. C., Mead, P. S., Glass, R. I. (2006). Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. *Clin Infect Dis* **42** (7): 964-9.
862. Turcios-Ruiz, R. M., Axelrod, P., St John, K., Bullitt, E., Donahue, J., Robinson, N., Friis, H. E. (2008). Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr* **153** (3): 339-44.
863. Underdown, B. J., Knight, A., Papsin, F. R. (1976). The relative paucity of IgE in human milk. *J Immunol* **116** (5): 1435-8.
864. Van der Poel, W. H., Vinje, J., van der Heide, R., Herrera, M. I., Vivo, A., Koopmans, M. P. (2000). Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* **6** (1): 36-41.
865. Van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T. B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* **3** (9): 697-709.
866. Van Leeuwenhoek, A. (1965). In “*Arcana naturae detecta delphis batavorum. Apud Henricum a Krooneveld*”. **Epistola 106**.
867. Van Niel, C. W., Feudtner, C., Garrison, M. M., Christakis, D. A. (2002). Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* **109** (4): 678-84.
868. Vanderhoof, J., Young, R. (2002). Probiotics in Pediatrics. *Pediatrics* **109** (1): 956-8.
869. Varki, A. (1997). Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest* **99** (2): 158-62.
870. Veereman-Wauters, G., Taminiu, J. (2006). Diarrhea. En “*Pediatric Gastroenterology and Liver Disease. Pathophysiology, Diagnosis and Management*”. 3^a ed. (Willie, R., Hyams, J. S., Kay, M., eds.). The Netherlands; 151-168.
871. Veerhuis, R., Kijlstra, A. (1982). Inhibition of hemolytic complement activity by lactoferrin in tears. *Exp Eye Res* **34** (2): 257-65.
872. Venkataram Prasad, B. V., Hardy, M. E., Estes, M. K. (2000). Structural studies of recombinant Norwalk capsids. *J Infect Dis* **181** (2): 317-21.
873. Venkataram Prasad, B. V., Rothnagel, R., Jiang, X., Estes, M. K. (1994). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol* **68** (8): 5117-25.
874. Vicente, D., Cilla, G., Montes, M., Pérez-Yarza, E. G., Pérez-Trallero, E. (2007). Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* **13** (4): 636-7.
875. Victoria, C., Bryce, J., Fontaine, O., Monasch, R. (2000). Reducing deaths from diarrhea through oral rehydration therapy. *Bull World Health Organ* **78** (10): 1246-55.
876. Victoria, C., Util, S., Fuchs, S., Nobre, L. C., Barros, F. C. (1992). Deaths due to dysentery, acute and persistent diarrhea among Brazilian infants. *Acta Paediatr* **381**: 7-11.

-
877. Victoria, M., Carvalho-Costa, F. A., Heinemann, M. B., Leite, J. P., Miagostovich, M. P. (2007). Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* **79** (7): 939-44.
878. Vidal, R., Solari, V., Mamani, N., Jiang, X., Vollaire, J., Roessler, P., Prado, V., Matson, D. O., O'Ryan, M. L. (2005). Caliciviruses and foodborne gastroenteritis, Chile. *Emerg Infect Dis* **11** (7): 1134-7.
879. Vinje, J., Altena, S. A., Koopmans, M. P. (1997). The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* **176** (5): 1374-8.
880. Vinjé, J., Green, J., Lewis, D. C., Gallimore, C. I., Brown, D. W., Koopmans, M. P. (2000a). Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch Virol* **145** (2): 223-41.
881. Vinjé, J., Koopmans, M. P. (1996). Molecular detection and epidemiology of small-round structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* **174** (3): 610-5.
882. Vinjé, J., Koopmans, M. P. G. (2000b). Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J of Clin Microbiol* **38** (7): 2595-601.
883. Vinje, J., Vennema, H., Maunula, L., von Bonsdorff, C. H., Hoehne, M., Schreier, E., Richards, A., Green, J., Brown, D., Beard, S. S., Monroe, S. S., de Bruin, E., Svensson, L., Koopmans, M. P. (2003). International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol* **41** (4): 1423-33.
884. Viverge, D., Grimmonprez, L., Cassanas, G., Bardet, L., Solere, M. (1990). Discriminant carbohydrate components of human milk according to donor secretor types. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **11** (3): 365-70.
885. Von Ehrlich, P. (1891). Experimentelle untersuchungen über Immunität. I Über ricin. *Deutschen Medicinischen Wochenschrift* **32**: 1.
886. Von Liebig, J. (1865). Suppe für Säuglinge. *Braunschweig*. Ed. Friedrich Boewig und Sohn.
887. Walker, C. L., Bhutta, Z. A., Bhandari, N., Teka, T., Shahid, F., Taneja, S., Black, R. E. (2007). Zinc during and in convalescence from diarrhea has no demonstrable effect on subsequent morbidity and anthropometric status among infants < 6 mo of age. *Am J Clin Nutr* **85** (3): 887-94.
888. Walker-Smith, J. A. (1990). Management of infantile gastroenteritis. *Arch Dis Child* **65**: 917-918.
889. Walker-Smith, J. A. (1994). Intractable diarrhoea in infancy: a continuing challenge for the Paediatric Gastroenterologist. *Acta Paediatr* **83** (395): 6-9.

-
890. Walker-Smith, J. A., Sandhu, B. K., Isolauri, E. (1997). Guidelines prepared by the ESPHGAN Working Group on Acute Diarrhoea. Recommendations for feeding in childhood gastroenteritis. Medical position paper on behalf of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **24** (1-2): 619-20.
891. Walker-Smith, J., Murch, S., eds. (1999). Gastroenteritis and its sequelae. En "Diseases of the Small intestine in Childhood". 4^a ed. Oxford: Isis medical Media; 119-94.
892. Wang, J., Jiang, X., Madore, H. P., Gray, J., Desselberger, U., Ando, T., Seto, Y., Oishi, I., Lew, J. F., Green, K. Y., Estes, M. K. (1994). Sequence diversity of small round structured viruses. *J Virol* **68**: 5982-90.
893. Wapnir, R. A., Lifshitz, F. (1985). Osmolality and solute concentration, their relationship with oral rehydration solution effectiveness: an experimental assessment. *Ped Res* **19** (9): 894-8.
894. Ward, R. L., Knowlton, D. R., Greenberg, H. B., Schiff, G. M., Bernstein, D. I. (1990). Serum neutralizing antibody to VP4 and VP7 proteins in infants following vaccination with WC3 bovine rotavirus. *J of Virol* **64**(6): 2687-91.
895. Weaver, E. A., Goldblum, R. M., Davis, C. P., Goldman, A. S. (1981). Enhanced immunoglobulin A release from human colostrual cells during phagocytosis. *Infect Immun* **34** (2): 498-502.
896. Weiler, I. L., Hickler, W., Sprenger, R. (1983). Demonstartion that milk cells invade the neonatal mouse. *Am J Reprod Immunol* **4** (2): 95-8.
897. Weisz-Carrington, P., Roux, M. E., McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J. M., Lamm, M. E. (1978). Hormonal induction of the secretory immune system in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* **75** (6): 2928-32.
898. Welsh, J. K., Arsenakis, M., Coelen, R. J., May, J. T. (1979). Effect of antiviral lipids, heat and freezing on the activity of viruses in human milk. *J Infect Dis* **140** (3): 332-8.
899. White, K. E., Osterholm, M. T., Mariotti, J. A., Korlath, J. A., Lawrence, D. H., Ristinen, T. L., Greenberg, H. B. (1986). A foodborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis. Evidence for post-recovery transmission. *Am J Epidemiol* **124** (1): 120-6.
900. White, L. J., Ball, J. M., Hardy, M. E., Tanaka, T. N., Kitamoto, N., Estes, M. K. (1996). Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *J Virol* **70** (10): 6589-97.
901. Whitmore, A. C., Prowse, D. M., Haughton, G., Arnold, L. W. (1991). Ig isotype switching in B lymphocytes. The effect of T-cell derived interleukins, cytokins, cholera toxin, and antigen on isotype switch frequency of a cloned B cell lymphoma. *Int Immunol* **3** (1): 95-103.

-
902. Widdowson, E. M., Colombo, V., Artavanis, C. (1976). Changes in the organs of pigs in response to feeding for the first 24 hours after birth. II. The digestive tract. *Biol Neonate* **28** (5-6): 272-82.
903. Widdowson, M. A., Breese, J. R., Genstch, J. R., Glass, R. I. (2005a). Rotavirus disease and its prevention. *Curr Opin Gastroenterol* **21** (1): 26-31.
904. Widdowson, M. A., Cramer, E. H., Hadley, L., Breese, J. S., Beard, R. S., Bulens, S. N., Charles, M., Chege, W., Isakbaeva, E., Wright, J. G., Mintz, E., Forney, D., Massey, J., Glass, R. I., Monroe, S. S. (2004). Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus. United States, 2002. *Infect Dis* **190** (1): 27-36.
905. Widdowson, M. A., Sulka, A., Bulens, S. N., Beard, R. S., Chaves, S. S., Hammond, R., Salehi, E. D., Swanson, E., Totaro, J., Woron, R., Mead, P. S., Breese, J. S., Monroe, S. S., Glass, R. I. (2005b). Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg Infect Dis* **11** (1): 95-102.
906. Widerlite, L., Trier, J. S., Blacklow, N. R., Schreiber, D. S. (1975). Structure of the gastric mucosa in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Gastroenterology* **68** (3): 425-30.
907. Wiechers, C., Bissinger, A. L., Hamprecht, K., Kimmig, P., Jahn, G., Poets, C. F. (2008). Apparently non-specific results found using a norovirus antigen immunoassay for fecal specimens from neonates. *J Perinatol* **28** (1): 79-81.
908. Wilhelmi, J., Román, E., Sánchez-Fauquier, A. (2003). Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* **9** (2): 247-62.
909. Wilson, C. B., Westall, J., Johnston, L., Lewis, D. B., Dower, S. K., Alpert, A. R. (1986). Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *J Clin Invest* **77** (3): 860-7.
910. Wilson, E. O., ed. (1980). En "Sociobiology: The New Synthesis". Cambridge, M. A: Harvard University Press.
911. Winberg, J., Wessner, G. (1971). Does breast milk protect against septicaemia in the newborn? *Lancet* **2** (7709): 1091-4.
912. Wirblich, C., Thiel, H. J., Meyers, G. (1996). Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from *in vitro* translation studies. *J Virol* **70** (11): 7974-83.
913. Wirt, D., Adkins, L. T., Palkowetz, K. H., Schmalstieg, F. C., Goldman, A. S. (1992). Activated-memory T lymphocytes in human milk. *Cytometry* **13** (3): 282-90.
914. Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K. O., Sosnovtsev, S., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y., Virgin, IV, H. W. (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* **2** (12): e432.

-
915. Wold, W., Horwitz, M. S. (2007). Adenoviruses. En "Fields Virology". 5^a ed. (Knippe, D. M., y Howley, P. M., eds.). Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2395-436.
916. Woodbury, R. M. (1922). The relation between breast and artificial feeding in infant mortality. *Am J Hyg* **2** (6): 668-7.
917. World Health Organisation. (1985). Persistent diarrhea in children. Geneva: WHO-Diarrheal disease control. *Bull World Health Organ* **85** (1): 1-9.
918. World Health Organisation. (2004). Clinical Management of acute diarrhea. Disponible en URL: <http://www.emro.who.int/cah/pdf/who_unicef_statement.pdf>. [Acceso 14 junio, 2010].
919. World Health Organisation. (2008a). Global burden of protein-energy malnutrition in the year 2000. Global Burden of Disease 2000. *Bull World Health Organ* **8**: 1-12.
920. World Health Organisation. (2008b). The Global Burden of Disease: 2004 update. Geneva (Switzerland): WHO Press. ISBN 9789241563710. Disponible en URL: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf. [Acceso 28 de mayo, 2010].
921. World Health Organisation. (2009). Progress on health-related Millennium Development Goals (MDGs). Disponible en URL: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs290/en/index.html>>. [Acceso 31 de mayo, 2010].
922. World Health Organisation. Department of Child and Adolescent Health and Development. (2006). Reduced osmolarity oral rehydration salts (ORS) formulation. Report from a meeting of experts jointly organized by UNICEF and WHO. WHO/FCH/CAH/01.22. Disponible en URL: <<http://rehydrate.org/ors/low-osmolarity-ors.htm>>. [Acceso 9 junio, 2010].
923. Wu, H. M., Fornek, M., Schwab, K. J., Chapin, A. R., Gibson, K., Schwab, E., Spencer, C., Henning, K. (2005). A norovirus outbreak at a long term-care facility: the role of environmental surface contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26** (1): 802-10.
924. Wyatt, R. G., Dolin, R., Blacklow, N. R., DuPont, H. L., Buscho, R. F., Thornhill, T. S., Kapikian, A. Z., Chanock, R. M. (1974). Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* **129** (6): 709-14.
925. Wyatt, R. G., Greenberg, H. B., Dalgard, D. W., Allen, W. P., Sly, D. L., Thornhill, T. S., Chanock, R. M., Kapikian, A. Z. (1978). Experimental infection of chimpanzees with the Norwalk agent of epidemic viral gastroenteritis. *J Med Virol* **2** (2): 89-96.
926. Wyatt, R. G., Kapikian, A. Z. (1977). Viral agents associated with acute gastroenteritis in humans. *Am J Clin Nutr* **30**: 1857-70.
927. Wyatt, R. G., Mata, L. J. (1969). Bacteria in colostrum and milk in Guatemalan Indian women. *J Trop Pediatr* **15** (4): 159-62.

-
928. Yachie, A., Takano, N., Ohta, K., Uehara, T., Fujita, S., Miyawaki, T., Taniguchi, N. (1992). Defective production of interleukin-6 in very small premature infants in response to bacterial pathogens. *Infect Immun* **60** (3): 749-53.
929. Yamashita, T., Sugiyama, M., Tsuzuki, H., Sakae, Y., Suzuki, Y., Miyazaki, Y. (2000). Applications of reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the Picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J Clin Microbiol* **38** (8): 2955-61.
930. Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J., Ellison, R. T. (1993). Antibacterial activity of lactoferrin a pepsin-derived peptide fragment. *Infect Immun* **61** (2): 719-28.
931. Yan, L., Zhu, F., Xu, X., Hong, X., Lv, Q. (2005). Molecular basis for para-Bombay phenotypes in Chinese persons, including a novel nonfunctional FUT1 allele. *Transfusion* **45** (5): 725-30.
932. Yoda, T., Suzuki, Y., Terano, Y., Yamazaki, K., Sakon, N., Kuzuguchi, T., Oda, H., Tsukamoto, T. (2003). Precise characterization of norovirus (Norwalk-like virus)-specific monoclonal antibodies with broad reactivity. *J Clin Microbiol* **41** (6): 2367-71.
933. Yolken, R. H., Peterson, J. A., Vonderfecht, S. L., Fouts, E. T., Midthun, K., Newburg, D. S. (1992). Human milk mucin inhibits rotavirus replication prevents experimental gastroenteritis. *J Clin Invest* **90** (5): 1984-91.
934. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M. Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., Fujita, T. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175** (5): 2851-8.
935. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5** (7): 730-737.
936. Yu, V. Y., Jamieson, J., Bajuk, B. (1981). Breast milk feeding in very low birth weight infants. *Aust Pediatr J* **17** (3): 186-90.
937. Yunus, M. A., Chung, L. M. W., Chaudry, Y., Bailey, D., Goodfellow, I. (2010). Development of an optimized RNA-based murine norovirus reverse genetics system. *J Virol Meth* **169** (1): 112-8.
938. Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., Monroe, S. S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346** (2): 312-23.
939. Zimbabwe, Bangladesh, South Africa (Zimbasa). Dysentery Study Group. (2002). Multicenter randomised, double blind clinical trial of short courses versus standard course oral ciprofloxacin for *Shigella dysenteriae* in children. *Pediatr Infect Dis J* **21** (12): 1136-41.

-
- 940.Zingg, W., Colombo, C., Jucker, T., Bossart, W., Ruef, C. (2005). Impact of an outbreak of norovirus infection on hospital resources. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26** (3): 263-7.
- 941.Zintz, C., Bok, K., Parada, E., Barnes-Eley, M., Berke, T., Staat, M. A., Azimi, P., Jiang, X., Matson, D. O. (2005). Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Infect Gent Evol* **5** (3): 281-90.