

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA  
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA  
“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



Determinación fenotípica de antígeno H en muestras  
de saliva de una cohorte de recién nacidos.

Anniuska Suemy Toledo Cornejo

Tesis para obtener el título profesional de  
**Químico Farmacéutico**

Asesora: Q.F. PhD. Mónica Pajuelo Travezaño

Lima, Perú.

2019

## **JURADO EVALUADOR**

Presidente: Dra. Manuela Verástegui Pimentel

Vocal: Dr. Rubén Cueva Mestanza

Secretaria: Dra. Claudia Machicado Rivero

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanas por el apoyo incondicional y por enseñarme a siempre dar lo mejor de mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora, la Dra. Mónica Pajuelo, por ser una excelente mentora y darme seguridad en cada paso. A Edith Málaga, por todo el conocimiento brindado. Al equipo del laboratorio de Microbiología Molecular, dispuesto a ayudarme con todo lo que estuvo a su alcance. Finalmente, agradezco a mis amigos por sus palabras de aliento, consejos y compañía durante todo este camino.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	Introducción .....	1
1.1.	Norovirus.....	1
1.2.	Los HBGA y su relación con las fucosiltransferasas. ....	3
1.3.	Justificación .....	6
II.	Hipótesis .....	8
III.	Objetivos .....	8
3.1.	Objetivo general.....	8
3.2.	Objetivos específicos .....	8
IV.	Materiales y métodos.....	9
4.1.	Población de estudio.....	9
4.2.	Muestras biológicas.....	10
4.3.	Tamaño de muestra .....	11
4.4.	Colección de datos de infecciones .....	11
4.5.	Estandarización de ELISA .....	11
4.6.	Ensayos para evaluar la precisión de la prueba.....	13
4.7.	Procesamiento de muestras. ....	14
4.8.	Análisis de resultados .....	14
4.8.1.	Análisis estadístico .....	14
4.8.2.	Análisis de datos con los resultados de infección por NoV.....	15
V.	Resultados.....	17
5.1.	Estandarización de prueba ELISA.....	17
5.2.	Ensayos de precisión.....	20
5.3.	Evaluación de estado secretor .....	21
5.4.	Análisis de los resultados con las infecciones por NoV .....	23
VI.	Discusión .....	25
VII.	Limitaciones.....	31
VIII.	Conclusiones.....	32
IX.	Recomendaciones.....	33
X.	Referencias bibliográficas .....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Síntesis de antígenos histosanguíneos ABH y Lewis a partir del precursor tipo 1. ....	4
<b>Figura 2:</b> Flujograma de prueba ELISA directo para detectar antígeno H en muestra de saliva. ....	12
<b>Figura 3:</b> Evaluación de condiciones para estandarización de prueba ELISA. ....	19
<b>Figura 4:</b> Curva de calibración .....	20
<b>Figura 5:</b> Estructura del antígeno H1. ....	27

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Condiciones a analizar en la estandarización de la prueba ELISA. ....	17
<b>Tabla 2:</b> Densidades ópticas de evaluación de hervido de muestra a diferentes diluciones de conjugado y muestra. ....	18
<b>Tabla 3:</b> Valores de densidades ópticas de la evaluación del buffer de dilución, la dilución de conjugado y la dilución de la muestra. ....	19
<b>Tabla 4:</b> Datos de la prueba del ensayo de precisión. ....	21
<b>Tabla 5:</b> Densidades ópticas de muestras de niños no secretores. ....	21
<b>Tabla 6:</b> Proporción de secretores y no secretores. ....	22
<b>Tabla 7:</b> Infecciones correspondientes a no secretores. ....	23
<b>Tabla 8:</b> Relación entre estado secretor e infecciones por NoV. ....	24
<b>Tabla 9:</b> Relación entre el estado secretor y la presencia o ausencia de infecciones por el genogrupo GII. ....	24
<b>Tabla 10:</b> Relación entre el estado secretor y la presencia o ausencia de infecciones por el genogrupo GI. ....	25
<b>Tabla 11:</b> Relación entre el estado secretor y la presencia o ausencia de infecciones por el genogrupo GII.4. ....	25

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> .....	40
<b>Anexo 2</b> .....	41
<b>Anexo 3</b> .....	40
<b>Anexo 4</b> .....	40



## ABREVIATURAS

CV: Coeficiente de Variación

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ETEC: *Escherichia coli* Enterotoxigénica

GlcNAc: N-Acetilglucosamina

HBGA: Antígenos histosanguíneos

LLOQ: Límite inferior de cuantificación

NoV: Norovirus

OD: Densidad óptica.

ORF: Marco de lectura abierta

PBS: Buffer fosfato- Salino

UEA-I: Lectina *Ulex europaeus* agglutinin tipo I

ULOQ: Límite superior de cuantificación.

## RESUMEN

La adhesión de Norovirus a antígenos histosanguíneos (HBGA) encontrados en el epitelio intestinal, específicamente el antígeno H, causa gastroenteritis ocasionando anualmente gran número de hospitalizaciones y pérdidas monetarias. El precursor de los HBGA, es un disacárido que puede ser transformado a antígeno H mediante una  $\alpha$ 1-2fucosiltransferasa, la cual es codificada por el gen *FUT2*. Una persona que carece de antígeno H en fluidos por una posible mutación del gen *FUT 2*, es denominada no secretora. Los estudios relacionados a Norovirus en el Perú hasta el momento, no toman en cuenta la relación entre las infecciones y el estado secretor del individuo. Sin embargo, es de suma importancia ya que la presencia de antígeno H puede determinar cierta susceptibilidad o protección hacia el virus. El propósito de esta investigación es evaluar la expresión de antígeno H en muestras de saliva de una cohorte de recién nacidos de Villa el Salvador, con lo cual se podrá conocer el estado secretor y con ello la proporción de secretores y no secretores en la cohorte. A los niños incluidos en el estudio se les colectó muestras de saliva que fueron analizadas mediante una prueba de ELISA directo. Del análisis de las muestras de 335 niños, se encontró que 5 niños (1,49%) eran no secretores, de los cuales tres presentaron infecciones por Norovirus.

PALABRAS CLAVE: Norovirus, antígeno, histosanguíneo, secretor

## ABSTRACT

The adhesion of Norovirus to histoblood antigens (HBGAs) found at the intestinal epithelium, specifically antigens H, causes gastroenteritis generating a considerable number of hospitalizations and monetary losses every year. The precursor of the HBGA is a disaccharide-, that can be transformed into antigen H by a  $\alpha$ 1-2 fucosyltransferase-, and is codified by the *FUT2* gen. A person that lacks of antigen H, as a result of a possible mutation in *FUT2* gen is called a non-secretor. The studies related to norovirus in Peru do not consider the relation between the infections and the secretor status of the individual. However, this is very significant because the presence of antigen H can determinate the susceptibility or protection to the virus. The purpose of this investigation is to evaluate the expression of antigen H in saliva samples of a cohort of new borns from Villa el Salvador, with this data we will be able to determinate the secretor status and subsequently the proportion of secretors and no secretors at the cohort. Saliva samples were collected form the children included in the study and analyzed by a direct ELISA. From the analysis of samples from 335 children, 5 (1,49%) were non secretors, of which three had Norovirus infections.

KEY WORDS: Norovirus, antigen, histoblood, secretor

## I. Introducción

### 1.1. Norovirus

Norovirus (NoV) pertenece a la familia *Caliciviridae* y es el segundo entero patógeno no bacteriano más común causante de gastroenteritis severa en niños en países desarrollados y no desarrollados, encontrándose un puesto debajo de Rotavirus. Aunque, este último está disminuyendo su prevalencia después de la introducción de las vacunas; a diferencia de NoV, Rotavirus cuenta con vacunas eficaces y precalificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La efectividad de las inmunizaciones realizadas a lo largo de los años ha causado que en algunos países Norovirus esté reemplazando a Rotavirus como la primera causa de gastroenteritis viral (1).

Diarrea, náuseas, vómitos y fiebre son los signos y síntomas causados por la gastroenteritis, a la cual también se le denomina gripe estomacal. En el 2008, se estimó que anualmente en países desarrollados hay aproximadamente novecientos mil casos de gastroenteritis, en niños menores de cinco años causadas por NoV, que requieren visitas a un centro de salud, así como sesenta y cuatro mil hospitalizaciones por la misma razón. En el caso de los países en vías de desarrollo se calculó que por año hay hasta 1,1 millones de hospitalizaciones y doscientas dieciocho mil muertes (2). Además, se ha reportado que globalmente las infecciones por este patógeno ocasionan una pérdida monetaria de 60,3 billones de dólares anualmente entre gastos directos al sistema de salud y pérdidas de productividad (3). En el Perú, también se ha evaluado la epidemiología de este virus y se concluyó que hay alta prevalencia del mismo en poblaciones de niños y adultos (4,5). Una de las investigaciones realizadas encontró que, en una cohorte de niños estudiada durante dos años, el 80% se infectó con Norovirus

durante el primer año, llegando a tener hasta ocho infecciones terminadas el segundo año (4).

La transmisión de Norovirus puede darse por contacto entre personas, con superficies contaminadas o por contaminación en alimentos o aguas. Esto puede ser una explicación a su rápida propagación cuando se reportan nuevos brotes, especialmente en lugares como colegios, centros de cuidado a adultos mayores o centros de salud. Diversos factores influyen en la epidemiología del patógeno como la inmunidad de la población, la evolución del virus, el ambiente y la estación (1).

Norovirus posee un RNA de una sola hebra, el cual posee marcos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) que codifican para genes estructurales y no estructurales. El ORF1 forma proteínas no estructurales que son necesarias para la replicación; aunque, el proceso de replicación del virus aún no está caracterizado. El ORF2 codifica para la proteína estructural mayor de la cápside (VP1) y el ORF3 para la proteína estructural menor (VP2). Adicionalmente, VP1 se divide en los dominios de la cáscara interior (S) y los protuberantes (P1 y P2) que salen de la cáscara y de los cuales P2 es el que se encuentra en la parte más exterior de la superficie de la cápside (6,7).

Los avances genéticos recientes permiten dividir a Norovirus en cinco genogrupos diferentes (GI-GV) de los cuales el I, II y IV infectan a humanos. Los restantes se han encontrado en animales: el IV en caninos, el III en bovinos y el V en murinos (8). Los genogrupos se dividen a su vez en genotipos, esta distribución se realiza según la similitud de la cadena de nucleótidos. Cepas de un mismo genotipo tienen entre 69 a 97% de semejanza entre sus nucleótidos mientras que dentro de un mismo genogrupo habrá entre 51-56% de similaridad genética (9). Puede existir variaciones en el gen que codifica para la proteína estructural mayor de la cápside, lo que lleva a variantes dentro de un mismo genotipo (8), a las cuales se les nombra según el lugar donde el brote fue

identificado. GII.4 es el que, hasta el momento, tiene mayor cantidad de genotipos y variantes reconocidas (10), por este motivo no es sorprendente encontrar que sea el que causa la mayor cantidad de infecciones y el que se une a mayor cantidad de tipos de antígenos histosanguíneos (HBGA), los cuales se explicarán con mayor detalle a continuación (2,4,5).

## 1.2. Los HBGA y su relación con las fucosiltransferasas.

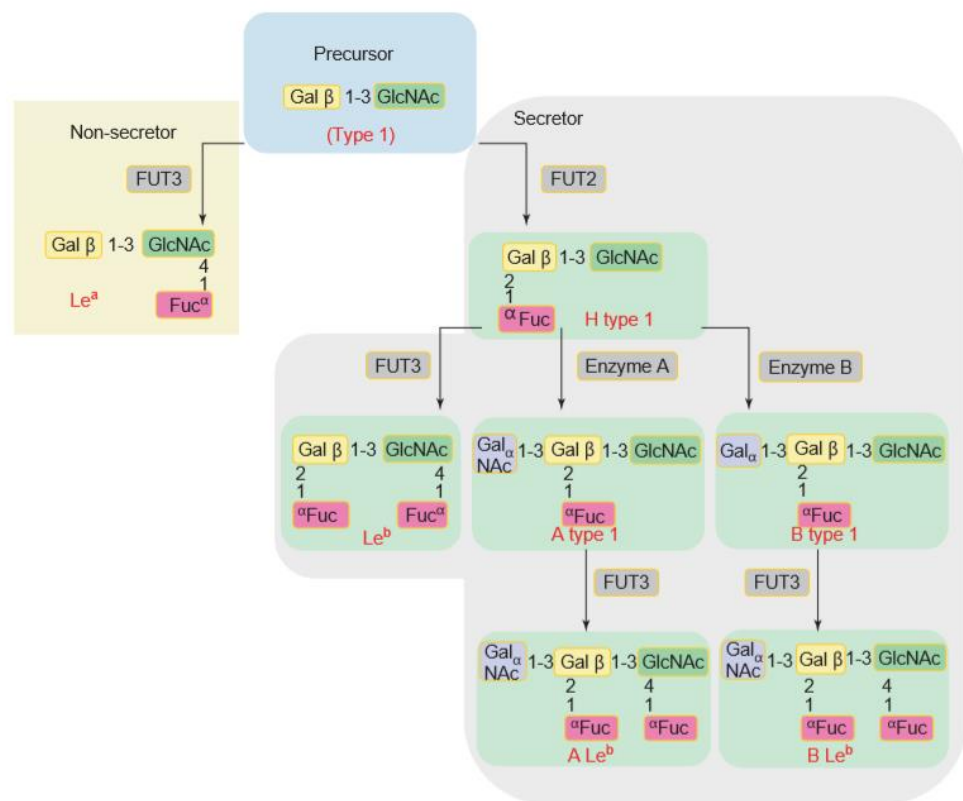
Los HBGA son carbohidratos complejos que se encuentran en forma de glicoproteínas o glicolípidos en los glóbulos rojos y el epitelio de mucosas, o de forma libre en fluidos como saliva, leche o contenido estomacal. Los HBGA determinan los tipos de sangre ABO, Lewis y secretor mediante glucosiltransferasas que adicionan monosacáridos a un precursor y que son codificadas por una familia de genes (11,12).

Los HBGA en los que nos enfocaremos son los del tipo ABH, los cuales determinan el estado secretor de una persona. Esto debido a que estudios han demostrado que Norovirus se une a este tipo de antígenos histosanguíneos, específicamente los del tipo H1 (13). Lo que significa que la presencia de antígeno H en el organismo, principalmente en el epitelio intestinal, favorece su adherencia y por lo tanto una infección por NoV (11,12,14).

Además del antígeno H1, el H2 también se ha descrito ampliamente. Ambos difieren entre sí por la estructura de la cual proceden: el antígeno H2 proviene del precursor tipo 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-R), el cual presenta una unión  $\beta$ 1-4 entre una galactosa y una N- acetilglucosamina (GlcNAc); mientras que el precursor tipo 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-R), posee un enlace  $\beta$ 1-3 uniendo también una galactosa y una GlcNAc (15).

Como ya se mencionó, los diferentes tipos de antígenos se sintetizan mediante la adición de mono o disacáridos al precursor.

Estos azúcares son añadidos por acción de una enzima  $\alpha$  fucosil transferasa codificada por la familia de genes *FUT*. De este grupo se destacan tres: el *FUT 1*, *FUT 2* y *FUT 3*. Los dos primeros son fucosil transferasas del tipo  $\alpha$ 1-2, la diferencia entre ellos es que *FUT 1* agrega una fucosa a la galactosa del precursor tipo 2 en glóbulos rojos para convertirlo en antígeno H2, mientras que *FUT 2* convierte al precursor tipo 1 presente en secreciones y en mucosa intestinal (16,17,18,19). Después del obtener el antígeno H, este puede transformarse a los ya conocidos antígenos A y B, por la unión de una galactosa N acetilada y una galactosa respectivamente. Por otro lado, *FUT 3*, adiciona una fucosa mediante enlaces  $\alpha$ 1-4 a la N-Acetilglucosamina presente en el precursor tipo 1 o el antígeno H1 para producir los antígenos Lewis (13) (Figura 1).



**Figura 1:** Síntesis de antígenos histosanguíneos ABH y Lewis a partir del precursor tipo 1 (20).

Se debe acotar que la presencia o ausencia de antígeno H en saliva y eritrocitos son independientes, esto se ha demostrado al hallar individuos que no presentan antígeno H en eritrocitos pero pueden tenerlos o no en saliva, los denominados fenotipo Bombay (19).

Por otro lado, una persona que tiene dos alelos no funcionales para el gen *FUT2*, no logra la transformación del precursor tipo 1 a antígeno H1. Mediante pruebas en saliva se puede determinar la presencia o ausencia de antígeno H, en caso no se encuentre antígeno en dicha muestra se dice que la persona es no secretora. Se asume que un no secretor no tendrá antígeno H ni en saliva ni en epitelio intestinal, ya que en ambas zonas se realiza el mismo proceso: el paso de precursor tipo 1 a antígeno H1, mediado por la misma fucosiltransferasa (15,19). La secreción de antígeno H es una característica dominante (13). Los polimorfismos que pueden ser encontrados en el *FUT2*, como la variante sin sentido G428A, causan un estado no secretor (14,21). Esta mutación en particular no ofrece protección definitiva ya que se ha encontrado el caso de un no secretor, con mutación en el aminoácido 428, que tuvo una infección por sintomática por NoV (14). Se debe agregar también que no todos los genotipos de Norovirus presentan el mismo patrón de unión a HBGA (22) y que el haber tenido una infección de cierto genotipo de NoV otorga una protección, a corto plazo y no contra otros genotipos (19).

A pesar de las similitudes en la estructura de los antígenos mencionados anteriormente, el H1 y H2, estos presentan una diferencia importante: el lugar en el cual se expresan mayormente. El antígeno tipo 1 lo hace principalmente en derivados de tejidos endodérmicos como el epitelio del revestimiento y el epitelio glandular del tracto digestivo; mientras que el de tipo 2 en derivados de tejidos ecto y meso dérmicos, estos incluyen la piel y los eritrocitos (23). En la unión gastroduodenal, que es el lugar donde



se da la unión de NoV, H1 puede ser encontrado a nivel de la superficie epitelial mientras que H2 a nivel glandular (24).

Ya que el antígeno de tipo 1 es el que se encuentra en el tracto digestivo y es al cual Norovirus se une específicamente, (13,23) este es el que se detectó en la presente investigación, mediante la lectina *Ulex europaeus* agglutinin tipo I (UEA-I). Esta lectina reconoce fuertemente los enlaces  $\alpha$  1-2 cuando se encuentran especialmente en posiciones subterminales de la molécula, como es el caso de la estructura del antígeno H1. En caso la estructura presente enlaces en la parte interna o tenga fucosas pero unidas mediante enlaces tipo  $\alpha$  1-3,  $\alpha$  1-6, la UEA-I no los reconocerá (25).

La presencia de antígenos H en el sistema digestivo, es decir, el estado secretor es asociado a la susceptibilidad o resistencia a patógenos como Rotavirus (26), y Norovirus y *Escherichia Coli* enterotoxigénica (ETEC) (21). En el caso de los dos primeros, la presencia de antígeno en saliva se vincula a una mayor probabilidad de ser infectado con el patógeno. Por otro lado, lo contrario ocurre con ETEC, un no secretor es más susceptible a infectarse.

Para NoV específicamente la interacción proteína-carbohidrato que se da entre la cápside viral y los HBGAs es primordial en la asociación del virus a la unión gastroduodenal, lo que podría determinar si una persona llega a ser infectada o no (13,20).

### 1.3. Justificación

Diversas investigaciones a nivel mundial han estudiado poblaciones y descrito la relación entre las infecciones por Norovirus, sus genotipos, y los episodios de diarrea (2). Pero son pocos los que hacen hincapié en evaluar también de manera precisa el estado secretor de las personas analizadas.

Una de las primeras investigaciones en el tema determinó que el 80% de una población Europea es secretora; sin embargo, estos

datos han sido basados en individuos caucásicos y como se sabe la genética entre diferentes grupos étnicos es extremadamente variable (27). Por ejemplo; un estudio realizado en diferentes localidades peruanas, incluyendo Lima, encontró que al menos un 17% de la ascendencia genética proviene de otros continentes, principalmente Europa (28). Con estos datos se puede inferir que genéticamente la población peruana es mestiza.

El presente estudio nos dará información relevante acerca del estado secretor en una población cuya raza es muy distinta a la europea.

Adicionalmente, el porcentaje de secretores y no secretores podrá ser relacionado con el número de infecciones encontradas en la cohorte para determinar si hay una relación importante entre ellas.

Finalmente, los resultados encontrados servirán como referencia para futuras investigaciones en el país ya que estos datos son relevantes para el estudio de la inmunología y genética asociada al virus.

## II. Hipótesis

La proporción de secretores de antígeno H será mayor al 80% sabiendo que esta característica es un rasgo dominante y que la población peruana es mestiza.

## III. Objetivos

### 3.1. Objetivo general

Evaluar la presencia de antígeno H en muestras de saliva de una cohorte de recién nacidos mediante una prueba ELISA.

### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar el estado secretor de antígeno H en una cohorte de recién nacidos peruanos.
- Estimar la proporción de personas secretoras y no secretoras en una cohorte de recién nacidos peruanos.
- Analizar la relación entre el estado secretor y las infecciones por NoV en una cohorte de recién nacidos peruanos.

#### IV. Materiales y métodos

El presente trabajo tiene como objetivo conocer la prevalencia del antígeno H en saliva mediante un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA); el cual nos dio valores de densidad óptica (OD), que fueron analizados para determinar la proporción de secretores y no secretores en la población. A continuación, se describe a la población estudiada y los procedimientos realizados.

##### 4.1. Población de estudio

La población estudiada son niños incluidos en el proyecto de investigación “La infección natural de norovirus y sapovirus en una comunidad periurbana del Perú”, con código SIDISI 65178, aprobado por el comité de ética de la UPCH (Anexo 4). Para el reclutamiento de los participantes, se realizó un tamizaje inicial en la comunidad de Oasis, distrito de Villa el Salvador y en centros de salud cercanos para identificar a madres embarazadas; a las cuales se les informó del estudio en detalle y se las invitó a participar del mismo. Se hizo un seguimiento hasta el nacimiento y se incorporaron 357 niños recién nacidos al estudio desde febrero del 2016 hasta junio del 2017, de los cuales 185 eran mujeres y 172 eran varones.

Los criterios de inclusión para los niños fueron los siguientes:

- Haber nacido en los 28 días del reclutamiento
- Vivir en el área de estudio.
- Padre o tutor leal haya dado su consentimiento.

De la misma manera, los criterios de exclusión fueron:

- Enfermedad grave que requiere hospitalización o cualquier otra condición grave o crónica.
- Enfermedades congénitas.
- Enfermedades neonatales.

- VIH/SIDA en la madre o niño.
- Fibrosis quística diagnosticada.
- Enteropatía diagnosticada.
- Embarazo múltiple.
- Peso al nacer menor a 1500 g.
- Aceptar parcialmente la participación en el estudio.
- Incapacidad de la madre o tutor de dar consentimiento.
- Madre no dispuesta a participar del estudio.

#### 4.2. Muestras biológicas

Se analizaron muestras de saliva colectadas como parte del proyecto con código SIDISI 65178 “La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú”. A los recién nacidos se les realizó un seguimiento desde su nacimiento hasta los dos años de edad, tiempo durante el cual se les colectó saliva mensualmente. Estas estuvieron almacenadas a -4°C hasta el momento de su evaluación. Se reclutaron 357 niños en el estudio; sin embargo, solo se obtuvo muestras de saliva de 335 de ellos ya que algunos se retiraron al poco tiempo de comenzado el proyecto.

De las muestras evaluadas, 35 de ellas (10,4%) fueron tomadas en un periodo simultáneo al de lactancia, es decir entre los primeros seis meses de edad. Los controles positivos y negativos pertenecían a personas adultas que donaron muestra de saliva voluntariamente. El control positivo se identificó como una reacción colorimétrica positiva en la prueba ELISA. Ésta fue usada para las pruebas de estandarización, precisión y como control positivo hasta el final de la investigación. En el caso del control negativo, este fue encontrado después de la evaluación de diversas muestras hasta hallar aquella que no daba reacción colorimétrica, lo que indica la ausencia de antígeno H.

#### 4.3. Tamaño de muestra

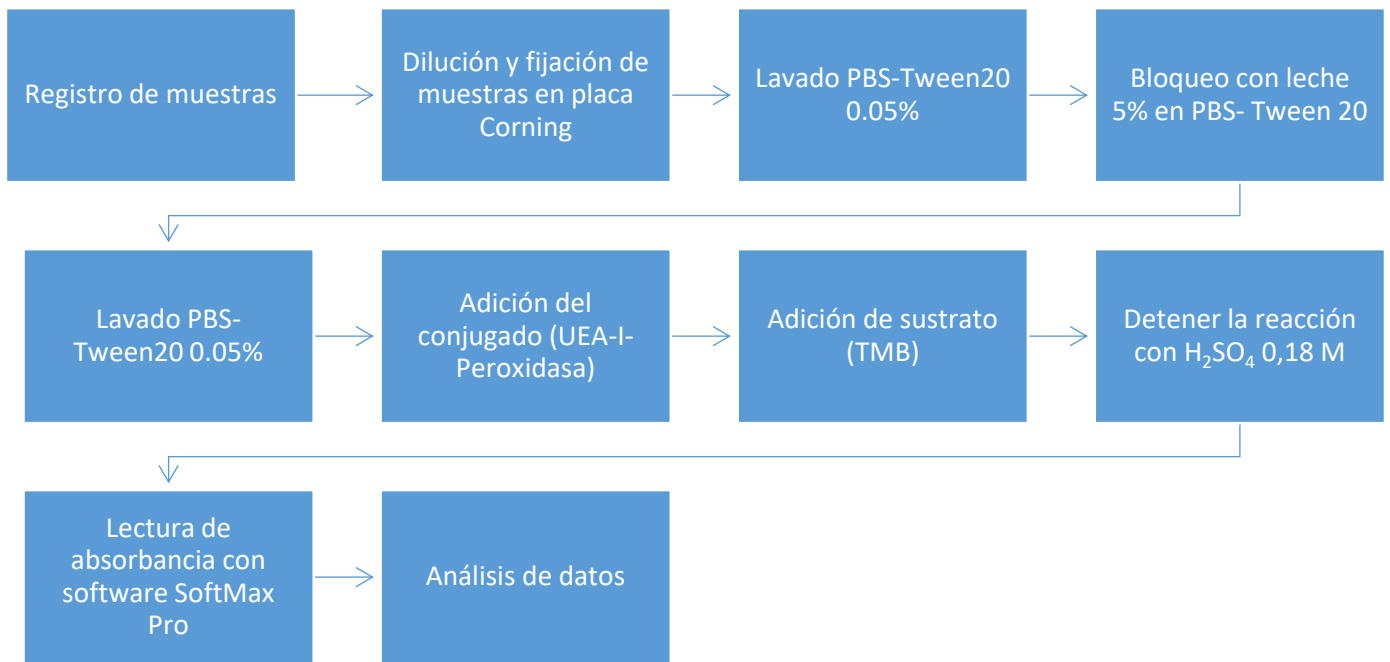
Se analizó el máximo número de muestras posible, las 335 muestras de saliva obtenidas. Mediante el programa EPIDAT 4.2 se calculó la potencia estadística teniendo en cuenta que por cada persona no secretora habrá por lo menos cuatro personas secretoras en la cohorte. Además, se consideró que el 20% de los secretores y el 5% de los no secretores se infectará por Norovirus (29). Finalmente, se determinó que la potencia estadística era de 93,7%.

#### 4.4. Colección de datos de infecciones

Del proyecto “La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú” con código SIDISI 65178 se obtuvo datos de la ausencia o presencia de infecciones por Norovirus, así como los genotipos del virus, en caso este haya sido detectado en los niños.

#### 4.5. Estandarización de ELISA

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) empleado es del tipo directo. El procedimiento estandarizado y explicado a continuación está basado en el protocolo descrito por Nordgren y col (30).



**Figura 2:** *Flujograma de prueba ELISA directo para detectar antígeno H en muestra de saliva.*

El primer paso por evaluar en la estandarización fue la dilución de muestras, donde se puso a prueba tres variables: realizar un baño maría a las muestras, el tampón de dilución y la dilución tanto de las muestras como del conjugado. En el primer caso se probó si el hervir la saliva durante cinco minutos permitía una mejor absorbancia en los pocillos, ya que este proceso elimina otros componentes que podrían causar interferencias. Después, se evaluaron dos tipos de tampón para la dilución de la muestra o también llamados Coating buffers: el carbonato bicarbonato y el fosfato salino (PBS). En el caso de la dilución de la muestra se ensayó concentraciones de 1/400, 1/800, 1/1000, 1/1500, 1/1600 y 1/3200.

Con la saliva diluida se recubrieron micro placas de 96 pocillos de fondo plano (*Corning*), las cuales ofrecen alta unión a biomoléculas de mediano y gran tamaño. Se dejó incubar a 4°C toda la noche (aproximadamente 14 horas). Los lavados subsiguientes se realizan por quintuplicado con PBS 1X y Tween 20 al 0.05%. El

siguiente paso fue el bloqueo con PBS-Tween 0.05% y leche descremada (*Instant Nonfat Dry Milk Nestle Carnation*) al 5%, mezcla a la que se denomina Blotto. Se incubó por una hora a 37°C en una cámara húmeda y se realizan los lavados correspondientes. Posteriormente, se agregó un conjugado compuesto de la lectina Ulex european agglutinin (UEA-I), la cual es específica para el enlace  $\alpha$ 1,2 con un grupo fucosa; marcada con peroxidasa de rábano (HRP) diluido en Blotto. Para el conjugado se ensayaron concentraciones de 1/500, 1/1000, 1/5000 y 1/10000. Después de la incubación a 37°C y los lavados, se agregó tetrametilbencidina (TMB substrate kit; Thermo Scientific) como sustrato. Luego de 10 minutos se detuvo la reacción con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,18 M. Finalmente, la absorbancia de cada uno de los pocillos fue leída a 450nm en una lectora de placas ELISA, mediante el programa SoftMax Pro.

Cabe resaltar que cada una de las muestras fue evaluada por duplicado. Adicionalmente, en cada una de las placas se incluyó pocillos con controles negativos, controles positivos y tampón de dilución para comprobar el desempeño de la prueba, como contaminación de la placa o falsos positivos.

#### 4.6. Ensayos para evaluar la precisión de la prueba.

Se realizó dos tipos de ensayo para evaluar la reproductibilidad de las mediciones, es decir, la precisión. El primero, es el intra ensayo; en este se evaluaron las mediciones en una misma placa por lo que se analizaron por quintuplicado cinco muestras a cinco diferentes diluciones: Límite inferior de cuantificación (LLOQ), concentración baja, concentración media, concentración alta y límite superior de cuantificación (ULOQ), para encontrar el valor de las diluciones que se usarían para cada concentración se realizó una curva de calibración. Luego, para el inter ensayo el esquema de cada placa



es el mismo que el descrito para el intra ensayo pero se realizaron seis corridas de las mismas muestras en tres días diferentes.

#### 4.7. Procesamiento de muestras.

Para evaluar el estado secretor en las muestras se utilizó el procedimiento descrito anteriormente, ya estandarizado. En este caso, adicionalmente a los controles correspondientes, cada una de las muestras iba acompañada de un pocillo en el que se incubó el antígeno, pero se omitió agregar el conjugado, de esta manera se comprobó que las muestras no dieran un falso positivo.

Se consideraron resultados positivos aquellos pocillos que resultaban con valores de OD superiores a cuatro veces el valor de OD del control negativo.

Durante todo el procesamiento de muestras se utilizó un único control positivo y un único control negativo, ya que de esa manera se realizaba un mejor análisis de los resultados. Tener un mismo control negativo nos aseguraba que el criterio para determinar si un resultado era positivo o no, fuera el mismo para todas las muestras. Por otro lado, un mismo control positivo era necesario para identificar si factores externos a la prueba estaban influenciado el valor de las absorbancias obtenidas

#### 4.8. Análisis de resultados

##### 4.8.1. Análisis estadístico

El análisis de la precisión del ELISA se evaluó encontrando el coeficiente de variación (CV), el cual es el cociente entre la desviación estándar y la media de los OD obtenidos para cada muestra. Se consideran aceptables valores de CV menores al 20% para cada muestra en la evaluación del intra e inter ensayo (31).

En el caso de la determinación de la proporción de personas secretoras se halló mediante el cociente entre el número de muestras positivas y el número total de muestras analizadas. Además, se estimó el intervalo de confianza al 95%, este último mediante la siguiente fórmula (32):

$$\text{Intervalo de confianza al 95\%} = p \pm z * \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Donde:

P es la proporción de no secretores

Z es el valor para la distribución normal que corresponde a un nivel de confianza del 95%

n es el tamaño de muestra.

#### 4.8.2. Análisis de datos con los resultados de infección por NoV

Los resultados obtenidos mediante la evaluación fenotípica fueron comparados con resultados de infección y genotipos de NoV en cada niño, en caso estos presentaron una infección. Los datos se obtuvieron a lo largo del proyecto “La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú” (Dra. Pajuelo, Resultados preliminares, no publicados). El análisis de asociación se realizó mediante la prueba exacta de Fisher.

#### 4.9. Cuestiones éticas

El proyecto, “La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú”, fue evaluado por el Comité de Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y aprobado por el mismo en noviembre del 2015, según la constancia N°520-23-

15. De la misma manera, el CIEI evaluó el presente estudio aprobándolo bajo la categoría de exento en julio del 2018, como figura en la constancia 340-14-18.

## V. Resultados

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a la evaluación de muestras de saliva de 335 niños, 171 mujeres y 164 varones, cuyas edades variaban entre los dos años y los seis días de nacido al momento de la colección de la muestra. La saliva fue colectada entre abril del 2016 y mayo del 2018.

### 5.1. Estandarización de prueba ELISA

Las condiciones que se pusieron a prueba en el proceso de estandarización se muestran en la Tabla 1, los cambios propuestos se realizaron en base al protocolo descrito por Nordgren y col (30).

**Tabla 1:** Condiciones a analizar en la estandarización de la prueba ELISA.

<i>Condiciones a analizar</i>	
<i>Tratamiento previo a la muestra</i>	Muestra en baño maría
	Muestra sin baño maría
<i>Buffer de dilución</i>	Carbonato/Bicarbonato
	Fosfato Salino (PBS)
<i>Dilución de la muestra</i>	1/400
	1/800
	1/1000
	1/1500
	1/1600
	1/3200
<i>Dilución del conjugado</i>	1/500
	1/1000
	1/5000
	1/10000

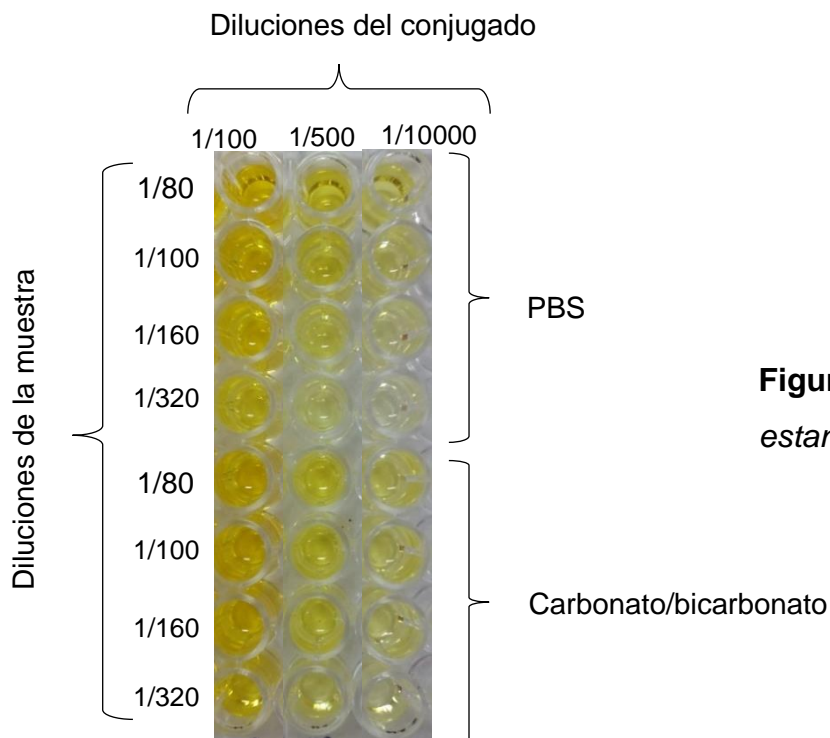
La primera variable en ser definida fue si la muestra se colocaba en baño maría antes del proceso, se decidió realizar este proceso a la muestra ya que con esto se observó una mayor variación de los OD entre las diferentes diluciones, ya sea de la muestra o del conjugado. En la tabla 2 se muestran los OD de la evaluación de la variable ya mencionada en dos concentraciones diferentes de muestra y de conjugado.

**Tabla 2:** Densidades ópticas de evaluación de hervido de muestra a diferentes diluciones de conjugado y muestra.

<b>Dilución conjugado</b>	<b>1/1000</b>			<b>1/5000</b>		
<b>Dilución de muestra</b>	<b>1/1000</b>	<b>1/1500</b>	<b>Control negativo*</b>	<b>1/1000</b>	<b>1/1500</b>	<b>Control negativo*</b>
Muestra no hervida	2,42435	2,30995	0,0488	1,3286	1,3234	0,0446
Muestra hervida	2,6655	2,5092	0,0462	1,22075	1,2028	0,0453

\*Control negativo: muestra que no da reacción colorimétrica a la prueba ELISA.

Además, en la figura 3 se resume la evaluación de las condiciones restantes. Algunas diluciones fueron descartadas durante el proceso, ya que estas fueron analizadas en diversos momentos. Como se observa en la imagen; entre las diluciones de conjugado, la más apropiada fue la de 1/5000. Las otras no nos permitían hacer un análisis correcto porque los valores de OD eran o muy altos o muy bajos, tomando como referencia los valores obtenidos por Nordgren y *col.* En cuanto a la dilución de la muestra, se escogió la 1/1000. Finalmente, para el buffer de dilución se eligió el buffer carbonato/bicarbonato porque, al igual que en el caso del hervido de la muestra, esto nos permitía una mejor diferenciación de los OD entre las diluciones. En la tabla 3 se muestran los valores de los OD para las variables evaluadas.



**Figura 3:** Evaluación de condiciones para estandarización de prueba ELISA.

**Tabla 3:** Valores de densidades ópticas de la evaluación del buffer de dilución, la dilución de conjugado y la dilución de la muestra.

Para cada una de las diluciones se muestra su control negativo correspondiente (muestra que no da reacción colorimétrica a la prueba ELISA).

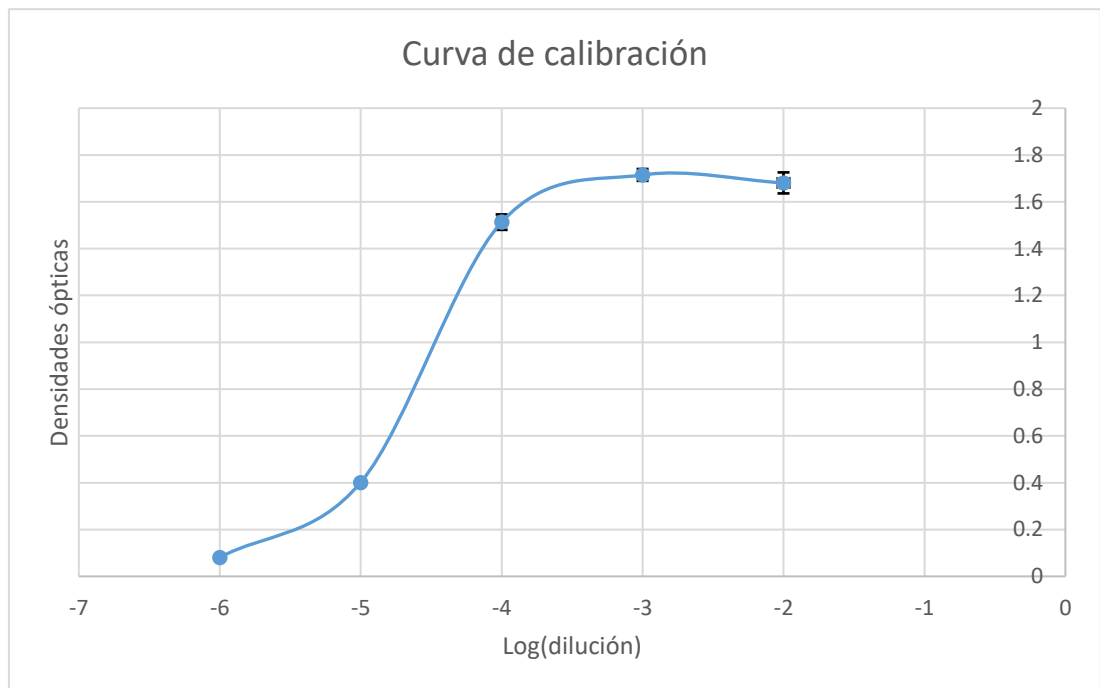
Dilución del conjugado		1/1000	Control negativo	1/5000	Control negativo	1/10000	Control negativo	
<b>Dilución de la muestra</b>	1/800	2,7962	0,052	1,2022	0,0488	0,6514	0,0534	<b>Tampón PBS</b>
	1/1000	2,5819	0,0446	0,989	0,0446	0,5401	0,0432	
	1/1600	1,9314	0,0462	0,6174	0,0461	0,3268	0,0438	
	1/3200	1,0874	0,0465	0,3723	0,0464	0,1948	0,046	
	1/800	2,7988	0,0486	1,0083	0,0507	0,5622	0,0473	<b>Tampón Carbonato/bicarbonato</b>
	1/1000	2,5197	0,0492	0,9188	0,0466	0,5187	0,0454	
	1/1600	2,2864	0,0467	0,8279	0,0439	0,4362	0,0451	

	1/3200	1,4429	0,0457	0,4684	0,0444	0,2623	0,0434	
--	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--

En resumen, las condiciones de la prueba estandarizada son las siguientes: la muestra se hierva antes de su dilución en el tampón carbonato/bicarbonato a 1/1000 y el conjugado se diluye a 1/5000.

## 5.2. Ensayos de precisión

Para determinar las diluciones que se usarían para cada concentración (Límite inferior de cuantificación, concentración baja, concentración media, concentración alta y límite superior de cuantificación) se hizo una curva de calibración (Figura 4) con diluciones de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000, de la muestra usada como control positivo durante todo el experimento.



**Figura 4:** Curva de calibración

La curva de calibración nos permitió determinar los valores de las diluciones a utilizar para los ensayos de precisión. Para las concentraciones baja, media y alta; se usaron valores dentro de la fase lineal, siendo 1/10000, 1/5000 y 1/1000 respectivamente. El límite inferior

cuantificable se estableció a una concentración de 1/100000 y el límite superior de 1/100. A los valores de los OD hallados en las pruebas de precisión intra e inter ensayo se les determinó el coeficiente de variación (Tabla 4) y se graficó una curva con los promedios obtenidos. (Anexo 2)

**Tabla 4:** Datos de la prueba del ensayo de precisión.

CONCENTRACIÓN	DILUCIÓN	PROMEDIO	CV%***
<b>ULOQ *</b>	1/100	1.30046	5.610
<b>ALTA</b>	1/1000	1.0322	18.003
<b>MEDIA</b>	1/5000	0.31016	18.553
<b>BAJA</b>	1/10000	0.15972	17.662
<b>LLOQ**</b>	1/100000	0.06039	15.409

\*ULOQ: Límite superior de cuantificación

\*\*LLOQ: Límite inferior de cuantificación.

\*\*\* CV%: Coeficiente de variación

### 5.3. Evaluación de estado secretor

De las 335 muestras analizadas cinco de ellas no mostraron reacción colorimétrica y sus valores de OD eran de hasta cuatro veces menores que su control negativo. Por ello se consideró que la saliva testeada pertenecía a un sujeto no secretor.

**Tabla 5:** Densidades ópticas de muestras de niños no secretores.

MUESTRAS	POCILLOS		
	C1	C2	C-
<b>M1</b>	0.0524	0.0502	0.0511
<b>M2</b>	0.0526	0.0512	0.06



<b>M3</b>	0.0533	0.0499	0.0464
<b>M4</b>	0.0471	0.0466	0.0482
<b>M5</b>	0.0453	0.0459	0.0447

C1 y C2 = pocillos con muestras C- =Control negativo M1 – M5  
(Muestras de niños sin presencia de antígeno H)

La proporción de secretores y no secretores se resume en la tabla 6.

**Tabla 6:** Proporción de secretores y no secretores

	<b>Número</b>	<b>Proporción</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Secretores</b>	330	0.9851	98,51%
<b>No secretores</b>	5	0.0149	1,49%
<b>Total</b>	335	1	100%

Después de obtener la proporción de secretores y no secretores se puede calcular el intervalo de confianza.

$$\text{Intervalo de confianza al 95\%} = 0,0149 \pm 1,96 * \sqrt{\frac{0.0149(0.9851)}{335}}$$

El intervalo de confianza al 95% es (0.0019, 0.027)

#### 5.4. Análisis y asociación de los resultados con las infecciones por NoV

Después de conocer cuáles eran los niños cuyas muestras correspondían a la de un fenotipo no secretor, se correlacionó con los datos de infecciones obtenidas del proyecto. Lo hallado se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7:** Infecciones correspondientes a no secretores.

<i>Código de niño no secretor</i>	<i>N° infecciones (Genotipo)</i>
<i>SP002X</i>	2 (GII.13 y GII.23) 1(GI.6)
<i>SP064X</i>	0
<i>SP129X</i>	0
<i>SP174X</i>	1 (GI.1)
<i>SP272X</i>	1 (GII.4)

Tres de los cinco niños no secretores (60%) presentaron infecciones por NoV, el primero de ellos tuvo tres infecciones por los genotipos GII.13, GI.6 y GII.23; a los 8,9 y 22 meses respectivamente. La infección del niño con código SP174X se dio a los 11,5 meses por el genotipo GI.1 y la infección por GII.4 fue a los 10,3 meses en el niño con código SP272X.

Por otro lado, de los 330 secretores, 291 presentaron infecciones por NoV (88,18%) (Tabla 8). La relación entre no secretores y secretores respecto a la infección por NoV no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,115$ ).

**Tabla 8:** Relación entre estado secretor e infecciones por NoV.

	<b>PRESENCIA DE INFECCIÓN POR NOROVIRUS</b>	<b>AUSENCIA DE INFECCIÓN POR NOROVIRUS</b>	<b>TOTAL</b>
<b>NIÑOS SECRETORES</b>	291 (88,18%)	39 (11,82%)	330 (100%)
<b>NIÑOS NO SECRETORES</b>	3 (60%)	2 (40%)	5 (100%)
<b>TOTAL</b>	294 (87,76%)	41 (12,24%)	335 (100%)

Test de Fisher exacto  $p= 0,115$

Como parte del proyecto “La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú”, se ha identificado también el genogrupo de NoV que infectó a los niños secretores. El genogrupo GII es el que causó mayor número de infecciones, encontrándose en 77,58% de los niños (Tabla 9). Por otro lado, el genogrupo GI infectó a 34,24% de los niños secretores (Tabla 10).

**Tabla 9:** Relación entre el estado secretor y la presencia o ausencia de infecciones por el genogrupo GII.

	<b>PRESENCIA DE INFECCIÓN POR GENOGRUPO GII</b>	<b>AUSENCIA DE INFECCIÓN POR GENOGRUPO GII</b>	<b>TOTAL</b>
<b>NIÑOS SECRETORES</b>	256 (77,58%)	74 (22,42%)	330 (100%)
<b>NIÑOS NO SECRETORES</b>	2 (40%)	3 (60%)	5 (100%)
<b>TOTAL</b>	258 (77,01%)	77 (22,99%)	335 (100%)

Test de Fisher exacto  $p= 0,082$

**Tabla 10:** Relación entre el estado secretor y la presencia o ausencia de infecciones por el genogrupo GI.

	<b>PRESENCIA DE INFECCIÓN POR GENOGRUPO GI</b>	<b>AUSENCIA DE INFECCIÓN POR GENOGRUPO GI</b>	<b>TOTAL</b>
<b>NIÑOS SECRETORES</b>	113 (34,24%)	217 (65,76%)	330 (100%)
<b>NIÑOS NO SECRETORES</b>	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)
<b>TOTAL</b>	114 (34,04%)	221 (65,97%)	335 (100%)

Test de Fisher exacto  $p= 0,665$

Finalmente, de las infecciones por el genogrupo GII que han sido genotipificadas, 116 de ellas (45%) fueron por el genotipo GII.4 (Tabla 11).

**Tabla 11:** Relación entre el estado secretor y la presencia o ausencia de infecciones por el genogrupo GII.4.

	<b>PRESENCIA DE INFECCIÓN POR GENOGRUPO GII.4</b>	<b>AUSENCIA DE INFECCIÓN POR GENOGRUPO GII.4</b>	<b>TOTAL</b>
<b>NIÑOS SECRETORES</b>	115 (34,85%)	215 (65,15%)	330 (100%)
<b>NIÑOS NO SECRETORES</b>	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)
<b>TOTAL</b>	116 (34,63%)	219 (65,37%)	335 (100%)

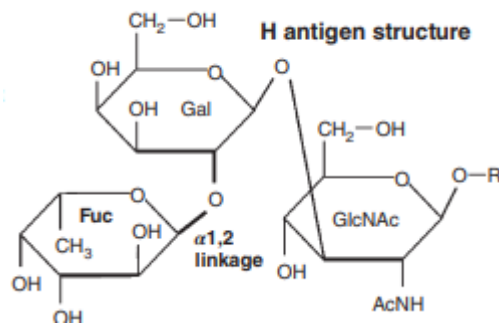
Test de Fisher exacto  $p= 0,662$

## VI. Discusión

El objetivo principal del presente trabajo era estimar la proporción de secretores y no secretores en una cohorte de niños, mediante un ELISA

directo. Este procedimiento fue adaptado del protocolo publicado por Nordgren y col (30), al cual se le adicionó un paso, el tratamiento a la muestra previo a la dilución. Este tratamiento se realizó con la finalidad de inactivar anticuerpos específicos a Norovirus, ya que estos pueden interferir en los ensayos de unión como el aplicado en la presente investigación (11,31,32). Las inmunoglobulinas específicas contra NoV. como la IgA salival que es considerada un marcador de inmunidad a corto plazo, han sido encontradas en personas expuestas a cepas de Norovirus hasta 21 días después de la exposición (33, 34). Había posibilidad de encontrar estas mismas inmunoglobulinas en las muestras analizadas ya que se desconocía si la muestra fue tomada antes o después de una infección por NoV.

Adicionalmente, la especificidad del ELISA está basado en la unión específica de la lectina EUA-I con los grupos fucosa unidos por enlaces  $\alpha$  1-2. Ensayos de inhibición han demostrado la importancia de otros grupos funcionales presentes en el antígeno H, además de la fucosa, en la unión con la lectina que se da por puentes de hidrógeno mediados por grupos hidroxilo. El antígeno H está compuesto por una galactosa, una N-acetilglucosamida y una fucosa (Figura 5). Se han encontrado hidroxilos determinantes para formar enlaces en las posiciones 3,4 y 6 de la galactosa, en la posición 6 de la N-acetilglucosamida y en las posiciones 2,3 y 4 de la fucosa (35). Investigaciones en acoplamiento molecular corroboran esta información al reportar las uniones de los hidroxilos en las posiciones 2, 3 y 4 de la fucosa con ácido aspártico, glicina y asparagina; aminoácidos abundantes en la lectina (36,37). Además, se ha encontrado que el grupo 6-hidroximetil presente en la estructura de la N-acetilglucosamida del antígeno hace uniones hidrofóbicas importantes, ya que su eliminación de la molécula disminuye notablemente su asociación (36).



**Figura 5:** Estructura del antígeno H. (38)

Los ensayos de precisión de la prueba ELISA estandarizada, intra ensayo e inter ensayo, dieron coeficientes de variación menores al 20%; cumpliendo con los estándares propuestos por el Centro de Evaluación de Drogas e Investigación (31). Esto nos indica que las muestras procesadas pueden ser re evaluadas y se obtendrán resultados similares.

El estado secretor se evalúa comúnmente en saliva asumiendo que esta prueba nos da información acerca de la presencia o ausencia de antígeno H en saliva y en epitelio intestinal, ya que el paso de precursor tipo 1 a antígeno H1 está mediado por la misma fucosiltransferasa en ambas zonas. Además, el análisis de estado secretor en epitelio intestinal requeriría procedimientos quirúrgicos muy invasivos para la población de estudio (39).

Por otro lado, treinta y cinco muestras fueron tomadas durante el periodo de lactancia del niño, dos de ellas se determinó que pertenecían a niños no secretores. Se espera que la posibilidad de que la muestra de saliva haya sido contaminada con los antígenos H1 que se podrían encontrar en la leche materna de una madre secretora sea muy baja, teniendo en cuenta que dentro del grupo de muestras tomadas durante el periodo de lactancia se encontró dos muestras con valores de OD cercanos a cero. A pesar de ello, si esta variable fuera significativa la variación de los resultados encontrados sería mínima ya que estas muestras corresponden a un porcentaje bajo del total de muestras analizadas.

En cuanto a la proporción de no secretores, se encontró 5 de 335 niños, (1,49%; IC 95%: 0,19% - 2,7%). Si se compara el porcentaje de no secretores con los encontrados en otros países de Latinoamérica, notamos que el encontrado en esta población es muy bajo. Aun cuando las poblaciones son similares, como en el caso de un estudio en Ecuador, donde un seguimiento a una cohorte de 194 recién nacidos encontró un porcentaje de no secretores de 21% (40)

Por otro lado, un estudio a adultos y niños, con un rango de edades de 1,9 a 56,4 años, en Nicaragua reportó un porcentaje de 6% (41). Esta última cifra se acerca más a la encontrada en el presente estudio; sin embargo, las poblaciones estudiadas son muy diferentes.

El porcentaje de no secretores en Nicaragua puede estar relacionado con la gran cantidad de mestizos que hay en el país mencionado, llegando a ser casi el 70% de la población (42). Como se mencionó anteriormente ser secretor es una característica dominante por lo que a mayor mestizaje se esperaría una mayor cantidad de secretores y consecuentemente una disminución en el número de no secretores. Tener datos exactos acerca de la genética poblacional de la cohorte nos ayudaría a esclarecer la razón del bajo porcentaje de no secretores hallado; sin embargo, este es parcialmente explicado por el mestizaje presente en la población limeña.

Diversos estudios han demostrado el rol protector que cumple la ausencia del antígeno H contra infecciones de Norovirus (13, 24). En la presente investigación no fue posible hacer una correlación ya que la baja proporción de no secretores no permite confirmar con precisión el rol protector del estado no secretor. Por otro lado, investigaciones recientes reportan variaciones en las uniones de HBGA con distintos genotipos y cepas de NoV, encontrando que estas no son necesariamente dependientes del estado secretor. Esto puede explicarse por la gran variabilidad genética de la secuencia codificante del subdominio P2. Este dominio de la proteína de la cápside del virus se encuentra en la parte más superficial de la cápside y es la que se une al receptor celular (10, 43, 44). Además, el subdominio P2, contiene un sitio de unión para

HBGAs (45). Por lo tanto, un cambio en la estructura del dominio P puede alterar las uniones a antígenos histosanguíneos.

Cao *et al* determinaron que existe interacción entre el dominio P de una cepa de GII.4 y un grupo fucosa, que se encuentra en el antígeno H, mediante puentes de hidrógeno. Sin embargo, este experimento se realizó con una cepa específica de GII.4 y al comparar su estructura con la de Norwalk virus (GI.1) la composición de aminoácidos no era la igual por lo que se puede decir que la forma en que interaccionará con la fucosa tampoco será la misma (46). Adicionalmente, se ha encontrado que hay interacciones entre estructuras que no contienen fucosa y partículas similares a virus (VLPs) de Norovirus (13). La fucosa no sería el único involucrado ya que otros sacáridos como la galactosa o la galactosa NAc, también tienen interacción con la cápside de NoV formando uniones a larga distancia que estabiliza la interacción (46). Estas evidencias nos indican que, a pesar de que la fucosa es importante para la unión virus-carbohidrato, esta no sería totalmente determinante, lo que explicaría la complejidad de la interacción entre norovirus y HBGA.

Se ha relacionado el estado secretor de los niños de la cohorte con las infecciones por NoV detectadas durante el proyecto “La infección natural de norovirus y sapovirus en una cohorte de nacimiento en una comunidad periurbana del Perú” (Resultados no publicados) y no se encontró una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,115$ ). Tres de los cinco no secretores (60%) presentaron infecciones por NoV a lo largo de todo el estudio (hasta los dos años de edad). Los genotipos identificados en estos niños fueron GI.1, GI.6, GII.4, GII.13 y GII.23. Esto nos indica que existen genotipos que no son dependientes del estado secretor de un individuo. A continuación, analizaremos la relación entre la presencia de antígeno H1 en saliva y los genogrupos I y II.

En el caso del genogrupo I, se ha encontrado que G1.1 se une a antígenos Lewis tipo a (13), los cuales están presentes en sujetos no secretores, si estos poseen un gen *FUT 3* funcional (Figura 1). Adicionalmente, otros genotipos como el denominado Boxer (GI.8) y el GI.3 también pueden infectar a sujetos no secretores a pesar de la supuesta inmunidad que



este estado les otorgaba (47,11). Finalmente, un reciente estudio realizado en el 2014 demostró que la presencia de GI.7 en personas deficientes de antígeno H, se debía a cambios estructurales en el dominio P (45).

Por otro lado, a pesar de haber encontrado una infección por genotipo GII.4 en un niño no secretor, diversos estudios han determinado que las infecciones por GII.4 son dependientes del estado secretor. Mediante inmunoensayos o estudios epidemiológicos se ha encontrado que cepas como la GII.3, GII.6, GII.1 y GII.8 podía infectar a personas no secretoras; mientras que no hallaron lo mismo para GII.4. (14,28,39,48,49). Sin embargo, de manera inusual, un estudio en adultos entre 18 y 49 años encontró RNA de NoV en muestras de heces de una persona no secretora que tuvo una infección asintomática por GII.4 (54). Este caso es similar al encontrado en este proyecto ya que el niño con código SP272X tampoco presentó síntomas de diarrea. En el presente estudio no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el estado secretor y las infecciones por GII.4 ( $p=0,662$ ).

Finalmente, como era de esperar, la proporción de secretores que presentó infecciones por NoV fue alta llegando hasta casi un 88%. El genogrupo predominante fue el II y el genotipo que causó mayor número de infecciones fue el GII.4, estos datos son concordantes con lo encontrado en estudios similares, incluyendo un estudio realizado a una cohorte de recién nacidos en Ecuador (8, 40,50).

## VII. Limitaciones

La presente investigación presenta limitaciones al evaluar el estado secretor mediante una sola prueba, las referencias mencionadas a lo largo del texto evalúan este estado mediante la presencia de antígeno H y de antígenos Lewis. Una persona puede tener diferentes combinaciones de HBGAs (Lewis, ABH y ABO) por lo que determinar el fenotipo Lewis y ABO en cada niño nos daría una mejor visión acerca de si verdaderamente las infecciones se deben a la unión de NoV con el antígeno H o con algún otro del grupo de los HBGA.

Por otro lado, la comparación de los resultados fenotípicos encontrados, con análisis genotípicos nos permitiría evaluar si lo hallado está relacionado con la ausencia o presencia de mutaciones que están asociadas a las diferentes razas y con ello explicar el pequeño porcentaje de no secretores en la cohorte.

Finalmente, el bajo porcentaje de niños no secretores no nos permite saber de manera certera si el estado no secretor está asociado realmente a una protección contra las infecciones de NoV.

## VIII. Conclusiones

- Se corroboró la hipótesis al obtener más del 80% de niños secretores, pues se obtuvo 1,49% de niños no secretores dentro de la cohorte.
- Tres de los cinco niños no secretores presentaron infecciones por norovirus, y de éstas una fue por el genotipo GII.4, a pesar de que su estado se relacionaba con una posible protección contra este genotipo.
- No hubo suficiente evidencia para determinar la existencia de una asociación entre el estado secretor de un niño y las infecciones por NoV.

## IX. Recomendaciones

- Es necesaria la determinación de otros HBGAs, como los pertenecientes al fenotipo Lewis y ABO, para investigar una relación entre las infecciones y las diferentes combinaciones de antígenos.
- El estudio se debería realizar en una población similar, pero con un número mayor de muestras.

## X. Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. [Internet] Rotavirus. [actualizado abril 2015; citado 14 august, 2018] URL Disponible en: <http://www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/es/>
2. Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(8):1224–31.
3. Bartsch, S. M., Lopman, B. A., Ozawa, S., Hall, A. J., & Lee, B. Y. (2016). Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PLoS ONE*, 11(4), 1–16. URL disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151219>
4. Saito M, Goel-Apaza S, Espetia S, Velasquez D, Cabrera L, Loli S, et al. Multiple norovirus infections in a birth cohort in a Peruvian periurban community. *Clin Infect Dis*. 2014;58(4):483–91.
5. Ballard SB, Reaves EJ, Luna CG, Silva ME, Rocha C, Heitzinger K, et al. Epidemiology and genetic characterization of noroviruses among adults in an endemic setting, Peruvian Amazon Basin, 2004-2011. *PLoS One*. 2015;10(7):2004–11.
6. Donaldson, E. F., Lindesmith, L. C., Lobue, A. D., & Baric, R. S. (2008). Norovirus pathogenesis : mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Inmunological Reviews*, 190–211
7. 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. *Journal of Virology*, 77(23), 12562–12571. URL disponible en: <https://doi.org/10.1128/JVI.77.23.12562>
8. Ramani, S., Atmar, R. L., & Estes, M. K. Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2014; 30(1), 25–33. URL disponible en: <https://doi.org/10.2217/nm.12.167>
9. Katayama, K., Shirato-horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., & Oka, T. Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like

- Viruses. *Virology*. 202; 239: 225–239. URL disponible en:  
<https://doi.org/10.1006/viro.2002.1568>
10. Manuel, J., Fernández, R., & Gómez, J. B. Infecciones por Norovirus. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010; 28(Supl 1), 51–55. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70009-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70009-4)
  11. Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, Morrow AL, et al. 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* [Internet]. 2005;79(11):6714–22. URL disponible en: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.11.6714-6722.2005>
  12. Tan, M., Jin, M., Xie, H., Duan, Z., Jiang, X., & Fang, Z. . Outbreak studies of a GII-3 and a GII-4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. *Journal of medical virology*. 2008;80(7), 1296-1301.
  13. Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, et al. Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding. *J Virol* [Internet]. 2008;82(21):10756–67. URL disponible en: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00802-08>
  14. Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, Rydell GE, Lidón MF, Montava R, et al. The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 norovirus infection. *PLoS One*. 2009;4(5).
  15. Le Pendu, J., Lemieux, R. U., Lambert, F., & Dalix, A.-M. Distribution of H Type 1 and H Type 2 Antigenic Determinants in Human Sera and Saliva. *American Journal of Human Genetics*. 1982;34: 415–420.
  16. Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis Histo-Blood Group System and Associated Secretory Phenotypes. *Vox Sang*. 1995;69(3):166–82
  17. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* [Internet]. 1990;345(6272):229–33. URL disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/345229a0>

18. Reid, M. E., Lomas-Francis, C., & Olsson, M. L. H Blood Group System. The Blood Group Antigen FactsBook. 2012; 2: 489–498. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415849-8.00020-X>
19. Oriol, R. Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues. *Journal of Immunogenetics*. 1990; 17: 235–245.
20. Tan M, Jiang X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: An answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol*. 2005;13(6):285–93.
21. Mottram L, Wiklund G, Larson G, Qadri F, Svennerholm AM. FUT2 non-secretor status is associated with altered susceptibility to symptomatic enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in Bangladeshis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–7.20
22. Harrington, P. R., Lindesmith, L., Yount, B., Moe, C. L., & Baric, R. S. Binding of Norwalk Virus-Like Particles to ABH Histo-Blood Group Antigens Is Blocked by Antisera from Infected Human Volunteers or Experimentally Vaccinated Mice. *Journal of Virology*. 2002; 76(23): 12335–12343. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12335-12343.2002>
23. Oriol, R., Le Pendu, J., & Mollicone, R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and Related Antigens. *Vox Sanguinis*. 1986; 51(3): 161–171. URL disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1986.tb01946.x>
24. Mollicone, R., Bara, J., Le Pendu, J., and Oriol, R. Immunohistologic pattern of type 1 (Lea, Le) and type 2 (X, Y, H) blood group related antigens in the human pyloric and duodenal mucosae. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1985; 53. 219-27.56, 219-227
25. Liener, I. (Ed.). *The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*. Elsevier.p.2012: 201-204.
26. Ramani S, Hu L, Venkataram Prasad B V., Estes MK. Diversity in Rotavirus-Host Glycan Interactions: A “Sweet” Spectrum. *Cmgh* [Internet]. 2016;2(3):263–73. URL disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.03.002>
27. Mourant, A. E., Kopèc, A. C., and Domaniewska-Sobezak, K. (1976) *The distribution of the human Blood Groups and Other Biochemical Polymorphisms*, 2nd Ed, Oxford University Press, London.

28. Sandoval, J. R., Salazar-granara, A., Acosta, O., Castillo-herrera, W., Fujita, R., Pena, S. D. J., & Santos, F. R. Tracing the genomic ancestry of Peruvians reveals a major legacy of pre-Columbian ancestors. *Journal of Human Genetic*. 2012: 1–8. URL disponible en: <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.73>
29. Frenck, R., Bernstein, D. I., Xia, M., Huang, P., Zhong, W., Parker, S., ... Jiang, X. (2012). Predicting susceptibility to norovirus GII.4 by use of a challenge model involving humans. *Journal of Infectious Diseases*, 206(9), 1386–1393. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis514>
30. Nordgren, J., Nitiema, L. W., Ouermi, D., Simpore, J., & Svensson, L. Host Genetic Factors Affect Susceptibility to Norovirus Infections in Burkina Faso. *PLoS ONE*. 2013; 8(7): 23–25. URL disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069557>
31. F. D. A. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. May, 2018.
32. KREIS, Irene A., et al. (ed.). *Essentials of Environmental Epidemiology for Health Protection: A handbook for field professionals*. OUP Oxford, 2012.
33. Rydell, G. E., Nilsson, J., Rodriguez-Diaz, J., Ruvoën-Clouet, N., Svensson, L., Le Pendu, J., & Larson, G. Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology*. 2009; 19(3): 309–320. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn139>
34. Lindesmith, L., Moe, C., Lependu, J., Frelinger, J. A., Treanor, J., & Baric, R. S. Cellular and Humoral Immunity following Snow Mountain Virus Challenge. 2005; 79(5): 2900–2909. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2900>
35. Du, Ming-hui, Spohr, Ulrike; Lemieux, R. The recognition of three different epitopes for the H-type 2 human blood group determinant by lectins of *Ulex europaeus*, *Galactia tenuiflora* and *Psophocarpus tetragonolobus*. *Glycoconjugate Journal*. 1994; 11: 443–461.
36. Lindesmith, L. I. S. a L., Oe, C. H. M., Arionneau, S. E. M., Uvoen, N. A. R., lang, X. I. J., Indblad, L. A. L., Baric, R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med*. 2003; 9(5): 548–553. <https://doi.org/10.1038/nm>

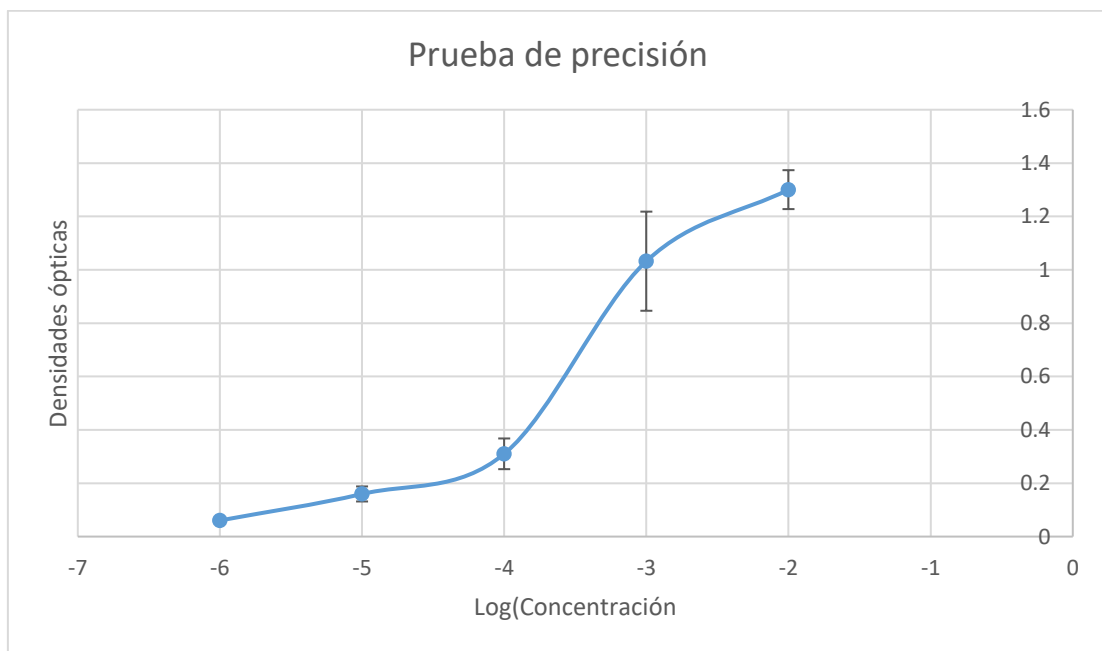


37. Audette, G. F., Vandonselaar, M., & Delbaere, L. T. J. Resolution Structure of the O (H) The 2 . 2 A Blood-group-specific Lectin I from *Ulex europaeus* 2000. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4214>
38. Ewald, D. R., & Sumner, S. C. J. Blood type biochemistry and human disease. 2016. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1355>
39. SZULMAN, A. E. The histological distribution of blood group substances A and B in man. *The Journal of Experimental Medicine*. 1960; 111(23): 785–800. <https://doi.org/10.1084/jem.111.6.785>
40. Lopman, B. A., Trivedi, T., Vicuña, Y., Costantini, V., Collins, N., Gregoricus, N., ... Cooper, P. J. Norovirus infection and disease in an ecuadorian birth cohort: Association of certain norovirus genotypes with host FUT2 secretor status. *Journal of Infectious Diseases*. 2015; 211(11): 1813–1821. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu672>
41. Bucardo, F., Kindberg, E., & Paniagua, M. Genetic Susceptibility to Symptomatic Norovirus Infection in Nicaragua. 2009; 735: 728–735. <https://doi.org/10.1002/jmv>
42. Nuñez, C., Baeta, M., Sosa, C., Casalod, Y., Ge, J., Budowle, B., & Martínez-Jarreta, B. Reconstructing the population history of Nicaragua by means of mtDNA, Y-chromosome STRs, and autosomal STR markers. *American journal of physical anthropology*. 2010; 143(4): 591-600.
43. Prasad, B. V. V., Hardy, M. E., Rossmann, M. G., & Estes, M. K. X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid. *Science*. 1999; 286: 287–290
44. Karst, S. M., Wobus, C. E., Goodfellow, I. G., Green, K. Y., & Virgin, H. W. Review Advances in Norovirus Biology. *Cell Host and Microbe*. 2014; 15(6): 668–680. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.015>
45. Shanker, S., Czako, R., Sankaran, B., Atmar, L., Estes, M. K., Prasad, B. V. V., ... Venkataram, B. V. Structural Analysis of Determinants of Histo-Blood Group Antigen Binding Specificity in Genogroup I Noroviruses. 2014. <https://doi.org/10.1128/JVI.00201-14>
46. Cao, S., Lou, Z., Tan, M., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Z., ... Rao, Z. Structural Basis for the Recognition of Blood Group Trisaccharides by Norovirus . 2007; 81(11): 5949–5957. <https://doi.org/10.1128/JVI.00219-07>

47. Nordgren, J., Kindberg, E., Lindgren, P., Matussek, A., & Svensson, L. Norovirus Gastroenteritis Outbreak with a Secretor-independent Susceptibility Pattern, Sweden. 2010; 16(1): 81–87. <https://doi.org/10.3201/eid1601.090633>
48. Currier, R. L., Payne, D. C., Staat, M. A., Selvarangan, R., Shirley, S. H., Halasa, N., Morrow, A. L. Innate Susceptibility to Norovirus Infections Influenced by FUT2 Genotype in a United States Pediatric Population. 2015; 60: 1631–1638. <https://doi.org/10.1093/cid/civ165>
49. Van Trang, N., Vu, H. T., Le, N. T., Huang, P., Jiang, X., & Anh, D. D. Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in Vietnamese children. *Journal of clinical microbiology*. 2014.
50. Patel, M. M., Widdowson, M. A., Glass, R. I., Akazawa, K., Vinjé, J., & Parashar, U. D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14(8): 1224–1231. <https://doi.org/10.3201/eid1408.071114>

## Anexo 1

Gráfico del promedio de las absorbancias obtenidas de las pruebas de precisión.



## Anexo 2

Valores de OD de todas las muestras analizadas

\*OD blanco: Muestra a la que no se le agregó el conjugado.

0: Niño no secretor

1: Niño secretor

<b>Cod. Persona</b>	<b>OD1</b>	<b>OD2</b>	<b>*OD blanco</b>	<b>Estado secretor (0,1)</b>	<b>Número de placa</b>
<b>SP001X</b>	1.0345	1.033	0.0651	0	24
<b>SP002X</b>	0.0524	0.0502	0.0511	1	24
<b>SP003X</b>	0.8145	0.708	0.05	0	25
<b>SP005X</b>	0.818	0.7473	0.0471	0	32
<b>SP006X</b>	0.6199	0.6362	0.0488	0	23
<b>SP008X</b>	1.0267	1.0406	0.0539	0	21
<b>SP009X</b>	1.4038	1.4308	0.0503	0	24
<b>SP010X</b>	1.2245	1.0557	0.0749	0	20
<b>SP011X</b>	1.1068	1.0771	0.0475	0	27
<b>SP013X</b>	1.3052	1.263	0.0508	0	25
<b>SP014X</b>	1.3052	1.3696	0.0555	0	24
<b>SP015X</b>	1.3709	1.3711	0.0467	0	25
<b>SP016X</b>	0.9615	0.9988	0.0532	0	24
<b>SP017X</b>	0.9809	0.979	0.0465	0	25
<b>SP019X</b>	0.8681	0.8224	0.0476	0	18
<b>SP020X</b>	0.8554	0.9067	0.0556	0	24
<b>SP021X</b>	1.5613	1.5459	0.0523	0	24
<b>SP022X</b>	0.6218	0.6066	0.0551	0	25
<b>SP023X</b>	0.9956	0.9917	0.053	0	25
<b>SP024X</b>	1.2661	1.2161	0.0482	0	25
<b>SP025X</b>	0.7399	0.8433	0.0489	0	18
<b>SP026X</b>	0.7771	0.7724	0.0482	0	23
<b>SP027X</b>	1.4329	1.3199	0.0475	0	19
<b>SP030X</b>	1.6976	1.6377	0.051	0	25
<b>SP031X</b>	1.0866	1.1116	0.0671	0	25
<b>SP032X</b>	1.2657	1.3252	0.0544	0	25
<b>SP034X</b>	0.7177	0.6642	0.0561	0	25
<b>SP035X</b>	0.8284	0.8306	0.0509	0	24
<b>SP036X</b>	1.2828	1.2631	0.0481	0	25
<b>SP037X</b>	0.8716	0.8336	0.0667	0	25
<b>SP038X</b>	0.5672	0.5402	0.0603	0	24

<b>SP039X</b>	0.5353	0.5178	0.0482	0	25
<b>SP040X</b>	0.7814	0.7729	0.0459	0	21
<b>SP042X</b>	1.5951	1.6336	0.0504	0	24
<b>SP043X</b>	0.544	0.5232	0.0533	0	25
<b>SP044X</b>	1.2366	1.3102	0.0474	0	25
<b>SP045X</b>	0.9714	1.0937	0.0519	0	25
<b>SP046X</b>	1.6499	1.5202	0.0575	0	18
<b>SP048X</b>	1.5477	1.5307	0.0517	0	25
<b>SP049X</b>	1.0506	1.0533	0.0524	0	25
<b>SP050X</b>	1.2162	1.2493	0.0519	0	24
<b>SP051X</b>	1.082	1.2875	0.0526	0	3
<b>SP052X</b>	1.1858	1.2593	0.0527	0	25
<b>SP053X</b>	0.7701	0.7838	0.0514	0	25
<b>SP054X</b>	1.7679	1.619	0.0481	0	18
<b>SP055X</b>	1.0167	1.0323	0.0481	0	25
<b>SP057X</b>	1.4596	1.3542	0.0485	0	18
<b>SP058X</b>	0.9307	0.9217	0.054	0	28
<b>SP059X</b>	1.166	1.1567	0.0501	0	25
<b>SP060X</b>	1.3751	1.3424	0.0503	0	25
<b>SP061X</b>	1.0685	1.1124	0.0447	0	15
<b>SP062X</b>	1.6338	1.6425	0.0492	0	22
<b>SP063X</b>	1.0566	1.2176	0.0473	0	5
<b>SP064X</b>	0.0526	0.0512	0.06	1	19
<b>SP065X</b>	0.7986	0.8575	0.0526	0	19
<b>SP066X</b>	0.7163	0.7441	0.0498	0	16
<b>SP067X</b>	1.3704	1.3163	0.0522	0	28
<b>SP069X</b>	0.7102	0.7096	0.0478	0	14
<b>SP070X</b>	1.0353	1.0361	0.0508	0	20
<b>SP071X</b>	1.0301	1.0481	0.0421	0	2
<b>SP072X</b>	1.228	1.4358	0.0501	0	25
<b>SP073X</b>	0.8324	0.9379	0.0476	0	13
<b>SP074X</b>	1.1266	1.0999	0.0487	0	14
<b>SP075X</b>	0.9904	0.9522	0.0618	0	21
<b>SP076X</b>	0.1325	0.1298	0.0517	0	32
<b>SP077X</b>	1.0255	1.0737	0.0436	0	9
<b>SP078X</b>	0.9498	0.9728	0.047	0	12
<b>SP079X</b>	0.7558	0.778	0.0518	0	24
<b>SP080X</b>	1.0318	1.1847	0.0543	0	17
<b>SP081X</b>	1.1733	1.0692	0.0479	0	28
<b>SP082X</b>	1.018	1.1324	0.0433	0	10
<b>SP083X</b>	0.7932	0.8358	0.0483	0	18
<b>SP084X</b>	0.3355	0.3646	0.0433	0	3
<b>SP085X</b>	1.0247	0.9893	0.0548	0	13
<b>SP086X</b>	1.0418	1.1266	0.0485	0	18
<b>SP087X</b>	0.7451	0.6607	0.0473	0	26
<b>SP088X</b>	0.5358	0.5729	0.0473	0	5

<b>SP089X</b>	1.013	1.0078	0.0454	0	12
<b>SP092X</b>	0.9303	0.7567	0.0449	0	32
<b>SP093X</b>	1.0423	0.9824	0.0397	0	2
<b>SP094X</b>	1.0399	1.0399	0.0429	0	4
<b>SP095X</b>	0.8763	0.9601	0.0511	0	7
<b>SP096X</b>	0.9462	1.0936	0.0456	0	12
<b>SP097X</b>	1.1364	1.1697	0.0474	0	27
<b>SP098X</b>	0.9807	0.8096	0.0472	0	21
<b>SP099X</b>	1.1504	1.1705	0.0478	0	17
<b>SP100X</b>	1.1886	1.1852	0.0439	0	13
<b>SP101X</b>	1.1501	1.1693	0.0441	0	7
<b>SP102X</b>	2.2922	2.2551	0.0479	0	22
<b>SP103X</b>	0.5971	0.5618	0.0491	0	19
<b>SP104X</b>	0.8848	0.8701	0.0467	0	10
<b>SP105X</b>	1.8772	1.9986	0.0505	0	17
<b>SP106X</b>	0.9093	0.926	0.0477	0	15
<b>SP107X</b>	0.6611	0.5931	0.0503	0	27
<b>SP108X</b>	1.4579	1.4401	0.0477	0	26
<b>SP109X</b>	1.1432	1.0783	0.0481	0	28
<b>SP110X</b>	0.7914	0.7275	0.0517	0	21
<b>SP111X</b>	2.179	2.0339	0.0513	0	22
<b>SP112X</b>	0.8926	0.9726	0.0503	0	9
<b>SP113X</b>	1.4145	1.3981	0.0486	0	15
<b>SP114X</b>	0.3823	0.3505	0.0451	0	13
<b>SP115X</b>	1.0014	0.9616	0.0555	0	22
<b>SP116X</b>	0.8528	0.8578	0.045	0	6
<b>SP117X</b>	1.4551	1.351	0.0574	0	19
<b>SP118X</b>	0.9095	0.8699	0.0423	0	3
<b>SP119X</b>	1.3469	1.3592	0.0502	0	22
<b>SP121X</b>	0.3078	0.3076	0.0454	0	12
<b>SP122X</b>	0.919	0.9747	0.0464	0	9
<b>SP123X</b>	1.4678	1.4436	0.0484	0	18
<b>SP124X</b>	1.0535	1.0006	0.0461	0	16
<b>SP125X</b>	0.6941	0.7066	0.0503	0	22
<b>SP126X</b>	1.0577	1.1692	0.0472	0	19
<b>SP127X</b>	0.4559	0.403	0.0501	0	28
<b>SP128X</b>	0.9899	1.0954	0.0465	0	3
<b>SP129X</b>	0.0533	0.0499	0.0464	1	19
<b>SP130X</b>	0.9525	1.005	0.0483	0	10
<b>SP131X</b>	1.0574	1.0712	0.0462	0	12
<b>SP132X</b>	0.6202	0.6136	0.0447	0	8
<b>SP133X</b>	1.5552	1.5727	0.0501	0	15
<b>SP134X</b>	0.8367	0.7773	0.0432	0	10
<b>SP135X</b>	0.7628	0.8412	0.0492	0	10
<b>SP136X</b>	0.7253	0.6673	0.0498	0	14
<b>SP137X</b>	0.7541	0.841	0.0445	0	5

<b>SP138X</b>	1.0462	1.0915	0.0432	0	10
<b>SP140X</b>	1.1656	1.1895	0.0485	0	9
<b>SP141X</b>	0.6804	0.6809	0.045	0	2
<b>SP142X</b>	1.07	1.1537	0.0477	0	4
<b>SP143X</b>	0.7717	0.9294	0.0422	0	5
<b>SP144X</b>	1.3983	1.4561	0.0496	0	16
<b>SP145X</b>	0.5256	0.5804	0.0552	0	20
<b>SP146X</b>	0.7556	0.7515	0.0473	0	13
<b>SP147X</b>	0.9227	0.9417	0.044	0	11
<b>SP148X</b>	0.8765	0.9404	0.0479	0	18
<b>SP149X</b>	1.3906	1.2536	0.0559	0	7
<b>SP150X</b>	0.2718	0.2712	0.0478	0	26
<b>SP151X</b>	0.8361	0.7637	0.0429	0	2
<b>SP152X</b>	0.8679	0.8905	0.0502	0	21
<b>SP153X</b>	1.6577	1.5603	0.0479	0	19
<b>SP154X</b>	0.4558	0.4649	0.0439	0	12
<b>SP155X</b>	0.8942	0.8633	0.0493	0	13
<b>SP156X</b>	1.2018	1.283	0.046	0	12
<b>SP157X</b>	0.8152	0.8314	0.0462	0	10
<b>SP158X</b>	1.7135	1.6473	0.0519	0	14
<b>SP160X</b>	1.1892	1.1544	0.0439	0	14
<b>SP161X</b>	1.1937	1.2278	0.0439	0	14
<b>SP162X</b>	1.0131	0.965	0.0469	0	10
<b>SP163X</b>	0.7774	0.849	0.052	0	18
<b>SP164X</b>	0.9623	0.9139	0.0481	0	7
<b>SP165X</b>	0.7276	0.777	0.0538	0	17
<b>SP166X</b>	1.0139	0.8931	0.0467	0	16
<b>SP167X</b>	0.8493	0.8916	0.045	0	7
<b>SP168X</b>	1.2189	1.288	0.0522	0	18
<b>SP169X</b>	1.5841	1.527	0.045	0	4
<b>SP170X</b>	1.0254	1.084	0.0454	0	3
<b>SP171X</b>	1.1403	1.1036	0.0467	0	5
<b>SP172X</b>	0.7476	0.8162	0.0483	0	9
<b>SP174X</b>	0.0471	0.0466	0.0482	1	6
<b>SP175X</b>	1.2818	1.2065	0.0434	0	7
<b>SP176X</b>	0.6668	0.6673	0.0498	0	5
<b>SP177X</b>	0.7969	0.8584	0.049	0	13
<b>SP178X</b>	0.856	0.8736	0.0486	0	24
<b>SP179X</b>	0.9261	0.9553	0.0439	0	11
<b>SP180X</b>	0.7101	0.6498	0.0349	0	5
<b>SP181X</b>	0.8189	0.7801	0.0435	0	5
<b>SP182X</b>	0.8939	0.9471	0.0479	0	27
<b>SP183X</b>	0.9135	0.9695	0.0544	0	8
<b>SP184X</b>	1.3347	1.3456	0.0439	0	9
<b>SP185X</b>	1.768	1.692	0.0494	0	26
<b>SP186X</b>	1.0596	1.0302	0.0438	0	4

<b>SP187X</b>	1.4393	1.2928	0.0498	0	16
<b>SP188X</b>	0.7049	0.7142	0.0455	0	6
<b>SP189X</b>	1.1572	1.2476	0.0439	0	9
<b>SP190X</b>	0.4593	0.4848	0.0455	0	5
<b>SP191X</b>	1.3475	1.3716	0.0487	0	18
<b>SP192X</b>	1.7744	1.8277	0.0452	0	22
<b>SP193X</b>	1.2035	1.2136	0.0442	0	3
<b>SP194X</b>	1.6222	1.6024	0.0456	0	16
<b>SP195X</b>	1.5712	1.6418	0.051	0	19
<b>SP196X</b>	0.808	0.7688	0.0463	0	3
<b>SP197X</b>	1.2587	1.2823	0.051	0	16
<b>SP198X</b>	0.5898	0.529	0.0481	0	3
<b>SP199X</b>	1.1679	1.3848	0.0481	0	21
<b>SP200X</b>	1.0404	1.0246	0.0471	0	3
<b>SP202X</b>	1.1646	1.0595	0.0454	0	12
<b>SP203X</b>	1.1368	1.1864	0.0498	0	14
<b>SP204X</b>	1.3381	1.3206	0.0426	0	4
<b>SP205X</b>	1.182	1.1408	0.0438	0	8
<b>SP206X</b>	1.4555	1.4144	0.0498	0	19
<b>SP207X</b>	1.0244	0.9693	0.0534	0	21
<b>SP208X</b>	1.2812	1.1851	0.0544	0	27
<b>SP209X</b>	0.9751	0.9756	0.0442	0	8
<b>SP211X</b>	1.2107	1.2949	0.0542	0	20
<b>SP212X</b>	1.1894	1.163	0.0475	0	9
<b>SP213X</b>	0.7061	0.6753	0.0551	0	24
<b>SP214X</b>	1.0972	1.112	0.0471	0	8
<b>SP215X</b>	0.7751	0.774	0.0493	0	15
<b>SP216X</b>	1.2237	1.0763	0.0437	0	8
<b>SP217X</b>	0.4621	0.4332	0.0806	0	27
<b>SP218X</b>	0.9287	0.9259	0.0473	0	11
<b>SP219X</b>	1.2052	1.2087	0.0527	0	10
<b>SP220X</b>	0.8559	0.7667	0.042	0	5
<b>SP221X</b>	1.1231	1.2359	0.0428	0	4
<b>SP222X</b>	0.8923	0.9051	0.0476	0	11
<b>SP223X</b>	0.7947	0.9263	0.0529	0	16
<b>SP224X</b>	1.1721	1.192	0.0459	0	2
<b>SP225X</b>	1.1828	1.2734	0.0443	0	7
<b>SP226X</b>	1.4786	1.4537	0.0452	0	15
<b>SP227X</b>	0.9968	0.9714	0.0494	0	12
<b>SP228X</b>	0.5013	0.5124	0.0532	0	12
<b>SP229X</b>	1.6286	1.5368	0.0478	0	19
<b>SP230X</b>	0.8554	0.8483	0.0447	0	13
<b>SP231X</b>	0.9565	0.9309	0.0437	0	5
<b>SP232X</b>	0.9482	1.0032	0.0511	0	10
<b>SP233X</b>	1.4548	1.4776	0.0471	0	16
<b>SP234X</b>	1.4318	1.4389	0.0483	0	16



<b>SP235X</b>	1.579	1.5679	0.0447	0	9
<b>SP236X</b>	0.9784	0.9526	0.0488	0	2
<b>SP237X</b>	0.7048	0.7535	0.0423	0	7
<b>SP238X</b>	0.8875	0.8228	0.0517	0	20
<b>SP239X</b>	0.5593	0.5927	0.0432	0	5
<b>SP240X</b>	1.3321	1.2557	0.045	0	4
<b>SP241X</b>	1.6154	1.5615	0.0487	0	16
<b>SP242X</b>	0.9356	0.8288	0.0439	0	13
<b>SP243X</b>	0.7179	0.7735	0.0434	0	12
<b>SP244X</b>	1.2787	1.3661	0.0463	0	9
<b>SP245X</b>	1.1631	1.3463	0.0476	0	17
<b>SP246X</b>	0.9762	1.0815	0.0497	0	11
<b>SP247X</b>	0.8572	0.7128	0.0451	0	2
<b>SP248X</b>	1.3181	1.3543	0.0513	0	17
<b>SP249X</b>	1.4922	1.4285	0.0489	0	28
<b>SP250X</b>	0.6891	0.7231	0.0458	0	11
<b>SP251X</b>	1.6099	1.4338	0.0471	0	20
<b>SP252X</b>	1.0005	1.0057	0.0485	0	8
<b>SP253X</b>	0.5212	0.5379	0.043	0	7
<b>SP254X</b>	1.6936	1.6532	0.0493	0	28
<b>SP255X</b>	1.2086	1.2258	0.0588	0	12
<b>SP256X</b>	1.2586	1.2458	0.0482	0	26
<b>SP257X</b>	0.8423	0.8368	0.0409	0	11
<b>SP259X</b>	0.9259	0.9241	0.0536	0	14
<b>SP260X</b>	0.7692	0.7278	0.0501	0	20
<b>SP261X</b>	1.336	1.3289	0.0449	0	11
<b>SP262X</b>	1.115	1.1599	0.0467	0	15
<b>SP263X</b>	0.4559	0.5515	0.0451	0	2
<b>SP264X</b>	1.0208	1.0214	0.0529	0	23
<b>SP265X</b>	0.5981	0.6155	0.0427	0	2
<b>SP266X</b>	1.4458	1.4773	0.0638	0	25
<b>SP267X</b>	1.2604	1.2629	0.0459	0	2
<b>SP268X</b>	0.8316	0.7178	0.0492	0	6
<b>SP269X</b>	0.3926	0.3629	0.0454	0	11
<b>SP270X</b>	0.9576	0.9334	0.0508	0	26
<b>SP271X</b>	0.6098	0.6871	0.0477	0	2
<b>SP272X</b>	0.0453	0.0459	0.0447	1	15
<b>SP273X</b>	0.6986	0.6081	0.0478	0	11
<b>SP274X</b>	1.1117	0.9955	0.0485	0	2
<b>SP275X</b>	1.3823	1.5494	0.0487	0	9
<b>SP276X</b>	1.4529	1.402	0.047	0	19
<b>SP277X</b>	1.7089	1.6575	0.0454	0	8
<b>SP278X</b>	0.8566	0.8524	0.0499	0	12
<b>SP280X</b>	1.2408	1.185	0.0516	0	20
<b>SP281X</b>	0.5289	0.5556	0.0433	0	11
<b>SP282X</b>	1.1157	1.0798	0.0465	0	20

<b>SP283X</b>	1.603	1.6492	0.0476	0	8
<b>SP284X</b>	0.8268	0.846	0.0537	0	24
<b>SP285X</b>	0.9697	0.9957	0.0442	0	14
<b>SP286X</b>	0.8984	0.8468	0.0436	0	10
<b>SP287X</b>	1.3968	1.3512	0.0515	0	22
<b>SP288X</b>	0.9305	0.8507	0.0475	0	14
<b>SP289X</b>	1.0634	1.1259	0.0424	0	2
<b>SP290X</b>	1.7394	1.5035	0.048	0	16
<b>SP291X</b>	1.3357	1.4093	0.0491	0	21
<b>SP292X</b>	1.2196	1.2613	0.05	0	21
<b>SP293X</b>	2.0126	2.0928	0.0534	0	24
<b>SP294X</b>	1.1964	1.1639	0.0515	0	19
<b>SP295X</b>	0.8276	0.7608	0.0454	0	4
<b>SP296X</b>	1.1755	1.25	0.0447	0	4
<b>SP297X</b>	0.8862	0.9308	0.047	0	14
<b>SP298X</b>	1.0422	1.0081	0.0478	0	13
<b>SP299X</b>	0.9517	0.9622	0.0495	0	5
<b>SP300X</b>	0.8814	0.8289	0.0521	0	20
<b>SP301X</b>	1.067	1.0326	0.0484	0	13
<b>SP302X</b>	0.3716	0.3775	0.0491	0	16
<b>SP303X</b>	1.0748	1.0551	0.0487	0	13
<b>SP304X</b>	1.534	1.5989	0.0514	0	22
<b>SP305X</b>	1.1984	1.2013	0.0472	0	8
<b>SP306X</b>	0.8421	0.9776	0.0426	0	7
<b>SP307X</b>	0.7322	0.7966	0.0508	0	20
<b>SP308X</b>	1.2353	1.1755	0.0473	0	27
<b>SP309X</b>	0.8468	0.9409	0.0449	0	6
<b>SP310X</b>	0.993	1.1365	0.0424	0	7
<b>SP311X</b>	1.5459	1.4672	0.0499	0	14
<b>SP312X</b>	0.8875	0.7668	0.0476	0	7
<b>SP313X</b>	1.0189	0.9056	0.0517	0	27
<b>SP314X</b>	1.3059	1.2449	0.0439	0	3
<b>SP315X</b>	1.3192	1.2866	0.0485	0	28
<b>SP316X</b>	1.8122	1.8389	0.073	0	24
<b>SP317X</b>	1.2648	1.2552	0.0488	0	8
<b>SP318X</b>	1.1862	1.2628	0.0541	0	21
<b>SP319X</b>	1.0105	0.9231	0.044	0	2
<b>SP320X</b>	0.7544	0.7786	0.0442	0	10
<b>SP321X</b>	0.9085	0.8985	0.0431	0	5
<b>SP323X</b>	1.7816	1.837	0.0473	0	8
<b>SP324X</b>	0.7257	0.78	0.046	0	5
<b>SP325X</b>	0.6882	0.64	0.0492	0	26
<b>SP326X</b>	1.7988	1.8446	0.0513	0	22
<b>SP327X</b>	0.5767	0.5468	0.0466	0	10
<b>SP328X</b>	0.4265	0.4411	0.0497	0	12
<b>SP329X</b>	0.9337	1.1276	0.0432	0	20

<b>SP330X</b>	1.1762	1.2916	0.0461	0	16
<b>SP331X</b>	1.9338	1.9181	0.0594	0	22
<b>SP332X</b>	1.4099	1.3664	0.0557	0	20
<b>SP333X</b>	1.0516	1.0579	0.0489	0	16
<b>SP334X</b>	0.7685	0.856	0.0514	0	12
<b>SP335X</b>	0.5779	0.647	0.0495	0	4
<b>SP336X</b>	0.5826	0.5835	0.0497	0	12
<b>SP337X</b>	1.4224	1.3094	0.0467	0	8
<b>SP338X</b>	1.4696	1.4436	0.0532	0	23
<b>SP339X</b>	1.3126	1.2786	0.0456	0	13
<b>SP340X</b>	1.3368	1.3128	0.051	0	4
<b>SP341X</b>	1.8077	1.7838	0.0485	0	16
<b>SP342X</b>	0.825	0.8292	0.0421	0	10
<b>SP343X</b>	1.3467	1.2399	0.0464	0	16
<b>SP344X</b>	1.0574	1.0346	0.0527	0	28
<b>SP345X</b>	0.1898	0.1858	0.0451	0	3
<b>SP346X</b>	1.0848	1.0749	0.0454	0	5
<b>SP347X</b>	0.9186	0.9301	0.0471	0	3
<b>SP348X</b>	1.1955	1.2173	0.0484	0	4
<b>SP349X</b>	0.7821	0.7985	0.0491	0	14
<b>SP350X</b>	0.545	0.6307	0.0438	0	13
<b>SP351X</b>	0.7691	0.6828	0.0501	0	4
<b>SP352X</b>	1.4335	1.4875	0.0504	0	8
<b>SP353X</b>	1.1996	1.1548	0.0483	0	14
<b>SP354X</b>	1.1659	1.0814	0.0381	0	12
<b>SP355X</b>	0.485	0.4589	0.0526	0	28
<b>SP356X</b>	0.9538	1.084	0.0473	0	7
<b>SP357X</b>	0.8444	0.8728	0.0532	0	23

### Anexo 3

Valores de OD de los controles negativos, positivos y buffer de dilución de cada una de las placas.

<i># placa</i>	<i>Con. Positivo</i>		<i>Con. Negativo</i>		<i>Buffer de dilución</i>	
1	0.9072	1.1961	0.0477	0.0457	0.0428	0.0431
2	0.918	1.0399	0.0459	0.0408	0.0419	0.0427
3	0.9352	0.953	0.0437	0.0451	0.0463	0.0427
4	1.0365	1.0571	0.0495	0.0435	0.0458	0.0445
5	0.9233	0.8314	0.0432	0.0428	0.0441	0.0429
6	0.9051	1.0748	0.043	0.0423	0.0487	0.0431
7	1.1488	1.1218	0.044	0.043	0.0446	0.044
8	0.9013	1.1866	0.045	0.0441	0.0445	0.0474
9	1.2061	1.2761	0.0451	0.0437	0.044	0.0442
10	1.0422	1.1317	0.0484	0.0494	0.0425	0.0469
11	1.1281	1.0238	0.0445	0.044	0.0436	0.0504
12	1.1942	1.1593	0.0447	0.0481	0.0501	0.0437
13	1.2113	1.0913	0.0454	0.0477	0.047	0.0476
14	1.1001	1.1462	0.0454	0.045	0.057	0.0593
15	1.2459	1.2645	0.0453	0.0443	0.0483	0.0488
16	1.4033	1.3782	0.0473	0.0477	0.0489	0.0478
17	1.4681	1.4558	0.0515	0.049	0.0478	0.0473
18	1.1378	1.0982	0.0463	0.0484	0.0476	0.0494
19	1.2328	1.2237	0.049	0.0634	0.049	0.052
20	1.1291	1.1437	0.0472	0.0641	0.048	0.0691
21	0.859	0.9517	0.0489	0.048	0.0508	0.0593
22	1.5894	1.5498	0.0492	0.0473	0.0473	0.0483
23	1.6443	1.6555	0.0492	0.0503	0.0496	0.0483
24	1.6588	1.6668	0.0457	0.0488	0.0499	0.0531
25	1.5634	1.5516	0.0491	0.0512	0.0489	0.06
26	1.1265	1.0589	0.0482	0.0476	0.0477	0.0495
27	1.1172	1.101	0.0474	0.0482	0.0476	0.0484
28	1.0703	1.0749	0.0484	0.0495	0.0495	0.0494
32	0.9628	0.9368	0.0491	0.0493	0.0482	0.0498