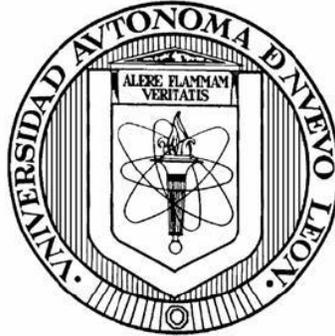


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“DETECCIÓN DE NOROVIRUS, VIRUS DE HEPATITIS A Y ROTAVIRUS EN
VEGETALES Y SU CORRELACIÓN CON PRESENCIA DE COLIFAGOS COMO
INDICADORES DE CONTAMINACIÓN VIRAL”

POR

L.B.G. AXEL ALEJANDRO OSSIO
RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el
Grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Julio, 2020

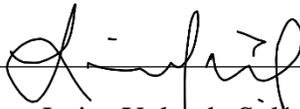
**“DETECCIÓN DE NOROVIRUS, VIRUS DE HEPATITIS A Y ROTAVIRUS EN
VEGETALES Y SU CORRELACIÓN CON PRESENCIA DE COLIFAGOS
COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN VIRAL”**

Comité de Tesis



Dr. José Ángel Merino Mascorro

Presidente



Dra. Luisa Yolanda Solís Soto

Secretario



Dra. Norma Laura Heredia Rojas

1er. Vocal



Dr. José Santos García Alvarado

2do. Vocal



Dr. Néstor Guadalupe Casillas Vega

3er. Vocal

Índice de contenido.

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Enfermedades virales transmitidas por alimentos e inocuidad alimentaria.....	5
2.1.1 Propagación y transmisión de las enfermedades virales transmitidas por alimentos.....	6
2.1.2 Contribución de los virus a el problema mundial de las ETAs.	7
2.2 Agentes virales asociados a alimentos.....	7
2.2.1 Norovirus.....	9
2.2.1.1 Epidemiología.....	12
2.2.2 Hepatitis A.....	14
2.2.2.1 Epidemiología.....	16
2.2.3 Rotavirus.....	17
2.2.3.1 Epidemiología.....	19
2.3 Estado del arte en la detección viral.....	20
2.3.1. RT-qPCR.....	22
2.4 Indicadores de contaminación.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPOTESÍS.....	28
5. OBJETIVO GENERAL.....	29
5.1 Objetivos específicos.....	29
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
6.1 Metodología, diagrama general.....	30
6.2 Obtención de muestras.....	30
6.2.1 Cuantificación de colifagos somáticos.....	30
6.2.2 Elución de la carga viral.....	31
6.3 Extracción de RNA total por el método de trizol/cloroformo.....	31
6.4 Síntesis de cDNA.....	32
6.5 Detección y cuantificación por qPCR.....	32

6.6 Análisis de correlación y regresión lineal.....	33
7. RESULTADOS.....	34
7.1 Cuantificación de colifagos.....	34
7.2. Cuantificación viral.....	36
7.2.1 Curvas de calibración y eficiencias de amplificación.....	36
7.2.2 Detección viral.....	37
7.2.3 Cuantificación de RV en muestras.....	38
7.3 Correlación entre virus entéricos y colifagos.....	39
8. DISCUSIÓN.....	42
9. CONCLUSIONES.....	46
10. BIBLIOGRAFÍA.....	47

Índice de tablas.

Tabla 1. Virus asociados (más no limitados) al tracto gastrointestinal en humanos.....	8
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación viral de los cuatro virus entéricos.....	33
Tabla 3. Cuantificación de colifagos somáticos en muestras de lechuga y perejil.....	34
Tabla 4. Presencia de virus patógenos en muestras de lechuga y perejil.	38
Tabla 5. Cuantificación de RV en muestras de lechuga.....	38
Tabla 6. Cuantificación de RV en muestras de perejil.	38
Tabla 7. Modelos de regresión lineal para concentraciones de RV.....	41

Índice de figuras.

Figura 1. Clasificación de los norovirus en 5 genogrupos (GI-V) y 32 genotipos basados en la diversidad de secuencias en la proteína de cápside completa VP1. Las cepas humanas se agrupan dentro de GI, GII y GIV (Patel et al., 2009).....	11
Figura 2. Composición genómica y el ciclo replicativo de norovirus (de Graaf et al., 2016)..	12
Figura 3. Composición génica y tipos de partículas infecciosas de VAH (Lemon et al., 2018).....	15
Figura 4. Ciclo replicativo de Rotavirus (Crawford et al., 2017a).....	19
Figura 5. Análisis de presencia de colifagos somáticos entre muestras.....	35
Figura 6. Curva estándar de NoV GI, GII y GIV.....	36
Figura 7. Curva estándar de VHA.....	37
Figura 8. Curva estándar de Rotavirus.....	37
Figura 9. Análisis de correlación de Spearman entre colifagos somáticos y copias genómicas de RV en lechuga.....	39
Figura 10. Análisis de correlación de Spearman entre colifagos somáticos y copias genómicas de RV en muestras de perejil.....	40

RESUMEN.

Los bacteriófagos tienen características morfológicas similares con muchos virus patógenos entéricos. Debido a las dificultades asociadas con la detección de patógenos virales en alimentos, como Norovirus (NoV), Hepatitis A (HAV) y Rotavirus (RV), los bacteriófagos se están convirtiendo en indicadores atractivos de contaminación viral, ya que se sugiere puedan imitar su supervivencia. En este estudio, se investigó el potencial de colifagos somáticos como indicadores de contaminación viral en vegetales de hoja verde comercializados en mercados locales. Un total de 40 enjuagues (cada uno consistente de 4 vegetales enjuagados en amortiguador de elución TGBE) de lechuga y perejil se sometieron a extracción de ARN por Trizol/cloroformo y se les realizó la transcripción inversa de ácidos nucleicos. La detección y cuantificación de NoV GI, NoV GII, NoV GIV, HAV y RV se realizó mediante qPCR utilizando G-blocks y plásmidos como controles positivos. La enumeración de colifagos somáticos se realizó según la EPA (método 1602). Se realizó un análisis de correlación de Spearman de los resultados y análisis de regresión lineal único con el propósito de representar un modelo de predicción de lo que sería una estimación de la contaminación por recuentos de colifagos somáticos. NoV o HAV no se detectaron en ninguna muestra. RV estuvo presente en una concentración de 707.050 GC (media) con un rango mínimo de 1.82 copias genómicas (CG) y un máximo de 7477.578 CG en 40 muestras de lechuga. Se obtuvo una media de 352.839 CG con un rango de 0.182 a 5194.888 CG. El recuento de colifagos somáticos en lechuga fue de 36.32 PFU/l en promedio, con un mínimo de 0.8 y un máximo de 800 PFU/ml; en tanto que, en 40 muestras de perejil, se obtuvo un promedio de 166.3 PFU/ml con un rango de detección de 0.8 a 1222.0 PFU/ml. Se obtuvo una $r^2 = -0.4885243$ en el caso de la correlación entre los colifagos somáticos y las copias genómicas en lechuga. Mientras que en perejil fue de -0.1448956 , siendo en ambos casos una correlación negativa no perfecta. Se generó un modelo de regresión lineal usando lechuga como matriz, obteniendo un r^2 de 0.009373, y una r^2 de 0.0084 en el caso de perejil. La concentración en copias genómicas totales de RV mostró una variación de 0.84% a 0.9373% entre las diferentes matrices. En base a una correlación negativa, el modelo permite una predicción de contaminación viral por Rotavirus, realizando las cuentas de solo colifagos somáticos. Existe, a pesar del novedoso esquema de vacunación de RV, aun contaminación de alimentos, no descartando así una transmisión de enfermedad por este medio.

ABSTRACT

Bacteriophages have similar morphological characteristics with many enteric pathogenic viruses. Because of the difficulties associated with direct detection of viral pathogens in food, such as Norovirus (NoV), Hepatitis A (HAV) and Rotavirus (RV), bacteriophages are becoming attractive indicators of viral contamination, suggesting that they can mimic their survival. In this study, we investigated the potential of somatic coliphages as indicators of viral contamination of leafy green vegetables expended on local markets. A total of 40 rinses (each one consisting of rinse with TGBE) of four vegetable samples (lettuce and parsley) were subjected to RNA extraction by Trizol/chloroform. Reverse transcription of nucleic acids was performed. Detection and quantification of NoV GI, NoV GII, NoV GIV, HAV and RV was carried out by qPCR using G blocks as positive controls. The enumeration of somatic coliphages was according to EPA (1602 method). A Spearman correlation analysis of results was performed. A single linear regression analysis was made with the purpose of represent a prediction model of what would be an estimation of contamination by somatic coliphages counts. NoV or HAV were not detected in any samples. RV was present in a concentration of 707.050 GC (mean) with a minimum range of 1.82 GC and a maximum of 7477.578 GC in a total of 40 samples of lettuce. In the other hand a mean of 352.839 GC with a minimum range of 0.182 GC and a maximum of 5194.888 GC was measured. A somatic coliphage count in lettuce of 36.32 PFU/ ml was obtained on average with a minimum limit of 0.8 and maximum of 800. In 40 samples of parsley, an average of 166.3 PFU / ml was obtained with a minimum limit of 0.8 and maximum of 1222.0 PFU/ ml. An $r^2 = -0.4885243$ was obtained in the case of the correlation between somatic coliphages and genomic copies in lettuce. While in parsley a correlation of $r^2 = -0.1448956$ was obtained. A model of lineal regression using lettuce as a matrix was generated, obtaining an r^2 of 0.009373, while modeling using parsley obtained an r^2 of 0.0084. The concentration in total genomic copies of Rotavirus has a 0.84% to 0.9373% variation in data between different matrices. Based on a negative correlation, the model allows the prediction of Rotavirus contamination, measuring counts of only somatic coliphages. Despite the novel RV vaccination scheme, there's still a food contamination, thus not ruling out a disease transmission by this means.

1. INTRODUCCIÓN

Los virus son cada vez más reconocidos como causas importantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) en todo el mundo (Masago et al., 2018). Los virus no son de vida libre y solo son capaces de replicarse dentro de las células vivas de humanos, otros animales, plantas o bacterias. Como tales, los virus transmitidos por los alimentos, a diferencia de las bacterias, no pueden replicarse en estos. La mayoría de estos virus carecen de envoltura viral, conteniendo el ácido nucleico en una capa proteína en lugar de lipídica, y por lo tanto son extremadamente estables en el medio ambiente, siendo en ocasiones capaces de soportar técnicas de procesamiento de alimentos, altas y bajas temperaturas, desinfección por químicos como sales de amonio y cloro, así como procesos que involucren altas presiones, usualmente usados para controlar patógenos bacterianos, pudiendo entonces sobrevivir durante largos períodos en los alimentos, en las manos, en las heces, en superficies y pisos que entran en contacto con los alimentos. La ruta de transmisión no solo está limitada a alimentos, siendo el agua una fuerte frecuente e importante, en parte debido al incremento de la población que cada vez más dificulta el abastecimiento de agua potable para el consumo y la producción de mariscos o para la cosecha de productos hortofrutícolas y su procesamiento (Miranda & Schaffner, 2019).

En la última década, ha habido un aumento en el conocimiento de datos epidemiológicos de las infecciones virales transmitidas por alimentos, los cuales con mucha frecuencia se propagan a través de heces o vómito de personas infectadas (Miranda & Schaffner, 2019). El norovirus humano (NoVH) y el virus de la hepatitis A (VHA) son las dos causas más comunes de enfermedades virales transmitidas por los alimentos a nivel mundial. El rotavirus humano (RVH) también se presentan en gran frecuencia, sin embargo, han sido desplazados por NoVH como agente causante de diarrea infantil, debido a los esquemas de vacunación exitosos. En general, se considera que el NoVH es la causa más importante de ETAs asociadas con virus en todo el mundo y estimándose que causa de 19 a 21 millones de casos de gastroenteritis aguda por año en los Estados Unidos (Masago et al., 2018; Miranda & Schaffner, 2019).

La detección de estos agentes puede ser un desafío mayor, más complicado que las bacterias cultivables, ya que los virus no se replican fuera del huésped y, por lo tanto, no pueden enriquecerse ni cultivarse. Las cargas virales presentes en las muestras de alimentos y agua

suelen ser mucho más bajas que las encontradas en las muestras clínicas, por lo tanto, los métodos de detección deben ser muy sensibles, por lo que los métodos actuales de detección de virus para alimentos se basan en métodos moleculares (Myrmel et al., 2018).

Se ha demostrado en algunos casos la existencia de correlación entre presencia de fagos bacterianos con la presencia de virus humanos; en un análisis realizado por Formiga-Cruz et al., (2003), se observó que el fago de tipo ARN-F (colifago específico de infección de *E. coli* con pili F y colifago de ARN) estaba significativamente relacionado con la presencia de contaminación viral en mariscos de aguas marinas, llegando a tener un valor predictivo muy fuerte para el virus tipo Norwalk (Norovirus), así como valores predictivos débiles para el virus de la hepatitis A, adenovirus y enterovirus. Específicamente, los colifagos de ARN específicos de F son morfológicamente similares a los enterovirus, calicivirus, astrovirus y hepatitis A y E (Genomas de ARN lineales positivos, no envueltos e icosaédricos). Adicionalmente los colifagos F específicos se han correlacionado positivamente con respecto a coliformes entre concentraciones de NoV GI y GII utilizando coeficientes de correlación de Spearman entre NoV, coliformes y colifagos en muestras de aguas superficiales (Cho et al., 2018b). Sin embargo, poco es sabido acerca de estas mismas correlaciones en matrices de alimentos vegetales, que bien pueden suponer un patrón de contaminación y/o correlación similar a los sistemas marinos, dada su estrecha relación con la matriz en cuestión, el agua. Por lo tanto, en el presente trabajo se buscó la presencia de NoVH, VHA y RVH en muestras de lechuga y perejil expandidas en supermercados del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León y su área metropolitana, por RT-qPCR, así como la determinación de correlación que pudiera existir entre estos virus con la presencia o número de colifagos como indicadores de contaminación viral.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades virales transmitidas por alimentos e inocuidad alimentaria.

En los últimos años, los virus han sido cada vez más reconocidos como causas importantes de ETAs. Los alimentos más frecuentemente vinculados a brotes incluyen a las verduras de hoja verde, frutas frescas y mariscos, así como al agua; sin embargo, cualquier alimento puede estar implicado. Los ingredientes crudos contaminados o los productos frescos pueden obtenerse de lugares muy distantes y usarse como ingredientes en una amplia variedad de alimentos, lo que aumenta el potencial de propagación de infecciones y el impacto de la enfermedad en toda la industria alimentaria (Myrmel et al., 2018).

Los virus actualmente conocidos que pueden infectar a los humanos se agrupan en 24 familias y los que son transmitidos por alimentos pertenecen al menos a 10; incluyendo enfermedades que van desde una diarreica leve hasta síntomas neurológicos graves, sin contar a las infecciones asintomáticas que también son comunes. Los NoVH son la causa más común de gastroenteritis viral transmitida por los alimentos en todo el mundo, y el VHA, que también puede transmitirse por alimentos, sigue siendo una amenaza internacional para la salud. El RVH es frecuentemente asociado a diarreas en infantes, sin embargo, como resultados de programas de vacunación efectivos su incidencia se ha visto considerablemente reducida. Algunos enterovirus, sapovirus y astrovirus también son importantes, aunque en menor medida (Masago et al., 2018; Miranda & Schaffner, 2019).

La mayoría de las evaluaciones de riesgos microbianos en alimentos se han centrado en patógenos bacterianos, sin embargo, se encuentra latente la amenaza que representan los virus entéricos, ya que las medidas frecuentemente utilizadas para controlar la contaminación bacteriana en alimentos o agua no siempre son efectivas para controlar también a los virus. Cuando se realizan las evaluaciones de riesgo viral deben tenerse en cuenta algunos factores importantes como la inactivación del virus a lo largo del tiempo, su susceptibilidad a los desinfectantes, las diferencias en la inmunidad del huésped, en los síntomas clínicos que provoca, la diversidad genética y la aparición de nuevas cepas virales. Durante la última década, se han publicado docenas de evaluaciones de riesgo viral de agentes transmitidos por alimentos o agua, pero a menudo estos estudios se centran en los alimentos comúnmente contaminados y en fuentes ambientales asociadas con los brotes. Las evaluaciones tempranas de riesgo se centran en la calidad del agua de riego y una variedad de virus y las evaluaciones

publicadas más recientemente se han centrado en NoVH en una variedad de productos alimenticios (Bányai et al., 2018; Miranda & Schaffner, 2019; Myrmel et al., 2018).

2.1.1 Propagación y transmisión de las enfermedades virales transmitidas por alimentos.

Los virus asociados a los alimentos se transmiten predominantemente por vía fecal-oral a través de la ingestión de alimentos y/o agua contaminados, o bien, por contacto persona-persona, contacto en superficies y aerosoles. Las aguas residuales, heces humanas y animales, los manipuladores de alimentos infectados y los animales que albergan virus zoonóticos se han identificado como las principales rutas de transmisión (FAO, OMS, 2008).

Es posible que el tratamiento de aguas residuales no elimine o desactive completamente a los virus, y la eficiencia de su eliminación dependerá de la carga viral. Se ha encontrado que el VHA sobrevive en ciertos tipos de estiércol y biosólidos durante más de 60 días. Por lo tanto, el uso de lodos y/o agua contaminados en el riego de productos agrícolas es una ruta de transmisión viral. Las proximidades de las letrinas a las fuentes de agua de riego, o incluso la falta de éstas en las áreas de cultivo, también han sido identificadas como factores de riesgo para la transmisión viral (Miranda & Schaffner, 2019). El agua contaminada utilizada para riego y para diluir agroquímicos y fertilizantes representa un riesgo de contaminación de productos frescos desde antes de la cosecha, mientras que el agua contaminada utilizada para el proceso de lavado puede también convertirse en un vehículo importante. Aunque las personas infectadas arrojan un gran número de virus en sus deposiciones, el NoVH también puede transmitirse a través del vómito, lo que puede conducir a un mayor riesgo de diseminación. Otro factor importante en la transmisión viral es el desprendimiento de partículas virales antes y después de la aparición de los síntomas y por portadores asintomáticos que parecen estar sanos pero que representan un alto riesgo de transmisión a través de la manipulación de alimentos y/o por la contaminación de superficies donde se manipularon los mismos (Masago et al., 2018; Miranda & Schaffner, 2019; Myrmel et al., 2018).

Los NoVH han presentado alta resistencia a agentes desinfectantes de uso común, tales como el cloro, alcoholes y detergentes, que son utilizados constantemente en ámbitos de cosecha, postcosecha y procesamiento de alimentos, sin mencionar la manipulación humana en cada

uno de estos puntos. Dicha resistencia representa una problemática a nivel mundial por las pérdidas económicas que pueden suscitarse, ya sea por pérdida de productos alimenticios o bien por trabajadores hospitalizados y los costos que esto conlleva (Masago et al., 2018; Myrmel et al., 2018).

2.1.2 Contribución de los virus a el problema mundial de las ETAs.

Las ETAs contribuyen en gran medida al número mundial de enfermedades. Los brotes y enfermedades causadas por patógenos transmitidos por los alimentos suponen una carga para la salud, no solo a través de la enfermedad sino también a través de los costos asociados en las poblaciones. Debido a la globalización, el potencial para la propagación de ETAs a través de las barreras nacionales y continentales es inmenso. En todo el mundo, el NoVH es el principal agente de gastroenteritis aguda, causando aproximadamente 1 de cada 5 casos en países desarrollados (CDC, 2016), superando a RVH como la causa más común de gastroenteritis infantil que requieren atención médica. Tan solo NoVH y VHA representan el 20 y 2% respectivamente de las 600 millones de ETAs representando el 7.6 y 4.2% respectivamente de días de discapacidad anuales (DALY por sus siglas en inglés), que puede considerarse como pérdida de vida "saludable" o debido a enfermedad, discapacidad o muerte prematura (Masago et al., 2018; Myrmel et al., 2018; Shukla et al., 2016).

2.2 Agentes virales asociados a alimentos.

Los virus son microorganismos o partículas muy pequeñas, que varían en tamaño desde 0.02 a 0.4 μm diámetro, mientras que las bacterias generalmente varían en tamaño desde 0.5 a 5 μm . A diferencia de las bacterias, que son de vida libre, los virus utilizan las células huésped para replicarse y son muy diversos; por ejemplo, su genoma viral puede ser ADN o ARN, en forma bicatenaria o monocatenaria. La partícula de virus puede variar desde una estructura relativamente simple que consiste en un genoma no envuelto con una sola capa proteica, como es el caso de la mayoría de los virus transmitidos por alimentos, a una estructura bastante compleja que consiste en un genoma segmentado, encapsulado en una cápside de proteína compleja y envuelto por una membrana lipídica. La estructura de la partícula del virus está vinculada a su resistencia ambiental, y las partículas de estructura más compleja son menos resistentes. Los virus causan patrones específicos de enfermedad, ya que cada

grupo de virus tiene su propio rango de hospedador típico y tropismo (Gall et al., 2015; Myrmel et al., 2018).

Se puede encontrar una gran cantidad de virus diferentes en el tracto gastrointestinal humano capaces de provocar enfermedades (**Tabla 1**). Aunque cualquier virus capaz de causar una enfermedad después de la ingestión podría considerarse potencialmente transmitido por los alimentos o agua, la mayoría de estas enfermedades son causadas por el NoVH y VHA. Sin embargo, otros agentes virales como rotavirus, sapovirus, enterovirus, astrovirus, adenovirus y el virus de la hepatitis E han sido implicados en la transmisión de ETAs y/o agua (Bányai et al., 2018; Chatziprodrmidou et al., 2018; Shaheen, 2018).

Tabla 1. Virus asociados (más no limitados) al tracto gastrointestinal en humanos.

Género	Familia	Genoma	Enfermedad	Transmisión*		
				Fecal-oral	Contacto persona-persona	Agua y ambiente.
Norovirus	<i>Caliciviridae</i>	ssRNA	Gastroenteritis	x		x
Hepatitis A	<i>Picornaviridae</i>	ssRNA	Hepatitis	x	x	x
Hepatitis E	<i>Hepeviridae</i>	SsRNA	Hepatitis	x		x
Rotavirus	<i>Reoviridae</i>	DsRNA segmentado	Gastroenteritis	x	x	
Sapovirus	<i>Caliciviridae</i>	ssRNA	Gastroenteritis	x	x	
Astrovirus	<i>Astroviridae</i>	ssRNA	Gastroenteritis, infección al SNC	x	x	x
AdeNoVHirus	<i>AdeNoVHiridae</i>		Gastroenteritis/ enfermedades respiratorias	x	x	x

Tabla 1. Virus asociados (más no limitados) al tracto gastrointestinal en humanos (Continuación).

Género	Familia	Genoma	Enfermedad	Transmisión*		
				Fecal-oral	Contacto persona-persona	Agua y ambiente.
Aichi virus	<i>Picornaviridae</i>	ssRNA	Gastroenteritis	x		x
Coronavirus	<i>Coronaviridae</i>	ssRNA	Gastroenteritis, enfermedades respiratorias, SRAS		x	
Enterovirus	<i>Picornaviridae</i>	ssRNA	Fiebre, encefalitis	x	x	x

*Al ser virus encontrados en el tracto gastrointestinal son todos potencialmente transmitidos por el consumo de alimentos contaminados. Información recopilada de Masago et al., 2018 y Myrmel et al., 2018.

2.2.1 Norovirus.

La familia *Caliciviridae*, está compuesta por 5 géneros, pero solo dos, NoVH y sapovirus son los únicos que causan infecciones en los seres humanos. El NoVH, conocido anteriormente como virus Norwalk, ya que fue identificado por primera vez en 1929 en muestras de heces en un brote de gastroenteritis en Norwalk, Ohio, EUA es el principal agente viral asociado a una gastroenteritis, que fue descrita inicialmente como la “enfermedad del vomito de invierno” por su predilección estacional y la alta frecuencia de vómito en los pacientes. La enfermedad tiene un periodo de incubación de 10 a 51 h, y es caracterizada por vómito, náuseas y/o diarrea acuosa no hemorrágica, dolor muscular y abdominal, escalofríos y fiebre, pudiendo provocar deshidratación. Ocurre generalmente en zonas con pobre calidad de agua potable y los síntomas desaparecen sin tratamiento entre las 12 y 48 h, sin embargo, personas vulnerables como infantes, adultos mayores y sujetos inmunodeprimidos pueden requerir cuidados adicionales ya que se pueden presentar

complicaciones como enterocolitis necrótica (mayormente en neonatos) e incluso la muerte (De Graaf et al., 2016; Glass et al., 2009).

Los NoVH están subdivididos en cinco genogrupos, de los cuales el GI, GII y GIV infectan a humano (refiriendo estos genotipos en conjunto como NoVH), causando enfermedad; los genogrupos GIII y GV afectan a bovinos y ratones respectivamente y se ha sugerido que el genogrupo GVI esta presente en perros domésticos. Se ha reportado que puede ocurrir transmisión zoonótica, dado que los NoVH pueden infectar a cerdos, sin embargo aún se requieren estudios adicionales para elucidar completamente este aspecto y establecer qué animales pueden ser reservorios (Patel et al., 2009). Recientemente se propuso una nomenclatura estandarizada para clasificar los Norovirus en 32 grupos genéticos que forman parte de cinco genogrupos. La mayoría de las cepas relevantes como causa de enfermedades humanas pertenecen a grupos genéticos dentro de los genogrupos I y II (**Figura 1**). Algunos estudios han demostrado que algunos genotipos de NoV pueden estar asociados a una ruta de transmisión particular, por ejemplo, el genotipo GII.4 más asociado a transmisión persona a persona, mientras que los genotipos GII.12 y GI.7 están asociados principalmente a alimentos (Thorne & Goodfellow, 2014). La persistencia del patógeno en el ámbito clínico está relacionada con la viabilidad del virus en el medio ambiente, complicando la completa desinfección y originando brotes recurrentes (Vega et al., 2014).

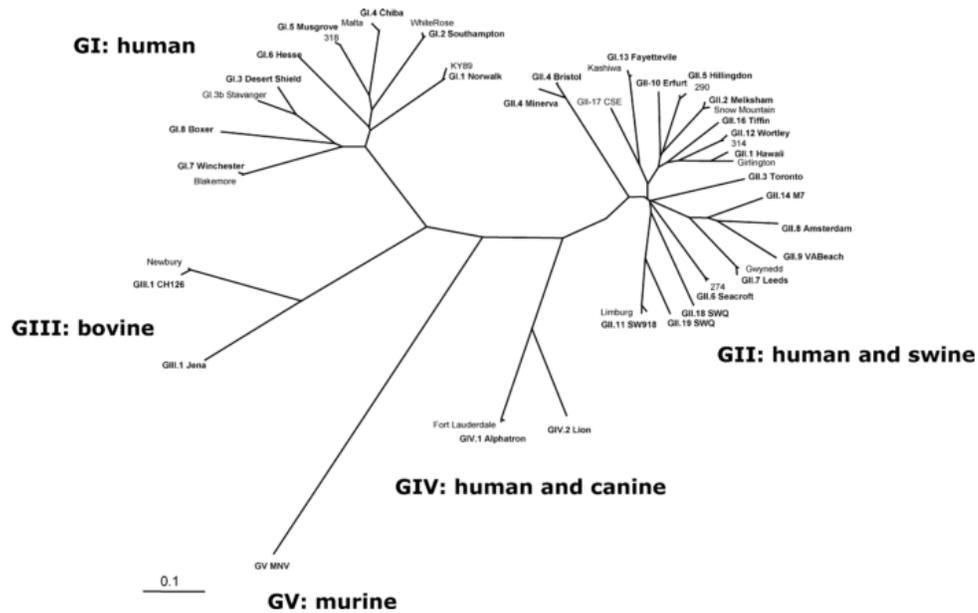


Figura 1. Clasificación de los norovirus en 5 genogrupos (GI-V) y 32 genotipos basados en la diversidad de secuencias en la proteína de cápside completa VP1. Las cepas humanas se agrupan dentro de GI, GII y GIV (Patel et al., 2009).

Las frutas y vegetales poseen un riesgo significativo de transmisión, debido a que con frecuencia son consumidas crudas y se pueden contaminar fácilmente (Rodríguez-Lázaro et al., 2012). En alimentos contaminados, el NoVH puede sobrevivir a temperaturas de congelamiento (-18°C) y es estable hasta a 60°C por 30 min, manteniendo incluso los títulos virales estables bajo condiciones de pasteurización (72-74°C por 1 min) (Mormann, Dabisch, & Becker, 2010).

El virión de NoVH no tiene envoltura. La cápside está compuesta de 180 proteínas VP1 (90 dímeros) con aproximadamente 38-40 nm de diámetro y simetría icosaédrica T=3 (número de triangulaciones T, el cual es el número de triángulos pequeños formados en una sola cara del icosaedro). Los viriones vacíos pequeños tienen un diámetro de aproximadamente 23 nm. Los viriones vacíos tienen aproximadamente 23 nm de diámetro y 60 proteínas VP1 40 con simetría icosaédrica T=1. Su genoma es ARN de sentido positivo monocatenario de 7.3 a 8.3 kb. Su extremo 5' está covalentemente unido a VPg (proteína viral ligada al genoma), y el

extremo 3' está poliadenilado. El ARN del virión es infeccioso y sirve como ARN mensajero viral. La escisión de la poliproteína ORF1 por la cisteína proteínasa tipo 3C codificada por el virus produce las proteínas maduras no estructurales. El ARN subgenómico codifica para la proteína de la cápside (VP1) y la proteína estructural secundaria VP2 que se expresa a través de la terminación/ reiniciación del ARN (**Figura 2**) (Glass et al., 2009; Robilotti et al., 2015).

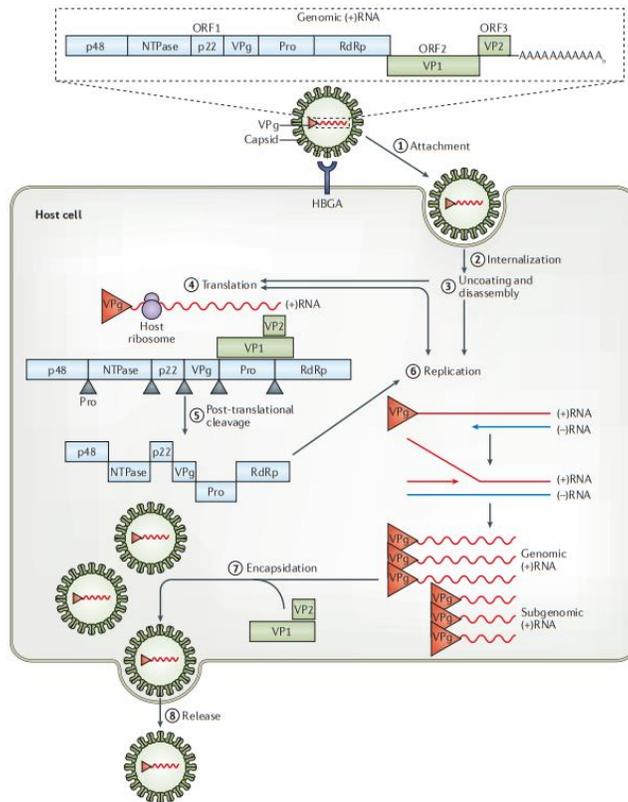


Figura 2. Composición genómica y el ciclo replicativo de norovirus (de Graaf et al., 2016).

2.2.1.1 Epidemiología.

El NoVH es un agente causante de gastroenteritis epidémica, tanto en poblaciones adultas como pediátricas en un amplio rango de regiones geográficas. El centro de control y prevención de enfermedades de Estados Unidos (CDC) ha estimado que es responsable del 60% de los casos de ETAs, llegando a representar hasta 21 millones de casos anuales tan solo en Estados Unidos. Así misma se estima que anualmente es responsable de alrededor de

400,000 casos de visita en emergencias y 71,000 hospitalizaciones, pudiendo incluso estar estas cifras subestimadas ya que muchos enfermos no solicitan atención médica. NoVH provoca el 90% de los casos de gastroenteritis virales, llegando incluso a causar 200,000 muertes anuales en infantes menores a 5 años (Capece & Gignac, 2018; Miranda & Schaffner, 2019).

Entre 2009 y 2012, el 48% (1008 de los 2098) de los brotes de ETAs notificados se debieron a NoVH. Los restaurantes fueron el entorno más común para estos brotes y la mayoría de ellos se atribuyeron a manipuladores de alimentos infectados (70%). Durante un período de 2 meses en 2012, aproximadamente 11,000 personas en Alemania se vieron afectadas por gastroenteritis por NoVH. Las frambuesas congeladas importadas de China causaron más de 700 casos confirmados de NoVH en Quebec entre marzo y julio de 2017. La línea de cruceros de Royal Caribbean llegó a los titulares en diciembre de 2017 después de que más de 500 personas se enfermaron de NoVH en dos de sus cruceros. Los Juegos Olímpicos de Invierno de 2018 en PyeongChang, Corea del Sur se vieron afectados por un brote del NoVH con 194 casos confirmados. La fuente probable del brote fue agua de cocina contaminada (Masago et al., 2018; Miranda & Schaffner, 2019; Myrmel et al., 2018).

La característica mejor descrita de los NoVH es su propensión para causar brotes, resultado de algunas propiedades básicas: la dosis requerida para una infección es muy baja (1-10 partículas), y las personas infectadas eliminan enormes cantidades de virus (hasta 10^{10} NoVH/ g de heces). Además de esto, los NoVH evolucionan a través de la acumulación de mutaciones y la selección de variantes más aptas que escapan a las actividades de bloqueo de receptores de los anticuerpos desencadenados por infecciones previas (Capece & Gignac, 2018).

Se ha reportado a NoVH en el 5 al 36% de los pacientes hospitalizados por gastroenteritis. Este patógeno afecta a personas de todas las edades, sin embargo, son más susceptibles los grupos pediátricos y los adultos mayores, donde la ruta oral-fecal es el principal modo de transmisión, seguido de aerosoles, alimentos, agua y contaminación del ambiente (superficies). Algunos estudios han demostrado que algunos genotipos de NoVH pueden estar asociados a una ruta de transmisión particular, por ejemplo, el genotipo GII.4 es más asociado a transmisión persona-persona, mientras que los genotipos GII.12 y GI.7 están

asociados principalmente a transmisión por consumo de alimentos contaminados. La persistencia del patógeno en el ámbito clínico está relacionada con la viabilidad del virus en el medio ambiente, complicando la completa desinfección y originando brotes recurrentes. (Barclay et al., 2015; Glass et al., 2009; Ong, 2013)

2.2.2 Hepatitis A.

El virus de la VHA, identificado por primera vez en 1973 por Feinstone, pertenece al género *Hepatovirus* y es miembro de la familia *Picornaviridae*. Es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo que se replica principalmente dentro de los hepatocitos. El VHA se transmite más comúnmente a través de la vía oral-fecal por la exposición a alimentos contaminados, agua o contacto físico cercano con una persona infecciosa. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las tasas de infección en los países desarrollados son bajas. Sin embargo, los grupos de alto riesgo incluyen a usuarios de drogas inyectables, personas que viajan a áreas endémicas y comunidades aisladas. El VHA no causa una enfermedad hepática crónica a diferencia de la hepatitis B o C y la hepatitis aguda corresponde a una enfermedad autolimitada y el desarrollo de hepatitis fulminante es raro. Los síntomas típicos de la infección aguda incluyen náuseas, vómitos, dolor abdominal, fatiga, malestar, falta de apetito y fiebre (Iorio & John, 2018).

Los hepatovirus solo se han encontrado en humanos y primates, lo que sugiere que no hay riesgo de introducción desde otro reservorio. Basados en la diversidad genética, los VHA se dividen en seis linajes o genotipos, de los cuales los genotipos I-III infectan a los humanos. Los genotipos I y II contienen subgenotipos (Ia, Ib, IIa y IIb). En las regiones con circulación de HAV endémica, se observa una mayor segregación en agrupaciones geográficamente definidas, una propiedad que se puede utilizar para apoyar las actividades de rastreo de fuentes en brotes de ETAs (Lemon et al., 2018).

Su genoma de ARN de sentido positivo tiene una longitud de aproximadamente 7.5 kb, con un segmento largo de ARN (5'UTR) no traducido unido covalentemente a una pequeña proteína codificada viralmente, VPg (o 3B) en su extremo 5'. El ARN contiene un único marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína gigante, cuya traducción se inicia bajo el control de un sitio de entrada de ribosoma interno altamente estructurado (IRES) dentro de la región 5'UTR. Río arriba del IRES, hay una estructura de horquilla terminal 5'

seguida de dos pseudonudos de ARN y un tracto de poli U/UC conservado, que es prescindible para la replicación y la virulencia. Dentro del ORF, hay un complejo vástago interno, que funciona como un elemento esencial de replicación del ARN que actúa en *cis*. El genoma termina río abajo del ORF en un segmento 3'UTR corto de una cola de poli A. Al igual que con otros virus de ARN de cadena positiva, el ARN sintético de longitud genómica es infeccioso y genera virus cuando se transfecta en cultivos celulares permisivos. Hay dos formas de virus infeccioso; los viriones del VHA no envueltos que se desprenden de las heces de los individuos infectados, son cápsulas de proteínas icosaédricas de 27 nm de diámetro dentro de las cuales se empaqueta el genoma. La estructura antigénica de la cápside está altamente conservada, y todos los hepatovirus humanos forman un solo serotipo. Los viriones casi envueltos (VHAe) que se secretan de forma no lítica de las células infectadas, representan una segunda forma del virus infeccioso. Estos viriones se encuentran en la sangre de personas infectadas y en sobrenadantes de cultivos de células infectadas; están formados por cápsides que contienen ARN dentro de vesículas membranosas que no poseen proteínas virales codificadas en su superficie y representan una característica inusual del VHA que se ha reconocido recientemente y que ocupa un lugar destacado en la patogénesis de la infección (**Figura 3**) (Iorio & John, 2018; Lemon et al., 2018).

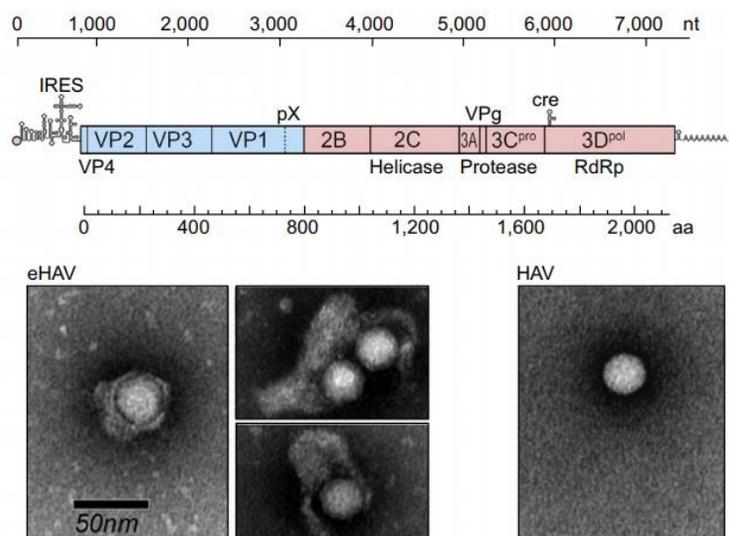


Figura 3. Composición genética y tipos de partículas infecciosas de VHA (Lemon et al., 2018).

2.2.2.1 Epidemiología.

La incidencia de la infección por VHA varía considerablemente dentro y entre los países. En la mayoría de los países en desarrollo, donde la infección por VHA es endémica, la mayoría de las personas se infectan en la infancia, cuando la infección es generalmente asintomática y prácticamente todos los adultos son inmunes. Sin embargo, en los países desarrollados, las infecciones por VHA son menos comunes como resultado de mejores estándares de higiene, donde pocas personas se infectan en la infancia, pero la mayoría de los adultos son susceptibles a la infección por VHA. Cuando la infección por VHA ocurre en la edad adulta puede provocar cuadros más graves. Como resultado, el riesgo potencial de brotes de VHA aumenta en estas regiones (Lemon et al., 2018; Myrmel et al., 2018; Sander et al., 2018).

La mejora del saneamiento ha provocado un cambio en el grupo de edad que adquiere el VHA, sin embargo, en los últimos años, ha habido una disminución en la incidencia de nuevas infecciones. Los Estados Unidos tienen una baja endemicidad, mientras que en México la prevalencia de individuos con el anticuerpo anti-VHA que indica una infección previa es alta. La frecuencia de hepatitis aguda es mayor en E.U.A., pero ha disminuido en un 90%, siendo de 1.2 casos por cada 100,000 habitantes. La mayor reducción se observa en niños y en aquellos estados donde se inició la vacunación de rutina en 1999. Las personas en poblaciones de alto riesgo (viajeros a países en desarrollo, cuidadores de niños, individuos institucionalizados y personas que viven en la pobreza) son responsables de la mayoría de los casos de infección por VHA. Adicionalmente, aunque los manipuladores de alimentos son una fuente poco frecuente de brotes en E.U.A., es un riesgo potencial ya que cualquier alimento mal manipulado puede estar contaminado con VHA (Iorio & John, 2018).

Se han documentado brotes transmitidos por los alimentos y el agua, aunque el modo más común de transmisión ocurre entre personas. El mayor riesgo del VHA transmitido por los alimentos es a través de los alimentos en regiones donde la inmunidad de la población es relativamente limitada. Por lo tanto, los alimentos susceptibles a la contaminación durante la fase de producción, como los moluscos bivalvos (ostras, almejas, mejillones) que se alimentan por filtración, cultivos que se exponen a agua contaminada (por ejemplo, chuga, cebolla verde, etc.) y frutas suaves, como las frambuesas y las fresas, son grupos identificados como de riesgo. Un ejemplo extremo del impacto potencial data de 1988, cuando casi

300,000 casos fueron causados por el consumo de almejas recolectadas en un área contaminada con aguas residuales en Estados Unidos (Lemon et al., 2018).

En 2012, fresas congeladas se vieron implicadas en un brote a gran escala de VHA. Las investigaciones epidemiológicas encontraron que las fresas fueron importadas de China, provocando casos en el norte de Italia. En general, las regiones con altos ingresos tienen niveles muy bajos de endemicidad por VHA (<50% de la población), mientras que es muy alto (> 90% de la población) en regiones de bajos ingresos (Cao et al., 2011). Las regiones de ingresos medios de la sociedad tienen niveles intermedios y bajos de endemicidades (Iorio & John, 2018; Lemon et al., 2018; Miranda & Schaffner, 2019).

2.2.3 Rotavirus.

En 1973 se identificaron partículas de virus en muestras fecales de niños con diarrea aguda y a estas se les denominó *rotavirus* (adaptado de la palabra latina 'rota', que se traduce como rueda) debido a su apariencia morfológica. Los rotavirus humanos (RVH) pronto se confirmaron como una de las principales causas de diarrea potencialmente mortal en bebés y niños menores de 5 años en todo el mundo, así como en las crías de muchas especies de mamíferos y aves. Además de la diarrea, la infección por RVH puede inducir vómitos, malestar y fiebre. El vómito es un sello distintivo de la enfermedad contribuyendo a la deshidratación, pudiendo obstaculizar la efectividad de las intervenciones terapéuticas, como la terapia de rehidratación oral. Las vacunas orales atenuadas contra el RVH fueron autorizadas para uso global en 2006 y actualmente se aplican en más 100 países en todo el mundo. Antes de la introducción de vacunas, la gastroenteritis asociada con el RVH causaba más 500,000 muertes en niños menores de 5 años al año. Aunque la introducción de vacunas ha reducido el número de muertes asociadas con este patógeno, la efectividad de las vacunas autorizadas es subóptima en los países de bajos ingresos, en los cuales, este agente todavía produce alrededor de 200,000 muertes al año (Crawford et al., 2017a).

Se han clasificado diez especies diferentes de RVH (A–J) según la secuencia y las diferencias antigénicas de VP6, una proteína estructural de cápside intermedia. Las especies A de RVH son la causa más común de infecciones en los niños. Los rotavirus de esta especie se clasifican en diferentes genotipos, basándose en las diferencias de secuencia en los segmentos de ARN 7 y 4 (que codifican para VP7 y VP4, respectivamente), que forman la base del

sistema de nomenclatura dual utilizado, por lo que la glicoproteína o VP7 y los subtipos de proteína escindida por proteasa (P, o VP4) se diferencian (Figura 4). Hasta la fecha, se han identificado 32 genotipos G y 47 genotipos P de rotavirus de la especie A, aunque globalmente, predominan seis tipos G (es decir, G1, G2, G3, G4, G9 y G12) y tres tipos P (es decir, P [4], P [6] y P [8]). Además, seis cepas del rotavirus de la especie A generalmente representan más del 90% del rotavirus A que circula a nivel mundial: G1P [8], G2P [4], G3P [8], G4P [8], G9P [8] y G12P [8] (Crawford et al., 2017a; Ramig, 2004).

Los RVH son virus de ARN de doble hebra (dsRNA) sin envoltura que tienen una arquitectura compleja de tres cápsides concéntricas que rodean un genoma de 11 segmentos de dsRNA. Los segmentos de ARN codifican seis proteínas virales estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6). La replicación ocurre por la adhesión a diferentes receptores de glucanos en la superficie de la célula huésped, a través de la interacción con el dominio de la proteína viral VP8. Durante décadas, los sialoglicanos (gangliósidos como GM1 y GD1a) se consideraron el receptor celular clave de glucanos para VP8, aunque esto sigue siendo cierto para las cepas de rotavirus animales, el VP8 de muchas cepas de RVH se une a glicoconjugados no dializados determinados genéticamente, llamados antígenos de grupos histo-sanguíneos (HBGA). Después de la unión inicial, VP7 y el dominio VP5 de VP4 pueden interactuar con varios de estos receptores, que se concentran en las balsas de lípidos para mediar la entrada viral. Dependiendo de la cepa del rotavirus, el virus se internaliza en las células mediante vías endocíticas dependientes de clatrina o independientes de clatrina e independiente de caveolina. Los bajos niveles de calcio dentro del endosoma desencadenan la eliminación de la capa externa de la cápside, que libera la partícula de doble capa transcripcionalmente activa (DLP) en el citoplasma. El ARNm viral se utiliza para la traducción o como plantilla para la síntesis de ARN durante la replicación del genoma; el ARN luego se empaqueta en nuevas DLP dentro de los viroplasmos. El ensamblaje de partículas de tres capas implica la unión de las DLP recién formadas a la proteína no estructural 4 (NSP4), que sirve como un receptor intracelular, seguida de la aparición de DLPs en el retículo endoplásmico. Además, NSP4 media un aumento en los niveles de calcio citoplásmico, que se requieren para la replicación del virus. En el retículo, se pueden observar partículas envueltas transitorias y las proteínas de la cápside externa VP4 y VP7 se agregan a las DLP, la envoltura se pierde, las partículas

de virus maduran y los viriones de la progenie se liberan de las células a través de la lisis celular o mediante un mecanismo de transporte vesicular no clásico independiente de Golgi en células epiteliales polarizadas (Boni-Cisse et al., 2018; Crawford et al., 2017a; Ramig, 2004).

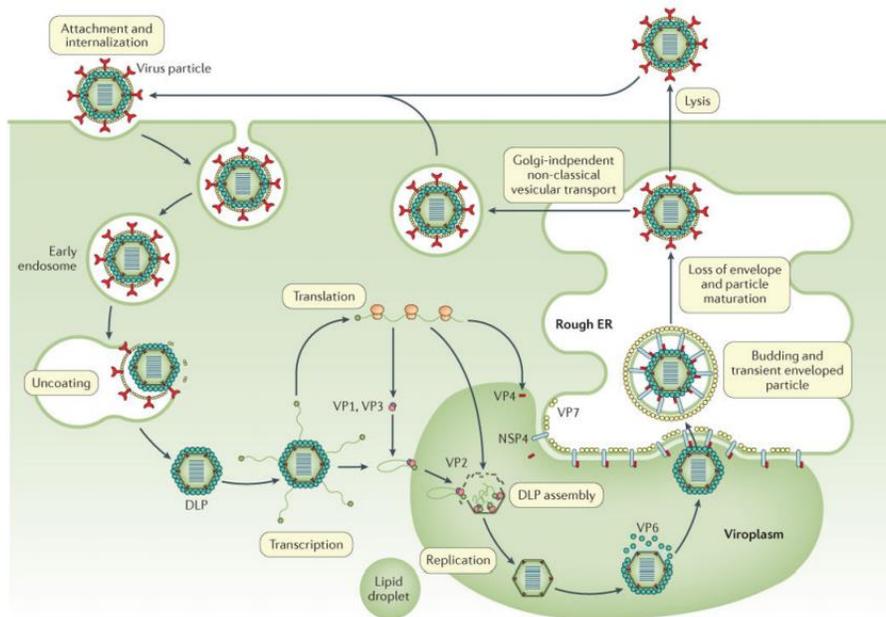


Figura 4. Ciclo replicativo de Rotavirus (Crawford et al., 2017a).

2.2.3.1 Epidemiología.

Los RVH son ubicuos e infectan a casi todos los niños a nivel mundial entre edades de 3 y 5 años. En 2003, se reportaron 114 millones de casos de infección por RVH en niños menores de 5 años en todo el mundo, de los cuales 24 millones requirieron visitas medicas ambulatorias y 2.3 millones requirieron hospitalización. En 2013, los RVH se asociaron con aproximadamente 200,000 muertes en niños menores de 5 años en todo el mundo, aunque la prevalencia de la infección por rotavirus en niños hospitalizados con diarrea es similar en todo el mundo (~ 30 a 50%), más del 90% de los niños con infecciones fatales viven en países de bajos ingresos, lo cual es probable debido al acceso limitado a la atención médica, la falta de terapia de hidratación disponible y una mayor susceptibilidad de enfermedades como la desnutrición, entre otros factores. La diarrea causada por la infección por RVH es de una severidad superior a la media, con respecto a otras diarreas causadas por virus entéricos.

Antes de la introducción de las vacunas contra el RVH, estudios de vigilancia epidemiológica en varios países informaron que alrededor del 40% de las hospitalizaciones por diarrea en niños menores de 5 años de edad eran atribuidas a RVH (Crawford et al., 2017a; Myrmel et al., 2018; Ramig, 2004).

A pesar de ya contar con un esquema de vacunación para este patógeno, sigue siendo importante realizar la vigilancia para monitorear el impacto de la vacunación, reducir la morbilidad y la mortalidad por la enfermedad del rotavirus a lo largo del tiempo, evaluar la efectividad de la vacuna en el uso de campo y determinar las causas de un posible fracaso de la vacuna así como controlar la posible aparición de cepas de RVH que puedan escapar de la vacunación e identificar grupos de población que podrían no estar adecuadamente protegidos por la vacunación (Crawford et al., 2017a).

2.3 Estado del arte en la detección viral.

Si bien en muchos países los virus ahora se consideran una causa extremadamente común de ETAs, rara vez se diagnostican, ya que las herramientas analíticas y de diagnóstico para tales virus no están ampliamente disponibles. Sin embargo, se ha avanzado mucho en los últimos años en términos de la metodología disponible para la detección e identificación de virus en muestras clínicas y de alimentos. Dichos desarrollos deberían contribuir a mejorar la evaluación de la carga microbiana en alimentos, así como a mejorar las estrategias para la prevención y el control de la contaminación por virus en los alimentos y los riesgos asociados (Masago et al., 2018).

El rápido avance de las técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), ha permitido obtener información cuantitativa sobre los genomas virales presentes en el agua. Aunque la qPCR en sí misma proporciona datos cuantitativos con alta precisión, las concentraciones obtenidas a través de este método deben interpretarse con mucho cuidado debido a las posibles pérdidas de eficiencia durante el proceso de detección, incluidas las etapas de concentración de virus, las extracciones de ADN/ARN, la transcripción inversa (RT) y la qPCR. Además, el desarrollo de métodos de detección estándar o acreditados, como el estándar de la Organización de Normas Internacionales (ISO) para la detección de VHA y NoVH utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) (ISO, 2013; ISO, 2017), han permitido que un número

creciente de infecciones por NoVH o VHA se vinculen definitivamente al consumo de alimentos contaminados (Masago et al., 2018; Myrmel et al., 2018).

Los métodos basados en cultivo celular se pueden usar para detectar algunos virus entéricos, utilizando una serie de etapas de concentración y purificación para eluir los virus de la matriz alimentaria, y han demostrado ser eficaces para la detección de algunos enterovirus o cepas de VHA de muestras ambientales o de alimentos. Sin embargo, a pesar de los numerosos intentos de cultivo e incluso de utilizar estructuras de tejido en monocapa o 3D de una variedad de líneas celulares, no se ha podido lograr una replicación *in vitro* reproducible para NoVH (Masago et al., 2018; Myrmel et al., 2018).

Históricamente, los métodos de cultivo celular han sido el estándar de oro para la detección de virus infecciosos; sin embargo, los métodos de PCR y qPCR se han convertido rápidamente en un pilar de la detección de virus entéricos en muestras de agua y alimentos. Esto se debe principalmente a la reducción de los tiempos de detección (horas), a la alta sensibilidad y especificidad, así como a la capacidad de detectar virus que no son fácilmente cultivables y tienden a evadir la detección mediante métodos basados en cultivos. La flexibilidad del diseño del oligonucleótido o sonda significa que los ensayos pueden adaptarse a la especificidad deseada hacia la detección amplia de un virus completo, o hacia cepas de virus más específicas, dependiendo de las secuencias blanco de ADN/ARN seleccionadas. Sin embargo, los métodos basados en PCR tienen la desventaja de ser susceptibles a sustancias inhibitorias que a menudo se concentran en forma conjunta con virus, como los ácidos húmicos, que suelen estar presentes en muestras de agua ambiental y alimentos. Los métodos de extracción basados en perlas magnéticas se utilizan a veces, y se espera que funcionen de manera más efectiva para eliminar los inhibidores de la qPCR (RT) que los métodos basados en columnas. El uso de polimerasas de ADN, que tienen alta resistencia contra los inhibidores es una opción importante para reducir estos efectos (Hassard et al., 2016; Masago et al., 2018; Myrmel et al., 2018).

Si bien la detección por PCR es útil, también ha generado preguntas en la industria alimentaria sobre la interpretación de un resultado de prueba positivo en alimentos, ya que existe poca información que vincule la presencia de genomas con la capacidad infectiva del virus. Sin embargo, dada la ruta principal de transmisión de un virus, su presencia

generalmente sugiere que la contaminación fecal ha ocurrido en algún lugar a lo largo de la cadena de suministro desde la granja hasta la mesa. Esto ha hecho que tanto los reguladores como la industria se pregunten cuál es la mejor manera de responder y reaccionar ante hallazgos positivos (Masago et al., 2018).

2.3.1. RT-qPCR.

El uso de la PCR en el diagnóstico molecular ha aumentado hasta el punto de que ahora se acepta como el estándar de oro para detectar ácidos nucleicos de diversos orígenes y se ha convertido en una herramienta esencial en el laboratorio de investigación. La PCR en tiempo real ha generado una mayor aceptación de la PCR de punto final debido a su mayor rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y el menor riesgo de contaminación por arrastre. En la actualidad, existen cinco procesos químicos principales utilizados para la detección de productos de PCR durante la reacción en tiempo real. Estos son los fluoróforos que se unen al ADN, la endonucleasa 5', oligosondas lineales y de horquilla adyacentes y los amplicones autofluorescentes. Tanto el hardware de amplificación como la química de detección fluorogénica han evolucionado rápidamente a medida que se desarrolla la comprensión de la PCR en tiempo real (Mackay, 2002). El hito más importante en la utilización de la PCR fue la introducción del concepto de monitoreo de la amplificación del ADN en tiempo real a través del monitoreo de la fluorescencia. En la PCR en tiempo real, la fluorescencia se mide después de cada ciclo y la intensidad de la señal fluorescente refleja la cantidad momentánea de ADN en la muestra. En los ciclos iniciales, la fluorescencia es demasiado baja para poder distinguirla del fondo. Sin embargo, el punto en el que la intensidad de la fluorescencia aumenta por encima del nivel detectable corresponde proporcionalmente al número inicial de moléculas de ADN de plantilla en la muestra. Este punto se denomina ciclo de cuantificación y permite la determinación de la cantidad absoluta de ADN objetivo en la muestra según una curva de calibración construida con muestras estándar diluidas en serie (generalmente diluciones decimales) con concentraciones conocidas o números de copias (Bharucha et al., 2018). Los sistemas de PCR en tiempo real se mejoraron mediante la introducción de sondas marcadas fluorogénicas que utilizan la actividad de nucleasa 5' de la ADN polimerasa Taq. La disponibilidad de estas sondas fluorogénicas permitió el desarrollo de un método en tiempo real para detectar solo productos de amplificación específicos. El

desarrollo de sondas etiquetadas fluorogénicas también permitió eliminar el procesamiento posterior a la PCR para el análisis de la degradación de la sonda (Kralik & Ricchi, 2017).

2.4 Indicadores de contaminación.

Tradicionalmente, las bacterias coliformes y *Escherichia coli* se han utilizado como indicadores de la calidad sanitaria en alimentos y esto ha llevado al éxito parcial en la prevención de ETAs de origen bacteriano. Sin embargo, se ha establecido que los estándares bacterianos no siempre revelan la presencia de virus o de miembros de un género, por lo tanto, hay una necesidad de indicadores de contaminación fecal viral para mejorar el control microbiológico de los alimentos y agua. Colifagos somáticos, bacteriófagos y bacteriófagos de ARN específicos de pili F (F-ARN) se han propuesto como posibles indicadores de virus infecciosos. Además, la detección de NoVH humano por PCR se ha propuesto como un índice molecular de contaminación viral de origen humano (Formiga-Cruz et al., 2003a).

Las correlaciones para determinar indicadores virales se han visto en muestras de agua. La evaluación de la sensibilidad y la precisión de los diversos indicadores moleculares es útil para determinar la calidad y fuente del agua. Es probable que la cuantificación molecular de virus o bacteriófagos sea el único método confiable que sea lo suficientemente rápido como para actuar como un sistema de alerta temprana para permitir que las acciones correctivas se apliquen de manera oportuna. Se han analizado varios indicadores de calidad del agua según las frecuencias relativas de enterococos fecales en varias matrices de agua (Arredondo-Hernandez et al., 2017). Los coliformes responden de manera diferente a los factores estresantes ambientales y los procesos de tratamiento diseñados por ingeniería genética que los patógenos virales y, por lo tanto, son indicadores imperfectos. Los bacteriófagos, que son similares en estructura y morfología a los virus entéricos humanos, pueden estar más relacionados con la presencia de patógenos virales (Arredondo-Hernandez et al., 2017).

La intención de estos modelos predictivos y sus correlaciones se ha visto predominantemente en sistemas de cultivo o producción de alimentos de origen de mar y por consiguiente de patógenos e indicadores asociados a estas aguas, Cho et al. (2018), realizó precisamente una matriz de correlación de Spearman con distintos tipos de Norovirus; GI, GI, combinación GI/GII, coliformes totales, coliformes fecales, colifagos F específicos y colifagos somáticos, encontrando que las concentraciones de norovirus (GI/GII) se correlacionaron

significativamente más con los colifagos específicos F ($P < 0,001$) que con los otros indicadores, aumentando su presencia de uno con respecto al otro. Además, los colifagos específicos F estaban altamente correlacionados con ambos norovirus GI y GII individualmente.

También se han realizado análisis de regresión lineal a partir de resultados de detección y correlación de indicadores de contaminación, Liang et al. (2015), comparó Norovirus GII y *Salmonella* spp, por estar entre los patógenos más prevalentes, con indicadores de contaminación como *E. coli* y enterococos, seguido de una regresión lineal múltiple por pasos lo cual permitió una construcción de modelos utilizando ubicaciones de muestreo y en base a esto un programa que permitiera predecir las concentraciones de *Salmonella* spp y NoV utilizando estos indicadores. Dentro del mismo estudio se explicó que la inclusión de indicadores microbianos específicos de humanos como *Methanobrevibacter smithii* y poliomavirus humanos puede mejorar los valores resultantes con una capacidad predictiva mejorada de, por ejemplo, valores $r^2 > 0.76$ (mayor confianza).

2.4.1 Evidencias positivas del uso de colifagos como posibles indicadores.

Estas asociaciones se han visto a lo largo del tiempo en muestras de agua principalmente, Lee et al., (1997) en un estudio con 473 muestras de agua fresca marina evaluó el uso de colifagos F específicos de ARN, *E. coli*, enterococos y enterovirus cultivables obteniendo asociaciones estadísticamente significativas entre el riesgo de enfermedad gastrointestinal y la densidad de colifagos F específicos. En 2007, Colford et al., en 8,000 muestras de agua marina evaluaron colifagos F específicos, somáticos, coliformes fecales, totales, adenovirus y NoVH obteniendo asociaciones significantes entre los niveles de colifagos F específicos con otros parámetros incluidos síntomas como náuseas, resfriado y fiebre.

2.4.2 Correlación entre colifagos y virus entéricos.

Los resultados de estudios que han evaluado la asociación entre la aparición de colifagos y virus en agua dulce, son variados; por ejemplo, Espinosa et al. (2009) encontraron una fuerte asociación entre colifagos específicos de F y enterovirus, pero una relación débil con colifagos y rotavirus y astrovirus en aguas superficiales. Ballester et al. (2005) encontraron que, en muestras de agua marina, tanto los colifagos somáticos como los específicos de F se asociaron significativamente con NoVH, rotavirus y enterovirus, aunque ningún tipo de colifago se asoció significativamente con la presencia de astrovirus. Las cantidades de

colifagos y virus también variaron según la estación, encontrándose menos cantidades de NoVH en meses cálidos. De los datos estacionales y de proximidad, parece que los colifagos se asociaron más con la presencia viral que con *E. coli* y que los colifagos específicos de F tuvieron la mayor asociación con la presencia viral.

Baggi et al. (2001) detectaron colifagos somáticos y específicos F en base al método de detección ISO 10705-1, junto con la presencia de enterovirus, rotavirus y el virus de hepatitis A en base a RT-PCR obteniendo una asociación positiva significativa en muestras de agua fresca en Suiza. Skraber et al. (2004) en muestras de rios en Francia, detectaron colifagos somáticos, enterovirus y NoVH GII por medio del método EPA 1602 e ICC-PCR (PCR acoplada a cultivo celular), determinando que el numero de muestras positivas para las copias genómicas virales de virus entéricos incrementaban con respecto a la densidad de colifagos somáticos. Utilizando el mismo método EPA 1602 y PCR en tiempo real, Rezaeinejad et al. (2014), detectaron colifagos somáticos, a una concentración media de 2.2×10^2 PFU/100ml y colifagos F específicos a 1.1×10^2 PFU/100ml, NoVH GII a 3.7×10^2 copias genómicas/l, Rotavirus a 2.5×10^2 copias/l en muestras de aguas urbanas obteniendo de asociación entre las densidades de los colifagos F específicos y NoVH.

De manera interesante en un estudio de cuatro años de aguas de fuentes superficiales en 10 lugares de prueba en Países Bajos, Lodder et al. (2010) encontraron una asociación significativa entre las densidades de colifagos (específicos F y somáticos) y enterovirus, pero no entre colifagos y otros virus (NoVH, rotavirus y reovirus). NoVH y rotavirus se detectaron en 45% y 48% de las muestras, respectivamente, y se detectaron enterovirus infecciosos y en aproximadamente el 80% de las muestras analizadas, colifagos somáticos y específicos de F en el 100 y el 97% de las muestras respectivamente. Concluyeron que sus resultados no apoyan el papel de los colifagos como indicadores de la calidad del agua de origen de manera significativa, sin embargo, también concluyen que los colifagos pueden ser útiles para determinar la eficacia del tratamiento.

La capacidad de los colifagos (incluidos los diferentes genogrupos de colifagos) y otros virus entéricos para sobrevivir en medio ambiente varía ampliamente, el efecto de los factores ambientales en la supervivencia del colifago se asocia con la morfología, donde se ha demostrado que algunas características estructurales específicas, como las colas, las cápsides

grandes y la falta de una envoltura, se asocian con una mayor resistencia a factores externos. Los efectos del estrés físico (temperaturas y luz solar), antagonistas biológicos (depredación microbiana y degradación enzimática) y antagonistas químicos también son importantes factores que se deben tomar en cuenta en la realización de estas asociaciones.

La importancia de establecer asociaciones y modelos predictivos de contaminación viral en matrices de alimentos expuestos a tratamientos con agua o cultivo con agua de procedencia variable es imperativa para la optimización de controles de calidad viral en alimentos y aguas puesto que ofrecen una reducción en tiempo e insumos, sin mencionar el económico con respecto a las detecciones tradicionales de cada uno de los posibles patógenos asociados. Sin embargo, hacen falta numerosos estudios en cuestión de matrices y número de muestras para entender y establecer estas asociaciones de manera fuerte y eficaz. Es por ello que el establecimiento de este tipo de asociaciones y la determinación de indicadores positivos en muestras de vegetales como lo son el perejil y la lechuga, que son alimentos de consumo cotidiano incluso en un contexto global, permitiría la optimización en la detección y/o prevención de patógenos virales asociados.

3. JUSTIFICACIÓN.

NoVH, VHA y RVH son tres de los principales agentes virales asociados a ETAs, como aquellos de origen vegetal. En todo el mundo, NoVH es el principal agente de gastroenteritis aguda, causando aproximadamente 1 de cada 5 casos en países desarrollados (CDC, 2016), llegando a causar el 20% de todas las ETAs y en segundo lugar VHA con un 2%. En los países donde se implementan vacunas contra el rotavirus, NoVH ha superado a los rotavirus como la causa más común de gastroenteritis infantil que requiere atención médica, por lo mismo la importancia de la vigilancia de rotavirus sigue siendo crucial. NoVH es uno de los patógenos más importantes en salud pública y en la industria de los alimentos, actualmente, dada su alta virulencia y fácil propagación, causando brotes importantes asociados a agua y alimentos, seguido del VHA y finalmente RVH. Aunque es bien sabido que la principal forma de transmisión de estos patógenos es la vía fecal-oral, estos patógenos también tiene alta facilidad de transmisión y propagación, pudiendo estar presentes en alimentos, y agua, por lo que su búsqueda es por demás imperativa, sin embargo, una gran limitante para realizar su búsqueda rutinaria es la dificultad para realizar su detección, requiriéndose ensayos complicados y complejos basados en técnicas de biología molecular. Debido a esto, se han buscado a agentes, tales como los colifagos para poder utilizarse como indicadores de contaminación viral, sin embargo, la existencia de una correlación entre estos con los virus patógenos es controversial. En el presente trabajo realizamos la búsqueda de estos virus patógenos en muestras de lechuga y perejil, alimentos de origen vegetal que se expenden en supermercados del área metropolitana de Nuevo León con el fin de determinar su presencia y evaluar su poder asociativo con respecto a colifagos obtenidos de las mismas muestras por medio de correlaciones estadísticas de Pearson para la elaboración de matrices y posibles modelos posteriores de indicadores de contaminación viral y su predicción de comportamiento en estas matrices de alimentos.

4. HIPOTESÍS.

Existe contaminación por Norovirus (G1, GII y GIV), Hepatitis A y Rotavirus, en muestras de perejil y lechuga que se expenden en supermercados del área metropolitana de Monterrey, N.L., y hay una correlación positiva entre la presencia de colifagos somáticos y los virus entéricos anteriores.

5. OBJETIVO GENERAL.

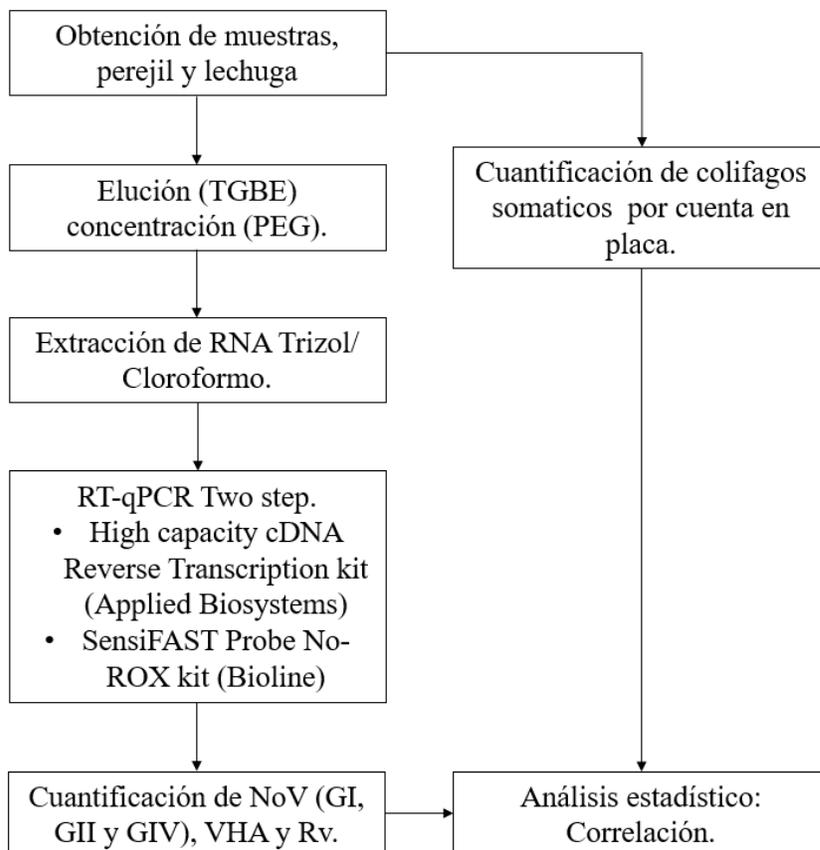
Determinar si muestras de lechuga y perejil obtenidas de mercados del área metropolitana de Monterrey, N.L., están contaminados con Norovirus, Hepatitis A y Rotavirus, así como establecer si existe correlación entre su presencia y la de colifagos somáticos.

5.1 Objetivos específicos.

- 1.- Determinar la presencia de Norovirus genotipos (I, II y IV), Hepatitis A y Rotavirus en muestras de lechuga y perejil obtenidas de mercados del área metropolitana de Monterrey, N.L.
- 2.- Establecer si existe correlación entre la presencia de Norovirus genotipos (I, II y IV), Hepatitis A y Rotavirus y la de colifagos somáticos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Metodología, diagrama general.



6.2 Obtención de muestras.

Un total de 320 muestras de perejil y lechuga, fueron obtenidas aleatoriamente en distintos puntos de venta en Monterrey, Nuevo León y su área metropolitana, sin pertenecer a una marca o distribuidor comercial específica, organizadas en muestras compuestas por 4 muestras de cada vegetal por establecimiento, dando un total de 40 muestras compuestas por vegetal.

6.2.1 Cuantificación de colifagos somáticos.

Se siguió la metodología descrita por la USA EPA; Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure. Se pesaron 40 g en total por muestra compuesta y se suspendieron en 360 ml de agua peptonada 0.1%, se homogenizó por 30 segundos en agitación, 30 segundos de masaje suave y 30 de agitación. A 50 ml de la

elución se le agregaron 2.5 ml de CaCl_2 0.44 mg/ ml y 2.5 ml de un cultivo fresco de *E. coli* CN-13 ATCC 700609. Se adicionaron 50 ml de agar triptona y se distribuyó el contenido en 4 placas Petri. Se incubó a 37°C/ 16 horas. La enumeración fue llevada a cabo de acuerdo con el protocolo y reportado como unidades formadoras de placa UFP/ ml. Se incluyó un control negativo utilizando el colifago ϕ X174 ATCC 13706-B1 sin cultivo bacteriano y el mismo como control positivo.

6.2.2 Elución de la carga viral.

Se pesaron 40 g de cada muestra compuesta y se homogenizó por 30 segundos en agitación, 30 segundos de masaje suave y 30 de agitación. Se agregó 360 ml de buffer de elución Tris 100Mm, Glicina 50Mm, extracto de carne 1%, MgCl_2 50 Mm, pH 9.5 (TGBE). 40 ml de la elución se centrifugaron a 10,000 x g/ 30 minutos a 4°C. El pH fue ajustado a 7.2.

A esta elución final se le agregó 10 ml de polietilenglicol (PEG 8000, Sigma-Aldrich) con 0.3 M NaCl a 10% p/v. Se incubó por 2 horas a 4°C en agitación y se centrifugó a 10,000 x g/ 30 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 500 μ l de PBS seguido de 500 μ l de cloroformo: butanol (1:1) e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 10,000 x g por 15 minutos a 4°C. 150 μ l de este recuperado se fueron utilizados para la extracción de RNA.

6.3 Extracción de RNA total por el método de trizol/cloroformo.

La extracción con trizol se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en el manual de usuario de TRIzol™ Reagent (Catalog Numbers 15596026 y 15596018 de Invitrogen, EE. UU); inicialmente por cada ml de TRIzol utilizado se agregó a cada muestra 0.2 ml de cloroformo, se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C. Seguido de esto, se tomó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo, agregando 0.5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol utilizado, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, se retiró el isopropanol y se agregó 1 ml de etanol al 75% por cada ml de TRIzol y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, se dejó secar a temperatura ambiente, finalmente se agregaron 30 μ l de agua miliQ. Posteriormente se sometió a baño maría por 5 min a 60°C. La concentración del RNA total se cuantificó por medición de su Absorbancia a 260nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

6.4 Síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando el kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems™ EE. UU. La síntesis se realizó en un termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cyclers Applied Biosystems™; 4 pasos: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos y 4°C.

6.5 Detección y cuantificación por qPCR.

Se realizó una PCR punto final para confirmar la presencia del producto de amplificación de todos los agentes virales. Se preparó un gel de agarosa al 1% en TBE1X y se agregaron 3 µl de gel red para la tinción del gel. Se corrieron las muestras en una cámara de electroforesis (Cell GT BIO-RAD) a 90V, para posteriormente visualizar el producto de amplificación en un fotodocumentador Gel logic 2000, Kodak. Los controles positivos utilizados fueron construcciones gBlocks® Gene Fragments, IDT, EE. UU para los tres genogrupos de NoV y VHA. Para RV se utilizó un plásmido pT7-VP6SA11 addgene, EUA, conteniendo la secuencia blanco. Oligonucleótidos para la detección de los virus (Tabla 2) en el caso de NoV GI y GII la región blanco es en el producto VP1, localizado genómicamente en el ORF2. En el caso de NoV GIV su blanco es una proteína no estructural con codificación en el ORF1. En el caso de Rotavirus el blanco es la proteína VP6 y para Hepatitis A la región 5' UTR. Se realizaron diluciones seriadas del cDNA a partir de una concentración conocida de virus (1 a 1,000,000 copias genómicas), y se midió la concentración por medio de qPCR, esto para la generación de curvas estándar para la detección. Se realizó la amplificación en el termociclador PikoReal 96, Thermo Scientific con los siguientes protocolos; 95°C a 5 minutos (activación de polimerasa), 95°C por 10 segundos (desnaturalización) y 60°C 50 segundos (alineación/ extensión) por 40 ciclos. Esto en el caso de NoV GI y GII. La temperatura de alineación/ extensión fue de 55°C en NoV GIV y VHA y de 50°C para RV.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación viral de los cuatro virus entéricos.

Blanco	Oligonucleótidos/ Sonda	Amplicon	Referencia.
Norovirus GI	Forward: 5' GCCATGTTCCGITGGATG 3' Reverse: 5' TCCTTAGACGCCATCATCAT 3' Sonda: FAM-TGTGGACAGGAGATCGCAATCTC-TAMRA	96pb	(Fout et al., 2016)
Norovirus GII	Forward: 5' CAAGAGTCAATGTTTGTAGGTGGATGAG 3' Reverse: 5' TCGACGCCATCTTCATTCACA 3' Sonda: FAM - TGGGAGGGCGATCGCAATCT - TAMRA	98pb	(Ngazoa et al., 2008)
Norovirus GIV	Forward: 5' CCAAAGTTTGAGTCCATGTACAAGTG 3' Reverse: 5' CGACGCCATCTTCATTCACA 3' Sonda: FAM CGATCTCGCTCCCG-TAMRA	103pb	(Chan et al., 2017)
5' UTR. Todos los genotipos de VHA.	Forward: 5' ATAGGGTAACAGCGGCGGATAT 3' Reverse: 5' AATGCATCCACTGGATGAG 3' Sonda: Cy5-AGACAAAACCATTCAACGCCGGAGG-IBRQ	90pb	(DePaola et al., 2010)
VP6 Rotavirus A.	Forward: 5' GGATGTCCTGTACTCCTTGTCAAA 3' Reverse: 5' TCCAGTTTGAAAGTCATTTCCATT 3' Sonda: FAM-ATAATGTGCCTTCGACAAT-TAMRA	145pb	(Logan et al., 2006)

6.6 Análisis de correlación y regresión lineal.

El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando el lenguaje de programación R, usando como plataforma R studio. Se realizó un análisis de correlación de Spearman de acuerdo con las muestras analizadas y virus encontrados, así como la relación entre los mismos virus y colifagos somáticos, con el fin de encontrar la efectividad de estos como indicadores de contaminación viral. Adicionalmente se construyó un modelo predictivo de concentración en base a los indicadores utilizando un modelo de regresión lineal.

7. RESULTADOS.

7.1 Cuantificación de colifagos.

Los recuentos de colifagos somáticos presentes en lechuga (n = 40) variaron en rangos de 0.8 a 800 UFP/ml, mientras que el perejil (n = 40) también hubo recuentos en el rango de 0.8 a 1222 UFP/ml, siendo en estas muestras donde hubo mayor presencia de colifagos somáticos. (Tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación de colifagos somáticos en muestras de lechuga y perejil.

Lechuga (n = 40)		Perejil (n = 40)	
UFP/ml	No. Muestras	UFP/ml	No. Muestras
0.8	7	0.8	3
2	7	2	6
4	3	4	5
6	1	6	2
8	6	8	2
10	2	10	2
12	2	12	1
14	1	14	1
16	1	16	1
18	1	18	2
26	2	26	1
42	1	36	1
48	2	54	1
68	1	60	1
104	1	62	1
112	1	208	1
800	1	238	1
		276	1
		476	1
		632	1
		800	4
		1222	1

La presencia de colífagos somáticos en lechuga tuvo una media de 36.32 UFP/ml mientras que en perejil fue de 166.3. Un análisis de comparación de medias simple por Tukey mostró diferencias (129.94) entre muestras, obteniendo un valor de F de 6.002 a una significancia de 0.01 (Fig. 1).

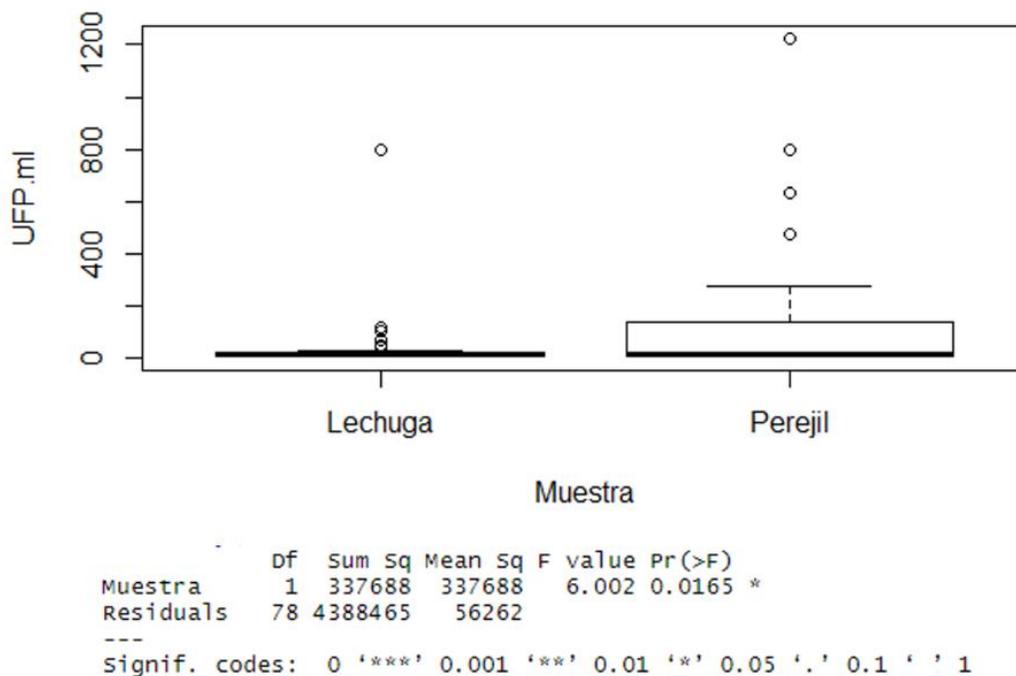


Figura 5. Análisis de presencia de colífagos somáticos entre muestras.

7.2. Cuantificación viral.

7.2.1 Curvas de calibración y eficiencias de amplificación.

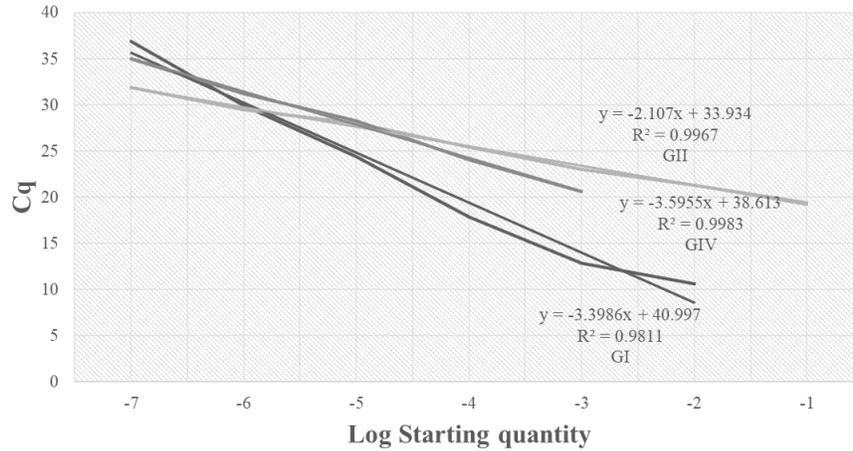


Figura 6. Curva estándar de NoV GI, GII y GIV. Eficiencia de amplificación GI = 96.90 %, GII = 98.27 % y GIV = 89.73 %. El límite de detección para NoV GI fue de 3 copias genómicas a 1.69E+08, el de NoV GII fue de 1.89 copias genómicas a 1.62E+06, y el de NoV GIV fue de 2.02 a 2.05E04 copias genómicas.

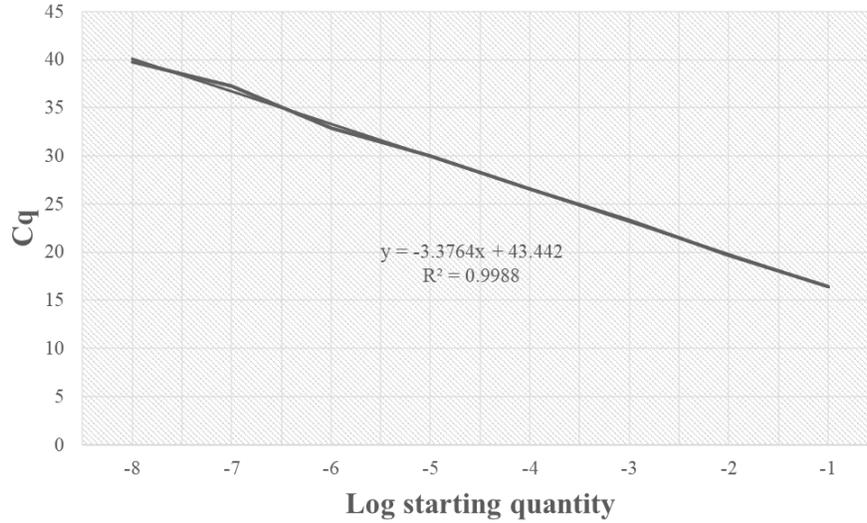


Figura 7. Curva estándar de VHA. Eficiencia de amplificación = 97.78 %. El límite de detección de Hepatitis A fue de 2.36 a 2.00E+7 copias genómicas.

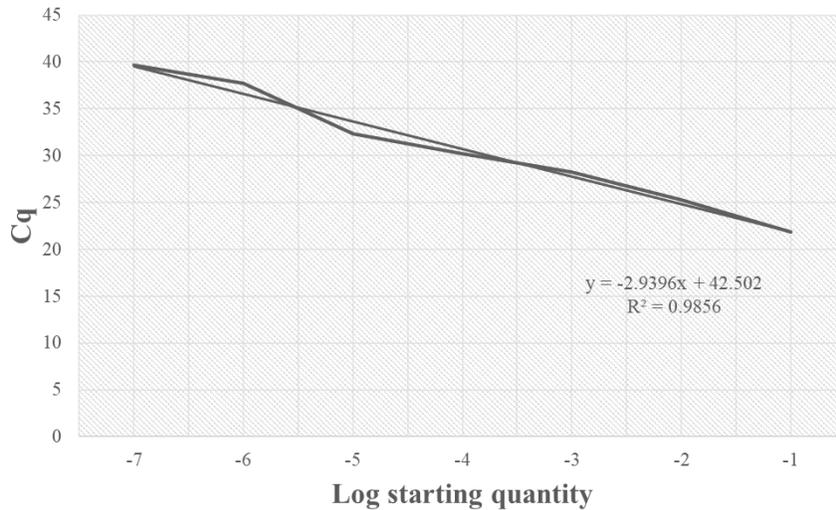


Figura 8. Curva estándar de Rotavirus. Eficiencia de amplificación = 118.87 %. El límite de detección de Rotavirus fue de 1.89 a 2.14E+06 copias genómicas.

7.2.2 Detección viral.

No se detectó la presencia de NoV (todos los genogrupos) o VHA en ninguna muestra. Un total de 9 muestras de 40 fueron positivas para Rotavirus A en lechuga y 8 de 40 en perejil (Tabla 4).

Tabla 4. Presencia de virus patógenos en muestras de lechuga y perejil.

Vegetal	Muestras positivas	Virus				
		NoV GI	NoV GII	NoV GIV	HVA	Rv
Lechuga	9/40	0	0	0	0	9 (22.5%)
Perejil	8/40	0	0	0	0	8 (20%)

7.2.3 Cuantificación de RV en muestras.

La presencia de RV en muestras de lechuga osciló entre 28 y 7477 copias genómicas totales (Tabla 5). Mientras que en muestras de perejil fue de 34 a 5194 copias genómicas totales (Tabla 6).

Tabla 5. Cuantificación de RV en muestras de lechuga.

	Promedio C _q	Replica 1	Replica 2	D.E.	GC/Rx
1	36.18	35.74	36.62	0.62	1.41E+02
2	34.475	34.37	34.58	0.15	5.38E+02
3	33.9	34.21	33.59	0.44	8.44E+02
4	39.11	42.64	35.58	4.99	1.43E+01
5	29.53	29.47	29.59	0.08	2.59E+04
6	29.11	29.14	29.08	0.04	3.60E+04
7	29.415	29.25	29.58	0.23	2.83E+04
8	29.06	29.13	28.99	0.10	3.74E+04
9	30.505	30.61	30.4	0.15	1.21E+04

Tabla 6. Cuantificación de RV en muestras de perejil.

	Promedio C _q	Replica 1	Replica 2	D.E.	GC/ Rx
1	34.155	34.23	34.08	0.11	6.91E+02
2	42.625	42.64	42.61	0.02	9.08E-01
3	34.21	34.03	34.39	0.25	6.62E+02
4	29.525	29.36	29.69	0.23	2.60E+04
5	30.715	30.2	31.23	0.73	1.02E+04
6	30.105	30.45	29.76	0.49	1.65E+04
7	30.14	29.75	30.53	0.55	1.60E+04
8	35.91	38.4	33.42	3.52	1.75E+02

7.3 Correlación entre virus entéricos y colifagos.

Siendo RV el único virus entérico detectado en las muestras, se comparó la relación entre colifagos somáticos y este. Se aplicó una regresión lineal para determinar la relación entre el patógeno y los colifagos somáticos, así como su valor correlativo en base a un valor correlativo. Los modelos fueron creados con base en la presencia por muestra y pueden ser de utilidad para predecir la concentración de RV usando los colifagos somáticos como indicadores (Fig 5 y 6, Tabla 7). Se obtuvo una $r^2 = -0.4885243$ ($P < 0.05$) en el caso de la correlación entre colifagos somáticos y copias genómicas en lechuga. Mientras que en perejil $r^2 = -0.1448956$ ($P > 0.05$). Estos valores indican una correlación negativa, donde la presencia viral, el aumento de una variable (Colifagos o Rotavirus) hace disminuir de manera inversamente proporcional la otra. Al menos usando lechuga como matriz, donde se encontró una diferencia significativa esto representa una linealidad en términos de concentración viral, sugiriendo un dinamismo inverso entre las interacciones colifagos somáticos-RV.

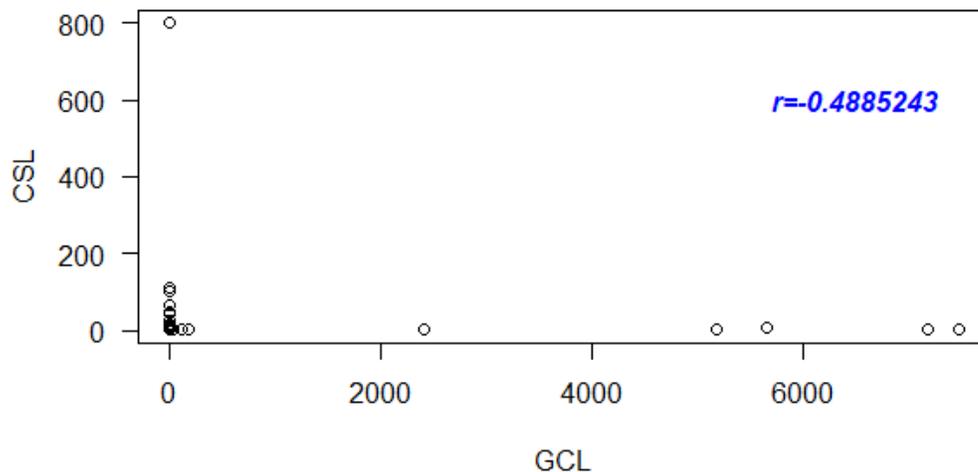


Figura 9. Análisis de correlación de Spearman entre colifagos somáticos y copias genómicas de RV en lechuga.

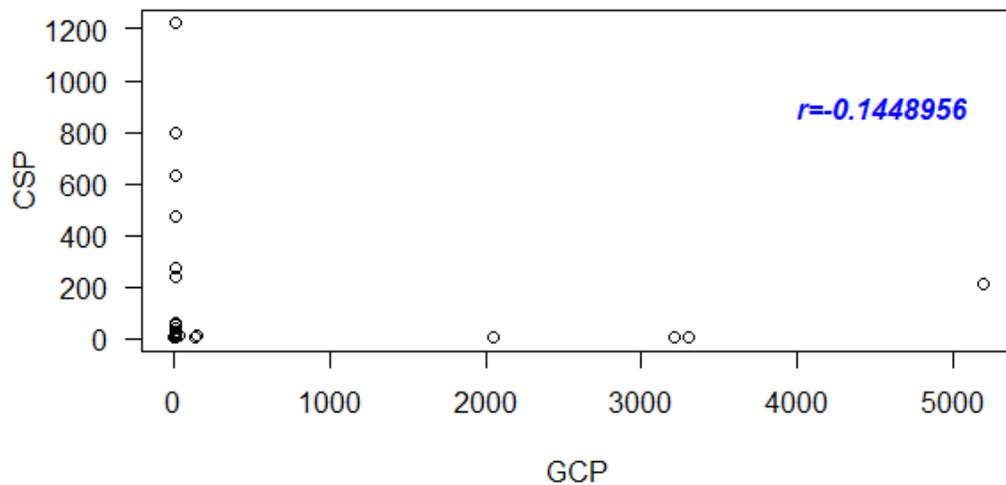


Figura 10. Análisis de correlación de Spearman entre colifagos somáticos y copias genómicas de RV en muestras de perejil.

Si bien, RV no es la mayor causa documentada de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, RV fue el patógeno prevalente detectado en nuestras muestras. Su relación con indicadores microbianos como lo son los colifagos somáticos fue comparada. Se aplicó un análisis de regresión lineal simple para determinar esta relación. Los modelos fueron creados usando los datos de la cuantificación de RV y colifagos somáticos en las dos matrices, lechuga y perejil, siendo modelos específicos para cada uno. Ambos modelos y sus respectivas variables individuales con valores P significantes fueron seleccionados automáticamente por R studio.

El modelo usando lechuga como matriz incluye la concentración de colifagos somáticos con una $r^2 = 0.009373$ ($P < 0.05$) el cual indica que la concentración de RV tiene el 0.9373% de variación de datos explicados por los colifagos somáticos. Usando perejil como matriz los datos tienen una variación del 0.84%, con una r^2 de 0.0084 ($P < 0.05$).

Tabla 7. Modelos de regresión lineal para concentraciones de RV.

Modelo	r ²	Significancia del modelo	Indicador	Coefficiente	Intervalo de confianza 95%	Significancia ^a	Constante
Rotavirus (Copias genómicas)							
Lechuga	0.009373	0.05	Colífagos somáticos	-0.00620	-0.02713332 a 0.01473269	0.05	40.70393
Perejil	0.0084	0.001		-0.02583	-0.1179712 a 0.06632097	0.001	175.37212

^aValor de $P < 0.05$ indica diferencia significativa.

8. DISCUSIÓN.

En comparación con la presencia y concentración de colifagos somáticos las muestras tanto de lechuga como de perejil, se encontró diferencias (129.94 UFP/ml) significativas, teniendo en lechuga una media de 36.32 y un límite mínimo de 0.8 y máximo de 800, mientras que la media fue de 166.3 UFP/ ml en perejil con un límite mínimo de 0.8 y máximo de 1222.0. Estos límites exactos tienen tendencia a variar entre tipo de muestras, sin embargo, son relativamente estables al punto de ser considerados indicadores de contaminación para patógenos bacterianos e incluso virales. Estudios previos indicaron en 5 muestreos de agua subterránea los colifagos somáticos variaron en promedio de 10, 189, 99, 46 y 57 (medias geométricas) UFP/ml (Liang et al., 2015a). En muestras de mariscos se han reportado variaciones desde 1,132 +- 10,366 o 70 +- 1105 UFP/ ml (Formiga-Cruz et al., 2003b). En granjas productoras de vegetales frescos se han obtenido medias de colifagos de 2.12 (1.85, 2.38) Log₁₀ NMP y 1.00 (0.54, 1.45) en agua de riego (Bartz et al., 2017); en melón las medias van de 3.81 (3.42, 4.20) y 3.45 (2.88, 4.03) Log₁₀ NMP en pre y post cosecha respectivamente, incrementándose (4.08 Log₁₀ NMP) en la etapa final de empaquetamiento y distribución, evidenciando alta estabilidad en términos de su concentración a lo largo de su cadena de producción (Bartz et al., 2016). La pura presencia de colifagos somáticos sugiere una posible contaminación fecal humana y con ello el riesgo de la presencia de agentes patógenos tanto bacterianos como virales.

Ningún genogrupo de NoV (GI, GII y GIV) fue detectado en las muestras de lechuga y perejil, siendo el mismo caso para el VHA. Aunque NoV, RV y VHA no se replican en el ambiente o en muestras de alimentos, son más persistentes que las bacterias a condiciones desfavorables, tales como temperatura, altas presiones y desinfectantes, gracias en gran medida a su cubierta proteica, menos susceptibles que los virus envueltos. Tomando en cuenta la relativa estabilidad de estos virus entéricos y del RNA genómico viral, el tratamiento de la muestra desde pre y post cosecha, procesamiento, empaquetado y distribución no debería impactar de manera significativa en la presencia de estos agentes. Tomando en cuenta la resistencia de la partícula viral y del RNA, la integridad de la cápside y los títulos de RNA viral pueden mantenerse altamente estables (Richards et al., 2012); por ejemplo NoV se ha reportado que soporta múltiples ciclos de congelación/ descongelación (-80 °C / + 22 °C) o después de almacenamiento a -80 °C por hasta 120 días. El VHA, es resistente

también a estas condiciones, por lo que pueden darse brotes por alimentos congelados contaminados, como fue el caso del brote multinacional en Mayo del 2013 en Europa debido a frambuesas y otras bayas (Severi et al., 2015; Torok et al., 2019). Todo esto nos puede dar como indicio que la ausencia de NoV y VHA no está necesariamente relacionada con el almacenamiento que se les aplicó a nuestras muestras (-80°) por periodos de tiempo relativamente largos (~1 año), sino que fue debido a su ausencia en las muestras. Sin embargo, es importante considerar los tiempos de muestreo, dado que NoV cuenta con la particularidad de ser un virus relativamente estacional mientras que otros virus como RV suelen ser relativamente ubicuos en el ambiente, principalmente en entornos relacionados a tratamiento de agua, aguas de uso recreacional y de riego (Crawford et al., 2017b). De ser posible y de contar con las mejores medidas de vigilancia epidemiológica, otros datos que suelen ser relevantes es la situación de brotes en el momento de la toma de muestra.

Para el agua de riego, la mayoría de las determinaciones refieren a RV y otros virus entéricos humanos, mientras que para los alimentos se considera una amplia variedad de virus y productos donde NoV o VHA son frecuentes ya que parecen transmitirse con mayor frecuencia (Bosch et al., 2018). Recientemente se han encontrado niveles de entre 10^4 y 10^5 copias genómicas de RV en vegetales crudos y de hoja verde, así como en queso (de Castro Carvalho et al., 2020), lo que concuerda con lo obtenido en este estudio (1.892 a 7477.578 copias totales en lechuga y 0.182 a 5194.888 copias totales en perejil). Aunque se desconoce el proceso previo a la llegada de los vegetales al punto de venta, hay que considerar a RV como un agente con probabilidad de contaminación por el uso de agua de riego en vegetales, incluso mayor que para NoV y VHA que ocurre por ruta oral-fecal. El hallazgo de contaminación por virus entéricos en vegetales en este estudio (como es el caso de RV) es importante y preocupante, ya que los vegetales, en particular aquellos que se consumen generalmente crudos están actuando como vehículos de transmisión de patógenos humanos. Cabe destacar que numerosos brotes de virus transmitidos por alimentos se han asociado con el consumo de productos frescos contaminados (Nasheri et al., 2019).

En un estudio realizado por Liang et al., (2015a), se evaluó la presencia de correlaciones entre diversos patógenos, indicadores microbianos y otros parámetros ambientales, utilizando el método de Spearman, encontrando correlaciones significantes ($P < 0.05$) en

muestras de aguas recreacionales entre patógenos como *Salmonella* sp. *P. aeruginosa*, NoV GI y GII, astrovirus, adenovirus y RV. Utilizando indicadores como colifagos F+ y colifagos somáticos, solo se encontraron correlaciones positivas significativas con bacterias y no para virus. De la misma entre RV y colifagos F específicos en muestras de agua subterránea no se encontró correlación (Ferguson et al., 2012a). mediante el análisis de Spearman. Se ha visto que algunos virus patógenos como RV no suelen correlacionarse bien con indicadores microbianos, en donde el tipo de ácido de nucleico puede influir en la inactivación viral, por ejemplo, al exponerse a radiación UV en donde los virus de RNA serán más resistentes debido a la ausencia de timina en su RNA. RV tiene una alta resistencia a degradación proteolítica debido a que posee una cápside de 3 capas proteicas (Espinosa et al., 2008; Ferguson et al., 2012a). Aunque existen algunas correlaciones significativas entre la detección de otros patógenos la evidencia sugiere que estas pueden ser bastante específicas del tipo y parámetros de muestra y por lo tanto difíciles de generalizar. Se ha sugerido el uso de una combinación simultánea de diversos indicadores tales como colifagos somáticos y F específicos, y coliformes totales, entre otros (Liang et al., 2015a), aumentando de esta manera la sensibilidad y especificidad siempre y cuando se tome en cuenta el patógeno a detectar.

Dado que RV fue el único virus detectado en nuestras muestras, se comparó su relación con colifagos somáticos como indicadores de contaminación. En el primer modelo usando lechuga como matriz tuvo un valor r^2 de 0.009373 mientras que con el perejil r^2 fue 0.0084. Esto puede sugerir que la concentración en copias genómicas totales de RV tiene un 0.84% a 0.9373% de variación de datos entre distintas matrices. Dicho de otra manera, utilizando colifagos somáticos como indicadores, estos tienen una habilidad de predicción de que esté presente RV cuando están colifagos mejor en lechuga ($r^2=0.009373$) que en perejil ($r^2=0.0084$). Sin embargo, este valor no es estadísticamente significativo para brindar una predicción certero, sin embargo, nos puede ser de utilidad como punto de comparación. En un el estudio publicado por Hot et al., (2003), se correlacionaron y modelaron la cantidad de colifagos somáticos con la presencia, mas no cuantificación de virus entéricos, entre ellos RV. Ellos no observaron asociación significativa entre la concentración de colifagos somáticos y la presencia de patógenos virales no enterovirus (Wilcoxon $P = 0.14$) en muestras de agua superficial (Hot et al., 2003). En un mismo estudio no se encontró correlación entre la presencia de RV y colifagos F específicos, sin embargo, se reportaron correlaciones

estadísticamente significativas entre presencia de RV en acuíferos poco profundos y la de patógenos bacterianos como *E. coli* y *Shigella* (Ferguson et al., 2012b). Un dato interesante en este mismo estudio reveló que las propiedades químicas del agua como presencia de NO_3 pueden impactar en la presencia de RV. En ríos urbanos se ha observado que las concentraciones de Adenovirus humano y de colifagos somáticos pueden correlacionarse significativamente, mas no para otros virus entéricos donde la correlación con estos, entre ellos RV y bacterias indicadoras podría depender de cuando ocurrió la contaminación fecal (Mackowiak et al., 2018). Pocos estudios correlativos y de modelaje se han hecho entre indicadores microbianos y virus entéricos en alimentos, esto debido en gran medida a la dificultad de detección viral, sin embargo algunos estudios se han hecho entre NoV y productos del mar y lácteos, encontrando r^2 de hasta 0.443, demostrando que un monitoreo de estos indicadores, particularmente colifagos pueden ser útiles (Cho et al., 2018a). Sin embargo más estudios con distintas muestras y niveles de contaminación son necesarios (Cho et al., 2018a; Yavarmanesh et al., 2015).

Estos modelos predictivos tienen la finalidad de predecir presencia y/o concentración de patógenos en muestras de alimentos, sin la necesidad de detectar directamente el patógeno en cuestión. Pueden ser aplicados para la evaluación del riesgo microbiano para la salud humana en dichas muestras. Sin embargo, estudios adicionales sobre la supervivencia de los indicadores microbianos y patógenos en distintas muestras, condiciones y concentraciones ayudarían a validar los resultados y proporcionarían un enfoque representativo de la gran cantidad de matrices.

9. CONCLUSIONES.

1. El recuento de colifagos somáticos en lechuga fue 36.32 UFP/ml en promedio con un rango de 0.8 a 800 UFP/ml. En perejil la media fue 166.3 UFP/ml, con un rango de 0.8 a 1222.0 UFP/ml.
2. El rotavirus fue detectado en muestras de lechuga (media 707.050 GC con rango de 1.82 a 7477.578 GC) y perejil (media de 352.839 GC, con rango de 0.182 GC a 5194.888 GC).
3. Los análisis de correlación arrojaron valores $r^2 = -0.4885243$ entre colifagos somáticos y copias genómicas de RV en lechuga. Mientras que en perejil se obtuvo una correlación de $r^2 = -0.1448956$.
4. Se generó un modelo usando lechuga como matriz obteniendo r^2 de 0.009373 ($P < 0.05$) y para perejil la r^2 fue de 0.0084 ($P < 0.05$).
5. La concentración (copias genómicas totales) de RV tuvo de 0.84% a 0.9373% de variación entre distintas matrices.
6. El coeficiente de determinación r^2 indicó que el modelo fue capaz de explicar el 0.9373% de variabilidad en la medición de colifagos somáticos mediante la concentración en copias genómicas de RV en lechugas y un 0.84% en perejil. Esto indica que el modelo explica este nivel de porción de la variabilidad de los datos de respuesta en torno a su media.
7. Los modelos de regresión lineal generados son útiles para la predicción de contaminación, el valor menor 50% de variabilidad entre datos es esperado al ser condiciones biológicas altamente dinámicas.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Arredondo-Hernandez, L. J. R., Diaz-Avalos, C., Lopez-Vidal, Y., Castillo-Rojas, G., & Mazari-Hiriart, M. (2017). FRNA Bacteriophages as Viral Indicators of Faecal Contamination in Mexican Tropical Aquatic Systems. *PLOS ONE*, *12*(1), e0170399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170399>
- Bányai, K., Estes, M. K., Martella, V., & Parashar, U. D. (2018). Viral gastroenteritis. *Lancet (London, England)*, *392*(10142), 175–186. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31128-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31128-0)
- Barclay, L., Park, G. W., Vega, E., Hall, A., Parashar, U., & Lopman, B. (2015). Infection control for norovirus. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(8), 731–740. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12674>.Infection
- Bartz, F. E., Hodge, D. W., Heredia, N., de Aceituno, A. F., Solís, L., Jaykus, L. A., Garcia, S., & Leon, J. S. (2016). Somatic Coliphage Profiles of Produce and Environmental Samples from Farms in Northern México. *Food and Environmental Virology*, *8*(3), 221–226. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9240-x>
- Bartz, F. E., Lickness, J. S., Heredia, N., de Aceituno, A. F., Newman, K. L., Hodge, D. W., Jaykus, L. A., García, S., & Leon, J. S. (2017). Contamination of fresh produce by microbial indicators on farms and in packing facilities: Elucidation of environmental routes. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(11). <https://doi.org/10.1128/AEM.02984-16>
- Bharucha, T., Sengvilaiaseuth, O., Vongsouvath, M., Vongsouvath, M., Davong, V., Panyanouvong, P., Piorkowski, G., Garson, J. A., Newton, P. N., de Lamballerie, X., & Dubot-Pérès, A. (2018). Development of an improved RT-qPCR Assay for detection of Japanese encephalitis virus (JEV) RNA including a systematic review and comprehensive comparison with published methods. *PloS One*, *13*(3), e0194412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194412>
- Boni-Cisse, C., Meite, S., Mlan, A. B., Zaba, F., N’Guessan, R., Lepri, N. A., & Lartey, B. (2018). Genotypic characterization of rotavirus in children under 5 years circulating in Côte D’Ivoire from 2010 to 2013. *Virology Journal*, *15*(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0973-z>
- Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F. S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., van Lieshout, L., Marthi, B., Myrmel, M., Sansom, A., Schultz, A. C., Winkler, A., Zuber, S., & Phister, T. (2018). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 285, pp. 110–128). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.001>
- Cao, J., Bi, S., Meng, Q., Shen, L., Zheng, H., & Zhang, Y. (2011). Genotyping of acute hepatitis a virus isolates from China, 2003-2008. *Journal of Medical Virology*, *83*(7), 1134–1141. <https://doi.org/10.1002/jmv.22086>
- Capece, G., & Gignac, E. (2018). Norovirus. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30020637>
- Chan, P. K. S., Guan, H., & Chan, M. C. W. (2017). *The norovirus : features, detection and*

prevention of foodborne disease. Academic Press.

- Chatziprodromidou, I. P., Bellou, M., Vantarakis, G., & Vantarakis, A. (2018). Viral outbreaks linked to fresh produce consumption: a systematic review. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(4), 932–942. <https://doi.org/10.1111/jam.13747>
- Cho, K., Lee, C., Park, S. J., Kim, J. H., Choi, Y. S., Kim, M. S., Koo, E. S., Yoon, H. J., Kang, J. H., Jeong, Y. S., Choi, J. D., & Ko, G. P. (2018a). Use of coliphages to investigate norovirus contamination in a shellfish growing area in Republic of Korea. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(30), 30044–30055. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2857-6>
- Cho, K., Lee, C., Park, S., Kim, J. H., Choi, Y. S., Kim, M. S., Koo, E. S., Yoon, H. J., Kang, J.-H., Jeong, Y. S., Choi, J. D., & Ko, G. (2018b). Use of coliphages to investigate norovirus contamination in a shellfish growing area in Republic of Korea. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(30), 30044–30055. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2857-6>
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M. A., Greenberg, H. B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., & Estes, M. K. (2017a). Rotavirus infection. *Nature Reviews. Disease Primers*, *3*, 17083. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
- Crawford, S. E., Ramani, S., Tate, J. E., Parashar, U. D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M. A., Greenberg, H. B., O’Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., & Estes, M. K. (2017b). Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*, 17083. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
- de Castro Carvalho, S. V., Rogovski, P., Cadamuro, R. D., Viancelli, A., Michelon, W., dos Reis, D. A., Santana das Chagas, I. A., Assenço, R., da Silva Lanna, M. C., Treichel, H., & Fongaro, G. (2020). Co-contamination of food products from family farms in an environmental disaster area in Southeast Brazil with pathogenic bacteria and enteric viruses. *Archives of Virology*, *165*(3), 715–718. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04501-9>
- de Graaf, M., van Beek, J., & Koopmans, M. P. G. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(7), 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.48>
- De Graaf, M., Van Beek, J., & Koopmans, M. P. G. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(7), 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.48>
- DePaola, A., Jones, J. L., Woods, J., Burkhardt, W., Calci, K. R., Krantz, J. A., Bowers, J. C., Kasturi, K., Byars, R. H., Jacobs, E., Williams-Hill, D., Nabe, K., & Nabe, K. (2010). Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(9), 2754–2768. <https://doi.org/10.1128/AEM.02590-09>
- Espinosa, A. C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., & Arias, C. F. (2008). Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research*, *42*(10–11), 2618–2628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.01.018>

- Ferguson, A. S., Layton, A. C., Mailloux, B. J., Culligan, P. J., Williams, D. E., Smartt, A. E., Saylor, G. S., Feighery, J., McKay, L. D., Knappett, P. S. K., Alexandrova, E., Arbit, T., Emch, M., Escamilla, V., Ahmed, K. M., Alam, M. J., Streatfield, P. K., Yunus, M., & van Geen, A. (2012a). Comparison of fecal indicators with pathogenic bacteria and rotavirus in groundwater. *Science of the Total Environment*, *431*, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.060>
- Ferguson, A. S., Layton, A. C., Mailloux, B. J., Culligan, P. J., Williams, D. E., Smartt, A. E., Saylor, G. S., Feighery, J., McKay, L. D., Knappett, P. S. K., Alexandrova, E., Arbit, T., Emch, M., Escamilla, V., Ahmed, K. M., Alam, M. J., Streatfield, P. K., Yunus, M., & van Geen, A. (2012b). Comparison of fecal indicators with pathogenic bacteria and rotavirus in groundwater. *Science of the Total Environment*, *431*, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.060>
- Formiga-Cruz, M., Allard, A. K., Conden-Hansson, A.-C., Henshilwood, K., Hernroth, B. E., Jofre, J., Lees, D. N., Lucena, F., Papapetropoulou, M., Rangdale, R. E., Tsibouxi, A., Vantarakis, A., & Girones, R. (2003a). Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(3), 1556–1563. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1556-1563.2003>
- Formiga-Cruz, M., Allard, A. K., Conden-Hansson, A. C., Henshilwood, K., Hernroth, B. E., Jofre, J., Lees, D. N., Lucena, F., Papapetropoulou, M., Rangdale, R. E., Tsibouxi, A., Vantarakis, A., & Girones, R. (2003b). Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(3), 1556–1563. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1556-1563.2003>
- Fout, G. S., Cashdollar, J. L., Griffin, S. M., Brinkman, N. E., Varughese, E. A., & Parshionkar, S. U. (2016). EPA Method 1615. Measurement of Enterovirus and Norovirus Occurrence in Water by Culture and RT-qPCR. Part III. Virus Detection by RT-qPCR. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *107*, e52646. <https://doi.org/10.3791/52646>
- Gall, A. M., Mariñas, B. J., Lu, Y., & Shisler, J. L. (2015). Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water. *PLOS Pathogens*, *11*(6), e1004867. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004867>
- Glass, R. I., Parashar, U. D., & Estes, M. K. (2009). Norovirus Gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine*, 1776–1785. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416975-3.00016-9>
- Hassard, F., Gwyther, C. L., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., Brett, H., Jones, D. L., McDonald, J. E., & Malham, S. K. (2016). Abundance and Distribution of Enteric Bacteria and Viruses in Coastal and Estuarine Sediments—a Review. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1692. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01692>
- Hot, D., Legeay, O., Jacques, J., Gantzer, C., Caudrelier, Y., Guyard, K., Lange, M., & Andréoletti, L. (2003). Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Research*, *37*(19), 4703–4710. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00439-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00439-1)

- Iorio, N., & John, S. (2018). Hepatitis A. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083664>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8, 108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Lemon, S. M., Ott, J. J., Van Damme, P., & Shouval, D. (2018). Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. In *Journal of Hepatology* (Vol. 68). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.034>
- Liang, L., Goh, S. G., Vergara, G. G. R. V., Fang, H. M., Rezaeinejad, S., Chang, S. Y., Bayen, S., Lee, W. A., Sobsey, M. D., Rose, J. B., & Gin, K. Y. H. (2015a). Alternative fecal indicators and their empirical relationships with enteric viruses, *Salmonella enterica*, and *Pseudomonas aeruginosa* in surface waters of a tropical urban catchment. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 850–860. <https://doi.org/10.1128/AEM.02670-14>
- Liang, L., Goh, S. G., Vergara, G. G. R. V., Fang, H. M., Rezaeinejad, S., Chang, S. Y., Bayen, S., Lee, W. A., Sobsey, M. D., Rose, J. B., & Gin, K. Y. H. (2015b). Alternative fecal indicators and their empirical relationships with enteric viruses, *Salmonella enterica*, and *Pseudomonas aeruginosa* in surface waters of a tropical urban catchment. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 850–860. <https://doi.org/10.1128/AEM.02670-14>
- Logan, C., O’Leary, J. J., & O’Sullivan, N. (2006). Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3189–3195. <https://doi.org/10.1128/JCM.00915-06>
- Mackay, I. M. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1292–1305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
- Mackowiak, M., Leifels, M., Hamza, I. A., Jurzik, L., & Wingender, J. (2018). Distribution of *Escherichia coli*, coliphages and enteric viruses in water, epilithic biofilms and sediments of an urban river in Germany. *Science of the Total Environment*, 626, 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.114>
- Masago, Y., Haramoto, E., Sano, D., Katayama, H., Kitajima, M., Torrey, J. R., & Hata, A. (2018). A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Research*, 135, 168–186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.004>
- Miranda, R. C., & Schaffner, D. W. (2019). Virus risk in the food supply chain. *Current Opinion in Food Science*, 30, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.002>
- Myrmel, M., Sansom, A., Marthi, B., Winkler, A., Zuber, S., Le Guyader, F. S., Lee, A., Bosch, A., van Lieshout, L., Phister, T., Gkogka, E., Loisy-Hamon, F., & Schultz, A. C. (2018). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 285(April 2017), 110–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.001>
- Nasheri, N., Vester, A., & Petronella, N. (2019). Foodborne viral outbreaks associated with

- frozen produce. In *Epidemiology and Infection* (Vol. 147, p. e291). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1017/S0950268819001791>
- Ngazoa, E. S., Fliss, I., & Jean, J. (2008). Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(3), 707–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03597.x>
- Ong, C. W. (2013). Norovirus: A challenging pathogen. *Healthcare Infection*, *18*(4), 133–142. <https://doi.org/10.1071/HI13016>
- Patel, M. M., Hall, A. J., Vinjé, J., & Parashar, U. D. (2009). Noroviruses: A comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*, *44*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.10.009>
- Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *JOURNAL OF VIROLOGY*, *78*(19), 10213–10220. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10213-10220.2004>
- Richards, G. P., Watson, M. A., Meade, G. K., Hovan, G. L., & Kingsley, D. H. (2012). Resilience of Norovirus GII.4 to Freezing and Thawing: Implications for Virus Infectivity. *Food and Environmental Virology*, *4*(4), 192–197. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9089-6>
- Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. a. (2015). Norovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(1), 134–164. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-14>
- Sander, A.-L., Corman, V. M., Lukashev, A. N., & Drexler, J. F. (2018). Evolutionary Origins of Enteric Hepatitis Viruses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *8*(12), a031690. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031690>
- Severi, E., Vennema, H., Takkinen, J., Lopalco, P. L., & Coulombier, D. (2015). Hepatitis A outbreaks. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 15, Issue 6, pp. 632–634). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00021-3)
- Shaheen, M. N. (2018). Burden of Adenovirus, Astrovirus, Norovirus and Rotavirus Gastroenteritis in Egyptian Children during 2000-2017. *J Med Microb Diagn*, *7*(3), 283. <https://doi.org/10.4172/2161-0703.1000283>
- Shukla, S., Cho, H., Kwon, O. J., Chung, S. H., & Kim, M. (2016). Prevalence and evaluation strategies for viral contamination in food products: Risk to human health—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(3), 1–15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1182891>
- Thorne, L. G., & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*, *95*(PART 2), 278–291. <https://doi.org/10.1099/vir.0.059634-0>
- Torok, V. A., Hodgson, K. R., Jolley, J., Turnbull, A., & McLeod, C. (2019). Estimating risk associated with human norovirus and hepatitis A virus in fresh Australian leafy greens and berries at retail. *International Journal of Food Microbiology*, *309*, 108327. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108327>
- Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S. H., Lee, D., & Vinjé, J. (2014). Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the united states, 2009 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(1), 147–155. <https://doi.org/10.1128/JCM.02680->

Yavarmanesh, M., Alum, A., & Abbaszadegan, M. (2015). Occurrence of Noroviruses and Their Correlation with Microbial Indicators in Raw Milk. *Food and Environmental Virology*, 7(3), 232–238. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9185-5>