

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NOROVIRUS HUMANO DEL
GENOGRUPO GII EN MUESTRAS DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA*) Y
PEREJIL (*PETROSELINUM CRISPUM*) Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA
DE COLIFAGOS SOMÁTICOS”**

POR

L.C.A. MARÍA FERNANDA FLORES RODRÍGUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

AGOSTO, 2018

**“DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NOROVIRUS HUMANO DEL
GENOGRUPO GII EN MUESTRAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa*) Y PEREJIL
(*Petroselinum crispum*) Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE
COLIFAGOS SOMÁTICOS”**

Comité de Tesis

Dr. José Ángel Merino Mascorro

Presidente

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Secretario

Dr. José Santos García Alvarado

Primer Vocal

Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Segundo Vocal

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto.

Tercer Vocal

**“DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NOROVIRUS HUMANO DEL
GENOGRUPO GII EN MUESTRAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa*) Y PEREJIL
(*Petroselinum crispum*) Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE
COLIFAGOS SOMÁTICOS”**

Dirección de tesis

Dr. José Ángel Merino Mascorro

Presidente

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero dar gracias a Dios por finalizar esta etapa de mi vida llena de muy buenas experiencias y muchos conocimientos que serán herramientas en mi futuro como persona y como profesional.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme su apoyo con la asignación de una beca para realizar mis estudios de Maestría.

Agradecer a mis abuelos por estar pendiente de cada miembro de la familia y su presencia. A mis padres por darme la vida, por su ejemplo, su disciplina, sentido de la responsabilidad y sobre todo por su amor. A mis suegros quienes fueron parte fundamental de este logro, por todo el apoyo incondicional que me brindaron.

Agradezco a mi esposo Héctor, por impulsarme a ser mejor y transmitirme su amor y a la personita más grande en mi vida, mi hijo Héctor Fernando, quien es la luz y alegría de mis días.

Quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a la Dra. Norma Heredia y el Dr. Santos García, gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar con ustedes y asignarme un espacio para desenvolverme en el laboratorio.

Muchas gracias a mi director el Dr. Ángel Merino porque con su profesionalismo, paciencia y amistad ha sido un excelente guía en este caminar, gracias a él hoy puedo ver finalizada esta tesis.

Un profundo y sincero agradecimiento a la Dra. Luisa Yolanda Solís, que fue la persona que durante todo este proceso me brindo su mano, su apoyo incondicional, colaboración y su amistad.

Gracias a cada una de las personas del LABGEM, con la cual forme una bonita amistad, donde cada uno de ellos con su trabajo dio un granito de arena para que este trabajo se pudiera desarrollar, sin ustedes esto hubiera sido más difícil y seguro menos divertido.

A mis maestros y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por las enseñanzas y conocimientos adquiridos, los cuales siempre se encontrarán presentes en mi vida.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios, a quien agradezco por siempre estar junto a mí, por darme la fuerza y fortaleza para responder a los momentos más complicados.

Con todo mi amor y cariño a mi esposo Héctor, por todo su sacrificio y esfuerzo, por creer en mi capacidad, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre ha estado brindándome su comprensión, cariño y amor. A mi hijo Héctor Fernando por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día y ser una mejor persona.

A mi mamá Juana María y a mis abuelos María y Salvador quienes con sus palabras de aliento no me dejaban decaer para que siguiera adelante y siempre sea perseverante y cumpla mis ideales, por haberme enseñado todas las cosas que son realmente importantes, por apoyarme en todas las decisiones y siempre estar ahí con sus sabios consejos. Todos mis logros son también suyos.

ÍNDICE

Capítulo	Página
PORTADA	I
HOJA DE FIRMAS	II
AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VI
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).	4
2.2. Epidemiología de los virus transmitidos por alimentos.	3
2.3. Características generales y evolución de norovirus humano.	5
2.4. Gastroenteritis y epidemiología de norovirus humano.	8
2.5. Transmisión de norovirus humano.	9
2.6. Prevención y control.	12
2.7. Diagnóstico molecular.	12
2.8. Microorganismos indicadores de contaminación fecal.	13
2.8.1. Indicadores de contaminación fecal alternativos.	15
2.9. Bacteriófagos como posibles indicadores virales.	16
2.9.1. Biología del bacteriófago.	17
2.9.2. <i>Colifagos somáticos</i> .	18
2.9.3. <i>Colifagos macho específico F+ (F-ARN)</i> .	18
2.9.4. <i>Fagos de Bacteroides</i> .	18
3. JUSTIFICACIÓN	20

4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1. Objetivo general	19
5.2. Objetivos específicos	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1. Obtención de muestras.	23
6.2. Cepas y cultivos de trabajo.	23
6.3. Cultivo y mantenimiento de la línea celular Raw 264.7.	23
6.4. Propagación viral de MNV-1.	24
6.4.1. Titulación viral por TCID ₅₀ .	25
6.5. Obtención del ARN de HuNoV como control positivo.	25
6.6. Modelo de contaminación en muestras de lechuga con MNV-1.	26
6.6.1. Inoculación de los vegetales.	26
6.7. Procesamiento de muestras para la recuperación del MNV-1 y HuNoV GII.	26
6.7.1. Elución y clarificación.	27
6.7.2. Concentración de partículas virales.	27
6.8. Extracción de ARN viral.	28
6.9. Síntesis de ADN complementario (ADNc).	28
6.10. Detección de HuNoVs por PCR convencional aislado de heces.	29
6.11. Cuantificación viral mediante qPCR basado en SYBR Green.	29
6.11.1. Curva estándar de calibración del MNV-1.	30
6.11.2. Curva estándar de calibración del HuNoV GII.	31
6.11.3. Búsqueda de HuNoV GII en las muestras de perejil y lechuga mediante qPCR basado en SYBR.	31
6.12. Detección y enumeración de colifagos somáticos (Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure) en muestras de lechuga y perejil.	31
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34

8. RESULTADOS	36
8.1. Modelo de contaminación en muestras de lechuga con MNV-1 CW 1 ATCC PTA 5935.	36
8.1.1. Propagación viral de MNV-1.	36
8.1.2. Titulación viral por TCID ₅₀ .	37
8.1.3. Curva de calibración estándar de MNV-1 mediante qPCR.	38
8.1.4. Límite de detección del MNV-1 como control de proceso.	39
8.2. Detección molecular de HuNoV GII en vegetales	40
8.2.1. Curva estándar de cuantificación de HuNoV GII mediante qPCR.	40
8.2.2. Detección y cuantificación de HuNoV GII mediante qPCR en muestras de lechuga y perejil.	41
8.3. Comparación de niveles de HuNoV GII en muestras de lechuga y perejil.	43
8.4. Detección y enumeración de colifagos somáticos en muestras de lechuga y perejil (Protocolo 1602-EPA 2001).	44
8.5. Comparación de niveles de colifagos somáticos de acuerdo al tipo de producto.	46
8.6. Correlación entre colifagos somáticos y HuNoV GII en el total de las muestras.	47
8.6.1. Correlación entre colifagos somáticos y HuNoV GII en muestras de lechuga..	49
8.6.2. Correlación entre colifagos somáticos y HuNoV GII en muestras de perejil.	51
9. DISCUSIÓN	53
10. CONCLUSIÓN	63
11. BIBLOGRAFÍA	64
RESUMEN BIOGRÁFICO	

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Título	Página
1	Brotos de enfermedades asociadas a virus por el consumo de frutas y vegetales.	11
2	Reactivos utilizados para la reacción de síntesis de ADNc.	28
3	Reactivos utilizados para la reacción de PCR convencional.	29
4	Reactivos utilizados para la reacción de qPCR.	30
5	Grado de relación según su coeficiente.	35
6	Detección de MNV-1 inoculado en lechuga evaluado mediante qPCR.	39
7	Frecuencias de log ₁₀ de CG de ARN / g de muestra compuesta en muestras de lechuga y perejil.	41
8	Niveles de colifagos somáticos (UFP / 100 ml) en muestras de lechuga y perejil.	44
9	Grado de asociación entre los colifagos somáticos con HuNoV GII en el total de muestras de lechuga y perejil.	47
10	Grado de asociación entre los colifagos somáticos con HuNoV GII en muestras de lechuga. El valor en el interior de las celdas de la matriz, representa el grado de asociación <i>Rho</i> de Spearman.	49
11	Grado de asociación entre los colifagos somáticos con HuNoV GII en muestras de perejil. El valor en el interior de las celdas de la matriz, representa el grado de asociación <i>Rho</i> de Spearman.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Título	Página
1	Estructura de la cápside y genoma del virus de Norwalk donde se muestra la región altamente variable del dominio sobresaliente, P2, el cual reconoce a los antígenos de grupo sanguíneo, los cuales son reconocidos como factores de susceptibilidad del huésped para la infección.	6
2	Composición y ciclo viral del HuNoV.	7
3	Rutas de transmisión del HuNoV a los alimentos, con énfasis en los humanos como una de las principales fuentes de partículas virales, expulsadas en las heces y el vómito.	10
4	Unidades formadoras de placa (UFP, flechas) utilizando el protocolo 1602 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2001). En flecha se indica una UFP típica.	33
5	(2A) Línea celular Raw 264.7 en confluencia celular del 80% y (2B) efecto citopático provocado debido a la infección viral.	36
6	Ensayo de titulación de TCID ₅₀ en placa de 96 pozos, con dos repeticiones del virus MNV-1 (ATCC PTA-5935) y control de referencia de un virus previamente producido en el laboratorio.	37
7	Curva estándar de MNV.1, con un valor de R ₂ de 0.9071 y la ecuación de la recta con una Y: -2.122X+29.93.	38
8	Curva estándar del HuNoV GII, con un valor de R ₂ = 0.9941 y la ecuación de la recta con una Y= -1.785X+30.597.	40
9	Grafica de frecuencias (%) de los rangos contaminación de las muestras de lechuga y perejil analizadas mediante qPCR y expresadas en Log10 de CG.	42
10	Comparación del log10 CG de ARN / g de muestra compuesta de lechuga y perejil adquiridas en el área metropolitana de Monterrey N.L.	43
11	Grafica de barras con frecuencias (%) de los rangos de contaminación por colifagos somáticos (UFP / 100 ml) en muestras de lechuga y perejil.	45
12	Comparación de los niveles de colifagos somáticos de las muestras de lechuga y perejil recolectados en el área metropolitana de Monterrey N.L.	46

13	Diagrama de dispersión de colifagos somáticos (UFP/100 ml) y HuNoV GII (CG de ARN / g de muestra compuesta) en muestras de lechuga y perejil	48
14	Diagrama de dispersión relacionando el valor de X de colifagos somáticos (UFP / 100ml) y el valor de Y de HuNoV (CG de ARN / g de muestra compuesta) en muestras de lechuga.	50
15	Diagrama de dispersión de colifagos somáticos (UFP / 100ml) y HuNoV (CG de ARN / g de muestra compuesta) en muestras de perejil, obteniendo una <i>Rho</i> de -0.385.	52

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

%	Porcentaje
±	Más-menos
log	Logaritmo base 10
°C	Grados Celsius
ml	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
μl	Microlitros
U	Unidad
oz	Onza
s	Segundo
min	Minutos
g	Gramos
ppm	Partes por millón
HCl	Ácido clorhídrico
dH ₂ O	Agua destilada
CaCl ₂	Cloruro de calcio
ECP	Efecto citopático
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
HuNoV	Norovirus humano
PEG	Polietilenglicol
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
CG	Copias genómicas
UFP	Unidades formadoras de placa
UV	Luz ultravioleta
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
OMS	Organización Mundial de la Salud
ETA	Enfermedad Transmitida por Alimentos
ARN	Ácido ribonucleico
CDC	Centro de Control de Enfermedades
NoV	Norovirus

HAV	Virus de Hepatitis A
MNV-1	Norovirus murino
M.O.I	Índice de Multiplicidad de Infección
ECP	Efecto citopático
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario

RESUMEN

Numerosos brotes de gastroenteritis causados por patógenos virales entéricos se han atribuido al consumo de verduras de hoja verde ya sea crudas o mínimamente procesadas. Dado el alto consumo de este tipo de productos a nivel mundial y su asociación a enfermedades gastrointestinales, el objetivo de este proyecto fue determinar la correlación entre la presencia de norovirus humano del genogrupo II (HuNoV del GII) y colifagos somáticos en lechuga (*Lactuca sativa*) y perejil (*Petroselinum crispum*). Se colectaron 40 muestras compuestas (que correspondieron al muestreo de 4 muestras individuales del mismo vegetal) que equivalían a 160 muestras de lechuga y 160 de perejil de punto de venta de mercados del área metropolitana de Monterrey, N.L. Para la detección de HuNoV, se utilizó la metodología de precipitación con polietilenglicol (PEG), posteriormente se realizó la cuantificación mediante qPCR utilizando SYBR Green, mientras que la cuantificación de colifagos somáticos se realizó mediante el método de capa simple de agar (Protocolo 1602-EPA, 2001). Nuestros resultados indicaron que HuNoV GII fue encontrado en el 80% de las muestras de perejil (32/40), y en el 92% de las muestras de lechuga (37/40). El rango en donde hubo mayor número de copias genómicas en las muestras de perejil fue de 0.1 a 0.9 log₁₀ (57%), a diferencia de las muestras de lechuga que solo el 5% estuvieron en este rango. En el 60% de las muestras de lechuga y en el 5% de las de perejil, el virus se encontró en niveles de 2 a 2.8 log₁₀. Se encontró que existía una correlación positiva moderada ($Rho=0.375$, $p= 0.032$) en las muestras de lechuga entre colifagos somáticos y HuNoV GII, en tanto que las muestras de perejil mostraron correlación negativa moderada ($Rho= -0.385$, $p= 0.027$). El análisis de colifagos somáticos determinó que la mayoría de las muestras de lechuga (75%) estaban presentes en niveles de 1 a 10¹ UFP / 100 ml, en tanto que el 42.5% de las muestras de perejil se encontraron con niveles de colifagos somáticos de 1-10¹ UFP / 100 ml, y solo una muestra (correspondiente al 2.5%) mostró niveles de colifagos somáticos >10³ UFP / 100 ml. En conclusión, el HuNoV estuvo presente en 92 y 80% de las muestras de lechuga y perejil, sin embargo, no es posible establecer si estos altos números inesperados de HuNoV positivos se deben de percibir como una amenaza para la salud pública, debido a la falta de correlación entre las partículas virales infecciosas y las copias genómicas. Por último, se observó una correlación en los niveles de HuNoV y colifagos en la lechuga, no se observó con el perejil, por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar la correlación entre estos agentes en otros tipos de muestras.

ABSTRACT

Numerous outbreaks of gastroenteritis caused by enteric viral pathogens have been attributed to the consumption of green leafy vegetables either raw or minimally processed. Given the high consumption of this type of products worldwide and its association with gastrointestinal diseases, the objective of this project is to determine the correlation between of human norovirus genogrupo II (HuNoV del GII) and the presence somatic coliphages in lettuce (*Lactuca sativa*) and parsley (*Petroselinum crispum*). Three hundred and twenty samples of lettuce and parsley were collected from different supermarkets in the metropolitan área of Monterrey, N.L. For each supermarket, four samples were collected and used to prepare one composite sample. At the end, 40 composite samples were obtained from each vegetable. For the detection of HuNoV, the methodology of precipitation with polyethylene glycol (PEG) was used, then the quantification was carried out by means of qPCR using SYBR Green, while the quantification of somatic Colifagos was carried out using the method of Simple layer of agar (protocol 1602-EPA, 2001). Our results indicated that HuNoV GII was found in 80% of the samples of Parsley (32/40), and in 92% of the samples of lettuce (37/40). The range in which there was a greater number of genomic copies in parsley samples was 0.1 to 0.9 log₁₀ (57%), unlike lettuce samples that only 5% were in this range. In 60% of the lettuce samples and 5% of those of parsley, the virus was found at levels of 2 to 2.8 log₁₀. It was found that there was a moderate positive correlation ($\rho = 0.375$, $p = 0.032$) in the samples of lettuce between somatics coliphages and HuNoV GII, while the samples of parsley showed moderate negative correlation ($\rho = -0.385$, $p = 0.027$). The analysis of somatics coliphages determined that most of the samples of lettuce (75%) were present at levels 1 to 10¹ UFP/100 ml, while 42.5% of the samples of parsley were found with levels of somatics coliphages of 1-10¹ UFP/100 ml, and only one sample (corresponding to 2.5%) showed somatics coliphages levels > 10³ UFP/100 ml. In conclusion, the HuNoV was present in 92 and 80% of the samples of lettuce and parsley, however, it is not possible to establish whether these high unexpected numbers of positive HuNoV should be perceived as a threat to public health, due to the lack of correlation between infectious viral particles and genomic copies. Finally, a correlation was observed in the levels of HuNoV and coliphages in lettuce, not observed with parsley, therefore, more studies are needed to determine the correlation between these agents in other types of samples.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la promoción de la salud pública para mejorar el estilo de vida a niveles más saludables ha llevado a una mayor demanda de productos frescos a nivel mundial (FAO/OMS 2008). Las verduras son constituyentes importantes de una dieta sana y equilibrada y su consumo es alentado en muchos países por las agencias de salud del gobierno. Sin embargo, las verduras y en particular, las de hoja verde que se consumen crudas o mínimamente procesadas se reconocen cada vez más como vehículos para la transmisión de patógenos humanos, incluyendo los virus entéricos (Crocchi *et al.* 2008; Berger *et al.* 2010).

Los virus entéricos son la principal causa de enfermedades gastrointestinales transmitidas por los alimentos (ETAs) en los Estados Unidos y de los 9.4 millones de casos de enfermedades se calcula que el 58% se atribuyen al norovirus humano (HuNoV) (Scallan *et al.* 2011), siendo los principales afectados niños menores de 5 años y ancianos, reportándose 1.8 millones de muertes al año a nivel mundial (Patel *et al.* 2009). Aunque las infecciones por HuNoV suelen causar enfermedades autolimitantes, cuyos síntomas mejoran dentro de las primeras 24 o 72 h, en el caso de las infecciones crónicas pueden causar síntomas severos, principalmente en el caso de pacientes inmunocomprometidos, en los que estas infecciones se vuelven intratables (Bok y Green, 2012). Actualmente no existe un tratamiento específico para la gastroenteritis producida por HuNoV, ni vacunas efectivas (Karst, 2014).

Los norovirus (NoV) son virus pequeños de ARN, no envueltos, pertenecientes a la familia *Caliciviridae* (Bok y Green, 2012), que se clasifican en siete genogrupos (GI a GVII) y tiene más de 30 genotipos. Los genogrupos I, II y IV son los responsables de las enfermedades en los seres humanos, mientras que el resto se ha encontrado en animales. Se han empleado varios métodos para la concentración de virus entéricos en vegetales (Le Guayeder *et al.* 2009). El método principal para la detección de virus entéricos implica ensayos moleculares basados en RT-qPCR, debido a que los virus pueden estar presentes en concentraciones muy bajas en muestras ambientales además de no contar con un modelo

robusto de cultivo *in vitro*. Sin embargo, a menudo la detección de HuNoV puede resultar complicada debido a la presencia de sustancias inhibitorias presentes en la muestra y que se extraen conjuntamente durante su procesamiento, además de la baja carga viral que con frecuencia está presente (Cannon y Vinje, 2008).

Debido a la dificultad que presenta poder rastrear al HuNoV en muestras de vegetales, actualmente se ha estado generalizando el uso de microorganismos indicadores de contaminación debido a que tienen un comportamiento similar a los patógenos y su detección resulta ser más rápida, económica y sencilla (Okafor 2011).

Es por ello que como alternativa para la detección de HuNoV se ha propuesto la detección de colifagos somáticos, los cuales son virus que utilizan específicamente bacterias como hospedadoras para la replicación (Okafor 2011). Los colifagos utilizan *Escherichia coli* y otras especies emparentadas con ella y, por lo tanto, pueden ser liberados por estos hospedadores bacterianos a las heces (Campos-Pinilla *et al.* 2008).

Actualmente, en varias partes del mundo, se ha reportado la presencia de HuNoV y virus entéricos circulando en el medio ambiente. Sin embargo, en nuestro país, se dispone de poca información al respecto. Es por esto que el objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de HuNoV del GII que causa gastroenteritis en los humanos y establecer si existe asociación entre la detección de indicadores virales de contaminación fecal como los colifagos somáticos con este tipo de patógeno.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) presentan un conjunto de síntomas que conllevan complicaciones en la salud, que generalmente suceden en el tracto gastrointestinal, aunque también pueden manifestarse extra-intestinalmente (Kirk *et al.* 2014). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETAs son la causa de aproximadamente 2.2 millones de muertes anuales en todo el mundo, y principalmente ocurren en países vías en desarrollo, donde los niños y ancianos son los más susceptibles (Younes ad Kuchenmüller, 2011)

El origen de estas enfermedades se da por la ingesta de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos o sustancias tóxicas. Dependiendo del agente causal y la susceptibilidad del huésped será el desarrollo de la enfermedad, ya que se pueden requerir bajas concentraciones del patógeno o sustancia para poder causar la enfermedad característica (Rosas y Acosta, 2001).

Dentro de los principales patógenos que causan las ETAs a nivel mundial se encuentran los virus. Scallan *et al.* (2011) estimaron que los virus representan el 59% de ETAs y el HuNoV representa el 99% de todos los incidentes de enfermedades transmitidas por alimentos al año. Los síntomas que mayormente se encuentran asociados a la infección gastrointestinal por vía fecal-oral debido al consumo de alimentos y/o agua:

- Diarrea aguda líquida, sin mecanismo inflamatorio,
- Diarrea con sangre con invasión y proceso inflamatorio,
- Diarrea crónica que se acompaña por mala absorción,
- Fiebre entérica por infección penetrante.

2.2. Epidemiología de los virus transmitidos por alimentos.

En Estados Unidos, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) estima que de los 47.8 millones de episodios de ETAs que suceden al año, el 59% de los casos son atribuidos a virus, de los cuales 15,000 son hospitalizaciones y 150 terminan en muerte. Los países en desarrollo son los más afectados, donde se estima anualmente, que tan solo HuNoV es responsable de más de 1.1 millones de hospitalizaciones y 218,000 muertes principalmente de infantes. En tanto que a nivel global el virus de Hepatitis A es responsable de 119 millones de casos por año, donde el 25% de los pacientes requieren de hospitalización y 34,000 casos terminarán con la muerte (Fabiszweski-de-Aceituno *et al.* 2013).

Es bien conocido que los virus que son transmitidos a través de los alimentos lo hacen principalmente por la vía fecal oral; estos poseen características únicas que los diferencian de las bacterias principalmente por su morfología y mecanismo de infección, ya que los virus son parásitos intracelulares que requieren de células específicas de un mamífero para poder replicarse, no sin antes sortear una serie de mecanismos internos del huésped para tratar de disuadirlo antes de implantarse en el tracto gastrointestinal humano. Algunos de los virus transmitidos por los alimentos no generan memoria inmunológica, por lo que la inmunidad a la enfermedad por parte del huésped puede ser muy corta (Sair *et al.* 2006).

Estos virus de origen alimentario pueden ser divididos en categorías de acuerdo al tipo de enfermedad que provocan (Koopmans, *et al.* 2002):

1. Virus que causan gastroenteritis: Astrovirus, Adenovirus entéricos, Rotavirus y dos géneros que pertenecen a los Calicivirus (Norovirus y Sapovirus).
2. Virus que causan hepatitis: Hepatitis A y Hepatitis E.
3. Virus que causan otras enfermedades: Enterovirus.

Se ha reportado que los principales agentes virales que están asociados a las ETAs incluyen a los Astrovirus (*Astroviridae*), Norovirus del tipo Norwalk (*Caliciviridae*), Sapovirus

(*Caliciviridae*), virus de Hepatitis E (*Hepeviridae*), virus de Hepatitis A (*Picornaviridae*) y el Rotavirus (*Reoviridae*) (Fabiszewski-de-Aceituno *et al.* 2013).

A pesar de que distintos tipos de virus pueden ser transmitidos por alimentos, los más recurrentes son los virus del tipo Norwalk también conocidos como HuNoV y los virus de Hepatitis A (HAV), los cuales pueden afectar a toda la población, en tanto que a los Rotavirus se le atribuyen el 32% de los casos de diarrea infantil (Fabiszewski-de-Aceituno *et al.* 2013).

2.3. Características generales y evolución de norovirus humano.

Los HuNoV pertenecen a la familia *Calicivirididae*, son virus pequeños, no envueltos, que poseen una cadena simple no segmentada de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 7.4–7.7 Kb como material genético (Robilotti *et al.* 2015). El extremo 3' se encuentra poliadenilado y el extremo 5' está unido covalentemente a una proteína viral no estructural, conocida como proteína VPg (Eden *et al.* 2014). Su genoma está organizado en tres marcos de lectura abiertos (ORFs), el ORF1 codifica una poliproteína que es escindida co-transcripcionalmente y postranscripcionalmente por proteasas virales, dando lugar a seis proteínas no estructurales, mientras que el ORF2 codifica para una proteína mayor de la cápside llamada VP1 la cual puede autoensamblarse en partículas parecidas a los virus (VLPs, virus-like particles) y por último el ORF3 que codifica para una proteína menor de la cápside conocida como VP2 (Karts and Baric, 2015).

Los HuNoV no tienen un mecanismo de reparación de errores durante la replicación, lo que le permite tener la capacidad de adquirir una gran diversidad genética. Este género se divide en siete genogrupos (GI al GVII), que se subdividen en al menos 30 genotipos. Los virus de los genogrupos GI, GII y GIV son los que se han involucrado con enfermedad en humanos mientras que GV, GVI y GVII, son exclusivos de infecciones en animales (Martella *et al.* 2008, Tse *et al.* 2012).

Este microorganismo se considera un patógeno entérico humano que llega a causar una morbilidad sustancial tanto en el ámbito de la salud como la población en general, tan es así

que desde el año 1996 a la fecha ha habido al menos seis pandemias causadas por norovirus. De estas pandemias (años 1996-1997, 2002, 2004, 2006, 2009 y 2012) los virus responsables fueron los pertenecientes al genogrupo II, genotipo 4 (GII.4) (Karts and Baric, 2015).

Estructura del virus de Norwalk

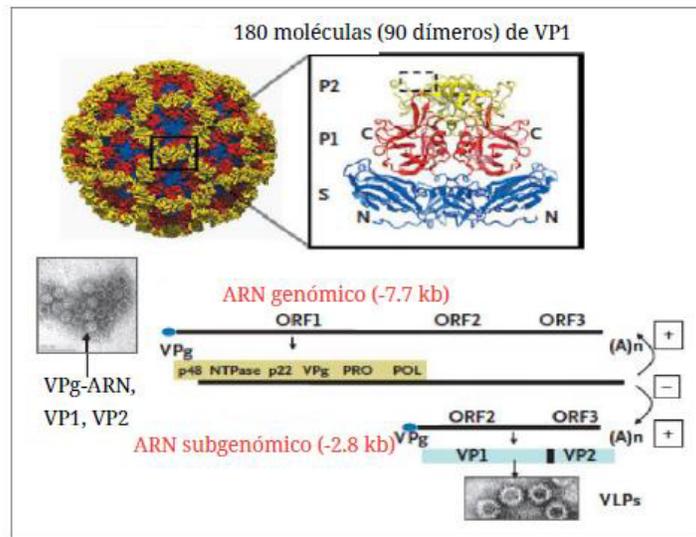


Figura 1. Estructura de la cápside y genoma del virus de Norwalk donde se muestra la región altamente variable del dominio sobresaliente, P2, el cual reconoce los antígenos de grupo sanguíneo, los cuales son reconocidos como factores de susceptibilidad del huésped para la infección. (Imagen tomada de Glass *et al.* 2009)

Con respecto al ciclo viral, el HuNoV se adhiere a las células hospedadoras (enterocitos) usando un receptor de carbohidratos y posiblemente a un co-receptor, entra a las células a través de endocitosis independiente de clatrina y caveolina. Subsecuentemente el ARN genómico viral se libera en el citoplasma, posteriormente se elimina VPg y el ARN viral se traduce en una poliproteína ORF 1 procesada para producir las proteínas de replicación (De Graaf *et al.* 2016). Se sintetiza un genoma de ARNs a partir del ARNss viral (+) que luego se transcribe y replica para producir ARNm virales y nuevos genomas de ARNss (+), respectivamente. El ARN subgenómico se traduce para formar la proteína de la cápside principal VP1 y VP2. Finalmente, las nuevas partículas de virus se ensamblan y liberan mediante lisis celular. El ARN de Norovirus se replica desde el extremo 5' para producir

RNA complementario completo (Thorne & Goodfellow, 2014). El genoma contiene característicamente la secuencia pGpU en el extremo 5' que está unida covalentemente a una proteína pequeña, VPg. Una región conservada corta (CR) en el extremo 5' se repite internamente en el genoma cerca del comienzo de un transcrito de ARN de tamaño subgenómico que es co-terminal con el extremo 3' del genoma. Cuando las células están coinfectadas con dos cepas diferentes, existe la posibilidad de iniciar la replicación de una cepa A desde el extremo 5' y cambiar a la cepa B en la región CR, el virus quimérico puede aparecer en la naturaleza e igual que otros virus de ARN monocatenario, la mutación también ocurre en el HuNoV y estos virus quiméricos son responsables de brotes constantes (Ushijima *et al.* 2014).

Ciclo viral del HuNoV

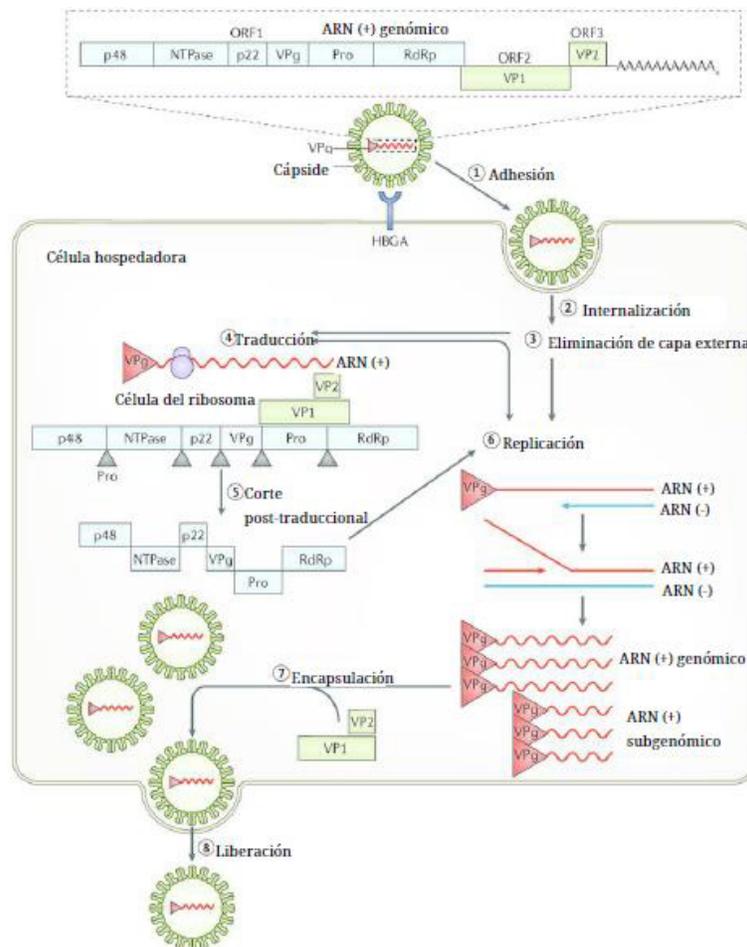


Figura 2. Composición y ciclo viral del HuNoV (Imagen tomada de Graaf *et al.* 2016).

2.4. Gastroenteritis y epidemiología de norovirus humano.

Los HuNoV son la principal causa de gastroenteritis no bacteriana a nivel mundial, siendo el agente causal de alrededor del 90% de los casos (Lopman *et al.* 2012; Patel *et al.* 2009). La gastroenteritis tanto epidémica como esporádica presenta una alta morbilidad y mortalidad entre personas de todas las edades, causando de 5 a 8 millones de muertes al año especialmente durante los meses de invierno (Lopman *et al.* 2012; Payne *et al.* 2013).

Reportes recientes han estimado de que los HuNoV son los responsables de entre 19 a 21 millones de enfermedades, 1.7-1.9 millones de visitas ambulatorias, 400,000 visitas a urgencias, 56,000-71,000 hospitalizaciones y 570-800 muertes anualmente tan solo en los EE.UU. (Scallan *et al.* 2011, Hall *et al.* 2013). Los principales afectados son niños menores de 5 años, ancianos e individuos inmunocomprometidos de los cuales se han reportado alrededor de 1.8 millones de muertes al año (Patel *et al.* 2009).

Sarah M. Bartsch, Benjamin A. Lopman y Bruce Y. Lee (2015), desarrollaron un modelo de simulación computacional para estimar la carga económica del HuNoV. A nivel mundial, el HuNoV resultó en un total de \$ 4.2 mil millones en costos directos del sistema de salud y \$ 60.3 mil millones en costos sociales por año. La enfermedad entre los niños <5 años cuesta a la sociedad \$ 39.8 mil millones, en comparación con \$ 20.4 mil millones para todos los demás grupos de edad, por lo tanto, la carga económica total es mayor en los niños, por lo tanto, la gastroenteritis por HuNoV se considera un problema económico global. Bruce Y. Lee *et al.* 2011 nos mencionan que los pacientes que son hospitalizados a causa de síntomas de gastroenteritis que son ocasionadas por el HuNoV, le genera un costo al hospital de \$ 1, 794.26 por cama-día.

Cuando se habla infecciones gastrointestinales por NoV, generalmente el GII es el agente causal, ya que se ha descubierto en el 80% de los brotes, donde las cepas epidémicas pertenecientes a GII.4 se considera que son las principales responsables en los últimos 20 años. La emergencia de otras cepas se considera que es debido a que el GII.4 sufre un

proceso de evolución secuencial, similar al que ocurre con los virus gripales (Matthews *et al.* 2012, Vega *et al.* 2014).

La tasa de incidencia de la enfermedad de HuNoV aumentó últimamente en varios países, asociándose a la aparición en el año 2012 de una nueva cepa del GII.4 de tipo Sydney (van Beek *et al.* 2013). Aunque la mayoría de las veces las infecciones por HuNoV suele causar una enfermedad autolimitante, cuyos síntomas se alivian dentro de 24 o 72 h, en el caso de las infecciones crónicas pueden causar síntomas severos, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, en los que estas infecciones se vuelven intratables (Bok y Green, 2012).

La gastroenteritis que causa el HuNoV es una afección asociada a procesos no inflamatorios en intestino delgado e inflamatorios a nivel de colon (Lin *et al.* 2015; Robilotti *et al.* 2015). Entre los síntomas que comúnmente se presentan se presenta diarrea, vómito y fiebre los cuales se manifiestan después de un período de incubación de 12-48 h. Los HuNoV también han sido asociados a casos de enterocolitis necrosante, convulsiones en infantes, encefalopatías, pneumatosis intestinales y coagulación intravascular diseminada (Patel *et al.*, 2009). Los pacientes afectados por esta enfermedad reciben principalmente tratamientos paliativos, como la rehidratación oral, ya que provee de electrolitos fundamentales y azúcares (Goodfellow *et al.* 2015).

2.5. Transmisión de norovirus humano.

Las rutas de transmisión de los HuNoV son una de las principales causas del porqué estos virus son identificados como la causa más común de gastroenteritis no bacteriana a nivel mundial (Lopman *et al.* 2012). La contaminación fecal-oral es la principal vía de transmisión, sin embargo, también se puede transmitir a través de vómito de pacientes u otros fluidos, o transmisión mecánica dada por la presencia de superficies contaminadas (Bozkurt *et al.* 2015; Takahashi *et al.* 2011).

Rutas de transmisión del HuNoV

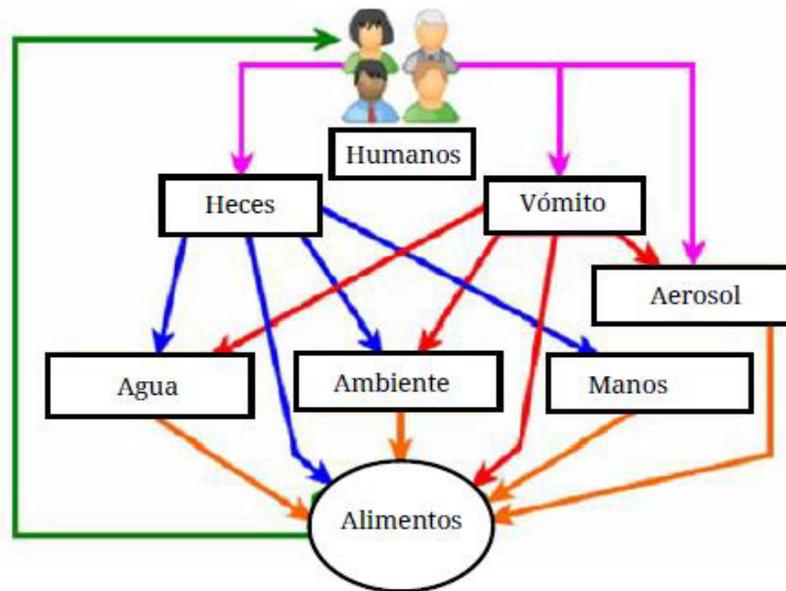


Figura 3. Rutas de transmisión del HuNoV a los alimentos, con énfasis en los humanos como una de las principales fuentes de partículas virales, expulsadas en las heces y el vómito (Imagen tomada de Baert L *et al.* 2009).

Debido a la baja dosis infecciosa que presentan el HuNoV (18 partículas virales), hace que se facilite su propagación y por ende permite que el virus se encuentre en contacto con superficies, como los equipos de preparación de alimentos, mesas, instrumentos o por contacto de manos contaminadas (Boxman *et al.* 2009). Los aerosoles suelen ser la causa más rápida de propagación del virus en ambientes cerrados, como hospitales, hoteles, centros médicos, asilos de ancianos o guarderías (Scallan *et al.* 2011).

Dentro de los brotes ocasionados por este microorganismo se han reportado algunos asociados al consumo de ostras, ensaladas y comida que se ingiere sin una previa cocción. Se ha encontrado que los mariscos (moluscos bivalvos) son capaces de concentrar los virus durante la filtración de aguas contaminadas con heces humanas (Robilotti *et al.* 2015) (Tabla 1). Una vez en los alimentos, los HuNoV pueden persistir por períodos extendidos

en condiciones de congelamiento y refrigeración, así como a temperatura ambiente (Takahashi *et al.* 2011).

Tabla 1. Brotes de enfermedades asociadas por virus de origen alimentario por el consumo de frutas y vegetales.

Producto	Virus entéricos	Año	No. De Casos	País
Ensalada verde	Norovirus	1979	63	Estados Unidos
Melón	Norovirus	1987	Desconocido	
Frambuesas	Norovirus	1988	108	Finlandia
Lechuga	Hepatitis A	1988	202	Estados Unidos
Apio	Norovirus	1991	1440	
Fresas	Hepatitis A	1992	28	
Tomates	Hepatitis A	1994	Desconocido	
Zanahoria	Norovirus	2000	Desconocido	Reino Unido
Frambuesas	Norovirus	2009	200	Finlandia
Lechuga	Norovirus	2010	260	Dinamarca
Ensalada verde	Norovirus	1998-2005	139 brotes/5139	Estados Unidos
Lechuga	Norovirus		42 brotes/1470	
Fruta/Ensalada	Norovirus		30 brotes/1502	
Melón	Norovirus	2004-2015	9	Estados Unidos
Jugos	Norovirus		3	
Vegetales de hoja verde	Norovirus		62	
tomate	Norovirus		5	
Moras	Norovirus		5	
Ensalada	Norovirus		97	

Fuente: Radin, 2012; Raquel M. Callejón 2015.

2.6. Prevención y control.

La prevención de brotes por HuNoV actualmente está dirigida a la identificación del modo de transmisión y la interrupción de la cadena de contagio mediante el aislamiento de los pacientes y la eliminación de alimentos contaminados, así como la descontaminación de aguas (Patel *et al.* 2009; Robilotti *et al.* 2015). Cabe mencionar que con excepción de los norovirus murinos y los calicivirus felinos, los demás no pueden cultivarse *in vitro* de manera eficiente lo cual hace difícil tener un acceso a la prevención clara del mismo.

La sanitización que se lleva a cabo en la industria alimenticia para reducir riesgos de brotes de gastroenteritis, está basada en aplicación de soluciones de cloro (200 ppm) principalmente (Takahashi *et al.* 2011). Sin embargo, se ha demostrado que este método no es completamente eficiente en la remoción de algunos sustitutos de HuNoV; encontrándose que solo logran disminuciones de 1 a 1.5 log en productos frescos contaminados (Ozawak *et al.* 2007).

La prevención de la propagación secundaria del virus a través del contacto persona-persona y de las superficies contaminadas son la clave para detener el aumento de brotes como los que se producen en las salas de hospitales, escuelas, comedores y cruceros. Es así como la aplicación de la higiene personal, la descontaminación adecuada de los alimentos y de las superficies ambientales pueden ayudar a que el HuNoV se minimice (Jones *et al.* 2000; Maury *et al.* 2007; Liu *et al.* 2010).

2.7. Diagnóstico molecular.

Hasta 1993, el único método disponible para diagnosticar las infecciones por HuNoV era la microscopía electrónica, dado que no se ha podido cultivar *in vitro*. Una vez conocida la secuencia nucleotídica de su genoma, la RT-qPCR se ha convertido en la técnica de referencia para su diagnóstico, lo que permite detectar HuNoV en muestras clínicas, ambientales, en agua y alimentos. Esta técnica, junto a la secuenciación de los amplificadores, es particularmente útil en los estudios epidemiológicos para descubrir el

origen de un brote o bien, para caracterizar cepas (Gunson RN *et al.* 2005). A pesar de que se han diseñado múltiples cebadores para detectar secuencias genómicas específicas de HuNoV, en general estos van dirigidos a detectar el gen de la ARN-polimerasa viral (región A) o el gen de la cápside (región C) (Vennema H *et al.* 2002)

La detección por PCR en tiempo real es más sensible y permite detectar y diferenciar entre genogrupos I, II y IV más rápidamente. Se ha comprobado que la tecnología basada en sondas TaqMan es más específica que la basada en SYBR Green es por ello que esta técnica se ha generalizado últimamente en laboratorios que procesan un elevado número de muestras (Gunson RN *et al.* 2005).

Actualmente, también se dispone de un método rápido consistente en una técnica enzimática ligada a enzimas (ELISA) que detecta proteínas de membrana y es capaz de diferenciar cepas de genogrupos GI, GII y GIV (Bruin *et al.* 2006).

Hoy en día se está buscando una alternativa para la detección del HuNoV, ya que el método de diagnóstico actual es más complejo y una de las limitantes es que el virus se encuentra en baja concentración en los alimentos, aparte de los altos costos de la técnica, es por eso que, en este trabajo, utilizamos indicadores de contaminación fecal, para intentar hacer un diagnóstico más sencillo, rápido y económico.

2.8. Microorganismos indicadores de contaminación fecal.

A pesar de la relevancia epidemiológica que tienen las ETAs, la búsqueda de patógenos en alimentos es un proceso caro que consume tiempo. Además, la contaminación de patógenos ocurre esporádicamente, por lo que, en forma general, los análisis de sanidad se basan en el rastreo de microorganismos no patógenos que, al estar presentes, pudieran indicar que las condiciones en ese ambiente son las adecuadas para que pudieran desarrollarse patógenos entéricos humanos. A estos microorganismos se les denomina microorganismos indicadores, entre los que se encuentran los coliformes fecales incluida *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.* (Ortega *et al.* 2009).

Gracias a la determinación de los microorganismos indicadores, se pudiera predecir la presencia de microorganismos potencialmente peligrosos y que estén asociados a enfermedades con humanos.

Britton, en el 2005 definió una serie de atributos que deben de cumplir los microorganismos para considerarse como indicadores de contaminación:

1. Ser miembro de la microbiota intestinal de mamíferos
2. Debe estar presente cuando los patógenos están presentes y ausentes en las muestras no contaminadas
3. Debe de estar presente en mayor cantidad que el patógeno
4. Debe de ser tan resistente como el patógeno a los factores ambientales y a los tratamientos de desinfección
5. No debe de multiplicarse en el entorno
6. Debe ser detectable por métodos fáciles, rápidos y económicos
7. Debe ser no patógeno
8. Debe de estar relacionado con el riesgo para la salud
9. Debe ser específico para una fuente fecal o que pueda identificarse en cuanto a la fuente de origen

Finalmente, la característica más importante que debe poseer un microorganismo indicador es que exista un fuerte grado de asociación entre la presencia o ausencia del indicador con un patógeno en particular o grupo de patógenos; la fuerza de correlación determina la efectividad y precisión como medida de la ocurrencia del patógeno (NH-DES, 2003).

Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado un microorganismo individual que cumpla con todos los atributos de un buen indicador. Por lo tanto, a menudo se prefieren utilizar indicadores múltiples con indicadores específicos que son más adecuados para ciertas situaciones (NHMRC, 2011).

2.8.1. Indicadores de contaminación fecal alternativos.

La valoración de la calidad microbiológica en las aguas ha sido principalmente mediada por indicadores microbiológicos como coliformes totales y fecales. Sin embargo, la falta de especificidad en los estudios de Rastreo de Contaminación Microbiológica (MST, por sus siglas en inglés) ha resultado en la necesidad de buscar alternativas para lograr un mejor monitoreo en el control de contaminación de aguas, así como la elaboración más precisa de estudios de riesgo microbiológico y el desarrollo de acciones correctivas económicas.

En la actualidad, la Ground Water Rule utiliza a los bacteriófagos (virus de bacterias) como alternativa al MST (Long *et al.* 2005). Sin embargo, una de las limitantes es que este indicador no ha sido ampliamente usado en los alimentos.

Fabiszewski-de Aceituno en el 2013 menciona que la detección de los virus en muestras de alimento, es particularmente complicada debido a que:

1. Los virus están en concentraciones inferiores en los alimentos naturalmente contaminados
2. Se requieren muestras de un peso mayor de 25 g
3. Las técnicas de detección moleculares a menudo presentan interferencias a los componentes utilizados para elaborar los alimentos
4. Los virus presentan dificultad a la hora de ser cultivados *in vitro*, por lo que primero deben de concentrarse, purificarse de la matriz alimentaria y ser amplificados por métodos de detección molecular

Adicionalmente, los virus solo pueden ser replicados en el huésped, lo que impide crecer en los alimentos, por tanto, el número de partículas virales puede estar más bajo que el límite de detección de la técnica utilizada (Koopmans *et al.* 2002).

En este sentido la Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua (Campos-Pinilla, 2003) reconoce a los colifagos (bacteriófagos que pueden infectar cepas de *E. coli*)

somáticos y a los colifagos macho-específico F+ como indicadores de contaminación ya que la justificación para esto radica en:

1. Los fagos están altamente distribuidos en aguas residuales y contaminadas.
2. Las poblaciones de colifagos son sustancialmente superiores a las de los enterovirus.
3. Los colifagos requieren de un huésped bacteriano para poder reproducirse.
4. Los métodos para aislar y cuantificar colifagos son sencillos.
5. Los resultados son más rápidos cuando se analizan los colifagos que cuando se utilizan enterovirus.
6. Algunos tipos de colifagos son naturalmente resistentes a los procesos de desinfección.

Por este motivo se proponen indicadores alternativos o sustitutos virales que puedan predecir el riesgo de contaminación viral como es el caso de los bacteriófagos los cuales se describen a continuación.

2.9. Bacteriófagos como posibles indicadores virales.

Desde el punto de salud pública, los virus entéricos son el grupo de organismos patógenos más críticos y además son los responsables de una amplia gama de infecciones en humanos con diversos síntomas. Los individuos infectados arrojan millones de partículas de virus en sus heces (10^6 / g) o fluidos corporales, que eventualmente entrarán a los sistemas de alcantarillado, pudiendo contaminar efluentes recreacionales si no se cuentan con las medidas adecuadas de tratamiento de estas aguas (Skraber S *et al.* 2011). Entre los virus entéricos patógenos los HuNoV son los que se han reportado con mayor frecuencia en aguas residuales (Myrmel M *et al.* 2006).

Las aguas residuales municipales suelen someterse a un tratamiento secundario antes de ser descargadas al medio ambiente. El proceso implica la remoción mecánica de sólidos, seguido de tratamiento biológicos y químicos. Sin embargo, las aguas residuales que únicamente son tratadas físicamente y que no se someten a un proceso de desinfección pueden albergar virus entéricos ya que son más resistentes a los desinfectantes comunes

que los indicadores bacterianos y, por consecuencia pueden ser infecciosos para el hombre (Kate R. Hodgson *et al.* 2017).

Las legislaciones han establecido de manera obligatoria el monitoreo de la calidad del agua para el consumo. En este caso, una práctica común es la búsqueda de microorganismos indicadores de contaminación fecal a fin de asegurar que dicha agua no haya sido contaminada con materia fecal. Los microorganismos que se utilizan frecuentemente para esto son de origen bacteriano e incluyen a coliformes fecales, coliformes totales, *E. coli*, y *E. faecalis* (Rezaeinejad S *et al.* 2014). Sin embargo, en forma general, los virus son más resistentes que las bacterias a tratamientos de UV o cloración (prácticas comunes de desinfección en el tratamiento secundario de aguas residuales). Incluso se ha reportado que la presencia de HuNoV en el agua u otros solidos reducen la eficacia de los desinfectantes y permiten al virus mantener su infectividad (Francy DS *et al.* 2012).

Como alternativa a dichos inconvenientes, se ha propuesto el uso de bacteriófagos los cuales son virus que solo utilizan bacterias como hospedadores. Los colifagos utilizan *E. coli* y otras especies emparentadas próximamente con ella como hospedadores y, por lo tanto, pueden ser liberados por estos hospedadores bacterianos a las heces humanas (Bitton G *et al.* 2011).

2.9.1. Biología del bacteriófago.

Los bacteriófagos son virus que infectan específicamente a las bacterias. Son ubicuos en el medio ambiente y son las entidades biológicas más abundantes en la tierra (Kutter y Sulakvelidze, 2005). No son patógenos para otros organismos y pueden permanecer infectivos en el medio ambiente sin un huésped durante largos períodos de tiempo. Ellos coexisten y coevolucionan con las bacterias en una relación dinámica depredador-presa (Bursow *et al.* 2004). Infectan y se replican en el huésped bacteriano y son generalmente específicos a nivel de especie, aunque hay algunos fagos con un rango de hospedadores más amplio (Hyman y Abedon, 2010). Los fagos que infectan *E. coli* y coliformes se llaman colifagos. Los tres grupos principales de fagos de interés para las pruebas de calidad

del agua son los colifagos macho-específicos F+ (conocidos como F-RNA) y fagos que van contra *Bacteroides fragilis* (Ashbolt *et al.* 2001).

2.9.2. Colifagos somáticos.

El grupo de fagos somáticos comprende una gran cantidad de fagos líticos de las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae* con diversas morfologías y genomas de ADN monocatenario y bicatenario (Ackermann, 2009). Los fagos somáticos inician la infección uniéndose a receptores específicos en la pared celular de la bacteria. Pueden replicar en el tracto gastrointestinal de mamíferos, además de que existe una mayor replicación de estos fagos en ambientes acuáticos.

2.9.3. Colifagos macho-específicos F+ (F-ARN).

Los fagos de F-ARN también conocidos como fagos “macho-específicos”, han sido lo más estudiados debido a su similitud con virus entéricos humanos que son patógenos, en particular del grupo de enterovirus, calicivirus, adenovirus, virus de hepatitis A y E (Jofre, 2007). Son un grupo restringido de fagos estrechamente relacionados de la familia *Leviviridae* con tamaño similar, forma y genoma de ARN monocatenario (ARNss) para virus entéricos humanos. Este tipo de colifagos infectan a la célula huésped a través de la unión a las fimbrias de fertilidad (F) en el huésped de *E. coli* (Leclerc *et al.* 2000). Las fimbrias solo pueden ser producidas por células que llevan un plásmido que codifica para este factor y sólo cuando las células están en fase de crecimiento logarítmico a temperaturas superiores a 30°C los fagos de F-RNA se replican en el tracto gastrointestinal de los mamíferos, sin embargo, es poco probable que se multipliquen en ambientes acuáticos donde las condiciones son inadecuadas (Havelaar *et al.* 1986).

2.9.4. Fagos de Bacteroides.

Bacterias del género *Bacteroides* se encuentran entre los grupos más abundantes del tracto gastrointestinal de mamíferos y muestran una importante especificidad del huésped, ya que

permite identificar la fuente de contaminación fecal. Estos fagos pertenecen a la familia *Siphoviridae*. Hasta la fecha no se ha informado que se repliquen fuera del tracto gastrointestinal debido a los requisitos nutricionales específicos del huésped y su naturaleza anaeróbica (Layton *et al.* 2006).

Hay dos grupos de fagos de *B. fragilis* que se utilizan como indicadores para la evaluación de la calidad del agua, el primero que es un grupo limitado de fagos que utiliza como hospedador la cepa HSP40 de *B. fragilis* y que tiene la propiedad única de encontrarse exclusivamente en heces humanas y no en la de animales. El segundo grupo de fago utiliza la cepa RYC2056 de *B. fragilis* como hospedador, el cual abarca una gama más amplia de fagos que están presentes en heces humanas y de otros animales y la concentración en aguas residuales es mayor (Madigan *et al.* 2006).

El monitoreo de bacteriófagos como el MS2, F2, Φ X174, GA, T2, T7 y Q β se han sugerido como un criterio más confiable para poder evaluar la contaminación de origen viral de las aguas residuales provenientes de las heces fecales humanas (Boudaud N *et al.* 2012). Por lo tanto, los colifagos son sustitutos o modelos útiles para evaluar el comportamiento de los virus entéricos en el agua y su sensibilidad a los procesos de tratamiento y desinfección. A este respecto, son más útiles que las bacterias fecales (Rezaeinejad S *et al.* 2014).

Debido a todo lo anterior y a la importancia epidemiológica que tiene el HuNoV al ser el principal agente causal de gastroenteritis transmitida por alimentos que son mínimamente procesados como es el caso de los vegetales de hoja verde y a la importancia de poder realizar una asociación entre HuNoV y los colifagos en estos productos, de ahí el presente trabajo.

3. JUSTIFICACIÓN

La importancia epidemiológica de los HuNoV radica es su capacidad de generar brotes masivos de gastroenteritis y por consecuencia presentan alta morbilidad entre personas de todas las edades. Esto tiene graves consecuencias en la salud y la economía, por lo que es necesario conocer las cepas que circulan y determinar su frecuencia, para así poder diseñar estrategias más eficientes que permitan prevenir y/o combatir brotes o casos de enfermedad.

Tradicionalmente muchos brotes por HuNoV de GII se han asociado al consumo de vegetales crudos, que han sido contaminados con heces fecales humanas. Además, son virus estables dentro de un amplio rango de temperaturas, sobreviven a la congelación, refrigeración, calentamiento a 60° C y a la acción de algunos desinfectantes.

Actualmente hay poca información sobre los métodos para rastrear la presencia de HuNoV en vegetales de hoja verde, incluyendo a la lechuga y perejil, también se deben considerar las diferentes rutas de transmisión de los HuNoV y además establecer si algunos indicadores no patógenos pueden ayudar a predecir el riesgo de la presencia de estos agentes infecciosos.

Estos productos históricamente se han visto involucrados en caso de gastroenteritis, por lo que establecer la asociación de HuNoV de GII y de colifagos somáticos en este tipo de productos que se expenden en el área metropolitana de Monterrey, nos permitirá establecer el estatus de estos agentes infecciosos

4. HIPÓTESIS

Existe correlación entre la presencia de HuNoV del GII y de colifagos somáticos en lechuga (*Lactuca sativa*) y perejil (*Petroselinum crispum*) que se expenden en punto de venta en el área metropolitana de Monterrey, N.L.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar la correlación entre HuNoV del GII y la presencia de colifagos somáticos en lechuga (*Lactuca sativa*) y perejil (*Petroselinum crispum*) que se expenden en punto de venta en el área metropolitana de Monterrey, N.L.

5.2 Específicos

- Detectar y cuantificar la presencia de HuNoV del GII en muestras de lechuga (*Lactuca sativa*) y perejil (*Petroselinum crispum*) que se expenden en punto de venta en el área metropolitana de Monterrey, N.L.
- Detectar y cuantificar la presencia de colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal en muestras de lechuga (*Lactuca sativa*) y perejil (*Petroselinum crispum*) que se expenden en punto de venta en el área metropolitana de Monterrey, N.L.
- Determinar la correlación entre el HuNoV GII y colifagos somáticos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Obtención de muestras.

Se colectaron un total de 320 muestras de las cuales 160 correspondieron a lechuga y 160 a perejil. Estas fueron adquiridas aleatoriamente de punto de venta de supermercados de Monterrey, N.L. y su área metropolitana, de cada cual se adquirieron cuatro muestras por establecimiento con la que se realizó una muestra compuesta completando con ello al final 40 muestras compuestas de cada vegetal. Una vez adquiridas las muestras se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente y se procesaron inmediatamente.

6.2. Cepas y cultivos de trabajo.

Se obtuvo comercialmente células Raw 264.7 (ATCC® TIB-71™) pertenecientes a *Mus musculus*, una línea celular de macrófagos; transformada con el virus de la leucemia murina de Abelson.

Para este trabajo se utilizó una cepa de Norovirus murino (MNV-1 CW1, ATCC PTA-5935 ATCC) obtenido comercialmente como sustituto de HuNoV, esto debido a que existen reportes en donde se ha comprobado una estrecha relación con el HuNoV por compartir características genéticas y bioquímicas similares, tomando en cuenta que el MNV es una cepa segura para la manipulación en un laboratorio nivel de bioseguridad 2.

6.3. Cultivo y mantenimiento de la línea celular Raw 264.7.

Para el mantenimiento y trabajo de la línea celular Raw 264.7, se usó el medio base DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 11965092 Gibco™) de alta glucosa y L-glutamina, suplementado con suero fetal bovino (CORNING) al 10%, penicilina-estreptomicina 100X al 1% (P4333 SIGMA), aminoácido no esencial al 1% (11140050 Gibco™) y una solución amortiguadora de CO₂ HEPES 1M al 1% (US Biological). Las células fueron cultivadas en cajas de cultivo de 25 cm² con cambio de medio y lavadas con solución PBS (0.1 M, NaCl

145 mM, Na₂HPO₄ 7.7 mM y NaH₂PO₄ 2.3 mM, pH 7.3) cada 48 h y con pases de confluencia de 80-90% en una relación 3:1, donde las células fueron recuperadas con un raspador celular (Corning™ Falcon™) y fueron resuspendidas en DMEM y cultivadas a una densidad celular de 7 x 10⁵ células y por último fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ (Walker, Kublin & Zunt, 2009). Alrededor del pase 3 o 4, las células fueron congeladas y criopreservadas en un tanque de nitrógeno, para esto se recuperaron células de una caja de 25 cm² (confluencia al 80%) y se ajustaron a ~1,000,000 células / ml por conteo en cámara de Neubauer y teñidas con azul de tripán. Un mililitro de la suspensión celular se colocó en crioviales con 5% de DMSO. Se congelaron primero a -20°C, posteriormente a -80°C y finalmente fueron transferidas a un tanque de nitrógeno.

6.4. Propagación viral de MNV-1.

La propagación del virus se realizó acorde a la metodología propuesta por Wobus *et al.* (2004) la cual se describe a continuación. Se tomaron 20 µl del MNV-1 obtenido comercialmente a una multiplicidad de infección (MOI por sus siglas en ingles) de 0.05, y se transfirió directamente en células de macrófago murino RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) previamente cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Corning) suplementado con 10% de suero bovino fetal (BFS), 1% de antibiótico/antimicótico, 1% de aminoácidos no esenciales y una solución amortiguadora de CO₂ HEPES 1M al 1% (US Biological). El cultivo se incubó a 37°C con 5% de CO₂ por 1 h, posterior a la cual, se retiró el medio y se adicionó medio fresco sin suplementar realizando la incubación final por 48h bajo las condiciones indicadas. Cada 24 h se determinó el efecto citopático con base a la confluencia celular (%) por medio del microscopio invertido (Olympus CK40-SL).

Transcurridas las 48 h las células fueron recuperadas con la ayuda de un raspador celular y se transfirieron a tubos Falcon de 15 ml y fueron sometidas a tres ciclos de congelación/descongelación a -80°C para posteriormente ser centrifugadas a 4000 xg durante 5 min. El sobrenadante donde se encontraban las partículas virales se almacenó en alícuotas a -80°C hasta su uso.

6.4.1. Titulación viral por TCID₅₀.

Del cultivo de MNV-1 mantenido a -80°C, se descongeló una alícuota (3 ml) en baño de agua a 37°C y de allí se transfirieron 100 µl a un tubo estéril, el cual fue centrifugado a 13,000 *xg* por 3 min para eliminar restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo, de allí 25 µl del virus se colocaron en el primer pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos (Corning® Costar®, Misuri, EE.UU) y se realizaron diluciones decimales (10⁻¹ a 10⁻⁸) transfiriendo 25 µl a cada pozo por triplicado. Posteriormente de una caja de cultivo celular de RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) de 25 cm² con una confluencia de 80-100% se agregaron 9 ml de medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Corning) suplementado con 10% de suero bovino fetal (BFS), 1% de antibiótico/antimicótico, 1% de aminoácidos no esenciales y una solución amortiguadora de CO₂ HEPES 1M al 1% (US Biological), por cada ml de suspensión celular, y se transfirieron 100 µl de esta suspensión a los pocillos en una nueva placa de microtitulación y se agregaron 50 µl de cada dilución por cuadruplicado, la placa se incubó a 37°C por 3 a 5 días (Walker *et al.* 2009). Pasado el tiempo de incubación, se observó el efecto citopático en cada pozo y se calculó el valor de TCID₅₀ mediante la siguiente fórmula, y se tomó la dilución a la cual el 50% de los pozos había células infectadas por el virus:

Distancia proporcional (-PD)

$$= \frac{(\% \text{ de pozos infectados a o por encima del } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ de pozos infectado a o por encima del } 50\%) - (\% \text{ pozos infectados por debajo de } 50\%)}$$

6.5. Obtención del ARN de HuNoV como control positivo.

Para el caso de un control positivo de HuNoV GII, una muestra de heces fue proporcionada a partir de aislados clínicos por el departamento de Patología Clínica del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la UANL de pacientes con gastroenteritis no bacteriana. Para esto, la muestra de heces se diluyó con agua miliQ para obtener una suspensión al 10% (p/v) y se clarificó mediante centrifugación a 13 000 rpm por 3 min. El sobrenadante se transfirió a tubos de 2 ml estériles y se almacenaron a -80° C. Se realizó la detección del virus mediante PCR convencional como se describe en la sección 6.11.

6.6. Modelo de contaminación en muestras de lechuga con MNV-1.

6.6.1. Inoculación de los vegetales.

Para evaluar la efectividad del método en la recuperación de HuNoV, el MNV-1 se inoculó en los vegetales a utilizar, para lo cual se utilizaron la metodología propuesta por Coudray *et al* (2012) como se menciona a continuación.

De una muestra de lechuga adquirida comercialmente, se pesaron 6 porciones de 10 g cada una de la lechuga los cuales se colocaron en bolsas Nasco estériles (Nasco Whirl-Pak 92 oz, 2721 ml). A cada muestra se le inocularon 100 µl de un cultivo de MNV-1 que contenía 2.0×10^6 TCID₅₀ / ml y diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-5} en PBS (0.1 M, NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 7.7 mM y NaH₂PO₄ 2.3 mM, pH 7.5). Esos 100 µl fueron distribuidos en aproximadamente 20 puntos de la superficie de cada muestra y se dejó secar a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar por 4 h para permitir la adhesión de las partículas virales.

6.7. Procesamiento de muestras para la recuperación del MNV-1 y HuNoV GII.

A partir de aquí se realizó la misma metodología para la recuperación del MNV-1 inoculado, así como la detección del HuNoV en las muestras de lechuga y perejil.

Se han reportado diferentes métodos para la obtención del HuNoV tales como la Ultrafiltración, Separación Inmunomagnética, Ultracentrifugación y Precipitación con polietilenglicol (PGE), y en este proyecto utilizamos el último método dado que es sencillo, rápido y económico y además está validado para ser utilizado en muestras de vegetales y frutas (Christina Bartsch *et al.* 2016)

Típicamente, un método para la detección de virus en los alimentos implica los tres pasos que se describen a continuación:

1. Elución y clarificación del virus en el alimento.
2. Concentración de las partículas virales.
3. Extracción y detección del ácido nucleico.

6.7.1. Elución y clarificación.

Para este paso se realizó la metodología reportada por Doboys *et al.* (2002), en la que los 40 g de cada muestra compuesta de lechuga y perejil que fueron colocados en las bolsas Nasco (92 oz) además de los inoculados con MNV-1, se homogenizaron por 30 s de agitación, 30 s de masaje y por último 30 s de agitación (Heredia *et al.* 2016) con 360 ml de amortiguador TGBE suplementado (Tris 100 mM, Glicina 50 mM, extracto de carne al 1%, pH 9.5 y 50 mM de MgCl₂). Posteriormente, se tomaron 40 ml de este enjuague y se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml correspondiendo esto al paso de elución. La clarificación se realizó con la finalidad de eliminar las partículas de alimento, para lo cual la muestra se centrifugó a 10 000 *xg* por 30 min a 4°C. Después de ello, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo donde se ajustó pH 7.2 con HCl al 10%.

6.7.2. Concentración de partículas virales.

Dado que los alimentos cuando están contaminados por virus entéricos, generalmente éstos se encuentran en muy baja concentración, se requiere un paso de concentración viral, para lo cual se siguió la metodología propuesta por Doboys *et al.* (2002) y por Butot *et al.* (2006) donde la clarificación obtenida en el paso anterior, se precipitó con 10 ml de una mezcla de polietilenglicol (PEG, 8000, Sigma-Aldrich,) a una concentración final de 10% (p/v) con 0.3 M de NaCl. Las muestras se incubaron 2 h a 4°C en agitación (100 rpm). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10, 000 *xg* por 30 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió con 500 µl de PBS por pipeteo. Esta solución se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se añadieron 500 µl de una mezcla

de cloroformo:butanol (1:1, v/v), se agitó con vórtex y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, posterior a lo cual se centrifugó a 10, 000 $\times g$ por 15 min a 4°C.

La fase acuosa superior obtenida (400-500 μl) se transfirió a un tubo nuevo de donde se tomaron 150 μl para la extracción del ARN viral y el resto se mantuvo a -80°C.

6.8. Extracción de ARN viral.

La extracción del ARN viral se realizó con el sistema comercial E.Z.N.A.® Viral RNA Kit (OMEGA bio-tek) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del ARN obtenido de las muestras se midió en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA EE. UU). El ARN extraído se almacenó a -80° C hasta su uso.

6.9. Síntesis de ADN complementario (ADNc).

La síntesis de ADNc se realizó utilizando el High Capacity ADNc Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) donde las condiciones de amplificación fueron de 1 solo ciclo de 25°C por 10 min, seguido de 120 min a 37°C, 5 min a 83°C y manteniéndose a 4°C.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la reacción de síntesis de ADNc

Componente	Volumen
10X RT Buffer	2.0 μl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 μl
10X RT Random Primers	2.0 μl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 μl
Agua libre de nucleasas	3.2 μl
Total por reacción	10.0 μl

6.10. Detección de HuNoVs por PCR convencional aislado de heces.

Para obtener un control positivo para HuNoV, a las muestras de heces previamente tratadas se les realizó una PCR punto final como se muestra en la tabla 3, obteniendo un volumen final de reacción de 20 μ l, el cual contenía los oligonucleótidos (Cap F 5'-CAAGAGTCAATGTTTAGGTGGATGAG-3', y Cap R 5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3' específicos para el GII), 1 U de *Taq* polimerasa y amortiguador de reacción. La amplificación se realizó en un termociclador PCR Express (Thermo Hybaid, California, EE. UU) con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C por 15 min (activar *Taq* polimerasa), seguido de 45 ciclos con etapas de 94°C por 1 s, 55°C por 20 s, 15 s a 72°C para finalizar con un ciclo de 72°C por 3 min según lo reportado por Jothikumar et al. (2004).

Los productos de amplificación (98 bp) fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (10 mg / ml) a 120V, y finalmente fueron documentadas en un fotodocumentador (Gel logic 2000, Kodak).

Tabla 3. Reactivos utilizados para la reacción de PCR convencional.

Componente	Volumen
Agua libre de nucleasas	10.3 μ l
Amortiguador de reacción	5 μ l
Cap F	1.25 μ l
Cap R	1.25 μ l
<i>Taq</i> polimerasa	0.2 μ l
ADN	2 μ l
Total por reacción	20 μ l

6.11. Cuantificación viral mediante qPCR basado en SYBR Green.

El PCR en tiempo real se realizó en un termociclador PikoReal (Thermo Scientific Massachusetts, Estados Unidos) utilizando un kit Maxima SYBR Green (Thermo Scientific

Waltham, EE. UU), utilizando los oligonucleótidos y condiciones que se mencionan a continuación, así mismo para la cuantificación se construyó una curva de calibración para el MNV-1 y el HuNoV GII.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la reacción de qPCR.

Componente	Volumen
Mezcla maestra	10 μ l
Cap F	1.25 μ l
Cap R	1.25 μ l
Agua libre de nucleasas	5.5 μ l
ADN	2 μ l
Total por reacción	20 μ l

6.11.1. Curva estándar de calibración del MNV-1.

Se realizó una curva de calibración con la cepa control de MNV-1 a la que se le realizó una extracción del ARN con el kit comercial mencionado anteriormente. Posteriormente se realizó la síntesis de ADNc viral y se hicieron diluciones seriadas desde de 201.7 ng / μ l hasta 2×10^7 ng / μ l de ADNc previamente cuantificado. Finalmente se cuantificó la concentración de ADNc de cada una de las diluciones en un termocilador PikoReal 96 (Thermo Scientific) utilizando un kit comercial Maxima SYBR Green (Thermo Scientific), para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos F-5'-TCCAGGATGACATAGTCCAGGGGCG-3' y R-5' TGGGATGATTTCCGGCATGGATGGACAACG-3', y se sometieron a un ciclo de 95°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de un paso a 95°C por 30 s, seguido de 30 s a 62°C y amplificación de 30 s a 72°C.

Los datos obtenidos permitieron la construcción de una curva estándar relacionando el ciclo de amplificación con la concentración de ADNc. De esta curva se obtuvo la regresión lineal y la ecuación de la recta las cuales permitieron estimar el número de copias genómicas (CG) de las diluciones del MNV-1 en las muestras.

6.11.2. Curva estándar de calibración del HuNoV GII.

Una vez obtenida la muestra positiva de ADNc de HuNoV GII se realizaron diluciones seriadas a partir de una concentración de 4049.8 ng / μ l para obtener 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 y 1 CG de ARN. Finalmente, cada una de las diluciones se cuantificó en un termociclador PikoReal 96 (Thermo Scientific) utilizando el kit comercial Maxima SYBR Green (Thermo Scientific), en la que utilizaron los oligonucleótidos para GII antes mencionados, y un protocolo de amplificación de 95°C por 15 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 10 s, 20 s a 55°C, 15 s a 72°C finalizando con un ciclo de 72°C por 3 min obteniendo un volumen final de 20 μ l. Los datos obtenidos permitieron la construcción de una curva estándar relacionando el ciclo de amplificación con la concentración de ADNc. De esta curva se obtuvo la regresión lineal y la ecuación de la recta las cuales permitieron estimar el número de CG de las diluciones del HuNoV GII en las muestras.

6.11.3. Búsqueda de HuNoV GII en las muestras de perejil y lechuga mediante qPCR basado en SYBR Green.

A partir del ARN extraído de las muestras de lechuga y perejil como se menciona en la sección 6.9, se realizó la síntesis de ADNc como se describe en la sección 6.10, para posteriormente ser evaluadas por qPCR basado en SYBR Green utilizando los oligonucleótidos y las condiciones de la sección 6.12.2. en el termociclador PikoReal 96 (Thermo Scientific). Finalmente, el número de CG fue estimado utilizando los datos de la curva estándar de calibración del HuNoV GII.

6.12. Detección y enumeración de colifagos somáticos (Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure) en muestras de lechuga y perejil.

Se pesaron 40 g (10 g de cada muestra individual) en bolsas de plástico Nasco estériles (92 oz) que contenían 360 ml de agua peptonada (0.1%) obteniendo con esto una dilución 1:10.

Las muestras se homogenizaron por 30 s de agitación, 30 s de masaje y 30 s de agitación (Heredia *et al.* 2016).

De cada lavado se tomaron 50 ml y se pasaron a un frasco estéril de 225 ml a los cuales se les adicionaron 2.5 ml de CaCl₂ (0.022 g CaCl₂ + 50 ml dH₂O). A este cultivo se le agregó 2.5 ml del cultivo de la bacteria hospedadora (*E. coli* CN-13 ATCC 700609) en crecimiento logarítmico (para lo cual el cultivo previamente estaba inoculado en caldo triptona e incubado 16 h a 36.5 ± 2°C, al transcurrir el tiempo se transfirieron 1.5 ml a un matraz con 30 ml de caldo triptona y se dejó por 4 h a 36.5 ± 2° en agitación) y 50 ml de agar triptona fundido (compuesto por triptona, extracto de levadura, NaCl, CaCl₂ y agar bacteriológico) posteriormente el contenido del matraz se agitó suavemente y fue distribuido en 4 placas Petri (para un volumen final de las 4 placas 100 ml).

Después de solidificado el agar, las placas fueron incubadas de forma invertida a 36.5 ± 2°C por 16 h al cabo del cual se contaron las UFP de las 4 placas para cada muestra. Los resultados fueron reportados por UFP / 100 ml. Como control negativo se utilizó el colifago Φ X174 (ATCC 13706-B1) sin bacteria hospedadora.

Se procesó de la misma manera un control positivo para la presencia de colifagos empelando el colifago Φ X174 (ATCC 13706-B1) para lo cual a 30 ml de caldo triptona se le agregó 1.5 ml de la cepa hospedadora y se incubó por 2 h a 36.5 ± 2°C en agitación. Al pasar las 2 h se le agregó 1 ml del colifago Φ X174 y se incubó de nuevo por 4 h más en agitación con la finalidad de concentrar el control positivo. Posteriormente el concentrado del colifago se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 47 mm de diámetro y 0.45µm de poro (M S-PAK Membranes Filters) tratada con extracto de carne al 1.5%. Del filtrado se tomó 1ml y se realizaron diluciones decimales seriadas con 9 ml de caldo triptona (10⁻¹, 10⁻², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁻⁸ y 10⁻⁹). De las diluciones 10⁻⁷, 10⁻⁸ y 10⁻⁹ se tomó 1 ml y se homogenizaron en un tubo de ensayo con 3 ml de agar triptona para la superficie (triptona, extracto de levadura, glucosa, NaCl, CaCl₂ y agar bacteriológico) y 100 µl de la cepa hospedadora en mitad de fase log. El contenido del tubo se transfirió a cajas petri que previamente tenían una capa de agar triptona para el fondo (con la misma

composición que el utilizado en la superficie a diferencia que se utiliza menos concentración de agar bacteriológico). Al quedar solidificada las placas se colocaron de forma invertida y se dejaron incubando toda la noche a $36.5 \pm 2^\circ\text{C}$. Pasado el tiempo de se contaron las UFP (unidades formadoras de placa, figura 1) y la dilución que se tomó como control positivo fue la que formaba de 30-80 UFP correspondiendo esto a la dilución 10^{-7} en nuestro caso.

Unidades formadoras de placa (UFP)

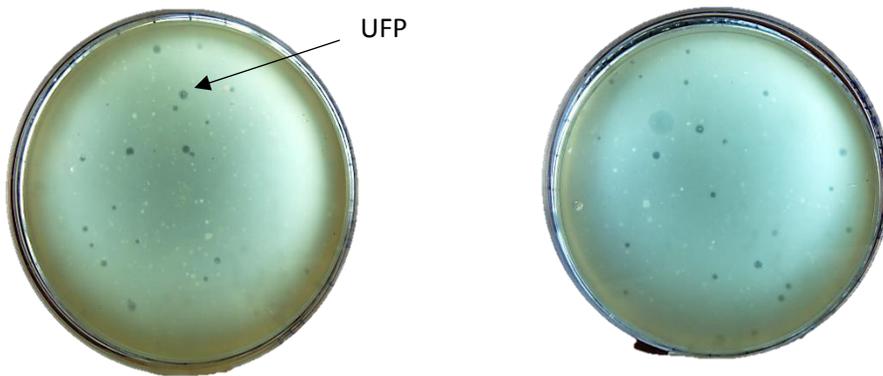


Figura 4. Unidades formadoras de placa (UFP, flechas) utilizando el protocolo 1602 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2001). En flecha se indica una UFP típica.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La enumeración de los colifagos somáticos se expresó en UFP / 100 ml y los del HuNoV GII en Log10 de CG de ARN / g de muestra compuesta. Los datos fueron logarítmicamente transformados en base 10 (log)

Para la descripción de los datos microbiológicos, se elaboraron diferentes tablas de frecuencia, así como gráficas de cajas, utilizando medidas de tendencia central y de variación para comparación de datos mediante los paquetes estadísticos IMB® SPSS® Statistics Version 22 y el GraphPad Prism Version 7.

Se utilizó el análisis unilateral de varianza por jerarquías Kruskal-Wallis. Esta prueba no paramétrica, se utilizó para observar si existían diferencias significativas entre los niveles de contaminación de acuerdo al tipo de vegetal.

Se realizó la correlación entre los colifagos somáticos y HuNoV GII para conocer el grado de asociación entre las dos variables, utilizando la correlación de Spearman (*Rho*).

Para poder interpretar la intensidad con la que se asociaron dos variables en la correlación de Spearman (*Rho*), se utilizó la categorización de Hernández Sampieri & Fernández Collado (1998), como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5. Grado de relación según su coeficiente

Rango	Relación
-0.91 a -1.00	Correlación negativa perfecta
-0.76 a -0.90	Correlación negativa muy fuerte
-0.51 a -0.75	Correlación negativa considerable
-0.11 a -0.50	Correlación negativa media
-0.01 a -0.10	Correlación negativa débil
0.00	No existe correlación
0.01 a 0.10	Correlación positiva débil
0.11 a 0.50	Correlación positiva media
0.51 a 0.75	Correlación positiva considerable
0.76 a 0.90	Correlación positiva muy fuerte
0.91 a 1.00	Correlación positiva perfecta

8. RESULTADOS

8.1. Modelo de contaminación en muestras de lechuga con MNV-1 CW 1 ATCC PTA 5935.

8.1.1. Propagación viral de MNV-1.

A partir de la línea celular Raw 264.1 (ATCC® TIB-71™), se realizó la proliferación viral, donde se subcultivó la línea cuando las células alcanzaron una confluencia celular del 80% (Fig. 1A). La propagación viral se obtuvo a partir de la infección de la línea celular con una multiplicidad de infección (M.O.I.) de 0.05, obteniendo el efecto citopático (ECP) provocado por la infección viral donde se puso de manifiesto el efecto característico de desprendimiento celular de la superficie (Fig. 2B). Las partículas virales pudieron ser detectadas mediante qPCR para corroborar la presencia del MNV.1

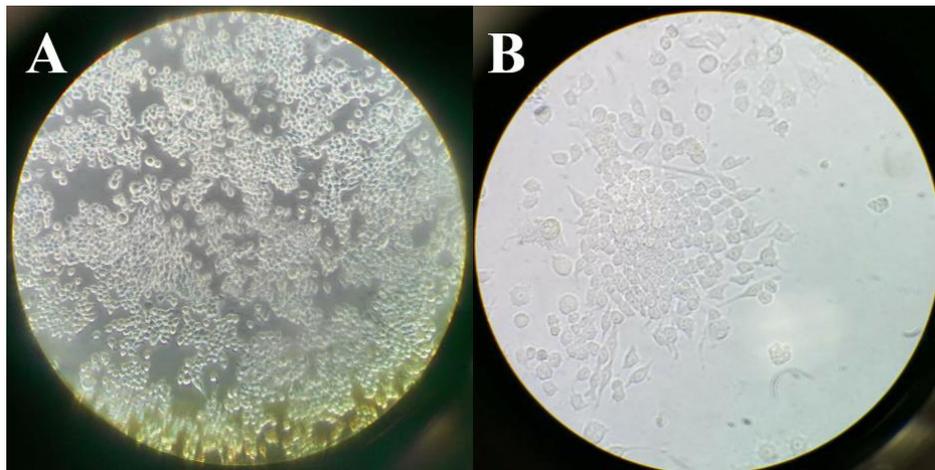


Figura 5. (2A) Línea celular Raw 264.7 en confluencia celular del 80% y (2B) efecto citopático provocado debido a la infección viral.

8.1.2. Titulación viral por TCID₅₀.

La titulación del MNV-1 CW1 (ATCC PTA-5935) se obtuvo mediante la titulación de TCID₅₀, obteniendo un título viral de 2.0×10^{-6} TCID₅₀ / ml, tomando en consideración un 75% de pozos infectados positivos y 25% positivos por debajo del 50%. Posteriormente se visualizaron los pozos para observar el efecto citopático del duplicado y el virus de referencia (0.1×10^{-6} TCID₅₀ / ml).

Ensayo de titulación de TCID₅₀

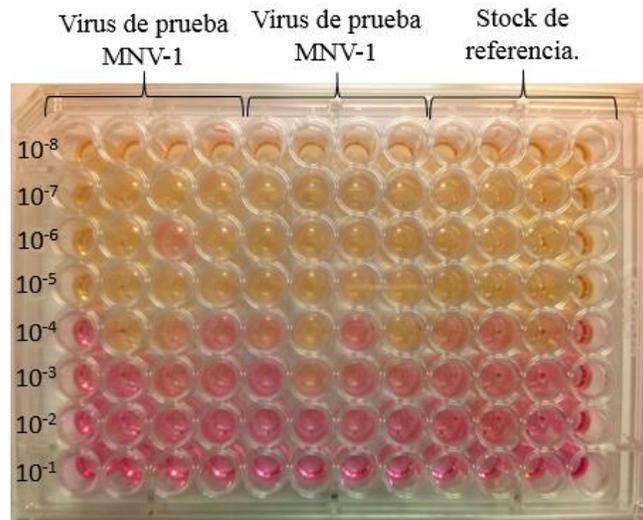


Figura 6. Ensayo de titulación de TCID₅₀ en placa de 96 pozos, con dos repeticiones del virus MNV-1 (ATCC PTA-5935) y un control de referencia de un virus previamente producido en el laboratorio.

8.1.3. Curva de calibración estándar de MNV-1 mediante qPCR.

La curva de calibración de qPCR para MNV-1, se obtuvo a partir de las diluciones seriadas del ADNc viral. La regresión lineal de la curva arrojó una $R^2 = 0.9071$ y la ecuación de la recta correspondiente Y: $-2.122X + 29.93$ (Figura 4).

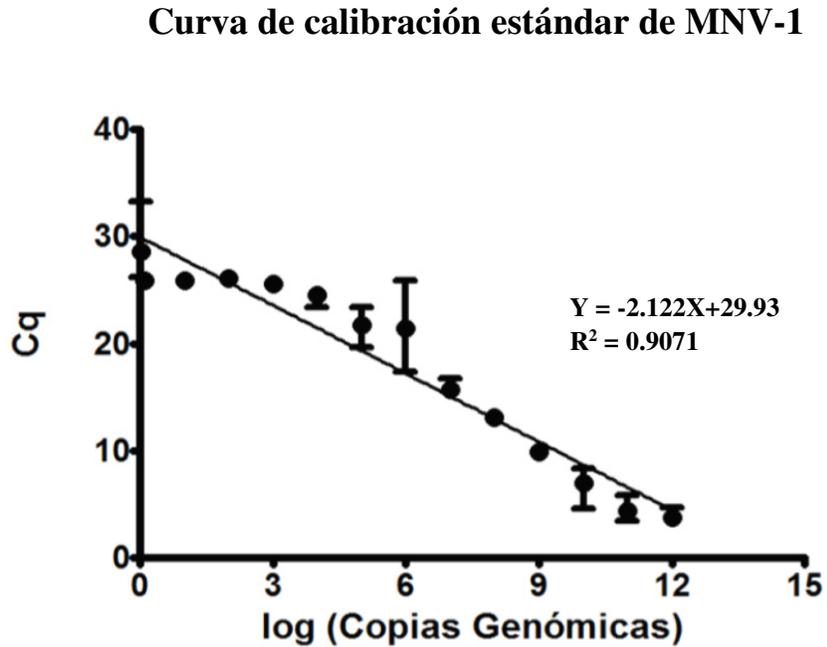


Figura 7. Curva estándar de MNV-1, con un valor de R^2 de 0.9071 y la ecuación de la recta con una Y: $-2.122X + 29.93$.

8.1.4. Límite de detección del MNV-1 como control de proceso

El límite de detección (LOD) se definió como la cantidad de virus más baja expresado en Log10 de CG de ARN. Posteriormente se realizó una qPCR, la cual logró detectar la presencia del MNV-1 en todas las muestras. La cuantificación de MNV-1 se estimó con la ecuación de la recta de la curva estándar como se muestra en la siguiente tabla.

El límite de detección fue de 0.12 y el límite de cuantificación (LOQ) de 2.34 log10 de CG de ARN.

Tabla 6. Detección de MNV-1 inoculado en lechuga evaluado mediante qPCR.

Inóculo	Método de PEG
MNV-1 (2.0×10^{-6} TCID₅₀ / ml)	MNV-1 (log10 CG de ARN)
100000	2.34
10000	1.87
1000	1.78
100	1.32
10	0.7
1	0.12

8.2. Detección molecular de HuNoV GII en vegetales.

8.2.1. Curva estándar de cuantificación de HuNoV GII mediante qPCR.

Posterior a la obtención del control positivo de HuNoV GII, se realizó una curva estándar de titulación cuantificándose a partir de diluciones seriadas de ADNc, obteniendo una R^2 de 0.9941 y la ecuación de la recta donde Y: $-1.785X+30.597$

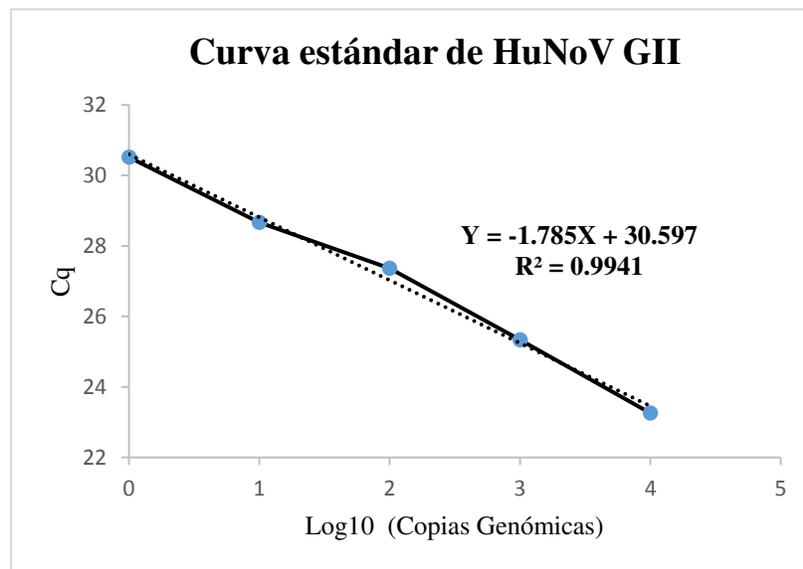


Figura 8. Curva estándar del HuNoV GII, con un valor de $R^2= 0.9941$ y la ecuación de la recta con una $Y= -1.785X + 30.597$

8.2.2 Detección y cuantificación de HuNoV GII mediante qPCR en muestras de lechuga y perejil.

De las muestras compuestas analizadas de cada producto, se obtuvo que para el caso de las de perejil, el 80% (32/40) fueron positivas para el HuNoV GII, en tanto que de las muestras de lechuga fue mayor con un 92% (37/40).

Tomando en cuenta que nuestro límite de detección fue de 0.1 log₁₀ CG de ARN / g, del total de muestras analizadas, los rangos en los que hubo mayor número de CG en las muestras de perejil fue de 0.1 a 0.9 log₁₀ (57.5%), a diferencia de las muestras de la lechuga que solo el 2.5% estuvieron en ese rango (Tabla 7, Fig. 9).

En las muestras de lechuga el 60% se estuvieron en los rangos de 2 a 2.9 log₁₀ y rango en el que el perejil solo se presentó el 5% de las muestras. Sólo algunas de nuestras muestras de lechuga (10%) estuvieron por encima de nuestro límite de cuantificación (≥ 3 log₁₀) (Tabla 7, Fig. 9).

Tabla 7. Frecuencias de log₁₀ de CG de ARN / g de muestra compuesta en muestras de lechuga y perejil.

Rango (log₁₀ CG de ARN / g)	Perejil Positivas/total (%)	Lechuga Positivas/total (%)
<0.1	8/40 (20)	3/40 (7.5)
0.1-0.9	23/40 (57.5)	1/40 (2.5)
1.0-1.9	7/40 (17.5)	8/40 (20)
2.0-2.9	2/40 (5)	24/40 (60)
>3.0	0/40 (0)	4/40 (10)
Total	32*/40 (80)	37*/40 (92)

* Considerando el límite de detección a partir del rango 0.1-0.9

Distribución de HuNoV GII en muestras de lechuga y perejil.

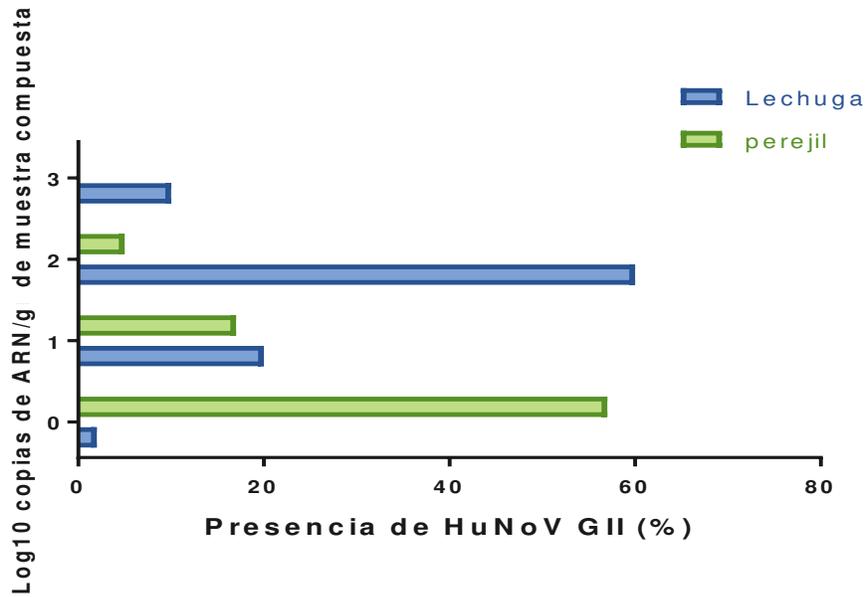


Figura 9. Grafica de frecuencias (%) de los rangos contaminación de las muestras de lechuga y perejil analizadas mediante qPCR y expresadas en log10 de CG

8.3. Comparación de niveles de HuNoV GII en muestras de lechuga y perejil.

Tras realizar el análisis estadístico se demostró que si había diferencias significativas ($p=0.000$) entre ambas muestras, debido a que en las muestras de lechuga se presentó mayor número de CG. El promedio de \log_{10} CG / g de las muestras de lechuga fue de 2.290, en tanto que para las muestras de perejil se obtuvo un promedio de 0.561 \log_{10} CG de ARN /g de muestra compuesta (Fig. 10).

Comparación de los niveles de contaminación de HuNoV GII en muestras de lechuga y perejil.

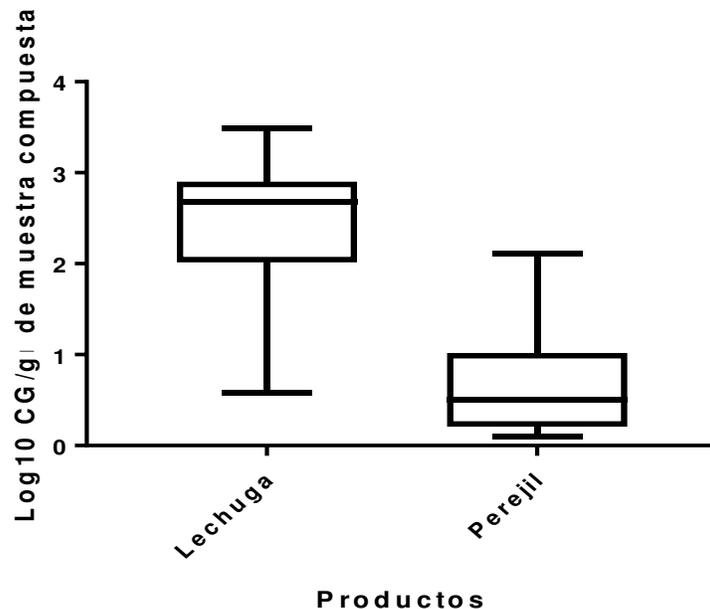


Figura 10. Comparación del \log_{10} CG de ARN / g de muestra compuesta de lechuga y perejil adquiridas en el área metropolitana de Monterrey N.L.

8.4. Detección y enumeración de colifagos somáticos en muestras de lechuga y perejil (Protocolo 1602-EPA 2001).

Al realizar la cuantificación de colifagos somáticos en ambos tipos de muestra, encontramos que, para el caso de lechuga, el 50% de las muestras presentaron niveles de contaminación entre $1-10^1$ UFP / 100 ml, seguido de niveles de $11-10^2$ y $101-10^3$ UFP / 100 ml con un 27.5 y 7.5% respectivamente. El 15% de las lechugas presentaron niveles <1 UFP/100 ml de colifagos (Tabla 8, Fig. 11).

Para el caso de las muestras de perejil, el 42.5% de las muestras compuestas presentaron niveles de colifagos somáticos entre $1-10^1$ UFP / 100 ml, mientras que un 25 y 22.5% de las muestras tuvieron cuentas entre $11-10^2$ y $101-10^3$ UFP/100 ml respectivamente. En este caso sólo una muestra tuvo niveles de colifagos somáticos mayores a 10^3 UFP / 100 ml representando esto el 2.5% del total de muestras, así mismo en el 7.5% de las muestras de perejil (3) se presentaron valores menores a 1 UFP / 100 ml (Tabla 8, Fig. 11).

Tabla 8. Niveles de colifagos somáticos (UFP / 100 ml) en muestras de lechuga y perejil

Colifagos somáticos (UFP / 100 ml)	Lechuga tipo Iceberg (n=40)	Perejil liso (n=40)
	Frecuencias (%)	Frecuencias (%)
< 1	6 (15)	3 (7.5)
$1-10^1$	20 (50)	17 (42.5)
$11-10^2$	11 (27.5)	10 (25)
$101-10^3$	3 (7.5)	9 (22.5)
$>10^3$	0 (0)	1 (2.5)

Distribución de colifagos somáticos en muestras de lechuga y perejil.

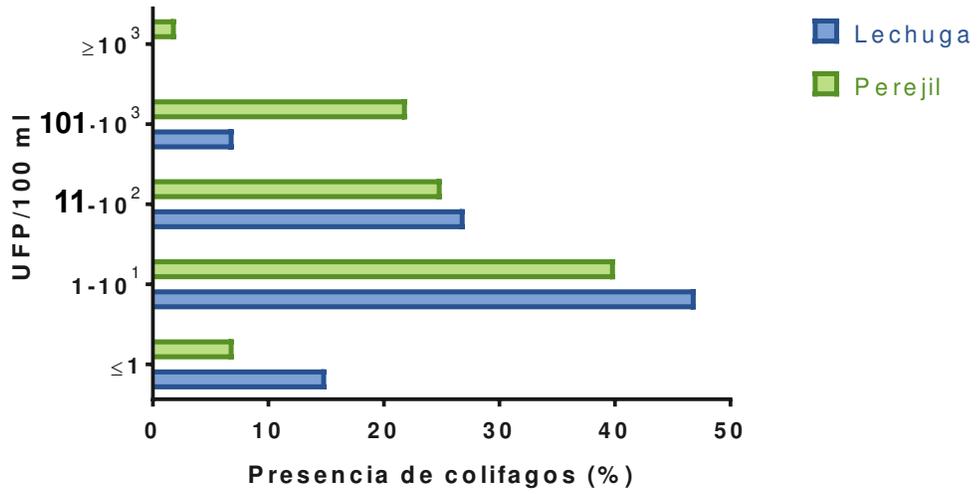


Figura 11. Grafica de barras con frecuencias (%) de los rangos de contaminación por colifagos somáticos (UFP / 100 ml) en muestras de lechuga y perejil.

8.5. Comparación de niveles de colifagos somáticos de acuerdo al tipo de producto.

Con respecto al tipo de producto, observamos que el perejil fue el que presentó mayor concentración de colifagos somáticos a diferencia de las muestras de lechuga, sin embargo, la media entre ambos productos era cercana, ya que la mayoría de las muestras se encontraron en el mismo rango de log UFP / 100 ml, donde la media para las muestras de perejil fue de 1.284 en tanto que para las de lechuga fue de 0.855 que tras realizar el análisis de los dos productos, se demostró que no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.073$) debido a que la distribución de los niveles de log UFP / 100 ml es similar entre los productos (Fig. 12).

Comparación de los niveles de contaminación de colifagos somáticos en muestras de lechuga y perejil.

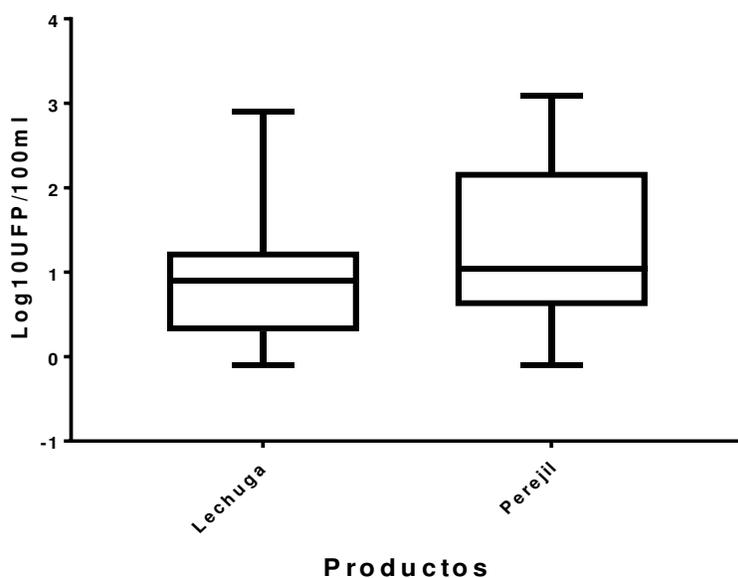


Figura 12. Comparación de los niveles de colifagos somáticos de las muestras de lechuga y perejil recolectados en el área metropolitana de Monterrey N.L.

Es destacable hacer mención que el 75% de las muestras de lechuga se encontraron niveles de colifagos somáticos de 1.2450 log UFP / 100 ml, caso contrario de las muestras de perejil donde los niveles más altos se encontraban en 2.1875 log UFP / 100 ml.

8.6. Correlación entre colifagos somáticos y HuNoV GII en el total de muestras.

Para realizar la correlación entre la presencia de ambos tipos de virus, se utilizó la correlación de Spearman (Rho) mediante el cual, al hacer los análisis de correlación entre el total de las muestras sin importar el tipo de producto, encontramos que los colifagos somáticos y HuNoV GII no presentaron correlaciones significativas ($Rho = -0.098$, $p = 0.432$) (Tabla 9) tomando en cuenta que mientras más cercano a 1 sea el valor, más correlación hay entre ambos (Fig. 13).

Tabla 9. Grado de asociación entre los colifagos somáticos con HuNoV GII en el total de muestras de lechuga y perejil.

Correlación <i>rho</i> de Spearman	Total de muestras de vegetales	
	Colifagos somáticos	HuNoV GII
Colifagos somáticos	1	-0.098
HuNoV GII	-0.098	1

Correlación entre colifagos somáticos y HuNoV GII en el total de las muestras

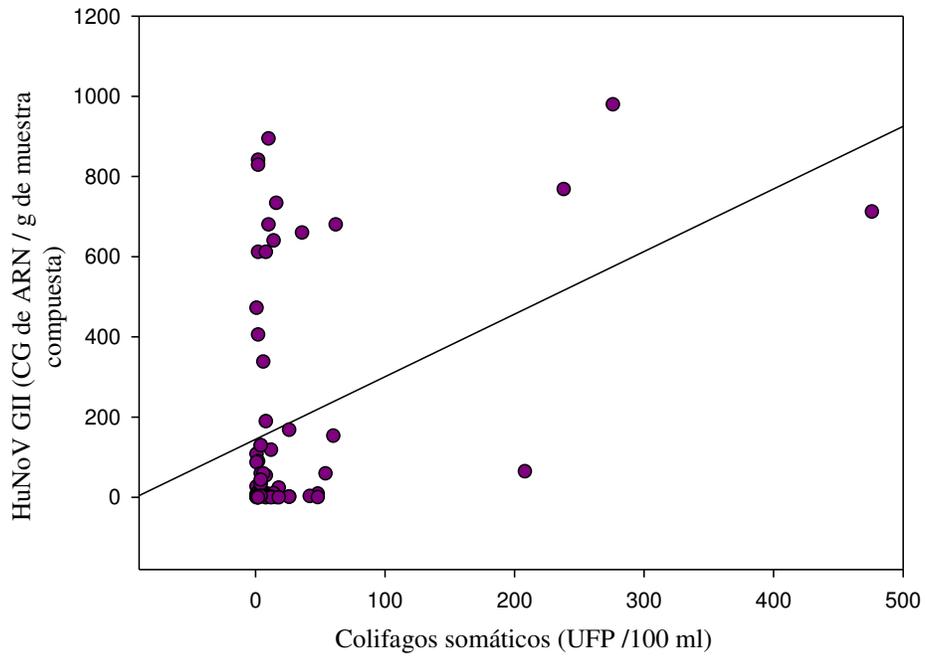


Figura 13. Diagrama de dispersión de colifagos somáticos (UFP/100 ml) y HuNoV GII (CG de ARN / g de muestra compuesta) en muestras de lechuga y perejil.

8.6.1. Correlación entre colifagos somáticos y HuNoV GII en muestras de lechuga.

Cuando se realizó la correlación de la detección de ambos virus dependiendo del tipo de muestra se observaron resultados diferentes. Para el caso de las muestras de lechuga al realizar el análisis estadístico, entre colifagos y HuNoV GII, se presentó una correlación media positiva mostrándose también en el diagrama de dispersión ($Rho = 0.375$, $p = 0.032$) (Tabla 10, Fig. 14).

Tabla 10. Grado de asociación entre los colifagos somáticos con HuNoV GII en muestras de lechuga. El valor en el interior de las celdas de la matriz, representa el grado de asociación Rho de Spearman.

Correlación ρ de Spearman	Total de muestras lechuga	
	Colifagos somáticos	HuNoV GII
Colifagos somáticos	1	0.375*
HuNoV GII	0.375*	1

*La correlación es significativa a un nivel de 0.05

Correlación positiva entre colifagos somáticos y HuNoV GII en muestras de lechuga,

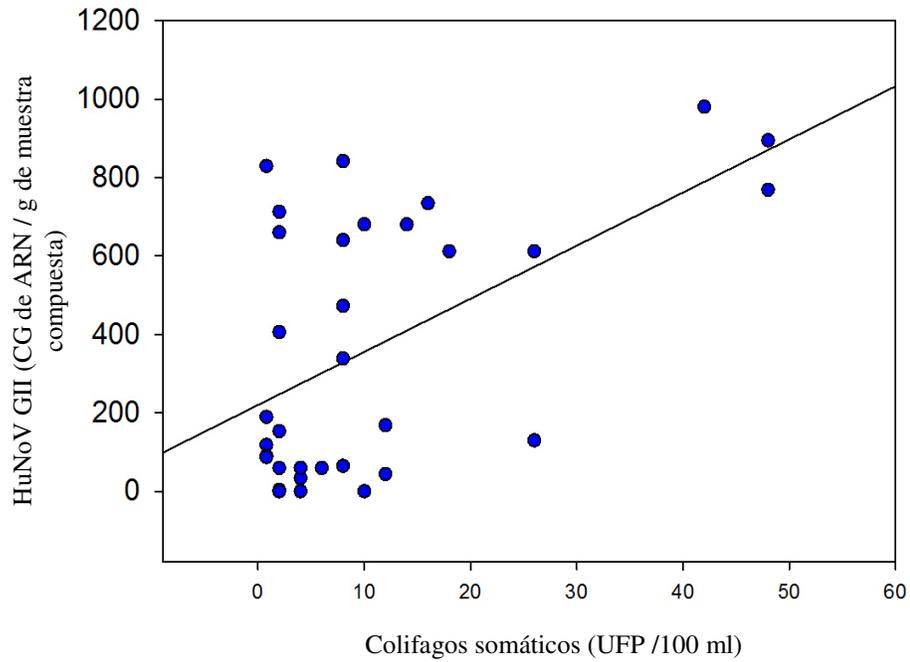


Figura 14. Diagrama de dispersión relacionando el valor de X de colifagos somáticos (UFP / 100 ml) y el valor de Y de HuNoV (CG de ARN / g de muestra compuesta) en muestras de lechuga.

8.6.2. Correlación entre colifagos somáticos y HuNoV GII en muestras de perejil.

Para el caso de las muestras de perejil al realizar el análisis estadístico, entre colifagos y HuNoV GII, se presentó una correlación media negativa con los HuNoV GII ($Rho = -0.385$, $p = 0.027$) mostrándose también en el diagrama de dispersión ($Rho = 0.375$, $p = 0.032$) (Tabla 11, Fig. 15).

Tabla 11. Grado de asociación entre los colifagos somáticos con HuNoV GII en muestras de perejil. El valor en el interior de las celdas de la matriz, representa el grado de asociación Rho de Spearman.

Correlación rho de Spearman	Total de muestras de vegetales (lechuga y perejil)	
	Colifagos somáticos	HuNoV GII
Colifagos somáticos	1	-0.385*
HuNoV GII	0.385*	1

*La correlación es significativa a un nivel de 0.05

Correlación negativa entre colifagos somáticos y HuNoV GII en muestras de perejil.

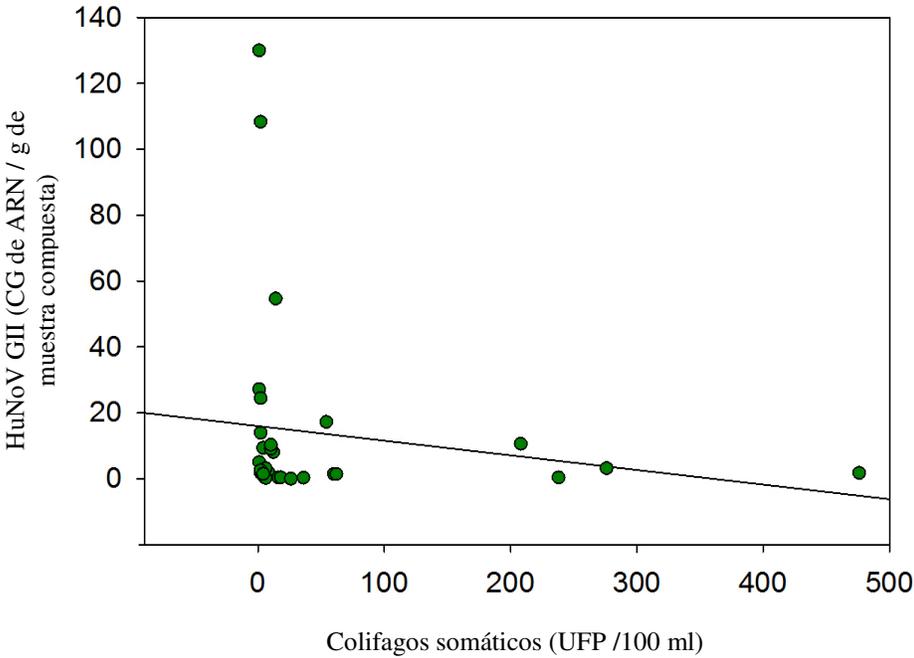


Figura 15. Diagrama de dispersión de colifagos somáticos (UFP / 100 ml) y HuNoV (CG de ARN / g de muestra compuesta) en muestras de perejil, obteniendo una *Rho* de -0.385.

9. Discusión

Desde los últimos 10 años, ha habido una creciente demanda de verduras de hoja verde y ensaladas listas para el consumo RTE (del inglés ready to eat), debido a que los consumidores cambiaron sus hábitos alimenticios derivado de su interés de tener un estilo de vida más saludable (Ambroos Stals *et al.* 2011). Con frecuencia estos productos se consumen crudos o mínimamente procesados, facilitando con ello la propagación de patógenos (virus, parásitos y bacterias) por lo que estos alimentos son reconocidos como una fuente de brotes de gastroenteritis en todo el mundo (Birce Mercanoglu Tuban y A. Kadir Halkman *et al.* 2011)

Entre los anteriores, el principal patógeno que ha sido atribuido a brotes masivos de gastroenteritis humana por consumo de alimentos contaminados es el HuNoV, representando el 57% de los brotes asociados al consumo de vegetales verdes, donde el genogrupo II (GII) es el más ampliamente reportado como causante de gastroenteritis (Painter *et al.* 2013).

Debido a lo anterior, el objetivo de nuestro trabajo fue detectar la presencia de HuNoV GII en muestras de lechuga y perejil y poder establecer una relación entre este patógeno con indicadores alternativos de contaminación fecal como lo son los colifagos somáticos, ya que en la actualidad es difícil rastrear al HuNoV debido a la falta de métodos sensibles de detección donde a menudo resulta ser más compleja y costosa, por tal motivo se considera de suma importancia monitorear al HuNoV mediante indicadores ambientales.

Con respecto a la metodología utilizada para la detección y concentración del HuNoV fue la propuesta por Dubois *et al.* (2002) y Butot *et al.* (2006), que implicó tres pasos diferentes de: (1) elución y clarificación del virus del alimento, (2) concentración de las partículas virales del virus y (3) extracción y detección del ácido nucleico, utilizando la precipitación con polietilenglicol (PEG) en combinación con ultracentrifugación.

En este sentido, Dubois *et al.* (2002) propusieron un protocolo que incluye lavar la superficie del vegetal con un amortiguador básico (pH 7.4 a 9.5) mismo que empleamos en nuestro estudio (TGBE, Tris 100 mM, Glicina 50 mM, y extracto de carne al 1%, pH 9.5 suplementado con MgCl₂) debido a que rompe las interacciones electroestáticas e hidrofóbicas entre las superficies de los vegetales y el virus. Además, la suplementación del amortiguador con Tris favorece la elución de las partículas virales proporcionando un medio satisfactorio al acoplarse a la RT-qPCR, sin embargo, tiene la desventaja de disminuir la infectividad del virus, para minimizar este paso se complementó con 50 mM de MgCl₂ (Parry y Mortimer 1984).

Posteriormente un paso también de suma importancia fue la concentración de las posibles partículas virales, esto tomando en cuenta que a menudo estos patógenos se encuentran en niveles muy bajos en los vegetales. Sin embargo, a pesar de proponerse diversas estrategias para la concentración viral, se deben adaptar para que sean compatibles con el eluyente utilizado y el tipo de alimento que se analiza. Es por esto que para nuestro caso utilizamos la adición de PEG al eluido clarificado ya que es un compuesto que reduce la solubilidad de las macromoléculas permitiendo una buena concentración viral (Lewis y Metcalf 1988).

Es importante mencionar que al final del tratamiento de la muestra, se realizó una purificación secundaria con cloroformo y alcohol butílico para eliminar sustancias interferentes previamente co-purificadas con partículas (Sair *et al* 2002; Dubois *et al.* 2006).

En cuanto a la técnica molecular utilizada para la detección y cuantificación del HuNoV GII empleamos aquellas basadas en la detección de ácidos nucleicos por PCR, ya que se consideran la mejor herramienta para la detección de virus patógenos en vegetales (Lees, 2002). Al realizar la técnica de PCR punto final esta mostró menos sensibilidad debido quizá a la baja concentración de virus en las muestras en comparación con la qPCR.

Con respecto a lo anterior, un estudio realizado por Nordgren *et al.* (2008) reportaron observaciones similares, planteando que una de las razones por las que el PCR convencional falla en la detección de HuNoV es la baja carga viral. Asimismo, Pang *et al.* (2004) atribuyen la baja sensibilidad a la dificultad en el desarrollo de un ensayo molecular para el HuNoV sobre todo en el diseño y construcción de oligonucleótidos, debido a la alta diversidad genética del género *Caliciviridae*, ya que las heterogeneidades existen aún en las regiones más conservadas del genoma viral, por ejemplo, la región dependiente de la ARN polimerasa (RdRp).

En el presente trabajo utilizamos también la PCR en tiempo real ya que ofrece la ventaja de ser un método sencillo y rápido, basado en SYBR Green, la cual resultó ser más sensible para la detección del HuNoV GII. Cabe mencionar que primero implementamos y evaluamos la metodología de detección del HuNoV GII, mediante un control de proceso utilizando al MNV-1 como subrogado o sustituto del HuNoV, debido a que actualmente, no hay un método fácil de estandarizar disponible para el cultivo del HuNoV y a que el MNV-1 sí puede ser cultivado en línea celular (Duizer *et al.* 2004).

Asimismo, en un estudio realizado por Luciana Croci *et al.* (2008) se plantea que la idea de utilizar un control de proceso involucra el inocular una muestra con una cantidad conocida de un agente que posee características similares de comportamiento en las matrices de alimentos como el virus de interés, es por ello que se seleccionó al MNV-1 además de estar estrechamente relacionado con el virus investigado, ser fácilmente disponible, simple de estandarizar e inofensivo para trabajar en el laboratorio (Hootfar *et al.* 2004). Además, el nivel de recuperación de dicho control permitirá la cuantificación relativa de la eficiencia del procesamiento de extracción de las muestras y más importante aún, proporcionará datos que puedan ayudar a la interpretación de si los resultados negativos podrían ser falsos debido al fracaso del procesamiento de extracción (Le Guyader *et al.* 2004).

En este sentido y después de haber evaluado que hubo una buena tasa de recuperación del MNV-1 inoculado con un límite de detección de 0.12 log₁₀ de CG de ARN, de las 40 muestras compuestas de lechuga 37 (92%) fueron positivas, de las cuales el 60% se encontraban en rangos de 2 a 2.9 log₁₀ de CG de ARN / g de muestra compuesta y el 10% de las muestras estuvieron por encima de nuestro límite de cuantificación (≥ 3 log₁₀ de CG de ARN / g). En lo reportado en la literatura por Martijn Bouwknegt *et al.* (2014), desarrollaron un modelo cuantitativo para estimar el riesgo que representan los virus entéricos en los vegetales de hoja verde en Europa a lo largo de la cadena de suministro, en sus resultados, al analizar la lechuga, encontraron concentraciones de 3.95 log₁₀ de CG de ARN / g porción, coincidiendo con los nuestros.

Para el caso de las 40 muestras compuestas de perejil, 32 (80%) resultaron positivas, sin embargo, presentaron un menor número de CG a diferencia de las muestras de lechuga. El 57% de encontraba en los rangos de 0.1 a 0.9 log₁₀ de CG de ARN / g de muestra compuesta, solamente el 5% presentaron valores de 2 a 2.1 log₁₀.

Específicamente en nuestro país poco se ha buscado la presencia de estos virus en muestras de vegetales, tal es el caso de un estudio realizado por Feliz-Valenzuela *et al.* (2012) donde se cuantificaron virus entéricos, incluyendo el HuNoV (GI) en productos frescos de las instalaciones de empaque en el Noroeste de México. Los resultados arrojados en las muestras de perejil que evaluaron provenientes de campo y con un paso de desinfección por inmersión se encontró en una muestra HuNoV GI con una concentración de 2.55 log₁₀ CG de ARN / g

Otro de los pocos estudios en la búsqueda de virus en cultivos en el Noroeste de México, fue realizado por Feliz *et al.* (2010). Buscaron la presencia de HuNoV en pimientos, encontrándolo en el 45% de las muestras del campo y en 30% de los pimientos envasados.

Con respecto a la estacionalidad del muestreo, Feliz-Valenzuela *et al.* (2012) analizaron vegetales como cebolla verde (3.75 log₁₀ ARN / g) y cilantro (2.68 log₁₀ ARN / g),

donde al comparar sus resultados con los obtenidos en el agua utilizada para la desinfección, los vegetales presentaron menor carga viral, ya que en las muestras de agua tuvieron niveles de 7.11 log₁₀ CG de ARN / ml concluyendo que dichas bajas cargas virales se pudieron deber a que el muestreo fue realizado en la temporada de primavera donde no hay la misma descarga de HuNoV, debido a que este patógeno es predominante en invierno. Es por ello que en nuestro trabajo pudieran haberse encontrado baja concentración viral ya que nuestro muestreo se realizó en la temporada de primavera-verano.

En otro estudio por Ambroos Stals *et al.* (2010) evaluaron la presencia de HuNoV diferentes frutas las cuales también reportaron rangos similares a nuestro estudio, como, por ejemplo: frambuesas (2.45 a 3.70 log / 10 g), fresas (2.20 a 4.10 log / 10 g), tomate (3.91 a 5.04 log / 10 g) y ensalada de frutas (4.64 log / 10 g). Los autores reportan la dificultad que representa el poder interpretar los resultados positivos por PCR, debido a que en la actualidad no es posible cuantificar el impacto a la salud que representa el número de CG presente en los alimentos, debido a la falta de correlación entre las CG y las partículas infecciosas, además de la falta de un modelo *in vitro* (Ambroos Stals *et al.* 2010), lo mismo podemos mencionar de nuestros resultados obtenidos en ambos vegetales.

Cabe mencionar que no todas las frutas y vegetales son susceptibles de igual manera a la contaminación microbiológica (Mercanoglu-Taban and Halkman, 2011). Las hojas de los vegetales verdes son más susceptibles ya que la arquitectura de las mismas puede influir en la supervivencia del patógeno, debido a la formación de protuberancias y depresiones en las hojas, además que tricomas y estomas e hidratos son estructuras que secretan sustancias y permiten que se creen micrositios para la supervivencia del microorganismo al incrementar la disponibilidad de alimento y agua, así como una temperatura más estable y protección ante la luz UV (Melotto *et al.* 2014).

Recientemente se ha estudiado como los virus entéricos patógenos principalmente el HuNoV se adhiere a la superficie de los vegetales y la razón por la que tiene mayor

afinidad a la lechuga que otros vegetales. Kokkinos *et al.* (2012) estudiaron la presencia de virus entéricos en la cadena de suministro en vegetales de hoja verde, concluyendo que la contaminación por virus se produce principalmente en la superficie de los cultivos agrícolas (Seymour y Appleton, 2001). Se ha descubierto que la adsorción de virus a los vegetales varía según la tensión y las propiedades de la superficie, donde factores externos como, manipulación, luz UV, lavado, procesamiento, distribución y empaque afectan la adherencia de los virus (Vega *et al.* 2008). En nuestro resultado encontramos que el perejil al ser un vegetal más expuesto a los factores mencionados anteriormente es posible que el virus no pudiera adherirse a la superficie y esto influya en encontrar menor cantidad copias genómicas.

La contaminación de la lechuga también puede deberse a la presencia de virus en los biosólidos, debido a los cortes abiertos y que los estomas pueden protegerse de la desinfección (Wei *et al.* 2010). Se ha demostrado que las partículas recombinantes (VLP) similares al virus de Norwalk, se unen a la superficie de la lechuga romana, lo que sugiere la posibilidad de ligados específicos en la superficie de la hoja (Gandhi *et al.* 2010).

La presencia de los virus en vegetales también puede deberse a la internalización y diseminación de HuNoV. Tal es el caso de la lechuga romana producida hidropónicamente (Erin DiCaprio *et al.* 2012), donde utilizó el HuNoV GII.4 y un modelo sustituto (MNV-1) y vieron que estos virus se internalizaron desde la raíz.

Se ha reportado que los genotipos de HuNoV tienen diferentes afinidades de unión de los receptores funcionales del virus a los antígenos del grupo hito-sanguíneo (HBGA) (Huang P *et al.* 2005; Hutson AM *et al.* 2002). Los HBGA son complejos de hidratos de carbono que están presentes en la superficie de los eritrocitos, así como en el epitelio intestinal, habiendo tres familias principales de HBGA: Lewis, ABO y secretor, y cada uno es específicamente reconocido por diferentes cepas de HuNoV. Aunado a esto, diversos estudios han demostrado que el HuNoV se une a moléculas similares a HBGA que existen en los productos frescos como lechuga, arándanos y fresas (Gandhi KM *et*

al. 2010; Tian P *et al.* 2007). Así mismo se ha reportado que algunos de estos carbohidratos son los análogos de los receptores de HuNoV, como la glucosa y el glucano, y son muy abundantes en vegetales y frutas, es por esto que es posible que estas moléculas similares a HBGA puedan desempeñar un papel en la unión viral, la internalización y la diseminación (Tian P *et al.* 2007).

Ambrožič *et al.* (2011), nos mencionan que debido a la creciente incidencia de infecciones víricas transmitidas por los alimentos el Comité sobre Higiene de los Alimentos del Codex Alimentarius preparó un borrador internacional sobre un Código de Prácticas de Higiene para el control de estos virus en los alimentos.

Actualmente solo existe un método validado para la detección de virus entéricos como virus de Hepatitis A y Norovirus humano en alimentos, el cual fue publicado por el Codex Alimentarius en el 2017. El método de validación es el ISO 15216-1 (cuantitativo) e ISO 15216-2 (cualitativo), en el cual especifican un método para la cuantificación o detección de los niveles Hepatitis A y Norovirus del GI y GII, a partir de productos alimenticios como: frutas blandas, superficies de vegetales y agua embotellada), este método no está validado para la detección de virus en otras matrices de alimentos. (CODEX 2017.)

Debido a la dificultad que presenta el poder detectar virus entéricos patógenos en las muestras de alimentos, se ha propuesto el uso de sustitutos o indicadores alternativos, por lo cual, en nuestra investigación utilizamos a los colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal, ya que comparten similitud con los virus entéricos en cuanto a su morfología, resistencia, persistencia en el medio ambiente y los alimentos (Riou *et al.* 2007).

El uso de colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal se ha explorado debido a que pueden ser candidatos importantes para indicar una contaminación de origen viral, dado a que poseen características similares a los virus entéricos tanto de origen humano, como animal; se les considera, además, organismos ambientales

resistentes comparado con *E. coli*, además de simular los patrones de resistencia y supervivencia a los virus entéricos (Endley *et al.* 2003).

El monitoreo de ciertos microorganismos indicadores es requerido por la ley en diferentes lugares en el mundo para determinar la calidad del agua. En este sentido, el uso de colifagos para el monitoreo de patógenos normalmente es utilizado para evaluar la calidad del agua. Sin embargo, aunque los colifagos no son patógenos para los seres humanos, Villamizar-G *et al.* (2005) han propuesto un límite permitido de colifagos de 0 / 100 ml para agua de bebida, basándose en la incidencia y comportamiento de los colifagos y virus entéricos en el ambiente, por lo que recomienda que, si las muestras tienen presencia de colifagos, sean analizadas para la posible presencia de virus entéricos patógenos. Para la búsqueda de colifagos somáticos se utiliza la metodología propuesta por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), método 1602-EPA (2001), protocolo diseñado para cuantificar la presencia de colifagos en muestras de agua.

En la actualidad, la mayoría de los estudios sobre la aplicación de los bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal están relacionados a estudios en calidad del agua (Rezaeinejad *et al.* 2014). Sin embargo, existen otros reportes donde se utilizan matrices de alimentos, como ostras, mariscos, pollo, productos avícolas y carnes, así como zanahoria para la detección y potencial uso de los colifagos somáticos (Pillai, 2006). En este sentido, Bartz *et al.* (2017), utilizaron a los colifagos somáticos como estándares de calidad microbiológica en muestras de melón, tomate, y chile jalapeño, obteniendo dichos resultados por el uso de un sistema comercial el cual es una versión reducida del protocolo 1602, reportando resultados similares al de nosotros.

Para ver el grado de asociación de los colifagos somáticos y HuNoV GII por cada tipo de producto, en nuestro trabajo, utilizamos la correlación de Spearman, para medir el grado de asociación entre los dos microorganismos, sin embargo, en base los resultados, obtuvimos correlaciones medias entre ambos productos y esto se puede deber a que en la literatura existe una polémica sobre el uso de colifagos como indicadores de

contaminación fecal, ya que Rezaeinejad *et al.* (2014) advierten que no siempre se puede realizar una correlación efectiva, pues en la actualidad existen discrepancias sobre la vigilancia de virus entéricos o el monitoreo a través de colifagos como microorganismos efectivos para la gestión de calidad del agua.

En la literatura las investigaciones sobre el uso de bacteriófagos como microorganismos de monitoreo de contaminación fecal se basa en la búsqueda de colifagos de ARN específicos (F-ARN), debido a que comparten similitud con los virus entéricos patógenos (Jofre, 2007). Sin embargo, su detección resulta más compleja, debido a que los colifagos F-ARN infectan la célula huésped a través de la unión a las fimbrias de fertilidad (F) (Leclerc *et al.* 2000). Las fimbrias solo pueden ser producidas por células que llevan un plásmido que codifica para este factor y solo cuando las células se encuentren en la fase de crecimiento logarítmico a temperaturas superiores a 30°C (Havelaar *et al.* 1986).

Debido a la dificultad que presenta la utilización de los colifagos F-RNA, nosotros utilizamos a los colifagos somáticos, ya que estos se encuentran en mayor abundancia y comprenden una gran cantidad de fagos líticos. Además, su método de detección es más sencillo, debido a que inician la infección uniéndose a receptores específicos en la pared celular de *E. coli*. El único inconveniente es que existe potencial para una mayor replicación de colifagos somáticos fuera del intestino en ambientes acuáticos y por ende la correlación podría verse afectada (Muniesa y Jofre, 2004).

Los factores ambientales, como las estaciones del año, también pueden influir para una correlación no efectiva, debido a que los HuNoV se consideran virus eméticos del invierno, por lo que su descarga será más elevada a diferencia de las otras estaciones (Hathaway *et al.* 2010), además la correlación puede verse afectada según el método de detección utilizado, donde Allwood *et al.* (2004) describe que el método de elución del virus influye en la detección de colifagos somáticos en muestras de vegetales verdes.

Por lo tanto, el método que se realice para la correlación podría afectar de manera o positiva el análisis. Por ejemplo, Allwood *et al.* (2004) demostró una correlación por tablas de contingencia entre los colifagos con muestras de vegetales que fueron relacionadas a un brote por HuNoV en Estados Unidos. Gobllick *et al.* (2011), asociaron los colifagos F-ARN con cepas de HuNoV del GI y GII en ostras provenientes de aguas residuales tratadas. El muestreo fue realizado durante seis semanas seguidas y después una vez cada mes hasta completar 7 meses. Al evaluar la asociación de la presencia de virus con los colifagos F-ARN, mencionan que el mes donde hubo mayor presencia de HuNoV correspondía a los meses de invierno.

En la actualidad, el control de la contaminación viral en los alimentos debe enfocarse en la prevención de la contaminación (por ejemplo, medidas preventivas, tratamiento de aguas residuales o manipulación de los alimentos), en lugar de destruir al patógeno mediante el uso de diversos procesos de inactivación, ya que una vez que los productos frescos están contaminados por estos virus, no existen medidas realistas de control de riesgos posteriores a la cosecha, excepto la cocción, la cual no es una opción con los productos frescos listos para el consumo (FAO/OMS 2008; Newell *et al.* 2010).

Debido a que nuestro país hay muy poca información sobre la detección de HuNoV y el uso de indicadores alternativos de contaminación fecal, es esencial que exista una gestión exhaustiva de la inocuidad de los alimentos para que puedan desarrollar sistemas que permitan controlar los virus entéricos patógenos en puntos críticos a lo largo de la cadena de suministro.

Por último, nosotros concluimos que para mejorar la detección y monitoreo microbiológico y aumentar los conocimientos sobre la contribución que tienen los vegetales de hoja verde como vehículos transmisores de virus entéricos, se necesitan métodos sensibles, confiables y estandarizados.

10. CONCLUSIONES

1. El método del protocolo EPA-1602 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos permitió detectar y cuantificar colifagos somáticos presentes en lavados de vegetales verdes como lechuga Iceberg y perejil liso.
2. El perejil fue el vegetal con mayores cuentas de colifagos somáticos.
3. Los colifagos somáticos se detectaron en las muestras de lechuga y perejil con niveles de 0.855 ± 0.700 y 1.285 ± 0.977 log UFP / 100 ml, respectivamente.
4. No se mostraron diferencias significativas en los niveles de contaminación por colifagos somáticos en las muestras de lechuga y perejil.
5. El método molecular qPCR basado en SYBR Green, mostró ser más sensible que el método de PCR convencional para la detección de HuNoV GII.
6. Las muestras de lechuga mostraron mayor número de copias genómicas (log₁₀ de CG de ARN / g de muestra compuesta) de ARN de HuNoV GII siendo éstos de 3.493, en tanto que el perejil fue de 2.114
7. Debido a la falta de correlación entre las copias genómicas y las partículas infecciosas, no se puede estimar el riesgo que representa el consumo de los vegetales con los números de copias genómicas presentes.
8. Si hay diferencias significativas en los niveles de contaminación por HuNoV GII en las muestras de lechuga y perejil.
9. Existe correlación media positiva ($p=0.032$) entre los colifagos somáticos y HuNoV GII con las muestras de lechuga.
10. Existe correlación media negativa ($p=0.027$) entre los colifagos somáticos y HuNoV GII con las muestras de perejil.

11. BIBLIOGRAFÍA

ALPHA. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 Ed. American Public Health Association. Washington

Ahmed SM. Hall AJ. Robinson AE. Verhoef, L., Premkumar P. Parashar UD. Koopmans M. Lopman BA. 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis : a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 14, 725–730.

Baert, L., Uyttendaele, M., Debevere, J., 2008. Evaluation of viral extraction methods on a broad range of ready-to-eat foods with conventional and real-time RTPCR for Norovirus GII detection. *International Journal of Food Microbiology* 123, 101–108.

Basic M. Keubler L M. Buettner M D R N. Achard M. Breves G. Schröder B. Smoczek A. Jörns A. Wedekind D. Zschemisch, N. Günther, C. Neumann D. Lienenklaus S. Weiss S. Hornef, M W. Mähler, M. Bleich, A. 2014. Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis*; 20,431–443.

Bambrick H. Dear K. Woodruff R. Hanigan, I. McMichael A. 2008. The impacts of climate change on three health outcomes: Temperature-related mortality and hospitalizations, salmonellosis and other bacterial gastroenteritis, and population at risk from dengue. *Garnaut climate change review, Australia*, 59 pp.

Barclay L, Park G W, Vega E, Hall A, Parashar U, Vinjé J, Lopman B. 2014. Infection control for norovirus. *Clin. Microbiol. Infect.* 20. 731–40.

Bok K, Green K Y. 2012. Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients 2126–2132.

Boxman, I.L.A., Tilburg, J.J.H.C., te Loeke, N.A.J.M., Vennema, H., de Boer, E., Koopmans, M., 2007. An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Food Protection* 70, 504–508.

Bozkurt H, D'Souza D H, Davidson PM. 2015. Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods. *J. Food Prot.* 78:1597–617.

Butot, S., Putallaz, T., Sánchez, G., 2007. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environment*

Bitton, G. 2005. Microbial indicators of fecal contamination. Report submitted to Florida Stormwater Association.

Bruce Y. Lee, MD, MBA^{1,2,3}, Sarah M. McGlone, MPH^{1,2,3}, Rachel R. Bailey, MPH^{1,2,3}, Zachary S. Wettstein^{1,2,3}, Craig A. Umscheid, MD, MSCE⁴, and Robert R. Muder, MD. 2011. Economic Impact of Outbreaks of Norovirus Infection in Hospitals.

Boehm, A.B., Van De Werfhorst, L.C., Griffith, J.F., Holden, P.A., Jay, J.A., Shanks, O.C., Wang, D., Weisberg, S.B. 2013. Performance of forty-one microbial source tracking methods: A twenty-seven lab evaluation study. *Water Research*, 47(18): 6812-6828.

Byamukama D, Kansiime F, Mach RL, Farnleitner AH. Determination of *Escherichia coli* contamination with chromocult coliform agar showed a high level of discrimination efficiency for differing fecal pollution levels in tropical waters of Kampala, Uganda. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66 (2).

Campos-Pinilla C., M. Cárdenas, & A. Guerrero. 2008. Comportamiento de los indicadores de contaminación fecal en diferente tipo de aguas de la sabana Bogotá (Colombia). *Universitas Sturrgart*. 13:103–108.

Cremon C, De Giorgio R, Barbara G, Glass R I, Parashar U D, Estes M K. 2010. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 362. 557–8.

Daniels, N.A., Bergmire-Sweat, D.A., Schwab, K.J., Hendricks, K.A., Reddy, S., Rowe, S.M., Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Atmar, R.L., Glass, R.I., Mead, P., 2000. A

foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *Journal of Infectious Diseases* 181, 1467–1470.

Dolin, R., Blacklow, N.R., DuPont, H., Buscho, R.F., Wyatt, R.G., Kasel, J.A., Hornick, R., Chanock, R.M., 1972. Biological properties of norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 140, 578–583.

Donaldson E F, Lindesmith, L C, Lobue A D, Baric R S. 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 231–241

Doultree J C, Druce J D, Birch C J, Bowden D S, Marshall J A. 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.* 41, 51–

Dubois, E., Agier, C., Traoré, O., Hennechart, C., Merle, G., Cruciére, C., Laveran, H., 2002. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *Journal of Food Protection* 65, 1962–1969. Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans,

Durán AE, Muniesa M, Méndez X, Valero F, Lucena F, Jofre J. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *Journal of Applied Microbiology.* 2002; 92(2): 338-47. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. 2009. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J Med* 361(1):1776-85.

Guévremont, E., Brassard, J., Houde, A., Simard, C., Trottier, Y.-L., 2006. Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. *Journal of Virological Methods* 134, 130–135.

Gunson RN, Carman WF. Comparison of two real-time PCR methods for diagnosis
Jean, J., D'Souza, D.H., Jayukus, L.-A., 2004. Multiplex nucleic acid sequence-based
amplification for simultaneous detection of several enteric viruses in model ready-to-eat
foods. *Applied and Environment Microbiology* 70, 6603–6610.

Gray JJ, Cunliffe C, Ball J, Graham DY, Desselberger U, Estes MK. Detection of
immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG Norwalk virus-specific antibodies by indirect
enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed Norwalk virus capsid
antigen in adult volunteers challenged with Norwalk virus. *J Clin Microbiol.* 1994;
32:3059–3063. [PubMed: 7883902]

Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus
infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis.* 1994;
170:34–43. [PubMed: 8014518]

Kamimoto M, Nakai Y, Tsuji T, Shimamoto T, Shimamoto T. 2014. Antiviral Effects of
Persimmon Extract on Human Norovirus and Its Surrogate, Bacteriophage MS2. *J. Food
Sci.* 79(5): 941-946.

Karst S M. 2014. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like 1575. *Science.*
1575(2003):1575-1578.

Kim H, Kwak I, Hwang I, Ko G. 2008. Optimization of methods for detecting norovirus
on various fruit. *Journal of Virological Methods* .153. 104–110.

Kim, H.-Y., Kwak, I.-S., Hwang, I.-G., Ko, G.P., 2008. Optimization of methods for
detecting norovirus on various fruit. *Journal of Virological Methods* 153, 104–110.

Koo H L, Ajami N, Atmar R L, DuPont H L. 2010. Noroviruses: The leading cause of
gastroenteritis worldwide. *Discov. Med.* 10.61–70.

Koopmans, M., Duizer, E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem.
International Journal of Food Microbiology 90, 23–41.

Lay, M.K., Atmar, R.L., Guix, S., Bharadwaj, U., He, H., Neill, F.H., Sastry, K.J., Yao, Q., Estes, M.K., 2010. Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans.

Le Guyader, F.S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K.-O., Alsterlund, R., Pommeuy, M., Svensson, L., 2004b. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *International Journal of Food Microbiology* 97, 179–186.

Le Guyader, F.S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommeuy, M., Atmar, R., 2009. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Applied and Environment Microbiology* 75, 618–624.

Le Guyader, F.S., Schultz, A.C., Haugarreau, L., Croci, L., Maunula, L., Duizer, E., Lodder-Verschoor, F., von Bonsdorff, C.-H., Suffredini, E., van der Poel, W.M.M., Reymundo, R., Koopmans, M., 2004. Round-robin comparison of methods for the detection of human enteric viruses in lettuce. *Journal of Food Protection* 67, 2315–2319.

Leclerc H, Edberg S, Pierzo V, Delattre JM. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in ground waters. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88: 5–21.

Lee YD, Kim JK, Park JH. Characteristics of coliphage ECP4 and potential use as a sanitizing agent for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control*. 2013; 34: 255-260.

Lin Y-C, Hipfl E, Lederer I, Allerberger F, Schmid, D. 2015. A norovirus GII.P21 outbreak in a boarding school, Austria 2014. *Int. J. Infect. Dis.* 37. 25–9.

Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommeuy, M., Le Guyader, F.S., 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods* 123, 1–7.

Lopman B, Gastañaduy P, Park GW, Hall A J, Parashar U D, Vinjé J. 2012. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr. Opin. Virol.* 2. 96-102.

Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Hill D, Perry C, Halladay T, et al. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:1827-34.

Lin Y-C, Hipfl E, Lederer I, Allerberger F, Schmid D. 2015. A norovirus GII.P21 outbreak in a boarding school, Austria 2014. *Int. J. Infect. Dis.* 37, 25–29.

Morton V, Jean J, Farber J, Mattison K. Detection of noroviruses in ready-to-eat of norovirus infection in outbreak and community settings. *J Clin Microbiol.* Okafor N. 2011. *Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems.* Springer; 1st Edition. Pp.170.

Sarah M. Bartsch¹, Benjamin A. Lopman², Sachiko Ozawa³, Aron J. Hall², Bruce Y. Lee^{1*}. 2015. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis.

Parashar, U. D., L. Dow, and R. Fankhauser. 1998. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiol. Infect.* 121:615–621.

Park, Y., Cho, Y.-H., Jee, Y., Ko, G., 2008. Immunomagnetic separation combined with real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of norovirus in contaminated food. *Applied and Environment Microbiology* 74, 4226– 4230.

Paruch AM, Mæhlum T. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform Bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal Contamination in the environment. *Ecological Indicators.* 2012; 23: 140– 142

- Patel MM, Widdowson M-A, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 14(8):1224-31
- Payne D C, Vinje, Szilagyi P G, Edwards K M, Staat M A, Weinberg G, Hall C B, Chappell J, Bernstein D I, Curns AT, Wikswo M, Shirley S H, Hall A J, Lopman B, Parashar U D. 2013. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S.
- Repp K K, Hostetler T P, Keene W E. 2013. A norovirus outbreak related to contaminated surfaces. *J. Infect. Dis.* 208. 295–298.
- Rha B, Burrer S, Park S, Trivedi T, Parashar UD, Lopman BA. 2013. Emergency department visit data for rapid detection and monitoring of norovirus activity. United States. *Emerg. Infect. Dis.* 19(8):1214-21
- Robilotti E, Deresinski S, Pinsky B A. 2015. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 28. 134–164. Rutjes, S.A., Lodder-Verschoor, F., van der Poel, W.H.M., van Duynhoven, Y.T.H.P., de Roda Husman, A.M., 2006. Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis. *Journal of Food Protection* 69, 1949–1956.
- Ryu S, You H J, Kim Y W, Lee A, Ko G P, Lee S J, Song MJ. 2015. Inactivation of norovirus and surrogates by natural phytochemicals and bioactive substances. *Mol. Nutr. Food Res.* 59. 65–74. *Pathog. Dis.* 8. 1177–1183.
- Schwab, K.J., de Leon, R., Sobsey, M.D., 1996. Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. *Applied and Environment Microbiology* 62, 2086–2094.
- Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. *Food Microbiology* 28, 52–58.
- Takahashi H, Ohuchi A, Miya S, Izawa Y, Kimura B. 2011. Effect of food residues on norovirus survival on stainless steel surfaces. *PLoS One* 6. 8–11.

Teunis PF, Moe CL, Liu P, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol* 2008;80:1468-76.

Van den Berg H, Lodder W, van der Poel W, Vennema H, de Roda Husman AM. 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res Microbiol* 156:532–540.

Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. 2014. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J Clin Microbiol* 52:147–155.

Vashist S. Bailey D. Putics A. Goodfellow I. 2011. UKPMC Funders Group Model systems for the study of human norovirus *Biology* 4, 353–367.

Verhoef L. Hewitt J. Barclay L.. Ahmed S M. Lake R. Hall A J. Lopman B. Kroneman A. Vennema H. Vinjé J. Koopmans M. 2015. Norovirus genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 592–599.

Vongpunsawad, S. Venkataram Prasad B V. Estes M K. 2013. Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. *J. Virol.* 87, 4818–4825.

Wobus C E . Karst S M. Thackray L B. Chang K-O. Sosnovtsev S V. Belliot G. Belliot G. Krug A. Mackenzie J M. Green K Y. Virgin H W. 2004. Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. *PLoS Biol.* 12, 2076-2084.

Wobus C.E. Thackray L B. Virgin H W. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* 80, 5104–5112.

Zheng D, Ando T, Fankhauser R L, Beard R S, Glass RI, Monroe S S. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346. 312–323.

RESUMEN BIOGRÁFICO

María Fernanda Flores Rodríguez, candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología por la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL

Tesis: DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NOROVIRUS HUMANO DEL GENOGRUPO GII EN MUESTRAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa*) Y PEREJIL (*Petroselinum crispum*) Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE COLIFAGOS SOMÁTICOS.

Campo de estudio: Inocuidad Alimentaria,

Datos personales:

Nacida en Monterrey, Nuevo León, México el 27 de septiembre de 1993, hija de Fernando Flores Esparza y Juana María Rodríguez Salas.

Educación:

Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas con el grado de Licenciado en Ciencia de Alimentos por la Universidad Autónoma de Nuevo León (2014).