



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Doctorado

**OCURRENCIA, DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTABILIDAD DE
NOROVIRUS EN FRUTAS Y HORTALIZAS SELECCIONADAS.**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos.

Presenta:

M. en C. Omar Hernández Hernández

Dirigido por:

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Presidente

Dra. Rocío Morales Rayas
Secretario

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Vocal

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Suplente

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro., Diciembre, 2022

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Omar Hernández Hernández', written in a cursive style.

Omar Hernández Hernández

RESUMEN

El objetivo del presente estudio es determinar el efecto de los carbohidratos HBGA en la estabilidad de norovirus murino en conjunto con el pH, temperatura, fuerza iónica, y presencia de bacterias en frutas y hortalizas. Se diseñó y validó un procedimiento para la detección múltiple de norovirus murino GV (MNV-1), *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) evaluando el efecto de la solución amortiguadora de elución de MNV-1 en la viabilidad bacteriana, el preenriquecimiento simultáneo y la detección simultánea por PCR. La técnica de detección se aplicó a 200 muestras de cilantro, lechuga, fresa y zarzamora y también se cuantificaron las bacterias mesófilas aeróbicas (BMA), enterobacterias (EB) y *E. coli* mediante técnicas de cultivo tradicional. La genotipificación se determinó mediante la herramienta norovirus typing tool secuenciando el ORF2. Se compararon con los genotipos más frecuentes en las bases de datos NoroNet y CalciNet. La estabilidad se evaluó en fresa y lechuga incluyendo la concentración de *E. coli* O157:H7 (5 Log₁₀ UFC/mL), la temperatura (22 y 4 °C), la fuerza iónica (0.25 mM), el pH (3 a 8) y la presencia de N-acetil glucosamina (1% p / v) con una cepa de MNV-1. El medio seleccionado para el preenriquecimiento de bacterias fue agua peptonada tamponada suplementada con vancomicina (8 ppm), novobiocina (0,55 ppm) y verde brillante (0,2 ppm) e incubación a 41.5 ° C / 24 h. Los productos de PCR fueron secuenciados y los números de acceso son: MW768703 (InvA), MW422896 (IpaH), MW768704 (Stx1) y MW768705 (Stx2). La sensibilidad de la técnica de detección fue de 10 a 100 partículas de MNV-1 y 1 a 10 células de cada bacteria patógena. La población de BMA, EB y *E. coli* para todas las matrices alimentarias, varió entre 3.18 a 5.67 y 1.8 a 4.3 Log₁₀ UFC/g y <1.8 a 3 NMP/g, respectivamente. Dos muestras de fresa fueron positivas para norovirus GI.1 (MZ224458) y GI.3 (MZ227012) y una muestra de lechuga para ECEH. La mayor presencia de aminoácidos hidrofílicos y ramificados con anillos aromáticos, y menor proporción con cadena lateral corta y capacidad de afectar la estructura secundaria indicaron un incremento en la estabilidad de los virus en general. MNV-1 fue más estable a pH ácido, temperatura de refrigeración y con la presencia de carbohidratos HBGA. *E. coli* O157:H7 estabilizó a MNV-1 exclusivamente en condiciones básicas.

Palabras clave: norovirus, diversidad genética, estabilidad, frutas y hortalizas.

ABSTRACT

The objective of the present project was to determine the HBGA-like carbohydrates effect on murine norovirus (MNV-1) stability at different pH, temperature, ionic strength, and microbiota levels. A multiple PCR detection technique was designed and validated for the simultaneous detection of (MNV-1), *Salmonella*, *Shigella* and enterohemorrhagic *E. coli* (STEC). MNV-1 elution buffer effect on bacterial viability was evaluated. PCR products were sequenced by Sanger dioxide. 200 samples were analyzed by the multiple PCR detection technique and mesophilic bacteria (BMA), enterobacteriaceae (EB) and *E. coli* concentrations were quantified. The food matrixes were coriander, lettuce, strawberry and blackberry. Genotyping was performed analyzing the ORF2 amplicon sequence with the norovirus typing tool. Comparison analysis with the most frequent strains reported in the NoroNet and CalciNet data base were included. MNV-1 stability was evaluated in strawberry and lettuce including the following factors: temperature (22 y 4 °C), ionic strength (0.25mM), pH (3 and 8), HBGA-like carbohydrates (1%) and STEC (5 Log₁₀ CFU/mL). The simultaneous detection conditions selected were: modified buffered peptone water supplemented with novobiocin (0.55 ppm), vancomycin (8 ppm) and brilliant green (0.2 ppm), and incubation temperature at 41.5 °C for 24 h. PCR products access numbers were MW768703 (InvA), MW422896 (IpaH), MW768704 (Stx1) y MW768705 (Stx2). The technique sensibility was 10-100 MNV-1 particles and 1-10 pathogenic bacterial cells. BMA, EB and *E. coli* populations ranges were 3.18 to 5.67 and 1.8 to 4.3 Log₁₀ CFU/g and <1.8 to 3 MPN/g, respectively. Two strawberry samples were positive for norovirus GI.1 (MZ224458) and GI.3 (MZ227012) and one lettuce sample for STEC. The minor presence of hydrophobic, non-branched and secondary structure disruption aminoacids and a high concentration in aromatic and hydrophilic aminoacids indicates a higher viral stability. MNV-1 was more stable at acid pH, 4 °C temperature and with the presence of HBGA-like carbohydrates. *E. coli* O157:H7 stabilized MNV-1 exclusively at basic conditions.

Key words: norovirus, genotyping, viral stability, fresh produce.

ÍNDICE

	Página
Resumen español	i
Abstract	ii
Índice	iii
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Historia de los norovirus a humanos	3
II.2 Morfología de norovirus a humanos	4
II.3 Epidemiología de norovirus a humanos	6
II.4 Estabilidad de norovirus en frutas y hortalizas	10
II.4.1 Efecto del pH en la estabilidad de los norovirus	10
II.4.2 Efecto de la temperatura y la humedad en la estabilidad de los norovirus	11
II.4.3 Efecto de la fuerza iónica en la estabilidad de los norovirus	12
II.4.4 Efecto de las bacterias, los carbohidratos tipo HBGA y la composición de los aminoácidos de la cápside proteica en la estabilidad de los norovirus	13
II.4.5 Detección y cuantificación de norovirus en frutas y hortalizas	16
II.4.6 Caracterización de norovirus	18
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	22
V.1 General	22
V.2 Específicos	22

VI. METODOLOGÍA	23
VI.1 Materiales	23
VI.1.1 Equipo	23
VI.1.2 Medios de cultivo	23
VI.1.3 Reactivos	23
VI.1.4 Material biológico	24
VI.2 Métodos	26
VI.2.1 Determinación de la ocurrencia de los norovirus en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora, naturalmente contaminados del municipio de Querétaro.	26
VI.2.2 Evaluación de la concentración de grupos indicadores y presencia de bacterias entéricas patógenas en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora y establecer si existe una asociación con la presencia de norovirus.	30
VI.2.2.1 Cuantificación de grupos indicadores en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora.	30
VI.2.2.2 Detección de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> y <i>E. coli</i> enterohemorrágica en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora.	30
VI.2.3 Análisis comparativo del marco de lectura 2 de los norovirus detectados en las muestras de cilantro, fresa, lechuga y zarzamora, con las secuencias reportadas en las bases de datos NoroNet, CalciNet, Norovirus Typing Tool y NCBI.	34
VI.2.4 Determinación mediante un análisis bioinformático comparativo con otras variantes de norovirus y otros virus transmisibles por alimentos el perfil de aminoácidos asociado con una mayor estabilidad.	35
VI.2.5 Evaluación del efecto de la temperatura, pH, concentración de bacterias, la fuerza iónica y la presencia de carbohidratos similares a los HBGA, en la estabilidad de	36

MNV-1 en fresa y lechuga.	
VII.ANALISIS ESTADÍSTICO	38
VIII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
VIII.1 Evaluación de medios de preenriquecimiento para el desarrollo simultáneo de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica, <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora.	39
VIII.1.1 Evaluación de medios de preeriquecimiento para el desarrollo individual de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica, <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> en cultivo puro.	39
VIII.1.2 Evaluación de medios de preenriquecimiento para el desarrollo simultáneo de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> y ECEH en frutas y hortalizas.	43
VIII.2 Diseño, estandarización y validación de iniciadores para la detección múltiple de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica, <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> .	46
VIII.3 Evaluación de la especificidad y sensibilidad de la técnica de detección múltiple de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> y ECEH en frutas y hortalizas.	51
VIII.4 Detección de MNV-1, <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> y ECEH y cuantificación de bacterias mesófilas aerobias, enterobacterias y <i>E. coli</i> en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora.	56
VIII.5 Determinación de la diversidad genética de los norovirus detectados en las muestras de cilantro, fresa, lechuga y zarzamora, y su comparación con los principales genotipos reportados en las bases de datos NoroNet, CalciNet, Norovirus Typing Tool y NCBI.	57
VIII.6 Determinación del perfil de aminoácidos de la cápside proteica de norovirus, virus de la hepatitis A, y parvovirus y establecer si	65

existe alguna asociación con su estabilidad en las frutas y hortalizas.

VIII.7 Evaluación del efecto de la temperatura, fuerza iónica, pH, presencia de carbohidratos similares a los antígenos del grupo histosanguíneo (HBGA) y la microbiota en la estabilidad de MNV-1 en fresa y lechuga.	70
IX.CONCLUSIONES	82
X. BIBLIOGRAFÍA	84

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Reportes de interacción entre bacterias y norovirus en agua y alimentos	17
2	Descripción de las secuencias de los iniciadores y utilizados para la detección del Genotipo I y II de norovirus.	28
3	Concentración de bacterias mesófilas aerobias (BMA), enterobacterias y <i>E. coli</i> y presencia/ausencia de norovirus, <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> y ECEH en cilantro, lechuga, zarzamora y fresa.	57
4	Perfil de aminoácidos de norovirus a humanos aislados en el presente proyecto y recuperados de la base de datos del NCBI.	67
5	Comparativa del perfil de aminoácidos de norovirus GII.4, parvovirus, priones y el virus de la hepatitis A.	69
6	Promedio de la población resistente de MNV-1 a diferentes niveles de pH, temperatura, microbiota, fuerza iónica y presencia de carbohidratos tipo HBGA en refrigeración.	72
7	Promedio de la población resistente de MNV-1 a diferentes niveles de pH, temperatura, microbiota, fuerza iónica y presencia de carbohidratos tipo HBGA a temperatura ambiente.	73
8	Promedio de la población resistente de MNV-1 a diferentes niveles de pH, <i>E. coli</i> O157:H7 y presencia de carbohidratos tipo HBGA en lechuga en refrigeración.	76
9	Promedio de la población resistente de MNV-1 a diferentes niveles de pH, <i>E. coli</i> O157:H7 y presencia de carbohidratos tipo HBGA en lechuga a temperatura ambiente.	76
10	Promedio de la población resistente de MNV-1 a diferentes	77

niveles de pH, *E. coli* O157:H7 y presencia de carbohidratos tipo HBGA en fresa en refrigeración.

- 11 Promedio de la población resistente de MNV-1 a diferentes niveles de pH, *E. coli* O157:H7 y presencia de carbohidratos tipo HBGA en fresa a temperatura ambiente. 77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras		Página
1	Ilustración de la organización del genoma y proteoma de norovirus. En la parte superior (genoma) se muestran los 3 marcos de lectura abierta (ORF) y en la parte inferior (proteoma) las proteínas estructurales (VP1 y VP2) y no estructurales (p48, NTPasa, p22, VPg, Pro, RdRp). Basado en la secuencia del genoma de norovirus GII.4 GenBank: X86557.1.	5
2	Ilustración de la estructura de la proteína VP1 dónde se muestra el grupo N- terminal del dominio en color verde (10 a 49 aminoácidos), el dominio S en amarillo (del aminoácido 50 a 225), el dominio P1 en rojo (del aminoácido 226 a 278 y del 406 a 520), y el dominio P2 en azul (del aminoácido 279 a 405)	6
3	Número de secuencias reportadas por año en el período 2005 – 2016 en la base de datos NoroNet.	7
4	Replicación del virus de Norwalk.	9
5	Árbol filogenético de los norovirus basado en su secuencia completa de la proteína VP1.	19
6	Esquema general para la detección de MNV-1 y norovirus GI y GII por la técnica de RT-qPCR.	29
7	Esquema general para la detección de bacterias entéricas patógenas por la técnica de PCR a partir de cultivo puro e inoculadas en las frutas y hortalizas	33
8	Variabilidad de la población máxima alcanzada de <i>Salmonella</i> modificando la temperatura (35 y 41.5 °C), medio de enriquecimiento (CST y APT) y los agentes selectivos (VB+1, VB-1, V+1, V-1, N+1, N-1) después de 24 horas de incubación.	41

VB: verde brillante, V: vancomicina, N: novobiocina, +1: nivel alto, -1: nivel bajo.

9	Variabilidad de la población máxima alcanzada de <i>Shigella</i> modificando la temperatura (35 y 41.5 °C), medio de enriquecimiento (CST y APT) y los agentes selectivos (VB+1, VB-1, V+1, V-1, N+1, N-1) después de 24 horas de incubación.	41
10	Variabilidad de la población máxima alcanzada de ECEH modificando la temperatura (35 y 41.5 °C), medio de enriquecimiento (CST y APT) y los agentes selectivos (VB+1, VB-1, V+1, V-1, N+1, N-1) después de 24 horas de incubación.	42
11	Población máxima alcanzada de <i>Salmonella</i> y BMA en cilantro (C), lechuga (L), fresa (F) y zarzamora (Z).	45
12	Población máxima alcanzada de <i>Shigella</i> y BMA en cilantro(C), fresa (F), Lechuga (L) y zarzamora (Z).	45
13	Población máxima alcanzada de ECEH (<i>E. coli</i> enterohemorrágica) y BMA en cilantro(C), fresa (F), Lechuga (L) y zarzamora (Z).	46
14	Dendograma de similitud de las secuencias del gen <i>IpaH</i> de <i>Shigella</i> (Clustal Omega).	48
15	Dendograma de similitud de las secuencias del gen <i>Stx1</i> de ECEH (Clustal Omega).	49
16	Dendograma de similitud de las secuencias del gen <i>InvA</i> de <i>Salmonella</i> (Clustal Omega).	49
17	Fragmento del alineamiento de diferentes secuencias del gen <i>InvA</i> de <i>Salmonella</i> .	50
18	Secuencias de iniciadores propuestas por el software Primer3Plus para <i>E. coli</i> enterohemorrágica (A), <i>Salmonella</i> (B) y <i>Shigella</i> (C).	50
19	Amplificación de los iniciadores para <i>Salmonella</i> (Sal), <i>Shigella</i> (Shi) y ECEH (EC) de manera individual y múltiple (Mix). La imagen A contiene 1 µM y la imagen B 0.2 µM. La temperatura de alineamiento fue de 60 °C. El marcador de peso molecular (MPM) es de 100 pb.	51
20	Evaluación de la especificidad de los iniciadores de <i>Shigella</i> para el gene <i>IpaH</i> . Se muestran 10 cepas exclusivas del género <i>Salmonella</i> y 6 de ECEH. Las cepas 10 inclusivas fueron del género <i>Shigella</i> . MPM: 100 pb	52

21	Detección de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> y ECEH en cilantro (C), fresa (F), lechuga (L) y zarzamora (Z). La temperatura de alineamiento fue de 60°C y la concentración de los indicadores de 0.2 µM. El marcador de peso molecular (MPM) es de 100 pb.	53
22	Detección de norovirus (MNV-1), <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> y ECEH en cilantro (3), lechuga (4), zarzamora (5) y fresa (6). La temperatura de alineamiento fue de 60°C y la concentración de los indicadores de 0.2 µM. El marcador de peso molecular (MPM) es de 100 pb.	55
23	Porcentaje de similitud de la cepa 1 de norovirus proveniente de fresa con las secuencias de la base de datos del NCBI.	58
24	Genotipificación de la cepa 1 de norovirus proveniente de fresa mediante la herramienta Norovirus typing tool.	58
25	Porcentaje de similitud de la cepa 2 de norovirus proveniente de fresa con las secuencias de la base de datos del NCBI.	59
26	Genotipificación de la cepa 2 de norovirus proveniente de fresa mediante la herramienta Norovirus typing tool.	59
27	Dendograma de similitud de la cepa GI.1 de norovirus proveniente de fresa con las secuencias de la base de datos del Norovirus typing tool.	61
28	Dendograma de similitud de la cepa GI.3 de norovirus proveniente de fresa con las secuencias de la base de datos del Norovirus typing tool.	62
29	Secuencia FASTA de la proteína VP1 del ORF2 de norovirus GI.1.	63
30	Secuencia FASTA de la proteína VP1 del ORF2 de norovirus GI.3.	64
31	Fragmento de la traducción de la secuencia nucleotídica de los norovirus GI.1 y GI.3 y su alineamiento mediante el software MEGA-X.	67
32	Curva de calibración de MNV-1 por RT-qPCR en la plataforma Rotor Gene de Qiagen utilizando una mezcla SYBR Green Start	72

Jump de Sigma Aldrich.

33	Análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey de los tratamientos evaluados para determinar su efecto en la estabilidad de MNV-1 en un modelo <i>in vitro</i> .	73
34	Gráfico de interacción entre el efecto del pH y la temperatura en la estabilidad de MNV-1 en un modelo <i>in vitro</i> .	74
35	Gráfico de interacción entre el efecto del tipo de tratamiento y la temperatura en la estabilidad de MNV-1 en un modelo <i>in vitro</i> .	74
36	Gráfico de interacción entre el efecto del tipo de tratamiento y el nivel de pH en la estabilidad de MNV-1 en un modelo <i>in vitro</i> .	75
37	Prueba de Tukey de los tratamientos evaluados para determinar su efecto en la estabilidad de MNV-1 en un modelo <i>in vitro</i> . La estructura de los niveles es: temperatura, pH, tratamiento (control, HBGA o <i>E. coli</i> O157:H7), y tiempo en su nivel alto y bajo (24 y 72).	76
38	Prueba de Tukey de los tratamientos evaluados para determinar su efecto en la estabilidad de MNV-1 en lechuga. La estructura de los niveles es: temperatura, pH, tratamiento (control, HBGA o <i>E. coli</i> O157:H7), y tiempo en su nivel alto y bajo (24 y 72).	80
39	Prueba de Tukey de los tratamientos evaluados para determinar su efecto en la estabilidad de MNV-1 en fresa. La estructura de los niveles es: temperatura, pH, tratamiento (control, HBGA o <i>E. coli</i> O157:H7), y tiempo en su nivel alto y bajo (24 y 72).	81

I. INTRODUCCIÓN

Los norovirus destacan como la principal causa de enfermedad por consumo de alimentos en el mundo. Existen 10 genogrupos (GI - GX), pero son el GI y GII los responsables de la mayoría de casos de enfermedad por consumo de alimentos en humanos. El principal reservorio es el hombre y es a través del vómito y la materia fecal que las partículas vírales son expulsadas al ambiente y pueden contaminar diferentes materiales y los alimentos. Entre los principales alimentos implicados en brotes de enfermedad por norovirus GI y GII destacan las frutas y hortalizas. Particularmente, frutas como la zarzamora y la fresa, y hortalizas como la lechuga y el cilantro. Por lo tanto, la pregunta general que surge es, ¿qué características poseen las frutas y hortalizas que las convierte en un vehículo tan propicio para los norovirus GI y GII?

Las frutas y hortalizas suelen almacenarse a temperatura ambiente y de refrigeración. Ambas condiciones de temperatura no afectan la integridad de norovirus, sin embargo, es la temperatura de refrigeración la que se ha reportado que genera mayor estabilidad en las partículas virales. El pH presente en las frutas y hortalizas tampoco es capaz de generar un daño considerable en la estabilidad de norovirus. Siendo el pH ácido, la condición que mejor promueve la persistencia de los norovirus en los alimentos. La presencia de solutos inorgánicos en la superficie de las frutas y hortalizas no se ha reportado como un factor de relevancia asociado a la estabilidad de norovirus. Por otra parte, la participación de las bacterias presentes en la superficie de las frutas y hortalizas en la estabilidad de norovirus no se encuentra totalmente esclarecida. Por una parte se observó que norovirus incrementó su estabilidad en espinaca al incrementar la concentración de las bacterias mesófilas aerobias (BMA), pero este comportamiento no fue replicable en lechuga. Adicionalmente, norovirus murino genogrupo GV fue estabilizado de mejor forma por la presencia de bacterias Gram + que por bacterias Gram -. El peptidoglicano que se encuentra en mayor

proporción en bacterias Gram + es una estructura formada por N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. La N-acetilglucosamina se ha reportado como estructura capaz de interactuar químicamente por fuerzas de Van der Waals con la cápside proteica de los norovirus y también, las frutas y hortalizas contienen N-acetil glucosamina en su superficie. Por lo que existe la posibilidad de que dicha interacción química contribuya a la adhesión y persistencia de los norovirus en las frutas y hortalizas. En un estudio se observó que la N-acetilglucosamina incrementó la estabilidad de poliovirus al exponerse a un proceso de desinfección con cloro al 0.1%. Por lo que en el presente proyecto tenemos la hipótesis de que la presencia y disponibilidad de N-acetilglucosamina es uno de los factores más importantes en la estabilidad de los norovirus. Adicionalmente, se tiene como objetivo diseñar un modelo experimental que incorpore el efecto de cada uno de los factores ecológicos previamente mencionados en la estabilidad de norovirus en las frutas y hortalizas. Lo anterior con el propósito de aproximarnos lo más posible a lo que ocurriría en un ambiente real.

Finalmente, los norovirus muestran una enorme capacidad para generar cambios en su material genético lo que puede conducir a variaciones en su estructura y estabilidad. Existe muy poca información referente al perfil de aminoácidos presentes en la cápside y su relación con la estabilidad de norovirus. Por lo anterior, el presente proyecto tiene como objetivo determinar la presencia de los norovirus en frutas y hortalizas del municipio de Querétaro y estudiar como afecta la diversidad genética de los norovirus, la presencia de bacterias, la temperatura, el pH, la N-acetilglucosamina y la fuerza iónica, en la estabilidad de los norovirus en las frutas y hortalizas. Esta es una información necesaria para diseñar estrategias de control enfocadas en disminuir su estabilidad y con ello prevenir la aparición de brotes de enfermedad por su consumo. Un impacto muy importante en el presente proyecto es la colaboración con SENASICA donde la metodología para la detección de los norovirus será utilizada como base para definir un protocolo para el análisis de frutas y hortalizas en México.

II. ANTECEDENTES

II.1 Historia de los norovirus a humanos

El primer caso registrado por norovirus fue descrito por el Dr. J. Zahorsky en 1929, donde se mencionó que el agente etiológico causaba vómito y diarrea acuosa principalmente en los meses de Noviembre a Mayo. Lo denominó “winter vomiting sickness”, que significa enfermedad de vómito de invierno. Otro evento ocurrió en el año de 1963 en Gran Bretaña, se registraron 142 casos a lo largo de 5 días y los intentos por identificar el origen etiológico fueron infructuosos. Las muestras fecales fueron congeladas a -70 °C y siete años y medio después fueron analizadas en el laboratorio de salud pública de Bristol, Inglaterra. Se llevó a cabo un experimento donde se administraba a los voluntarios un vaso de bicarbonato sódico diluido en agua y enseguida otro vaso con zumo de naranja al que se le había añadido la emulsión fecal contaminada con el agente W, nombre que recibió en aquel entonces por la temporal imposibilidad de identificarlo. Los resultados del estudio determinaron el mantenimiento de la capacidad infectiva del agente W, y se afirmó que era una partícula estable al calor con un tamaño menor a 50 nm (SEE, 2007). En 1968 se presentó otro incidente en Norwalk, Ohio, donde 116 personas entre niños y adultos de una escuela primaria resultaron afectadas. La sintomatología descrita incluía un cuadro de náusea, diarrea y vómito, con una duración aproximada de 24 horas (Adler y Zickl, 1969). Sin embargo, en ese momento no fue posible realizar la identificación del agente etiológico y las muestras fecales se almacenaron para su posterior evaluación. En 1972 un equipo de investigadores dirigidos por el Dr. Albert Kapikian administró un filtrado de heces procedente de las muestras almacenadas del brote de 1968 a un grupo de voluntarios sanos. El suero de la fase convaleciente del grupo de voluntarios se mezcló con el filtrado de las heces generando una reacción anticuerpo-antígeno que se observó mediante un microscopio electrónico. A partir de este ensayo se lograron observar pequeñas partículas esféricas de 27 nm a las que describió

como virus pequeños redondos estructurados. Posteriormente se asignó la denominación de virus de Norwalk por la localidad donde fue identificado (Kapikian, *et al.*, 1972). En los siguientes años se describieron otros virus con características similares que se denominaron virus de Hawai, Montgomery County, Tawton y Snow Mountain. Esta denominación se realizó en función de la región geográfica donde se presentó el brote. Debido a la similitud que mostraron con el virus de Norwalk, se les llamó Norwalk-like viruses (Thornhill *et al.*, 1977). Al mismo tiempo surgieron diversos nombres populares para el virus de Norwalk, por ejemplo, virus pequeños redondos estructurados, Norwalk-like virus, enfermedad de vómito de invierno, virus de las montañas de nieve, gripe estomacal, entre otros. En el año 2002, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus aprobó el nombre de norovirus para el virus de Norwalk (SEE, 2007).

II.2 Morfología de norovirus a humanos

Los norovirus son pequeñas partículas de aproximadamente 25 - 38 nm de diámetro que pertenecen a la familia *Caliciviridae*. Estructuralmente se encuentran cubiertos por una cápside de proteínas de forma icosaédrica (20 lados), la cual contiene depresiones en forma de copa o cálices, de ahí el nombre de calicivirus (Prasad *et al.*, 1999; CDC, 2022). No poseen envoltura lipídica. En el interior de la cápside proteica, se encuentra el material genético del virus, que corresponde a una cadena de ácido ribonucleico (ARN) en sentido positivo de aproximadamente 7.7 kb (Jiang *et al.*, 1993). En el extremo 5' se encuentra una proteína denominada VPg que está ligada covalentemente al genoma, mientras que el extremo 3' está poliadenilado, lo que confiere estabilidad a la cadena ARN. Después de la proteína VPg en el sentido 5' a 3' aparecen 3 marcos de lectura abierta (ORF1, ORF2 y ORF3) (Figura 1). El ORF1 codifica para una poliproteína no estructural que es subdividida por la proteasa viral en 6 proteínas: p48, una nucleósido trifosfatasa (NTPase), p22, VPg, Pro (proteasa) y la polimerasa dependiente de ARN (RdRp). La función de las 6 proteínas virales aún se

encuentra bajo estudio pero existen propuestas al respecto. Para p48 es la formación del complejo de replicación, la NTPase tiene función de helicasa, p22 formación del complejo de replicación, Vpg participa en la traducción y replicación, Pro funciona como proteasa y RdRp participa en la replicación (Thorne y Goodfellow, 2014; Moore *et al.*, 2015). ORF2 codifica para la proteína de la cápside VP1, que es la principal proteína estructural de norovirus. ORF3 codifica para VP2, una proteína estructural cuya función se asocia con la regulación de la expresión de VP1 y su estabilización en la estructura del virus (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2015). La cápside está compuesta por 90 dímeros de la proteína VP1 y 1 o 2 copias de la proteína VP2 (Prasad *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2015). Estructuralmente la proteína VP1 se divide en dos dominios. El dominio S o Shell que forma el núcleo y el dominio P o protuberante que se extiende fuera del núcleo. El dominio P se subdivide en los subdominios P1-1, P2 y P1-2 (Prasad *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2015). El subdominio P2 es una región hipervariable y es la sección más expuesta de la partícula viral. Está bien posicionado para interactuar con posibles anticuerpos neutralizantes y ligandos de antígenos del grupo histosanguíneo (HBGA) (Lochridge *et al.*, 2005). En conjunto la proteína VP1 varía entre 530 y 555 aminoácidos (Figura 2) (Jiang *et al.*, 1992). La proteína VP2 está compuesta por 208 a 268 aminoácidos y muestra una elevada variabilidad entre cepas de norovirus (Seah *et al.*, 1999).

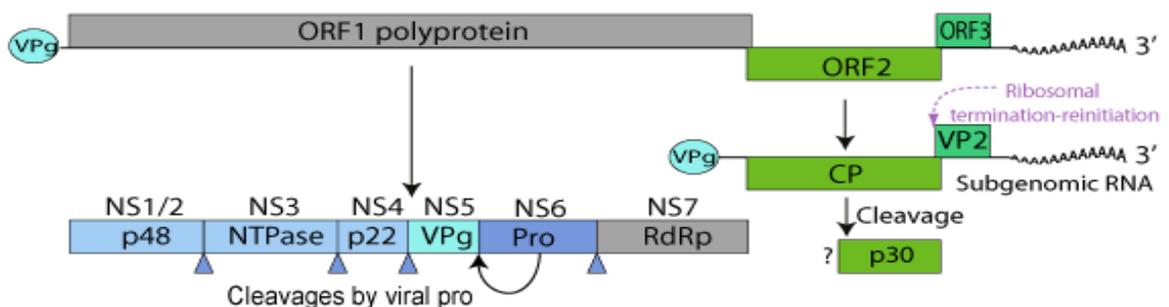


Figura 1. Ilustración de la organización del genoma y proteoma de norovirus. En la parte superior (genoma) se muestran los 3 marcos de lectura abierta (ORF) y en la parte inferior (proteoma) las proteínas estructurales (VP1 y VP2) y no estructurales (p48, NTPasa, p22, VPg, Pro, RdRp). Basado en la secuencia del genoma de norovirus GII.4 GenBank: X86557.1 (Liu *et al.*, 1995).

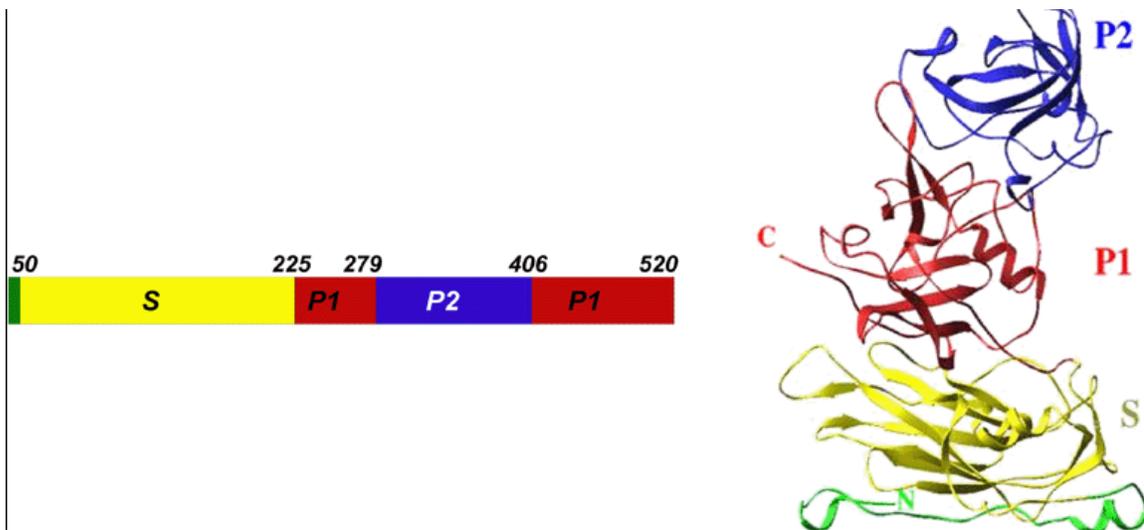


Figura 2. Ilustración de la estructura de la proteína VP1 dónde se muestra el grupo N- terminal del dominio en color verde (10 a 49 aminoácidos), el dominio S en amarillo (del aminoácido 50 a 225), el dominio P1 en rojo (del aminoácido 226 a 278 y del 406 a 520), y el dominio P2 en azul (del aminoácido 279 a 405) (Liu *et al.*, 1995).

II.3 Epidemiología de norovirus a humanos

A nivel mundial los norovirus generan 685 millones de casos de enfermedad por consumo de alimentos cada año (CDC, 2021). En Estados Unidos ocupan el 58% del total de casos que se presentan cada año (CalciNet, 2017). En el Norte de Inglaterra se observó que norovirus fue el responsable del 64% de los brotes por consumo de alimentos en casas de retiro para personas de la tercera edad (Inns *et al.*, 2020). En México se desconoce el número de casos de enfermedad por consumo de alimentos que producen los norovirus cada año, principalmente por la ausencia de aplicación de pruebas de detección de manera rutinaria. Los genogrupos GI, GII y GIV son los principales implicados en brotes por consumo de alimentos. Los genogrupos GVIII y GIX también generan casos de enfermedad en humanos pero son muy poco frecuentes. Los genogrupos GIII, GV, GVI, GVII y GX se han descrito en animales (CDC, 2022; Moore y Jaykus, 2018). Los genogrupos varían por más del 60% de las bases en su secuencia nucleotídica. A su vez cada genogrupo se subdivide en genotipos, que difieren entre ellos en

aproximadamente 40% de las bases nucleotídicas (Zheng *et al.*, 2006). Otros autores mencionan que los genotipos se encuentran definidos por tener al menos un 80% de identidad de los aminoácidos sobre la secuencia total de la cápside (Ando *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2015). El genogrupo GII genotipo 4 es el responsable del 70 - 80% de los casos de enfermedad por consumo de alimentos en el mundo (Bae *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2015; NoroNet, 2017). Otros genotipos frecuentes en el mundo son el GII.1, GII.2, GII.3, GII.5, GII.6, GII.7, GII.8, GII.10, GII.12, GII.13, GII.14, GII.15 y GII.25. Los genotipos GII.P17 y GII.P16.GII.P2 se han vuelto predominantes particularmente en algunas partes de Asia y Alemania respectivamente. (Bae *et al.*, 2011; De Graaf *et al.*, 2015; Niendorf *et al.*, 2017; Moore y Jaykus, 2018). El genogrupo GI (GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GI.5, GI.6, GI.7 y GI.9) también es responsable de casos de enfermedad por consumo de alimentos pero en una proporción mucho menor al genogrupo GII (Figura 3) (Calcinet 2017; NoroNet 2017).

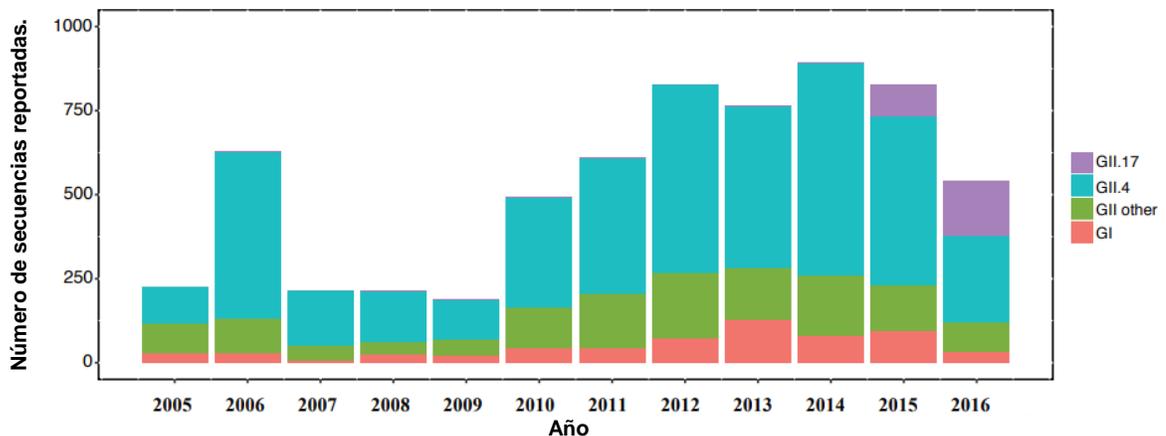


Figura 3. Número de secuencias reportadas por año en el período 2005 – 2016 en la base de datos NoroNet (NoroNet, 2017).

La variación estacional advierte una mayor incidencia en los meses de enero a junio y octubre a diciembre en Europa. De enero a febrero y mayo a diciembre en Africa. Todo el año en Asia, principalmente en los meses de septiembre a febrero. En Australia principalmente en los meses de enero y febrero

y septiembre a diciembre (NoroNet, 2017). La incidencia es por tanto más frecuente en los meses de frío.

El principal reservorio de los norovirus a humanos es el hombre y es a través del vomito y la materia fecal que puede contaminar diversos materiales. La transmisión puede ser persona a persona, y por el consumo de agua y alimentos contaminados (CDC, 2022). Los individuos más susceptibles son personas mayores, niños y personas con problemas en su sistema inmune. Los principales sitios implicados suelen ser casas de retiro para ancianos, guarderías, hospitales y escuelas (Bernard *et al.*, 2014; De Graaf *et al.*, 2015; Hofman *et al.*, 2020; Inns *et al.*, 2020; CDC, 2022). Entre los principales alimentos implicados en brotes por norovirus en el período de 1981 al 2020 se encuentran los mariscos, las ostras, las frutas, los vegetales y las hortalizas (Hofman *et al.*, 2020; CDC, 2021). Existe una particularidad en estas matrices alimentarias que permite a los norovirus persistir el tiempo suficiente para llegar al consumidor. Cuando los norovirus ingresan por el tracto digestivo, típicamente producen diarrea y malestar general autolimitado. Sin embargo, en algunos casos se requiere hospitalización o incluso pueden producir la muerte. El mecanismo para enfermar consiste en la interacción del virus con la superficie de las células del intestino, particularmente de los antígenos HBGA (Histo blood group of antigens ó antígenos del grupo histo sanguíneo). Posteriormente ingresa al interior de la célula por endocitosis. En el citoplasma el ARN genómico del norovirus puede actuar como ARNm y sintetizar las proteínas estructurales y no estructurales utilizando la maquinaria de traducción de la célula (Figura 4). Posteriormente se libera generando una lisis en la célula (ciclo lítico) (Green *et al.*, 2020; Thorne y Goodfellow, 2014). La dosis mínima infectante es de 10 a 100 partículas víricas, lo que implica que incluso la más mínima contaminación en los alimentos puede implicar un riesgo a la salud del consumidor (Bidawid *et al.*, 2004; FDA, 2018; CDC, 2022). Por su elevada capacidad de persistir en el ambiente, la facilidad con la que se transfiere persona-persona y la elevada incidencia en el mundo, se ha catalogado como el patógeno casi perfecto

(USDA, 2016). Cada 2 a 4 años surgen nuevas cepas en el mundo, esto debido a su elevado índice de mutaciones en el genoma. (Morales-Rayas *et al.*, 2009; Stals *et al.*, 2011; FDA, 2018). Para ilustrar su alarmante capacidad para generar brotes por consumo de alimentos, en el año 2011 en Alemania se presentó un brote por consumo de fresa donde 11,000 personas fueron afectadas (Made *et al.*, 2013; CDC, 2022).

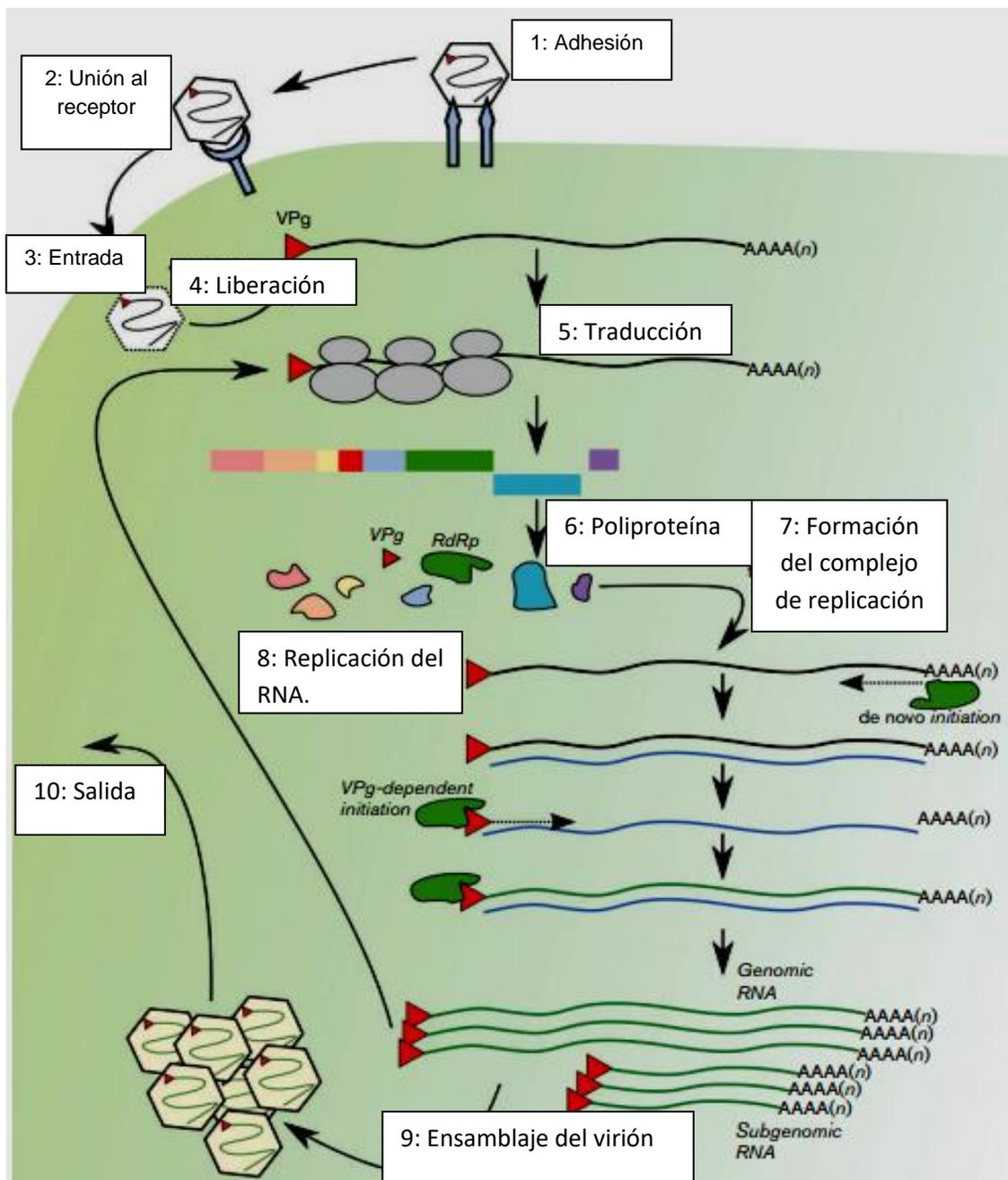


Figura 4. Replicación de los norovirus (Thorne y Goodfellow, 2014).

II.4 Estabilidad de norovirus en frutas y hortalizas

Los norovirus al no poseer una capa lipídica son más resistentes que los virus envueltos. Suelen ser más estables que las bacterias vegetativas a diferentes condiciones, por ejemplo: tratamientos térmicos, procesos de desinfección, sequedad, congelación, radiaciones, entre otros (Ahmed *et al.*, 2020; Bozkurt *et al.*, 2015). Aunque no se conoce con exactitud todas las características que promueven la estabilidad de los norovirus en superficies vivas e inertes, se ha observado que la ausencia de envoltura lipídica y menor tamaño de la partícula viral son características de los virus más resistentes (Ahmed *et al.*, 2020; Samandoulgou, 2015).

II.4.1 Efecto del pH en la estabilidad de los norovirus

El principal reservorio de los norovirus es el hombre, y es a través de la materia fecal (pH = 8) y el vómito (pH = 3) que se liberan al ambiente y pueden contaminar los alimentos. Al liberarse al ambiente, inmersos en cualquiera de estas dos mezclas heterogéneas, los norovirus han desarrollado mecanismos de adaptación a un amplio rango de pH. En un estudio realizado con norovirus murino GV (MNV-1), las partículas resistieron la exposición a un rango de pH = 2 - 10 durante 2 h con reducciones menores a 1 Log₁₀, aunque la mayor estabilidad se observó a niveles de pH ácido. Cabe señalar que el experimento fue realizado en una suspensión solvente - norovirus, sin la presencia de ningún sustrato adicional que pudiera generar algún tipo de protección a las partículas virales. Por lo tanto, se esperaría una menor reducción de MNV-1 en un alimento que pueda favorecer su estabilidad (Almand *et al.*, 2019; Pogan *et al.*, 2018). Los norovirus al poseer una cápside proteica pueden adquirir o donar iones hidrógeno (H⁺) en función del ambiente en el que se encuentren. En un ambiente ácido el exceso de iones hidrógeno polarizará la cápside proteica con cargas positivas, permitiéndole interactuar con compuestos aniónicos que pueden encontrarse en la superficie de

las bacterias y algunos alimentos. Y en un ambiente básico la cápside liberará iones hidrógeno, adquiriendo entonces una carga aniónica en su superficie, lo que contribuirá a la interacción con ambientes cargados positivamente (Almand *et al.*, 2019; Snowden *et al.*, 2020). También se ha reportado que al modificar el pH del medio en el que se encuentran los norovirus, es posible equilibrar la concentración de las cargas positivas y negativas en la superficie de la cápside proteica y por tanto inducir la neutralización de las cargas. Al no poseer carga eléctrica definida se puede reducir la capacidad de adhesión de los norovirus a las diferentes superficies, debido a que no podrá generar interacciones intermoleculares (Almand *et al.*, 2019; Vega *et al.*, 2005). Las mismas fuerzas electroestáticas son las responsables de generar la interacción entre los norovirus y los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en las superficies de los alimentos y los microorganismos (Almand *et al.*, 2019; Moore *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2010). Sin embargo, el efecto de estos compuestos en la estabilidad de los norovirus no se encuentra totalmente esclarecido.

II.4.2 Efecto de la temperatura y la humedad en la estabilidad de los norovirus

Los norovirus poseen una resistencia al calor ligeramente mayor que las bacterias mesófilas aerobias (BMA). Se ha determinado que el valor D para el MNV-1 (GV) es de 25 min a 60 °C y 5.17 min a 80 °C en medio celular. Es importante mencionar que las cepas de norovirus a humanos (GI y GII) pueden mostrar mayor termorresistencia que la cepa de MNV-1 que es un subrogado de norovirus. En ostras se observó un valor D de 2.64 min a 60 °C y 0.18 min a 72 °C (Bozkurt *et al.*, 2015). En otra evaluación, MNV-1 se depositó en una superficie de acero inoxidable que se mantuvo en una solución húmeda de mantenimiento a 4°C durante 7 días. Al final de la incubación MNV-1 disminuyó 1 Log₁₀. Al replicar el experimento bajo las mismas condiciones pero en un ambiente seco, MNV-1 disminuyó 2 Log₁₀. Por lo tanto, la humedad afectó la estabilidad de MNV-1 independientemente de la temperatura de refrigeración. Al incrementar la

temperatura a 22 °C manteniendo la superficie de acero inoxidable en una condición húmeda, la disminución también fue de 1 Log₁₀. Por lo que la humedad ejerce un efecto protector en la estabilidad de los norovirus observándose la misma disminución a 4 y 22 °C. Y finalmente al eliminar el agua a 22 °C la disminución fue de 5 Log₁₀ (Mariita *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2015). La inactivación se incrementa notablemente en la ausencia de humedad y al incrementar la temperatura hasta 22°C. Los norovirus no utilizan el agua para procesos metabólicos porque carecen de maquinaria para tal finalidad, pero las moléculas de agua contribuyen a estabilizar la estructura proteica externa mediante interacciones electroestáticas, que en un ambiente seco no se encontrarían en la misma proporción (Snowden *et al.*, 2020; Almand *et al.*, 2019).

Finalmente, los norovirus son muy estables a temperaturas de congelación. MNV-1 no perdió su integridad cuando fue almacenado a -80 °C por 120 días (Samandougou *et al.*, 2015 Richards *et al.*, 2012). A diferencia de los parásitos y las bacterias, los norovirus se encuentran muy adaptados a las temperaturas de congelación. Químicamente, la estructura de la cápside debe compactarse y aumentar su estabilidad en los enlaces internos y las interacciones electroestáticas. Un fenómeno similar se presenta en el agua que al bajar a 0 °C, alcanza 100% de puentes de hidrógeno (Snowden *et al.*, 2020; Almand *et al.*, 2019).

II.4.3 Efecto de la fuerza iónica en la estabilidad de los norovirus

La fuerza iónica suele ser representada por las cargas eléctricas presentes en un ambiente debido a la presencia de iones disueltos. Los iones pueden ser positivos como el sodio (Na⁺) y negativos como el cloro (Cl⁻). Estos iones al interactuar con la cápside proteica son capaces de estabilizarla mediante interacciones electroestáticas. Cuando la presencia de iones disueltos es muy grande se puede presentar el fenómeno opuesto que es la pérdida de la

estabilidad (Snowden *et al.*, 2020; Samandougou *et al.*, 2015). Lo mismo ocurre con las bacterias, cuando la concentración de iones presentes se incrementa mucho, las bacterias pueden inactivarse por el elevado diferencial de carga entre su interior y el ambiente externo (Snowden *et al.*, 2020; Samandougou *et al.*, 2015). Para los norovirus la mayor estabilidad se ha observado sin la presencia de solutos iónicos, y con la presencia de solutos iónicos cuando la concentración es de 0.25 mM que es un valor que se puede encontrar en algunas frutas y hortalizas (Samandougou *et al.*, 2015; CDC, 2022).

II.4.4 Efecto de las bacterias, los carbohidratos tipo HBGA y la composición de los aminoácidos de la cápside proteica en la estabilidad de los norovirus.

Se observó que los norovirus incrementaron su estabilidad en espinaca al incrementar la concentración de BMA. Sin embargo, este comportamiento no fue replicable en lechuga (Esseili *et al.*, 2016; Almand *et al.*, 2019). Paralelamente, se investigaron los compuestos responsables de la adhesión de los norovirus a la lechuga. Se sabe, que las hortalizas pueden contener hasta un 90% de carbohidratos. Y los norovirus poseen receptores en sus partes externas que les permiten unirse a carbohidratos presentes en la pared intestinal de los seres humanos. Por lo anterior, se procedió a extraer el material de la pared celular de las hojas de lechuga. El procedimiento general consistió en la desinfección de las hojas de lechuga con 1000ppm de hipoclorito de sodio por 10 min, posteriormente se enjuagaron con agua y se dejaron secar. Las hojas fueron congeladas con nitrógeno líquido y tratadas con etanol, metanol y cloroformo. El filtrado final se trató con acetona, se dejó secar por aproximadamente 12h, y se almacenó a 4°C para realizar los tratamientos. El primer tratamiento consistió en calentar el extracto a 100°C por 5 min con la finalidad de generar un daño en la estructura de las proteínas presentes. Se añadieron partículas sintéticas tipo norovirus GII.4 sintetizadas en un sistema de expresión de proteínas VP1 y VP2 de Baculovirus. La variable respuesta fue el porcentaje de adherencia de los norovirus sintéticos al

extracto de las hojas de lechuga previamente fijado a la superficie de una placa. La medición se realizó por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para los norovirus sintéticos, que fueron obtenidos a partir del suero de cerdos de Guinea. Se observó casi un 100% de adherencia de los norovirus sintéticos al extracto de las hojas. Por lo que se concluyó que otros compuestos diferentes a las proteínas, eran los responsables de la adherencia de los norovirus sintéticos. Por tal motivo, se trataron los extractos con peryodato de sodio con la finalidad de oxidar a los carbohidratos presentes y se utilizó un control sin tratar. El resultado obtenido fue que los extractos sometidos al procedimiento de oxidación no permitieron la adherencia de las partículas virales pero el extracto sin tratar permitió casi el 100% de adherencia. Se concluyó que los cabohidratos participaron activamente en la adherencia de los norovirus sintéticos. Sin embargo, se desconocían los tipos de carbohidratos implicados. Para caracterizarlos, utilizaron lectinas comerciales capaces de unirse a N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina, ácido siálico, fucosas, manosas y galactosas que están presentes en los extractos de hoja de lechuga. Se bloquearon los sitios de unión y se añadieron los norovirus sintéticos, observando una reducción en la unión superficial hasta en un 50%. Finalmente, se concluyó que los carbohidratos evaluados fueron los principales reponsables de la adhesión de los norovirus a las hojas de lechuga (Esseili *et al.*, 2012). Desde otro ángulo, se evaluó el efecto de algunos carbohidratos en la estabilidad de Poliovirus a diferentes factores de estrés. Se determinó que la celulosa, peptidoglicano, quitina, y N-acetil glucosamina incrementaron la resistencia a un proceso de desinfección con cloro a 100ppm (Robinson, *et al.*, 2014). Por lo anterior, la pregunta que surgió fue, ¿cuál es el papel de los carbohidratos tipo HBGA en la estabilidad de norovirus?, y también, ¿cuál es el efecto combinando de los carbohidratos tipo HBGA, y otros factores previamente mencionados, como la temperatura, pH, fuerza iónica y concentración de bacterias en la estabilidad de norovirus? Por otra parte, el efecto de la composición de los aminoácidos de la cápside proteica en la estabilidad de los norovirus no ha sido estudiado. Se sabe, que la estabilidad es conferida

mediante las interacciones superficiales entre los aminoácidos de los norovirus y los compuestos presentes en la superficie del alimento. Se ha observado un incremento en la estabilidad de los norovirus en ambientes enriquecidos con lipopolisacáridos y carbohidratos, generando un cambio conformacional en la cápside proteica que previene la generación de daño irreversible en la partícula vírica (Muller-Hermes *et al.*, 2020; Moore y Jaykus, 2018). Adicionalmente, los norovirus presentan una condición de hipervariabilidad en su material genético, que es causada por la baja fidelidad de la RdRp durante la replicación, la recombinación genética y el reordenamiento de los segmentos del genoma. Esta característica de hipervariabilidad genética se presenta con mayor frecuencia en virus que poseen la capacidad de replicarse de manera más rápida, y se traduce en cambios en ciertas secciones específicas de la cápside proteica (Muller-Hermes *et al.*, 2020; Regoes, *et al.*, 2013). Este fenómeno se ha observado en cepas de norovirus a humanos presentes en pacientes enfermos, donde la mayor variabilidad se presentó en la región VP1 de la cápside proteica (Nilsson *et al.*, 2003; Beek *et al.*, 2018). Dichos mecanismos les permiten librar el ataque de los anticuerpos presentes en el cuerpo y generar nuevos brotes de enfermedad. La cepa GII.4 exhibe mayor variabilidad en comparación con otras cepas de menor prevalencia, lo que sugiere que la mayor diversidad en su material genético resulta en una mayor capacidad para persistir en nuevos entornos principalmente por su capacidad para generar nuevos procesos infecciosos (Nilsson *et al.*, 2003; Beek *et al.*, 2018). Los estados conformacionales que puede adoptar la cápside proteica de los norovirus se definen como comprimidos y expandidos. Esta flexibilidad se asocia directamente con la composición de aminoácidos de la cápside viral (hidrofóbicos, hidrofílicos, de cadena ramificada, aromáticos o de cadena lateral corta), específicamente en sitios adaptativos (Hong y Smith, 2019). Para los norovirus GI y GII el perfil de aminoácidos, los cambios que experimentan en el tiempo y su efecto en la estabilidad en los alimentos no se han caracterizado profundamente. Por esta razón, es necesario comprender la tendencia evolutiva

de los norovirus mediante el estudio de las mutaciones que ocurren en sitios adaptativos de la cápside proteica.

II.4.5 Detección y cuantificación de norovirus en frutas y hortalizas

En lo que respecta a los norovirus, en México no se cuenta con una normatividad vigente para realizar su detección en alimentos (COFEPRIS, 2022). Existen empresas internacionales que ofrecen protocolos normalizados para a detección individual de los norovirus GI y GII en los alimentos. La técnica más utilizada es la de RT-qPCR (transcripción reversa – reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) que permite diferenciar entre los genotipos que se han reportado como más frecuentes en el mundo (Biomerieux, 2018). Se requieren etapas de elusión y concentración que son muy laboriosas y costosas (FDA, 2018; NoroCORE, 2018). Los eluyentes más comunes son glicina, amortiguador de fosfatos adicionado de glicina o triptosa, ó glicina mezclada con extracto de carne y pectinasa. Para la etapa de concentración se utiliza polietilenglicol, ultracentrifugación, filtros iónicos, partículas magnéticas, ultrafiltración (D'souza *et al.*, 2006; Morales-Rayas *et al.*, 2009; FDA, 2018; Hernández *et al.*, 2022). Más recientemente se ha propuesto la utilización de aptámeros que son fragmentos de cadenas simples de 70 a 100 nucleótidos que tienen zonas de elevada afinidad a la cápside de los norovirus y permiten recuperar hasta 10-100 copias de ARN viral (Escudero-Abarca *et al.*, 2014; NoroCORE, 2018). La técnica de RT-qPCR además tiene la particularidad que permite cuantificar la concentración de norovirus presentes en la muestra. Es la estrategia más común en ensayos de estabilidad en los alimentos por norovirus. En un estudio se cuantificó mediante RT-qPCR la persistencia de norovirus murino hasta por 50 días a 22 °C en semillas de germinado de alfalfa durante su almacenamiento y germinación, partiendo de una concentración inicial fue de 6.46 Log₁₀ UFP/g (Wang *et al.*, 2013). También, puede adaptarse para detecciones múltiples de norovirus y otros microorganismos patógenos. En el 2011 se detectó mediante la técnica de RT-

qPCR un incremento en el número de casos de norovirus durante un brote por *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) O104:H4 (Bernard *et al.*, 2014). Como ya sea mencionado, los individuos que han sido más susceptibles en brotes suelen ser personas mayores (Inns *et al.*, 2020) y personal de hospitales y servicio comunitario (Hofman *et al.*, 2020). Y la ocurrencia simultánea con otros microorganismos patógenos es probable, principalmente si comparten el mismo vehículo de transmisión que puede ser el vómito o la materia fecal. Sin embargo, para el caso de los norovirus no se encuentra bien determinado si existe alguna asociación con bacterias de relevancia sanitaria como las BMA, enterobacterias y las bacterias entéricas patógenas (*Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* enterohemorrágica). *Salmonella* es el segundo patógeno más frecuente en las frutas y hortalizas (Cardamone *et al.*, 2016; CDC, 2022). Las bacterias tanto Gram + como Gram – poseen carbohidratos en sus partes externas que permiten la interacción superficial con norovirus (Cuadro 1) (Ethelberg *et al.*, 2010; Esseili *et al.*, 2016; Moore y Jaykus, 2018). Las bacterias Gram + promueven de mejor forma la estabilidad de norovirus principalmente por el mayor contenido de peptidoglicano (Budicini *et al.*, 2022).

Cuadro 1. Reportes de interacción entre bacterias y norovirus en agua y alimentos (Moore y Jaykus, 2018).

Virus	Bacteria	Interacción
MNV-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	La infección de las células B por parte de los norovirus es asistida por las bacterias.
MNV-1	2 <i>E. coli</i> y 1 <i>E. coli</i> deficiente en polisacáridos.	Incremento en la termorresistencia del norovirus (2 <i>E. coli</i>) comparada con la <i>E. coli</i> deficiente en lipopolisacáridos.
Norovirus GII.4	BMA en lechuga y espinaca.	A mayor concentración de bacterias mayor sobrevivencia.

En Dinamarca, 11 brotes fueron causados por varios genotipos de norovirus y *E. coli* enterotoxigénica (Ethelberg *et al.*, 2010). En los Estados Unidos en el año 2016, se determinó que el 77% de los brotes fueron causados por etiología individual, el 2% por etiología múltiple y el 21% por causas desconocidas (CDC, 2016). En casos de coinfección la concentración de partículas virales y bacterias patógenas se incrementa considerablemente. Pueden liberarse al ambiente e ingresar a los alimentos en concentraciones inusualmente elevadas, por lo que existe la posibilidad de que los norovirus pudieran incrementar su estabilidad bajo estas condiciones pero no existen estudios al respecto.

II.4.6 Caracterización de norovirus

Cada 2 a 4 años surgen nuevas cepas de norovirus en el mundo, esto debido a su elevada tasa de mutación. Dentro del género norovirus se conocen 10 genogrupos (GI - GX). Los genogrupos GI, GII, GIV, GVIII y GIX afectan a las personas, mientras que los genogrupos GIII, GV, GVI, GVII y GX se han asociado con animales (Yilmaz *et al.*, 2011; Moore y Jaykus, 2018). Cada genogrupo se subdivide en genotipos (figura 5) basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína principal VP1. La técnica de RT-qPCR y la secuenciación son herramientas ampliamente utilizadas para la genotipificación de los norovirus (Hansman *et al.*, 2008; Biomerieux, 2018; NoroCORE, 2018; CDC, 2022). El genoma de los norovirus está constituido por una cadena simple de ARN con un tamaño aproximado de 7642 nucleótidos, localizada en el interior de una cubierta proteica sin envoltura. La región intergénica entre RdRp (ARN dependiente de ARN polimerasa) y VP1 es la más conservada en el genoma de los norovirus. La amplificación de dicha región, y posterior secuenciación del amplicón, permiten determinar el genogrupo y genotipo al que pertenece cada cepa detectada (Beuret *et al.*, 2000; Hansman *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2015; CDC, 2022). El análisis de las secuencias suele realizarse con la herramienta Norovirus Genotyping Tool versión 2.0 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>). Adicionalmente se

puede complementar con la herramienta BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch) de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Es muy importante conocer cuál es el genotipo más frecuente en México y contrastar con la incidencia de los genotipos en otros países en función de la estacionalidad, tipos de alimentos y la cantidad y el tipo de bacterias presentes. Posteriormente se construyen los árboles filogenéticos con la herramienta ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) y se puede analizar la presencia de cepas recombinantes (Simplot versión 3.5.1) y la evolución en el tiempo. Finalmente, su modelamiento mediante la herramienta PyMOL molecular graphics system (<https://pymol.org/2/>) permite modelar los cambios estructurales y los tipos de interacciones con otros microorganismos.

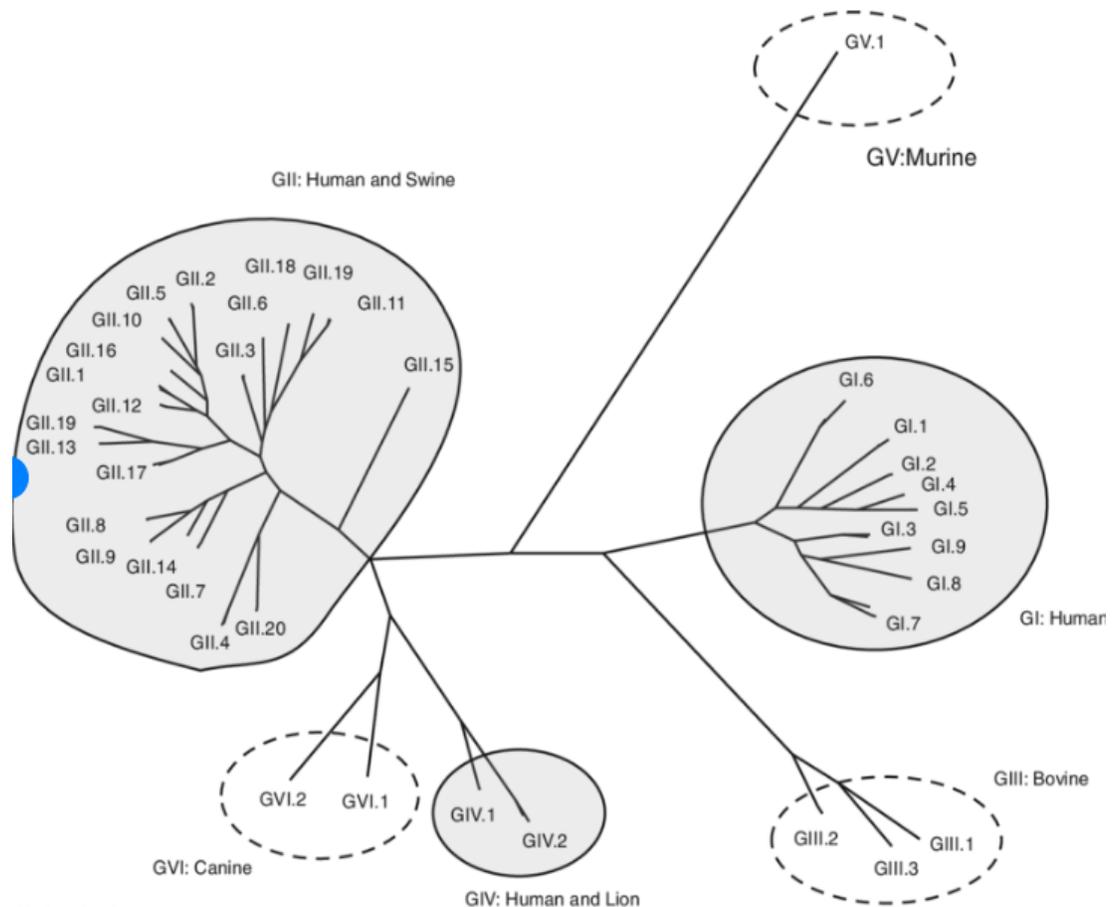


Figura 5. Árbol filogenético de los norovirus basado en su secuencia completa de la proteína VP1 (Zheng *et al.*, 2006)

III. JUSTIFICACIÓN

Los norovirus son la principal causa de enfermedad por consumo de alimentos en el mundo. Las frutas y hortalizas destacan como uno de los principales alimentos implicados en brotes por norovirus. Sabemos que los norovirus al provenir de la materia fecal y el vómito de los humanos se encuentran bien adaptados tanto a ambientes de pH ácido como básico. La temperatura de refrigeración, la elevada humedad y la ausencia o presencia de fuerza iónica en una concentración específica que se puede encontrar en las frutas y hortalizas de manera natural, contribuyen a la estabilidad de los norovirus. Adicionalmente, se ha observado que los norovirus son capaces de interactuar superficialmente con las bacterias. Las moléculas responsables de esta interacción son los carbohidratos tipo HBGA. Inicialmente se pensó que las bacterias eran responsables de generar la estabilidad en los norovirus, sin embargo, este fenómeno no fue reproducible en todos los alimentos evaluados. Por tal motivo, en el presente proyecto se tiene como objetivo esclarecer la contribución de las bacterias y los carbohidratos tipo HBGA en la estabilidad de los norovirus en alimentos de relevancia epidemiológica. Con ello se generará el conocimiento necesario para profundizar en las interacciones de las partículas virales con bacterias y alimentos que permitirá la construcción de nuevas estrategias de control de norovirus en la producción de frutas y hortalizas.

IV. HIPÓTESIS

La estabilidad de los norovirus en las frutas y hortalizas se favorece mediante interacciones superficiales con carbohidratos similares a los HBGA, presencia de solutos iónicos, mayor presencia de aminoácidos ramificados aromáticos e hidrofílicos y menor presencia de aminoácidos de cadena lateral corta, hidrofóbicos y con capacidad de disminuir la estructura secundaria de las proteínas de la cápside de los norovirus.

V. OBJETIVOS

V.1 General.

Determinar la ocurrencia, diversidad genética y estabilidad de los norovirus en frutas y hortalizas seleccionadas.

V.2 Específicos.

- Determinar la ocurrencia de los norovirus en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora en el municipio de Querétaro.
- Evaluar la asociación de la concentración de grupos indicadores y la presencia de bacterias entéricas patógenas en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora con la presencia de norovirus.
- Determinar la diversidad genética de los norovirus detectados en las muestras de cilantro, fresa, lechuga y zarzamora, y comparar con los principales genotipos reportados en las bases de datos NoroNet, CalciNet, Norovirus Typing Tool y NCBI.
- Evaluar la asociación del perfil de aminoácidos de la cápside proteica de norovirus, virus de la hepatitis A, parvovirus y priones con su estabilidad.
- Evaluar el efecto de la temperatura, pH, concentración de bacterias, la fuerza iónica y la presencia de carbohidratos similares a los HBGA, en la estabilidad de MNV-1 en fresa y lechuga.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Materiales

VI.1.1 Equipo

- *Cuenta colonias, Quebec Reicher-Jung
- *Cámara de electroforesis, BioRad[®], CHEF-DR-II[®]
- *Espectrofotómetro de luz ultravioleta, ConRalex[®] Mod. 1252-B
- *Fuente de poder para electroforesis Amercham Pharmacia Biotech[®] EPS 301
- *Homogeneizador Stomacher Laboratory Blender, Mod. 400 (BA 7021)
- *Potenciómetro, Jenway, 3510 pH Meter
- *Refrigerador REVCO, Thermo Scientific
- *Termociclador Tech-gene, Mod. 512
- *Transiluminador Hoeffler, Mod. 115VAC

VI.1.2 Medios de cultivo

- *Agar sulfito bismuto (ASB), (BD Bioxon)
- *Agar MacConkey (AM), (BD, Bioxon)
- *Agar Xilosa Lactosa Desoxicolato (AXLD), (BD, Bioxon)
- *Agar soya tripticaseína (AST), (BD Bioxon)
- *Caldo soya tripticaseína (CST), (BD, Bioxon)
- *Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI), (Invitrogen)

VI.1.3 Reactivos

- *Agarosa Ultrapura, Invitrogen
- *Bromuro de etidio a 1 ppm
- *Buffer de corrimiento 10x BlueJuice, Invitrogen
- *Duodecil Sulfato de Sodio, SDS, BioRad

- *Marcador de peso molecular, DNA ladder 100pb Invitrogen
- *PCR supermix, Quiagen
- *Random primers Promega (C1181)
- *TBE 1X amortiguador, Invitrogen

VI.1.4 Material biológico.

Las cepas fueron donadas por el Laboratorio de Salud Pública de Michoacán. Se almacenarán a -20 °C en glicerol al 15%.

Cepas de *Salmonella*:

- 1.- *Salmonella* Saintpaul.
- 2.- *Salmonella* Give.
- 3.- *Salmonella* Virchow.
- 4.- *Salmonella* Typhimurium.
- 5.- *Salmonella* Hadar.
- 6.- *Salmonella* Oranienborg.
- 7.- *Salmonella* Rissen.
- 8.- *Salmonella* Oslo.
- 9.- *Salmonella* spp.
- 10.- *Salmonella* Muenchen.
- 11.- *Salmonella* Bareilly.
- 12.- *Salmonella* Tennessee.
- 13.- *Salmonella* Derby.
- 14.- *Salmonella* Cannstatt.
- 15.- *Salmonella* Agona.
- 16.- *Salmonella* Bovismorbificans.
- 17.- *Salmonella* Enteritidis.
- 18.- *Salmonella* Anatum.

- 19.- *Salmonella Enteritidis*.
- 20.- *Salmonella Muenchen*.

Cepas de *Shigella*:

- 1.- *Shigella sonnei*.
- 2.- *Shigella sonnei* II.
- 3.- *Shigella flexneri*.
- 4.- *Shigella sonnei*.
- 5.- *Shigella sonnei*.
- 6.- *Shigella flexneri*.
- 7.- *Shigella flexneri*.
- 8.- *Shigella dysenteriae*.
- 9.- *Shigella flexneri*.
- 10.- *Shigella boydii*.
- 11.- *Shigella flexneri*.
- 12.- *Shigella boydii*.
- 13.- *Shigella sonnei*.
- 14.- *Shigella flexneri*.
- 15.- *Shigella spp.*
- 16.- *Shigella spp.*
- 17.- *Shigella sonnei*.
- 18.- *Shigella flexneri*.
- 19.- *Shigella boydii*.
- 20.- *Shigella spp.*

Cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas:

- 1.- *Escherichia coli* enterohemorrágica.
- 2.- *Escherichia coli* O157:H7.

- 3.- *Escherichia coli* enteropatógena.
- 4.- *Escherichia coli* enteroinvasiva.
- 5.- *Escherichia coli* enteroadherente.
- 6.- *Escherichia coli* ATCC.
- 7.- *Escherichia coli* enterotoxigénica.
- 8.- *Escherichia coli* enteroagregativa.

Materiales para norovirus:

- 1.- Cepa de norovirus murino ATCC.

Línea celular RAW 264.7:

1.Línea celular RAW 264.7 (macrófagos de sangre de ratón) como medio de propagación de norovirus murino.

VI.2 Métodos

VI.2.1 Determinación de la ocurrencia de los norovirus en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora, naturalmente contaminados del municipio de Querétaro.

Para la propagación de los norovirus, se utilizó la línea celular RAW 264.7 y se incubó a 37 °C y 5% de CO₂ por 48 h. Se cambió el medio RPMI cada 2 días, hasta que la superficie del frasco se volvió confluyente (saturación de células en un 80%). Se retiraron las células por raspado. Se almacenaron en viales a -20 °C por una noche. Se transfirieron a ultracongelación a -80 °C para largo almacenamiento (Morales-Rayas *et. al.*, 2009). A partir del cultivo de norovirus se realizaron diluciones decimales (10⁶ hasta 10⁰ Log₁₀ UFP/mL) y se amplificó por la prueba de RT - qPCR para obtener una curva de calibración.

Para la estandarización de la técnica de detección de norovirus se pesaron 25 g de cada uno de los 4 tipos de alimentos y se adicionó una cepa subrogada (MNV-1) en una concentración de 10 – 100 UFP y se dejó secar por 30 min en una campana de flujo laminar. Posteriormente se adicionaron 25 mL de una solución amortiguadora que contiene 50 mM de glicina, 100 mM de Tris y 3% de extracto de carne (pH = 9.6) y 25 unidades de la pectinasa de *Aspergillus niger*. Se procedió a la agitación del alimento con la solución amortiguadora de elución por 20 min a 1,500 rpm. Se recuperó el volumen total y se centrifugó a 12,000 rpm/15 min. Se separó el sobrenadante del pellet. El pellet es la fase que contiene a las bacterias y el sobrenadante es la fase que contiene a los norovirus. Se ajustó el pH a 7 con una solución amortiguadora de fosfatos y posteriormente se le adicionó polietilenglicol y cloruro de sodio hasta alcanzar una concentración del 8% y 1.75% respectivamente. Se agitó a 100 rpm durante 60 min y posteriormente se procedió a su centrifugación a 12,000 rpm/15 min (Morales-Rayas *et al.*, 2009). El ARN viral fue extraído y purificado mediante el RNAeasy mini kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. La única modificación es que durante la etapa de lisis se calentó la mezcla por a 56°C/10 min. El ARN recuperado en agua destilada estéril, se sometió a un proceso de transcripción reversa mediante el kit Omniscript RT de Qiagen utilizando la mezcla de random primers de la misma marca. Se incubó a 37 °C/60 min y se almacenó a -20°C. El ADNc sintetizado se utilizó como molde para la detección de los norovirus utilizando una mezcla de PCR SYBR Green Jump Start de Sigma Aldrich. Los iniciadores fueron: F: 5´-CAC GCC ACC GAT CTG TTC TG-3´ y R: 5´-GCG CTG CGC CAT CAC TC-3´. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94 °C/2 min, posteriormente 35 ciclos a 94 °C/15 s, 60 °C/60 s y 72 °C/60s (Vega *et al.*, 2011). Para las muestras naturalmente contaminadas (sin inocular con MNV-1) se utilizó la mezcla de iniciadores reportados en la literatura (Cuadro 2). Se evaluaron 200 muestras en total. 50 muestras de lechuga, 50 de zarzamora, 50 de fresa y 50 de lechuga. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94 °C/5 min,

posteriormente 35 ciclos a 94 °C/60 s, 55 °C/60 s y 72 °C/60s (Kroneman *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2022). El proceso general se muestra en la figura 6.

Cuadro 2. Descripción de las secuencias de los iniciadores y utilizados para la detección del Genotipo I y II de norovirus (Kroneman *et al.*, 2011)

Iniciadores	Secuencia 5´ a 3´
Genotipo I	
Cog 1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA
Cog 1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C
Genotipo II	
Cog 2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG
Cog 2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA

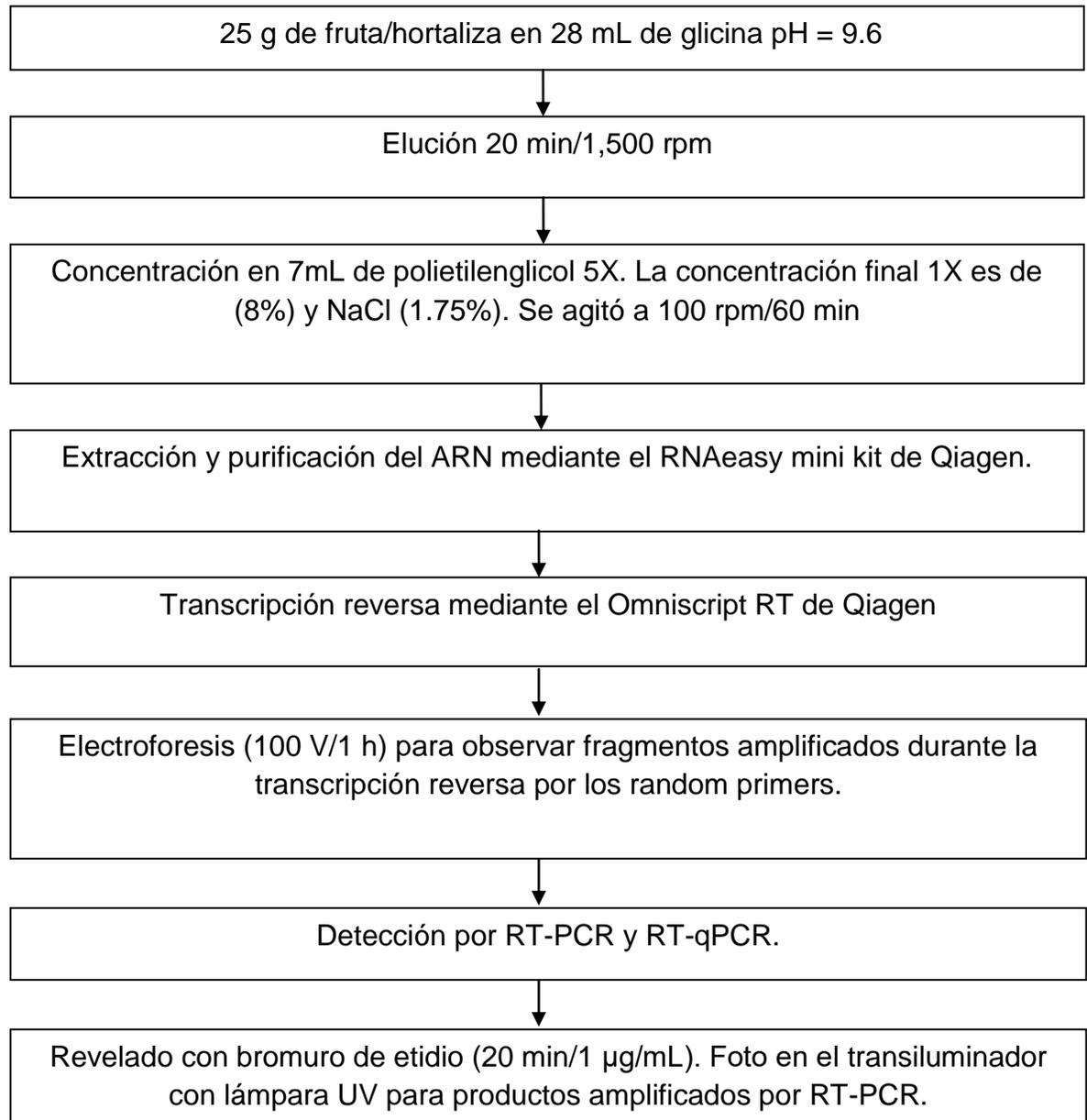


Figura 6. Esquema general para la detección de MNV-1 y norovirus GI y GII por la técnica de RT-qPCR (Morales-Rayas *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2022).

VI.2.2 Evaluación de la concentración de grupos indicadores y presencia de bacterias entéricas patógenas en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora y establecer si existe una asociación con la presencia de norovirus.

VI.2.2.1 Cuantificación de grupos indicadores en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora.

Se pesaron 10 g de cilantro, fresa, lechuga y zarzamora y se adicionaron 90 mL de diluyente de peptona de caseína al 0.1% estéril. Se homogeneizaron en stomacher a velocidad media por 2 min y se procedió a relizar 3 diluciones decimales. De cada uno de los tubos de dilución obtenidos para cada tipo de alimento se inoculó 1 mL en placas de Petri y posteriormente se adicionaron 20 mL de agar cuenta estándar para la cuantificación de BMA y agar bilis rojo violeta adicionado de glucosa para la cuantificación de enterobacterias (EB). Para la determinación de *E. coli* se utilizó la técnica del número más probable (NMP) y los tubos positivos se confirmaron en agar eosina azul de metileno (L-EMB) y por las pruebas bioquímicas IMVIC (indol, rojo de metilo, vogues porskauer y citrato) (FDA, 2018).

VI.2.2.2 Detección de *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* enterohemorrágica en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora.

Para la detección simultánea se evaluaron los siguientes factores de forma individual en cultivo puro. Se evaluaron 20 cepas de *Salmonella*, 20 cepas de *Shigella* y 8 cepas de *E. coli* enterohemorrágica. Como medio promotor del desarrollo de los 3 tipos de bacterias se evaluaron caldo soya tripticaseína y agua peptonada tamponada suplementada con 0.6% de extracto de levadura y 0.1% de glucosa (CST y mAPT). Se evaluaron 2 concentraciones de los siguientes agentes selectivos: novobiocina (N) (0.0555 ppm y 0.555 ppm), vancomicina (V) (0.8 ppm y 8 ppm) y verde brillante (GB) (0.02 ppm y 0.2 ppm). Las temperaturas de

incubación del preenriquecimiento fueron 35 y 41.5 °C. El estado fisiológico fue óptimo y con estrés. El estrés se generó mediante secado por 2 h y desinfección a 200 ppm de cloro por 15 min. Se incubaron por 24 h y se realizó la cuantificación. El diseño fue factorial completamente aleatorizado. La variable respuesta fue la población máxima alcanzada que se cuantificó en agar soya tripticaseína (Lewis *et al.*, 2014; FDA, 2018). El procedimiento se realizó por triplicado en 2 ocasiones.

Para la evaluación del desarrollo en las frutas y hortalizas se seleccionaron 5 cepas de *Salmonella*, 5 de *Shigella*, y 5 de ECEH a partir de la evaluación anterior en cultivo puro. El criterio de selección consistió en identificar la cepa que alcanzó la mayor población máxima, la cepa con menor población máxima y 3 cepas adicionales con un comportamiento intermedio (percentil 25, 50 y 75). Se pesaron 25 g de cada una de las frutas y hortalizas en 225 mL de APTm, suplementado con los 3 agentes selectivos en su concentración más alta. Se inoculó la mezcla de las bacterias de los 3 géneros patógenos de manera simultánea en una concentración de 1-10 UFC. En cada una de las mezclas de las bacterias un género fue resistente a 200 ppm de rifampicina y los otros 2 sin resistencia para poderlos diferenciar (Wei *et al.*, 1995; Stals *et al.*, 2011). Se incubaron a 41.5 °C/24 h y se cuantificó la población máxima alcanzada en agar soya tripticaseína con 200 ppm de rifampicina (Wei *et al.*, 1995; FDA, 2018). El procedimiento se realizó por triplicado en 2 ocasiones.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de la solución amortiguadora de glicina (12,1 g de base Tris, 3,8 g de glicina, 10 g de extracto de carne diluido en 1 L de agua destilada, pH final de 9,5) en la viabilidad de las bacterias entéricas patógenas ya que es el primer componente que entra en contacto con las frutas y hortalizas para separar a los virus y las bacterias. Se distribuyeron 3 mL de la solución amortiguadora de glicina en tubos y se inocularon por separado con una mezcla de 5 cepas de *Salmonella*, 5 de *Shigella* y 5 de ECEH previamente sometidas a estrés (se inocularon 95-105 UFC). La mezcla se incubó a 22 ° C / 60

min, y la población de bacterias patógenas se cuantificó en AST (35 ° C / 24 h). El procedimiento se realizó por triplicado en 2 ocasiones.

Posteriormente, se diseñaron iniciadores específicos mediante el programa Primer3plus (<https://primer3plus.com/>) para la detección múltiple. Los genes seleccionados de acuerdo al Bacteriological Analytical Manual de la Food and Drug Administration (FDA) fueron: *invA* para *Salmonella*, *ipaH* para *Shigella* y *stx1* y *stx2* para ECEH. Para la parte de la estandarización de los iniciadores previamente diseñados, se utilizó ADN extraído y purificado mediante un kit comercial de Qiagen Food Sample Kit. Se evaluó la concentración del iniciador como factor con 2 niveles (0.2 a 2 µM) y la temperatura de alineamiento como factor con un nivel (60 °C). Se utilizó la mezcla de PCR Multiplex de Qiagen (Figura 7) (FDA, 2018). Para validar la especificidad de la técnica los productos de PCR fueron secuenciados en el Langebio, Cinvestav, unidad Irapuato, México, y las secuencias analizadas se enviaron a la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para su registro.

Para el análisis de especificidad de los iniciadores se evaluaron 10 cepas inclusivas y 20 cepas exclusivas. El objetivo es que no se confundan durante la prueba de detección múltiple (FDA, 2018). Para valorar la sensibilidad alcanzada de la técnica se inocularon 1 - 10 UFC de la mezcla de 5 cepas de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH en 25 g de cada una de las frutas y hortalizas. Tanto para el análisis de especificidad y sensibilidad se siguió el procedimiento de la Figura 7 (FDA, 2018). Para la detección de las muestras naturalmente contaminadas se utilizó el procedimiento estandarizado que se mencionó previamente (Figura 7) con la diferencia de no realizar el proceso de inoculación al inicio del análisis. Se evaluaron 200 muestras de las frutas y hortalizas naturalmente contaminadas. Los resultados positivos se confirmaron por técnicas tradicionales del Bacteriological Analytical Manual de la FDA como estándar de referencia (FDA, 2018). Adicionalmente se enviaron a secuenciar los productos de los resultados positivos.

De igual forma, las secuencias analizadas se enviaron a la base de datos del NCBI.

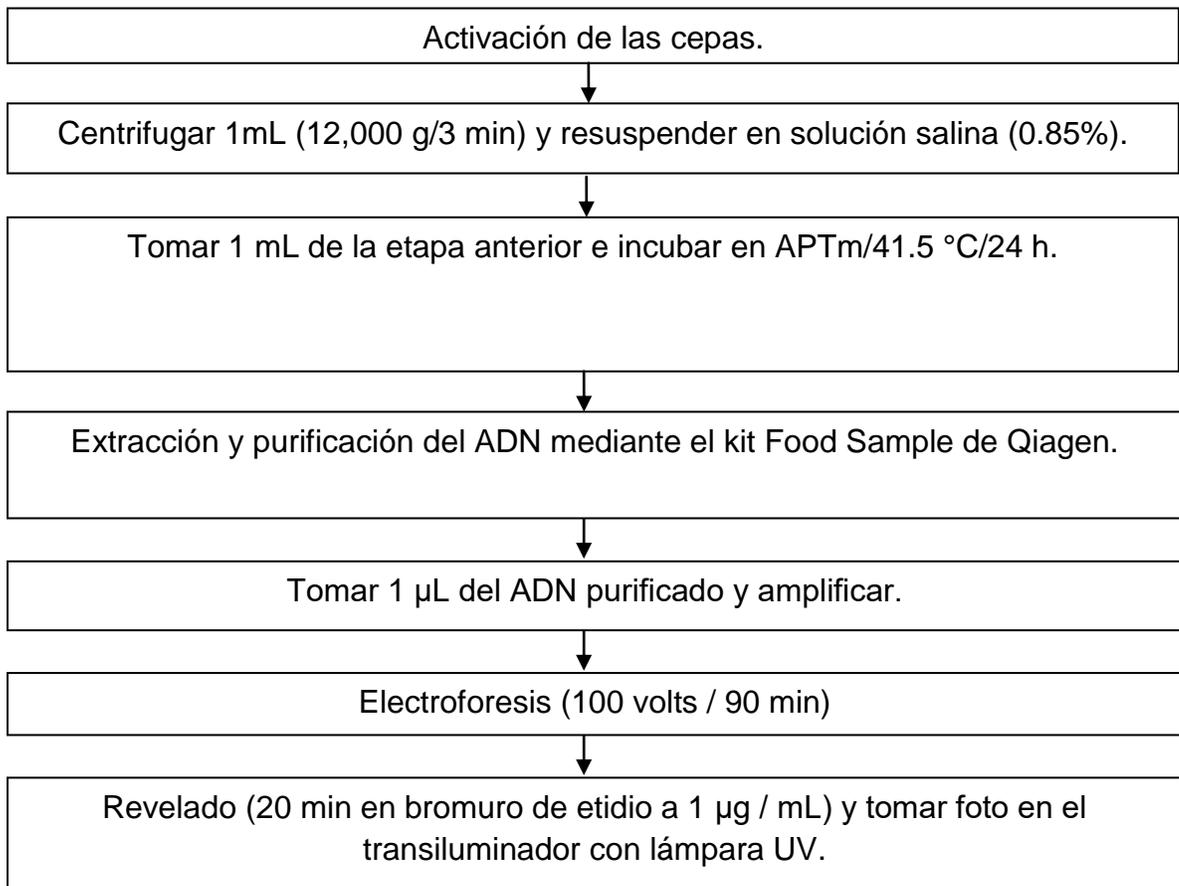


Figura 7. Esquema general para la detección de bacterias entéricas patógenas por la técnica de PCR a partir de cultivo puro e inoculadas en las frutas y hortalizas (FDA, 2018).

VI.2.3 Análisis comparativo del marco de lectura 2 de los norovirus detectados en las muestras de cilantro, fresa, lechuga y zarzamora, con las secuencias reportadas en las bases de datos NoroNet, CalciNet, Norovirus Typing Tool y NCBI.

Los iniciadores utilizados para la amplificación aparecen en el cuadro 3 y nos permitieron determinar si los norovirus pertenecen al genogrupo (I o II). Para determinar el genotipo de los norovirus se secuenció el producto de RT-qPCR perteneciente al ORF2 mediante la metodología Sanger dioxide en el Langebio, Cinvestav, unidad Irapuato, México. La caracterización de los norovirus se realizó analizando las secuencias en el programa Online Norovirus Genotyping Tool versión 2.0 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>). Se determinó el genogrupo y genotipo y se contruyeron árboles filogenéticos para determinar la homología de las secuencias con las cepas registradas en la base de datos Norovirus typing tool. Posteriormente, se confirmó mediante la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) el genotipo de los norovirus. Adicionalmente, se realizaron alineamientos mediante el programa BioEdit versión 7.0.5.3 y se construyeron árboles filogenéticos mediante el programa ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) para determinar la homología de las secuencias con las bases de datos del NCBI. Finalmente se compararon los genotipos caracterizados en el presente proyecto con los genotipos más frecuentes en las bases de datos NoroNet y CalciNet y establecer si existen similitudes o diferencias.

VI.2.4 Determinación mediante un análisis bioinformático comparativo con otras variantes de norovirus y otros virus transmisibles por alimentos el perfil de aminoácidos asociado con una mayor estabilidad.

Se determinaron los aminoácidos para los que codifican las secuencias mediante el programa MEGA-X. Se realizaron alineamientos y se compararon los perfiles obtenidos con los de las bases de datos del NCBI para identificar secciones de mayor variabilidad, y mutaciones sinónimas y no sinónimas. Se identificaron las secciones de hipermutación y el tipo de variantes reportados como más frecuentes.

En conjunto se analizaron secuencias de norovirus GI.1, GI.3, GII.4, el virus de la hepatitis A, parvovirus y los priones. Los últimos 3 tipos de virus se incluyeron por su notable capacidad para persistir en el ambiente y resistir tratamientos físicos y químicos. El criterio de análisis consistió en determinar la concentración de aminoácidos hidrofílicos, hidrofóbicos, ramificados, aromáticos, de cadena lateral corta y con capacidad de afectar la estructura secundaria. Se analizó el nivel de variación de los tipos de aminoácidos para cada uno de los géneros de los virus. Se consideraron los cambios que han experimentado las partículas virales en el tiempo utilizando las secuencias de diferentes años que se encuentran reportadas en las bases de datos para cada uno de los géneros de los virus. Finalmente, se realizó un análisis de relación entre los perfiles de los virus y la resistencia a diferentes factores de estrés reportados en la literatura. Se analizó también la capacidad de interactuar con moléculas hidrófilas, hidrófobas, iones disueltos y los carbohidratos tipo HBGA presentes en los alimentos.

VI.2.5 Evaluación del efecto de la temperatura, pH, concentración de bacterias, la fuerza iónica y la presencia de carbohidratos similares a los HBGA, en la estabilidad de MNV-1 en fresa y lechuga.

Se realizaron diluciones decimales de MNV-1 a partir de una concentración de 8 Log_{10} UFP/mL. A partir del número de ciclos requeridos para ser detectada cada una de las diluciones decimales se realizó una regresión lineal. La ecuación de la recta se utilizó para determinar la concentración de MNV-1 en los diferentes tratamientos de esta sección. Para la evaluación *in vitro* de la estabilidad de MNV-1 se inocularon 6 Log_{10} UFP/10 μL de MNV-1 en 90 μL de solución amortiguadora de fosfatos. La estructura de tratamientos consistió en dos niveles de pH (3 y 8), 2 temperaturas (4 y 22 °C), y 1 nivel de fuerza iónica (0.25 M) de manera combinada. La diferencia consistió en la presencia de 2 factores adicionales. El factor bacteria (5 Log UFC/mL) y el factor presencia de N-acetilglucosamina (1%). El factor bacteria fue representado por una *E. coli* O157:H7. El objetivo del modelo experimental fue esclarecer el efecto de las bacterias y los carbohidratos tipo HBGA en la estabilidad de MNV-1. Es el primer reporte donde se involucran todos estos factores de forma simultánea y se incluye la presencia de una bacteria entérica patógena de gran relevancia en brotes por consumo de frutas y hortalizas. Se realizaron las cuantificaciones a los 30 min y 4 h para 22 °C y a las 6 y 24 h para 4 °C por RT-qPCR.

Posteriormente se evaluaron los mismos factores pero en la fresa y lechuga con el objetivo de esclarecer el efecto real de las bacterias y los carbohidratos tipo HBGA en la estabilidad de los norovirus en las frutas y hortalizas. Se inoculó la misma concentración de 6 Log_{10} UFP/100 μL en la superficie de la fresa y la lechuga. Se almacenaron a 4 y 22 °C y se realizaron cuantificaciones a las 4 y 24 h para 22 °C y a las 24 y 72 h para 4 °C. La cuantificación de MNV-1 se realizó mediante RT-qPCR. Para la cuantificación se utilizó una mezcla Start Jump SYBR Green Sigma Aldrich y se siguió el protocolo

de amplificación de la sección VI.2.1. Se incluyeron controles negativos con todos los tratamientos sin inocular la partícula viral y controles positivos donde solo se adicionó la partícula viral sin ser sometida a ningún tratamiento de evaluación de estabilidad tanto para el modelo *in vitro* como para la evaluación en la fresa y lechuga.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la sección VI.2.2.2 se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado, donde los factores fueron tipo de medio de cultivo con dos niveles, tipo de agente selectivo con 4 niveles, y estado fisiológico con 2 niveles. La variable respuesta fue la población máxima alcanzada de las bacterias entéricas patógenas. Se realizó una prueba de medias de Tukey. En la sección VI.2.5 se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado, donde los factores fueron las bacterias con 2 niveles, la temperatura con 2 niveles, la fuerza iónica con 1 nivel y la presencia de carbohidratos tipo HBGA con 1 nivel. Se realizó una prueba de medias de Tukey. Se exploraron interacciones entre las variables estudiadas.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1 Evaluación de medios de preenriquecimiento para el desarrollo simultáneo de *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Salmonella* y *Shigella* en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora.

VIII.1.1 Evaluación de medios de preeriquecimiento para el desarrollo individual de *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Salmonella* y *Shigella* en cultivo puro.

Las cepas de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH se evaluaron de manera individual en cultivo puro. Se evaluaron 2 medios de preenriquecimiento (CST y APTm), 3 agentes selectivos (GB, V, N) en 2 niveles de concentración (-1 y +1), 2 temperaturas de incubación (35 °C y 41.5 °C) y 2 estados fisiológicos (con y sin exposición a estrés previamente descrito en la sección VI.2.2.2). Los medios de preenriquecimiento como el CST y APTm contienen una alta concentración de nutrientes y se encuentran libres de agentes selectivos o inhibidores. Por lo tanto, ambos medios son capaces de promover el desarrollo simultáneo de varios tipos de microorganismos en las frutas y hortalizas (FDA, 2018). Esta etapa se conoce como preenriquecimiento y tiene 2 objetivos principales. El primero es contribuir a reparar el daño de los microorganismos que se encuentren en un estado de estrés fisiológico reversible y el segundo es promover el desarrollo de los microorganismos presentes a su máxima expresión (Ibrahim y Fleet, 1985; Baylis *et al.*, 2000; Gehring *et al.*, 2012; Margot *et al.*, 2015). Los agentes selectivos se adicionan a los medios de preenriquecimiento con la finalidad de inhibir a la microbiota presente en la muestra y promover el desarrollo del microorganismo de interés (Baylis *et al.*, 2000; Margot *et al.*, 2015). El verde brillante, la novobiocina y vancomicina inhiben con mayor intensidad a la microbiota Gram positiva que a la Gram negativa (FDA, 2018). La temperatura de incubación también puede ejercer un efecto selectivo en el desarrollo de los microorganismos presentes en la muestra. A 41.5 °C se favorece la velocidad de desarrollo de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH respecto a la mayoría de las bacterias mesófilas aerobias (Zheng *et al.*,

2013). Por lo anterior, la hipótesis de esta primera parte fue que la combinación de la temperatura, los agentes selectivos y la elevada disponibilidad de nutrientes, serían capaces de promover el desarrollo simultáneo de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH a niveles más altos que la microbiota presente en las frutas y hortalizas. En el presente estudio, las cepas de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH mostraron una gran capacidad para desarrollar en todos los tratamientos evaluados. La población máxima alcanzada para las cepas de *Salmonella* (Figura 8) fue de 8.1 a 9.18 Log₁₀ UFC/mL, concentración suficiente para ser detectada por la técnica de PCR (3 Log₁₀ UFC/mL es la concentración mínima necesaria) (Margot *et al.*, 2015). Para *Shigella* (Figura 9) y ECEH (Figura 10) la población máxima alcanzada fue de 8.05 a 9.15 y 8.15 a 9.37 Log₁₀ UFC/mL respectivamente. En otros estudios *Salmonella* fue capaz de alcanzar 7.77±0.11 Log₁₀ UFC/mL al utilizar diferentes medios de preenriquecimiento, entre ellos, el APT (Zheng *et al.*, 2013). Para *Salmonella*, *Shigella* y ECEH la mayor variabilidad se observó al utilizar verde brillante (GB) y novobiocina (N) independientemente del nivel de concentración alto (+1) o bajo (-1) (p<0.05). Algunas cepas mostraron mayor capacidad para desarrollar en presencia de los agentes selectivos, condición que esperamos encontrar en productos naturalmente contaminados. Para el caso de vancomicina (V) las cepas responden de manera muy homogénea a la presencia de este agente selectivo independientemente del tipo de microorganismo. La población máxima alcanzada fue menor para V que para GB y N, aunque en cualquier caso es suficiente para ser detectados por la prueba de PCR. Posteriormente se evaluaron los agentes selectivos en mezcla replicando las condiciones de temperatura y medios de preenriquecimiento. La mezcla 1 (MIX-1) consistió en V, N y GB en su nivel bajo (-1) y la mezcla 2 (MIX+1) consistió en V, N, y GB en su nivel alto (+1). La población máxima alcanzada para *Salmonella* fue de 7.8 a 8.65 Log₁₀ UFC/mL, para *Shigella* de 7.61 a 8.42 Log₁₀ UFC/mL y para ECEH de 7.42 a 8.77 Log₁₀ UFC/mL. No se observó diferencia significativa (p>0.05) en la población máxima alcanzada en las evaluaciones de los agentes selectivos en mezcla respecto a las evaluaciones de los agentes selectivos en forma individual.

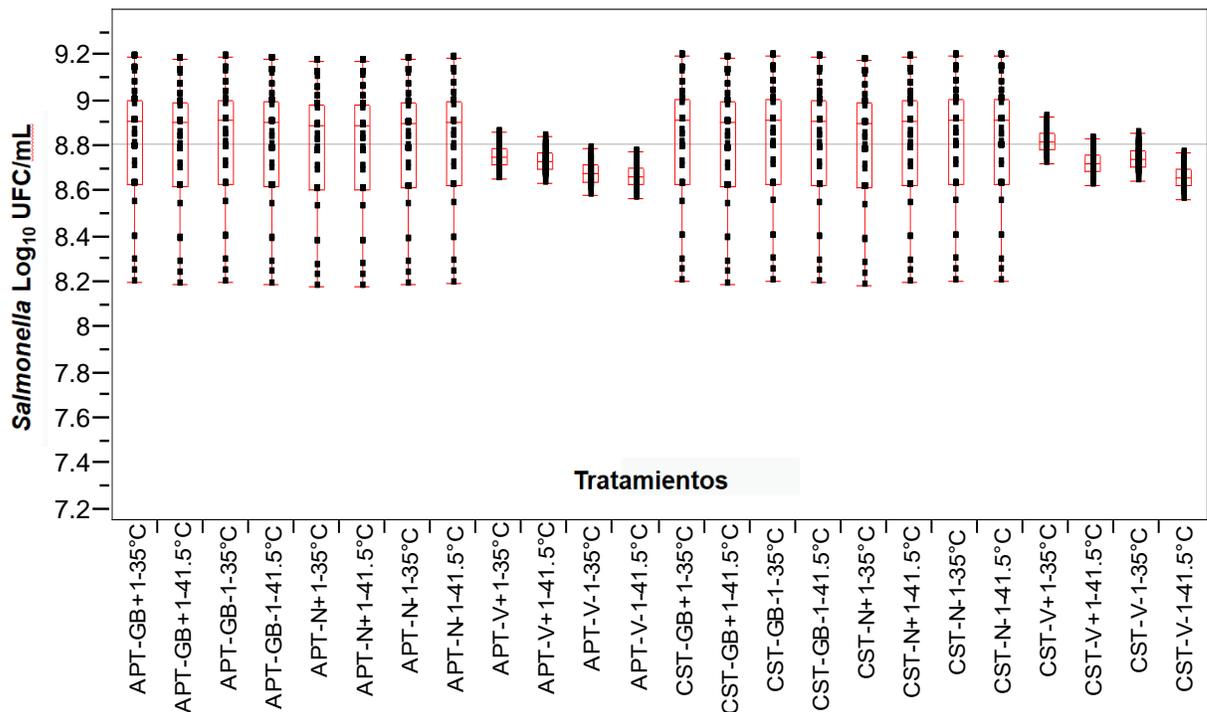


Figura 8. Variabilidad de la población máxima alcanzada de *Salmonella* modificando la temperatura (35 y 41.5 °C), medio de enriquecimiento (CST y APTm) y los agentes selectivos (GB+1, GB-1, V+1, V-1, N+1, N-1) después de 24 horas de incubación. GB: verde brillante, V: vancomicina, N: novobiocina, +1: nivel alto, -1: nivel bajo.

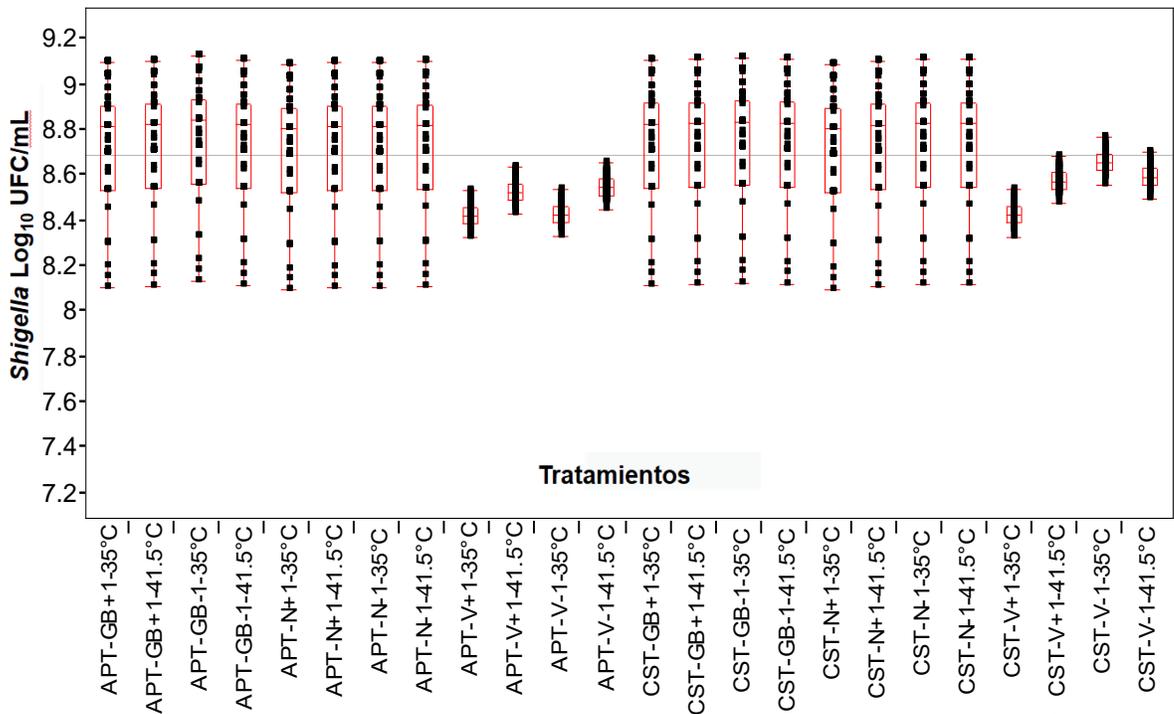


Figura 9. Variabilidad de la población máxima alcanzada de *Shigella* modificando la temperatura (35 y 41.5 °C), medio de enriquecimiento (CST y APTm) y los agentes selectivos (GB+1, GB-1, V+1, V-1, N+1, N-1) después de 24 horas de incubación. GB: verde brillante, V: vancomicina, N: novobiocina, +1: nivel alto, -1: nivel bajo.

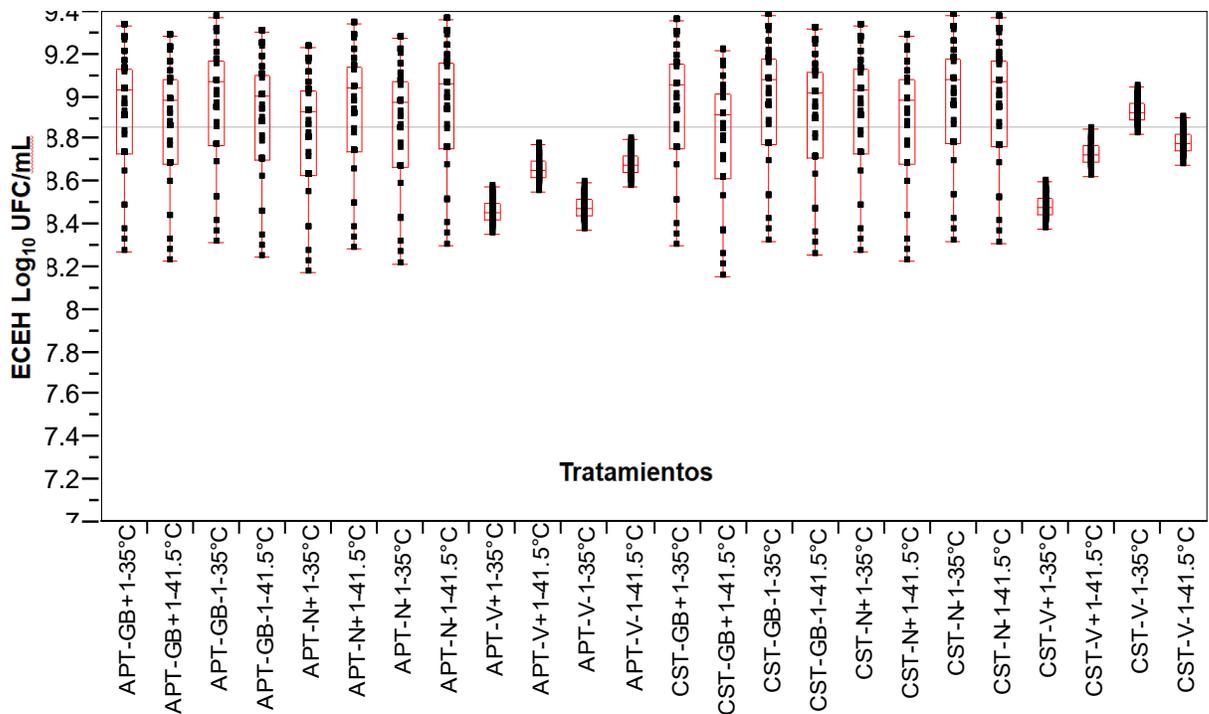


Figura 10. Variabilidad de la población máxima alcanzada de ECEH modificando la temperatura (35 y 41.5 °C), medio de enriquecimiento (CST y APTm) y los agentes selectivos (GB+1, GB-1, V+1, V-1, N+1, N-1) después de 24 horas de incubación. GB: verde brillante, V: vancomicina, N: novobiocina, +1: nivel alto, -1: nivel bajo.

La siguiente etapa consistió en replicar los mismos tratamientos previamente realizados pero con las cepas sometidas a una condición de estrés (sección VI.2.2.2). Las cepas naturalmente presentes en la superficie de las frutas y hortalizas suelen estar expuestas a diversas condiciones de estrés. Y la exposición a una condición de estrés fisiológico reversible suele alargar la fase de adaptación y el tiempo requerido para alcanzar la población máxima (Margot *et al.*, 2015; FDA, 2018). Por lo tanto, el objetivo de esta evaluación fue determinar el efecto del estrés en el desarrollo simultáneo de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH bajo las condiciones de preenriquecimiento previamente seleccionadas. Se observó que todas las cepas expuestas a la condición de estrés mostraron una ligera reducción en su población máxima alcanzada respecto a las cepas sin exposición. La población máxima alcanzada para *Salmonella* fue de 7.15 a 7.98 Log₁₀ UFC/mL, para *Shigella* de 6.95 a 7.64 Log₁₀ UFC/mL y para ECEH de 7.24 a 8.28

Log₁₀ UFC/mL. En todos los casos la población máxima fue suficiente para poder ser detectada por la prueba de PCR. En otra evaluación, *Salmonella* se expuso a una condición de estrés a 60 °C por 1.5 y 2 min. Se utilizaron diferentes medios de preenriquecimiento incluyendo el APT y *Salmonella* alcanzó poblaciones máximas entre 6 y 8 Log₁₀ UFC/mL (Zheng *et al.*, 2013). Concentraciones similares a las obtenidas en el presente proyecto. Por lo anterior, el tratamiento seleccionado para el preenriquecimiento simultáneo de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH en las frutas y hortalizas fue utilizar el medio APTm, la temperatura de incubación de

VIII.1.2 Evaluación de medios de preenriquecimiento para el desarrollo simultáneo de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH en frutas y hortalizas.

Toda la experimentación de la sección anterior se realizó de manera individual. Para esta sección se procedió a trabajar con una mezcla de 5 cepas de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH. Se seleccionó la cepa que alcanzó la mayor población máxima, la cepa que alcanzó la menor población máxima, y 3 cepas con capacidad de desarrollo intermedio (percentil 25, 50 y 75). Estas 5 cepas se expusieron a la condición de estrés descrita en la sección VI.2.2.2. Posteriormente se inocularon (1 - 10 UFC/alimento) en 25 g de cilantro, fresa, lechuga y zarzamora. En cada una de las mezclas de las bacterias un género fue resistente a 200 ppm de rifampicina y los otros 2 sin resistencia para poderlos diferenciar (Wei *et al.*, 1995; Stals *et al.*, 2011). Se adicionaron 225 mL de APTm, los agentes selectivos en mezcla en su nivel más alto y se incubaron a 41.5 °C por 24 h. Se cuantificó la concentración de BMA como grupo representante de la microbiota en las frutas y hortalizas. Para *Salmonella* (Figura 11) el desarrollo fue de 7.03 a 8.91 Log₁₀ UFC/mL, para *Shigella* (Figura 12) fue de 4.30 a 7.48 Log₁₀ UFC/mL y para ECEH (Figura 13) fue de 6.40 a 8.78 Log₁₀ UFC/mL. Niveles lo suficientemente altos para poder ser detectados por la prueba de PCR. Más aún, superó la población máxima alcanzada por las BMA en todos los alimentos evaluados. La combinación de los agentes selectivos en conjunto con la temperatura es

suficientemente efectiva para favorecer el desarrollo de las bacterias entéricas patógenas respecto a las BMA. De igual forma en otra investigación, *Salmonella* previamente sometida a estrés por calor incrementó su concentración de 2 a 8 Log₁₀ UFC/mL en 10 h a 37 °C, aún con la presencia de microbiota competitiva (Zheng *et al.*, 2013). Por lo tanto, las condiciones seleccionadas para el preenriquecimiento simultáneo de las bacterias entéricas patógenas en las frutas y hortalizas fue utilizar el APTm con los agentes selectivos en mezcla en su nivel de alta concentración y la temperatura de incubación de 41.5 °C. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la solución amortiguadora glicina en la reducción de la población de las bacterias entéricas patógenas. La solución amortiguadora tiene como objetivo retirar a los norovirus de las frutas y hortalizas para poder comenzar con el proceso de preenriquecimiento de las bacterias entéricas patógenas. La solución amortiguadora de glicina no generó ningún tipo de efecto inhibitorio en la viabilidad de las bacterias entéricas patógenas después de 60 min de exposición. Las poblaciones (UFC/mL) al inicio y término de la incubación fueron 101.7 ± 2.5 y 92.3 ± 3.2 para *Salmonella*, 96 ± 1 y 95.7 ± 3.1 para *Shigella* y 100.7 ± 2.5 y 94.0 ± 3.0 para ECEH. Por lo que su aplicación como medio de elución de los norovirus en las frutas y hortalizas no comprometió la capacidad de desarrollo de las bacterias entéricas patógenas.

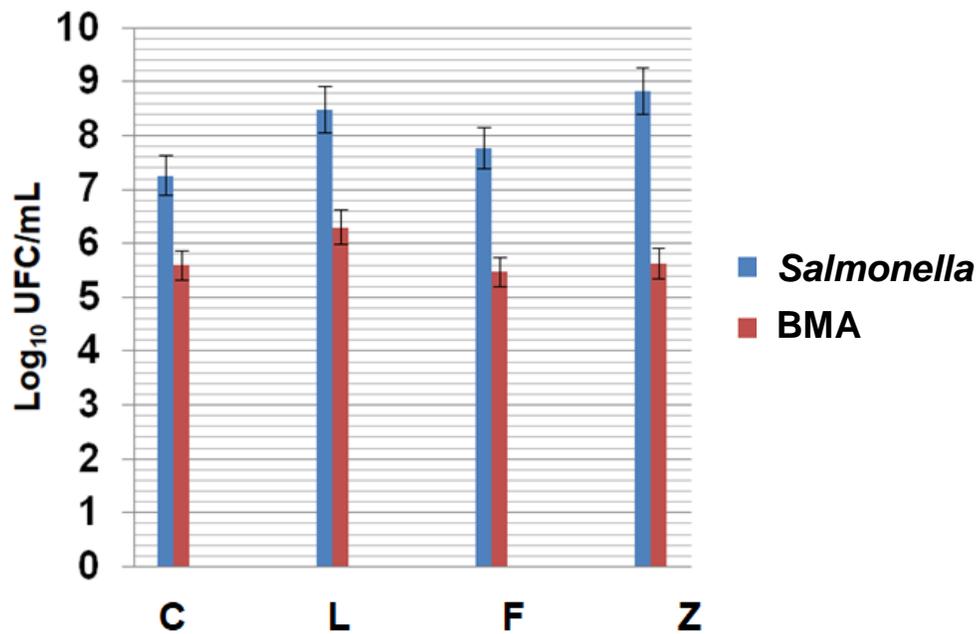


Figura 11. Población máxima alcanzada de *Salmonella* y BMA en cilantro (C), lechuga (L), fresa (F) y zarzamora (Z).

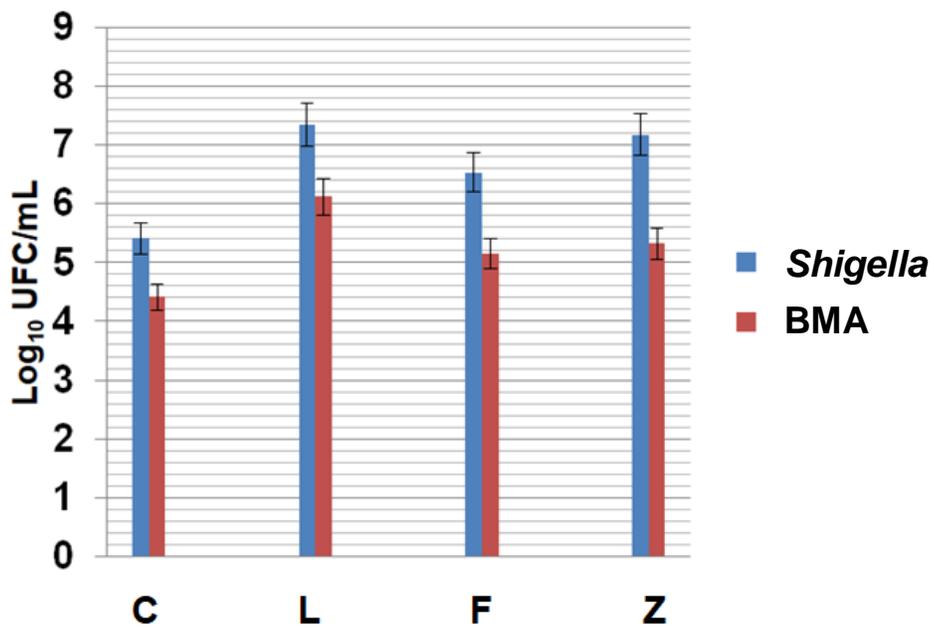


Figura 12. Población máxima alcanzada de *Shigella* y BMA en cilantro (C), lechuga (L), fresa (F) y zarzamora (Z).

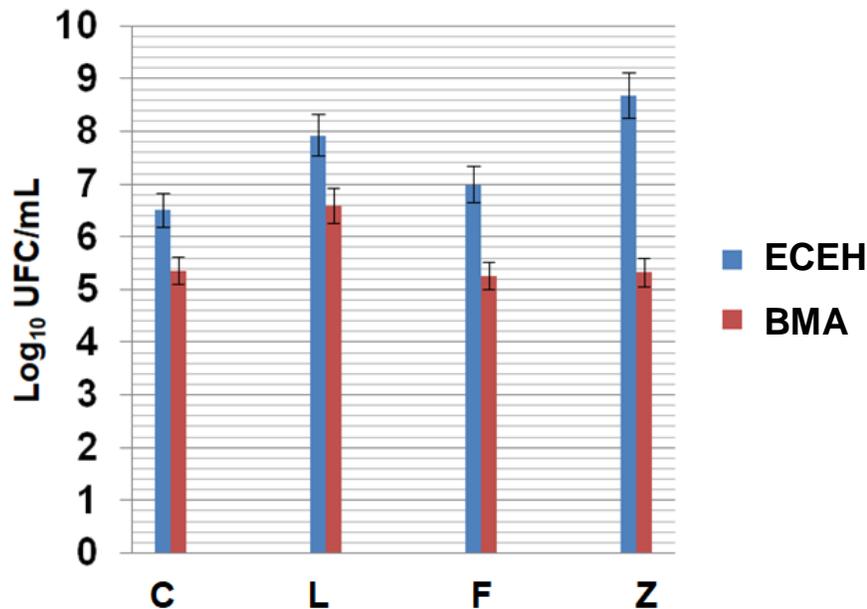


Figura 13. Población máxima alcanzada de ECEH y BMA en cilantro (C), lechuga (L), fresa (F) y zarzamora (Z).

VIII.2 Diseño, estandarización y validación de iniciadores para la detección múltiple de *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Salmonella* y *Shigella*.

E. coli enterohemorrágica, *Salmonella* y *Shigella* son las bacterias entéricas patógenas de mayor relevancia sanitaria en los alimentos (Kirk *et al.*, 2015; CDC, 2022). Su detección individual se encuentra bien documentada, sin embargo, en la actualidad no existen metodologías eficientes y normalizadas capaces de detectar de manera simultánea a los 3 tipos de bacterias en el mismo alimento (Kim *et al.*, 2009; FDA, 2018). La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una de las herramientas más utilizadas en el diagnóstico de la presencia/ausencia de microorganismos patógenos en los alimentos. Sus principales ventajas respecto a las metodologías tradicionales son el menor tiempo para obtener un resultado presuntivo (menos de 24 h), la posibilidad de detectar varios tipos de microorganismos en un mismo ensayo y la elevada especificidad determinada por la amplificación de una o varias secuencias altamente

conservadas en los microorganismos de interés. Para el presente proyecto se seleccionaron secuencias de genes de virulencia altamente conservados en cada uno de los géneros bacterianos: *InvA* (*Salmonella*), *IpaH* (*Shigella*), *Stx1* y *Stx2* (ECEH) (FDA, 2018). Para *E. coli enterohemorrágica* se reunieron 28 secuencias, para *Salmonella* se reunieron 16 secuencias y para *Shigella* 40 secuencias distintas. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del NCBI. Se alinearon mediante el programa Bioedit y Clustal Omega para identificar la zona más conservada para cada gene. Se elaboraron dendogramas con el objetivo de conocer la variabilidad de la secuencia de cada gene (Figura 14, 15 y 16). Posteriormente se seleccionó la zona más conservada (Figura 17) y se introdujo a los programas Primer3Plus, NCBI Primer-Blast, Eurofins Genomics PCR Primer Design Tool, Lasergene Sequence Builder Program, Interactive PCR Primer Design, Primer Quest Tool, y AmplifX para diseñar los iniciadores específicos (NCBI, 2022; Barros *et al.*, 2003; Rozen y Skaletsky, 2000). Los parámetros que se determinaron como significativos para el diseño de los iniciadores fueron los siguientes: el tamaño del iniciador (18 a 24 pares de bases), el contenido de Guanina y Citosina (G:C 40 a 60%), la temperatura de alineamiento (T_m : 60 ± 5 °C), la concentración (0.2 a 2 μ M), la complementariedad (intra e inter), el valor absoluto de la energía libre de Gibbs ($\Delta G < 9$ kcal), la presencia de bases púricas en los extremos 5' y 3', evitar la presencia de secuencias de 4 o más bases iguales repetidas, el tamaño del producto de amplificación para ser diferenciado en un gel de electroforesis (100 a 1000 pb), entre otros. Las secuencias finales (Figura 18) se evaluaron mediante el programa Amplifx para determinar el tamaño de los amplicones y la posible formación de dímeros. La especificidad se evaluó mediante la herramienta Blast de la base de datos NCBI. Se determinó la especificidad contra 209, 775 y 348 secuencias de ECEH, *Salmonella* y *Shigella* respectivamente. En todos los casos la especificidad *in silico* fue del 100%. Con las secuencias finales de los iniciadores se procedió a evaluar la concentración de los iniciadores (0.2 a 1 μ M) a una misma temperatura de alineamiento (60 °C) compartida entre todos los iniciadores para realizar la amplificación de manera

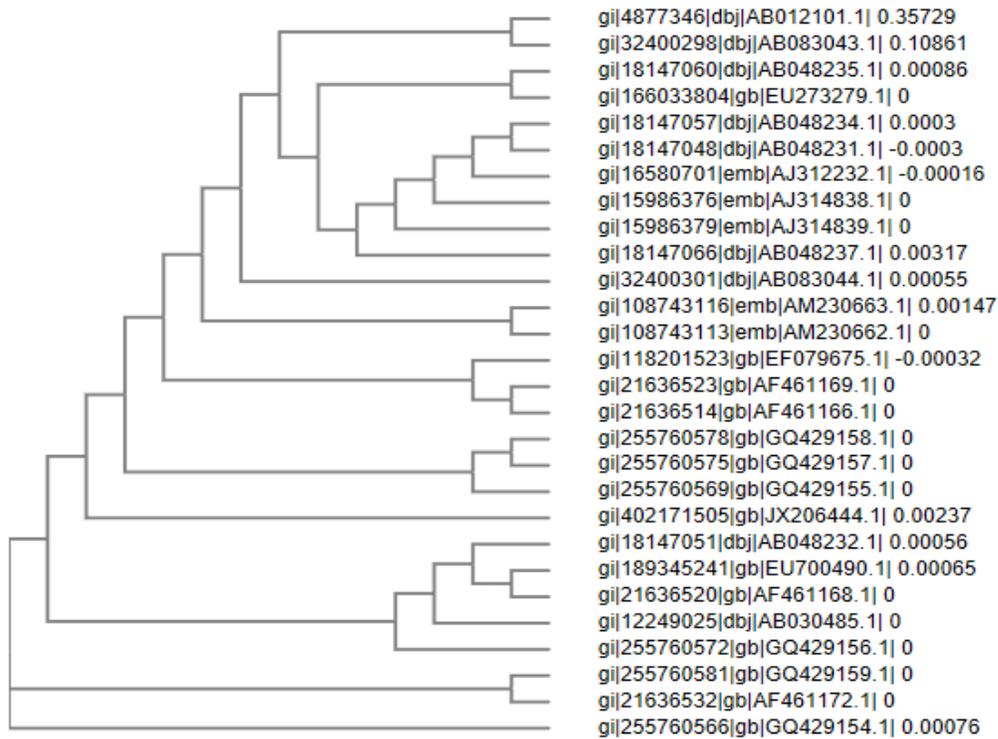


Figura. 15. Dendrograma de similitud de las secuencias del gene *Stx1* de *E. coli* enterohemorrágica.

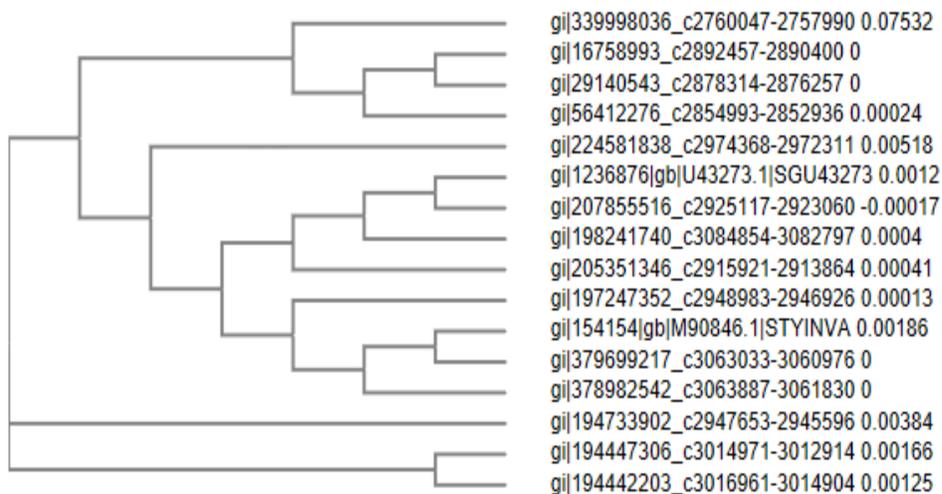


Figura 16. Dendrograma de similitud de las secuencias del gene *InvA* de *Salmonella* (Clustal Omega)

	520	530	540	550
gi 1236876 g	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 154154 gb	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 16758993 :	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 56412276 :	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 29140543 :	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 224581838	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 205351346	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 207855516	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 339998036	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 379699217	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 197247352	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 194447306	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 198241740	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 194733902	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 194442203	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			
gi 378982542	CTGGATGGTATGCCCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGA			

Figura 17. Fragmento del alineamiento de diferentes secuencias del gen *InvA* de *Salmonella* (Bioedit).

<input checked="" type="checkbox"/> Left Primer 1:	Primer_F	A			
Sequence:	CTGTGGCAAGAGCGATGTTA				
Start: 524	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 %	ANY: 4.0	
<input checked="" type="checkbox"/> Right Primer 1:	Primer_R				
Sequence:	CCTTCCCCAGTTCAACGTAA				
Start: 681	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 %	ANY: 5.0	
Product Size: 158 bp		Pair Any: 5.0	Pair End: 3.0		
<input checked="" type="checkbox"/> Left Primer 1:	Primer_F	B			
Sequence:	GTGCCGGTTTTATCGTGACT				
Start: 734	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 %	ANY: 4.0	
<input checked="" type="checkbox"/> Right Primer 1:	Primer_R				
Sequence:	CTCGCCTTGCTGGTTTTAG				
Start: 981	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 %	ANY: 2.0	
Product Size: 248 bp		Pair Any: 2.0	Pair End: 2.0		
<input type="checkbox"/> Left Primer 2:	Primer_1_F	C			
Sequence:	GCTGCTGGTGCTTGACTGTA				
Start: 32	Length: 20 bp	Tm: 60.2 °C	GC: 55.0 %	ANY: 3.0	
<input type="checkbox"/> Right Primer 2:	Primer_1_R				
Sequence:	ATACAGGTA CTGGGCATCG				
Start: 224	Length: 20 bp	Tm: 59.8 °C	GC: 55.0 %	ANY: 4.0	
Product Size: 193 bp		Pair Any: 5.0	Pair End: 0.0		

Figura 18. Secuencias de iniciadores propuestas por el software Primer3Plus para *E. coli* enterohemorrágica (A), *Salmonella* (B) y *Shigella* (C).

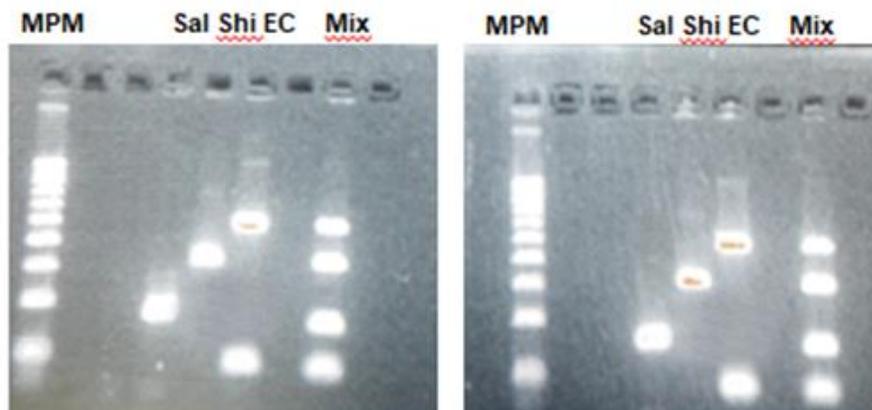


Figura 19. Amplificación de los iniciadores para *Salmonella* (Sal), *Shigella* (Shi) y ECEH (EC) de manera individual y múltiple (Mix). La imagen A contiene 1 µM y la imagen B 0.2 µM. La temperatura de alineamiento fue de 60 °C. El marcador de peso molecular (MPM) es de 100 pb.

VIII.3 Evaluación de la especificidad y sensibilidad de la técnica de detección múltiple de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH en frutas y hortalizas.

Posterior al diseño y estandarización de los iniciadores se evaluó la especificidad que consiste en determinar la capacidad de los iniciadores para detectar el microorganismo de interés y no amplificar otro tipo de microorganismo (Figura 20). La sensibilidad de la técnica se definió como la capacidad de detectar una concentración mínima de las bacterias entéricas patógenas en los 4 tipos de alimentos seleccionados. Para todos los casos se inoculó en cada uno de los 4 alimentos la mezcla de 5 cepas seleccionada en la sección (VIII.1.2) en una concentración de 1 a 10 UFC por alimento. Finalizado el tiempo de incubación se tomó 1 mL de cada muestra y se procedió a la extracción y purificación del material genético mediante el Kit de Qiagen Food Sample. Se realizó la prueba de detección múltiple y los resultados se muestran en la Figura 21. En otras investigaciones ECEH fue detectada con una sensibilidad de 10 UFC en 25 g de germinado de frijól en el 50% de los casos, la dificultad principal consistió en la

presencia de altas concentraciones de microbiota (7 – 8 Log₁₀ UFC/mL) en las muestras por lo que la sensibilidad alcanzada se encuentra beneficiada notablemente por las condiciones de enriquecimiento selectivo (Margot *et al.*, 2015).

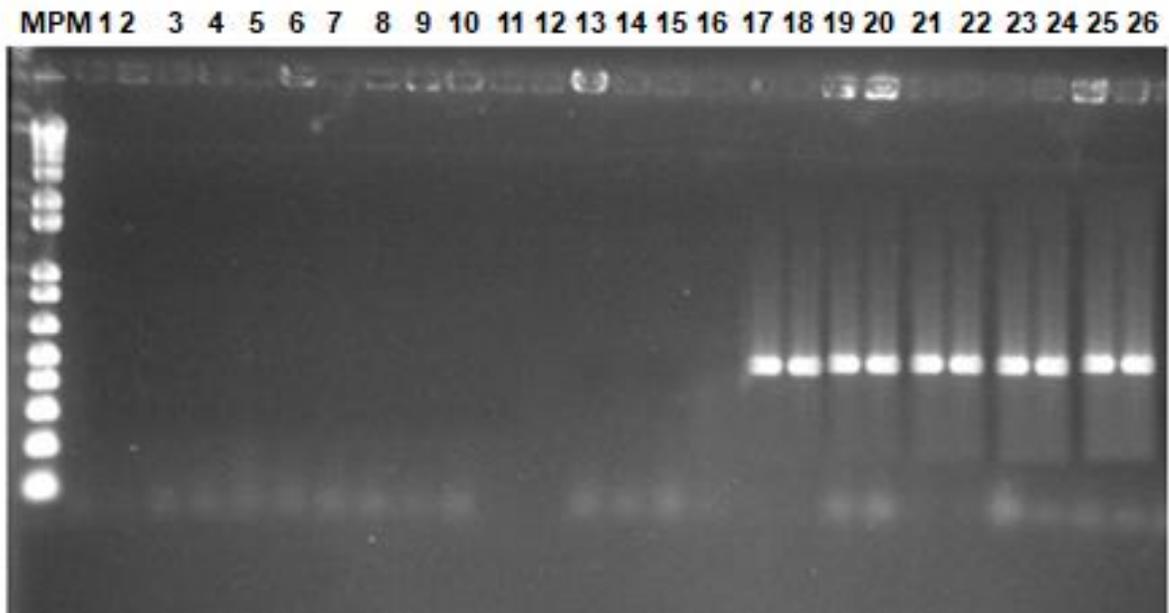


Figura 20. Evaluación de la especificidad de los iniciadores de *Shigella* para el gene *ipaH*. Se muestran 10 cepas exclusivas del género *Salmonella* y 6 de ECEH. Las cepas 10 inclusivas fueron del género *Shigella*. MPM: 100 pb

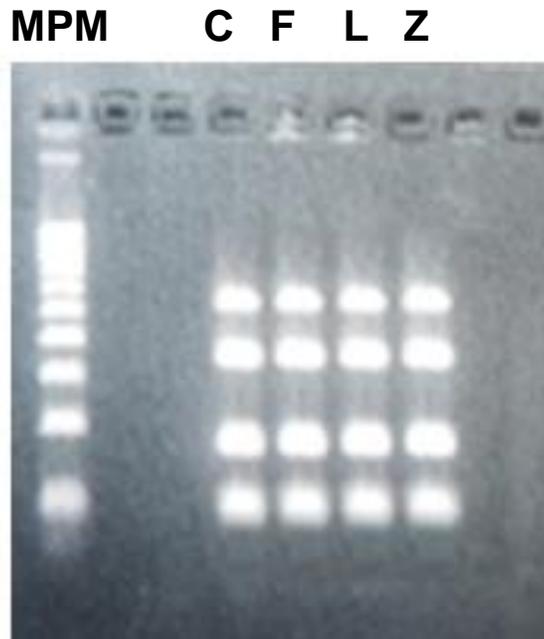


Figura 21. Detección de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH en cilantro (C), fresa (F), lechuga (L) y zarzamora (Z). La temperatura de alineamiento fue de 60°C y la concentración de los indicadores de 0.2 μ M. El marcador de peso molecular (MPM) es de 100 pb.

Hasta este punto la amplificación de los 3 tipos de microorganismos se logró con un 100% de especificidad y una sensibilidad de 1-10 UFC. Posteriormente, se realizó la estandarización con la cepa de MNV-1 para realizar la prueba de detección múltiple de los norovirus y las bacterias entéricas patógenas. Para esta parte se utilizó la metodología reportada por la Comisión Europea para el programa de monitoreo de norovirus. El procedimiento que utiliza es el ISO / TS15216-1: 2013, que es un protocolo alternativo validado para ISO16140. Sin embargo, estas metodologías solo se centran en la detección de norovirus, que es una acción limitada para determinar la diversidad de microorganismos patógenos que podrían estar presentes de manera simultánea. Por lo tanto, el objetivo principal para esta parte fue generar una técnica de

detección múltiple de PCR precisa y replicativa para norovirus y las bacterias entéricas patógenas. Para ese propósito, la selección del par de iniciadores para la detección fue una etapa crítica. La sensibilidad alcanzada por la técnica desarrollada fue de 10-100 UFP para MNV-1 y 1-10 UFC para cada una de las bacterias entéricas patógenas, independientemente de la matriz alimentaria. Los productos de PCR para *Salmonella*, *Shigella* y ECEH fueron 190 pb, 407 pb, 638 pb y 94 pb, respectivamente, y para norovirus 109 pb (Figura 22). Los productos de PCR fueron secuenciados y los números de acceso son los siguientes: MW768703 (*InvA*), MW422896 (*IpaH*), MW768704 (*Stx1*) y MW768705 (*Stx2*). Aunque uno de los fragmentos de ECEH estaba demasiado cerca del producto de MNV-1, el problema se resolvió utilizando 2.5% de geles de agarosa y realizando la electroforesis a 50 V durante 90 min. Otros autores han logrado resultados similares desarrollando PCR multiplex modificando la concentración de agarosa, el diseño del iniciador (FDA, 2018), los componentes en el volumen de reacción final y el tipo de colorante para detectar bajas concentraciones del producto de PCR (Tsuji *et al.*, 2018). El protocolo de la Comisión Europea recomienda el uso del mini kit QIAGEN RNEasy para extracción y purificación de ARN, el kit de transcripción inversa OMNISCRIPT de QIAGEN y la mezcla PCR multiplex de QIAGEN para la amplificación. Siguiendo este protocolo, las muestras se diluyen hasta 100 veces de la alícuota inicial (FDA, 2018; CDC, 2022). Eso implica que, teóricamente, 100 UFP es la cantidad más baja que la técnica puede detectar. El límite de detección de norovirus por RT-qPCR reportado en las curvas de calibración es de 10^2 copias de cADN / mL y los límites de detección son similares a los reportados para los ensayos de detección de las bacterias (Arunrut *et al.*, 2018; FDA, 2018). Para este caso, modificamos el protocolo resuspendiendo el ARN extraído en 10 μ L de agua libre de nucleasas en lugar de 30 o 50 μ L, que recomienda el kit QIAGEN. Luego tomamos 5 μ L del ARN concentrado y la etapa de transcripción inversa se realizó en una reacción de volumen final de 10 μ L. Para la amplificación, tomamos 5 μ L del cADN de norovirus (650 ng/ μ L), 3 μ L del ADN de las bacterias entéricas patógenas (600 ng/ μ L), 2.5 μ L para todos los

iniciadores y 5 μ L de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix para alcanzar un volumen final de reacción de 15.5 μ L. En total, el protocolo modificado nos permite detectar teóricamente tan solo 4 copias de ADN (en la práctica, 40 copias de ADN), lo que significa que es 25 veces más sensible que el protocolo regular; con la ventaja de que es capaz de detectar simultáneamente 1-10 UFC de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH desde la misma porción de muestra, ahorrando tiempo y reduciendo costos. Otras estrategias (MALDI-ToF-MS) han sido capaces de detectar bacterias patógenas en 18 h, pero son pruebas individuales y no incluyen agentes virales (Thouvenot *et al.*, 2018). La cantidad de norovirus en productos frescos suele ser muy baja (CDC, 2022), por lo tanto, es necesario mejorar de la sensibilidad de las técnicas de detección.

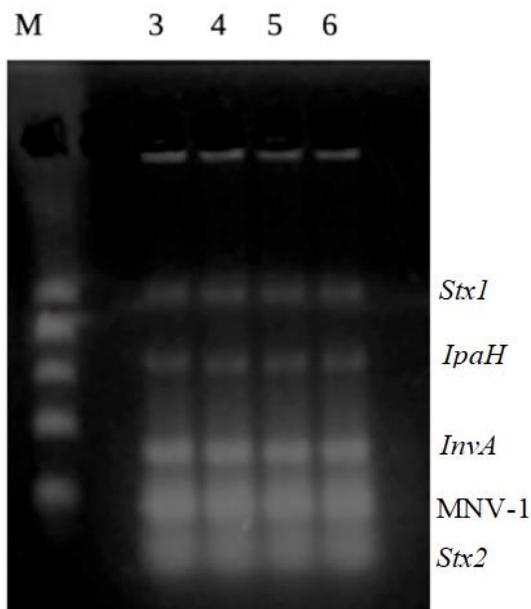


Figura 22. Detección de norovirus (MNV-1), *Salmonella*, *Shigella* y ECEH en cilantro (3), lechuga (4), zarzamora (5) y fresa (6). La temperatura de alineamiento fue de 60°C y la concentración de los iniciadores de 0.2 μ M. El marcador de peso molecular (MPM) es de 100 pb.

VIII.4 Detección de MNV-1, *Salmonella*, *Shigella* y ECEH y cuantificación de bacterias mesófilas aerobias, enterobacterias y *E. coli* en cilantro, fresa, lechuga y zarzamora.

Se analizaron 50 muestras de cilantro, 50 de lechuga, 50 de zarzamora, y 50 de fresa. Para las muestras de fresa se presentaron 2 pruebas positivas para norovirus (4%) y 1 muestra positiva para ECEH (2%). La concentración de *E. coli* fue de <1.8 NMP/g para fresa, lechuga y zarzamora, y 3 NMP/g para cilantro. Para las bacterias mesófilas aerobias la concentración fue de 2.93 a 6.16 Log₁₀ UFC/g y para las enterobacterias fue de 1.39 a 4.58 Log₁₀ UFC/g en los 4 tipos de alimentos (Cuadro 4). La fresa y la lechuga suelen consumirse en fresco por lo que no requieren tratamientos térmicos para su descontaminación, y los procesos de desinfección pueden no ser efectivos. Adicionalmente, se encuentran expuestos al ambiente durante su crecimiento y suelen ser manipulados poscosecha. Por lo que la presencia de norovirus y otros patógenos es más probable que en alimentos sometidos a tratamientos de descontaminación más intensos. En un estudio similar norovirus estuvo presente en 9.09% de las muestras de verdolagas y en 16.66% de las muestras de perejil. Los investigadores concluyeron que el uso de agua contaminada e inadecuada manipulación de los alimentos, fueron componentes medulares en la contaminación de las muestras (Parada-Fabián *et al.*, 2016). También, se ha observado que norovirus puede persistir hasta por 10 días en lechuga en refrigeración (Sánchez y Bosch, 2016; Mormann *et al.*, 2010; Lamhoujeb *et al.*, 2008). En espinaca norovirus incrementó su estabilidad por la presencia de BMA (Esseili *et al.*, 2016; Almand *et al.*, 2019). Por lo que norovirus tiene la capacidad de mantenerse presente por un cierto tiempo en las frutas y hortalizas. En otro estudio en el Reino Unido norovirus se encontró presente en el 5.3% de las muestras de lechuga, 2.3% en fresa y 3.6% en fresa congelada. El estudio duró 13 meses, y se analizaron 1152 muestras en total. Por lo anterior, las frutas y

hortalizas para consumo en fresco son un importante vehículo de norovirus a humanos en el mundo (Cook *et al.*, 2019).

Cuadro 3. Concentración de bacterias mesófilas aerobias (BMA), enterobacterias y *E. coli* y presencia/ausencia de norovirus, *Salmonella*, *Shigella* y ECEH en cilantro, lechuga, zarzamora y fresa.

Alimento	BMA Log ₁₀ UFC/g	Enterobacterias Log ₁₀ UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	Norovirus*	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	ECEH
Cilantro	5.67±0.49	4.3±0.28	<1.8	0/50	0/50	0/50	0/50
Lechuga	4.12±0.58	3.1±0.33	<1.8	0/50	0/50	0/50	1/50
Zarzamora	3.18±0.25	1.8±0.41	<1.8	0/50	0/50	0/50	0/50
Fresa	4.22±0.72	2.14±0.30	3	2/50	0/50	0/50	0/50

*Muestras positivas/muestras negativas

VIII.5 Determinación de la diversidad genética de los norovirus detectados en las muestras de cilantro, fresa, lechuga y zarzamora, y su comparación con los principales genotipos reportados en las bases de datos NoroNet, CalciNet, Norovirus Typing Tool y NCBI.

Los segmentos amplificados del marco de lectura 2 de las 2 cepas de norovirus que fueron detectadas y recuperadas de fresa se procesaron mediante el Kit DNA clean and concentrator Zymo Research de acuerdo a las indicaciones del fabricante para purificar y concentrar el material genético de las partículas virales. Brevemente, los productos de PCR se mezclaron con una solución amortiguadora de unión para poder ser retenidos en la columna de filtración. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm/1 min. La columna se lavó en 2 ocasiones con la solución amortiguadora de lavado y en cada ocasión se centrifugó a 10,000 rpm/1 min. Finalmente, el material genético se retiró mediante

la solución amortiguadora de elución y se envió en condiciones de congelación para ser secuenciado. La metodología Sanger fue utilizada para la secuenciación del marco de lectura 2 de las partículas virales, mediante la plataforma AB3730 DNA analyzer, Thermo Fischer Scientific. El proceso fue realizado en el Langebio, Cinvestav, unidad Irapuato, México. Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas mediante la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la herramienta Norovirus typing tool (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>). Los resultados se muestran en la Figura 23, 24, para el GI.1 y 25 y 26 para el GI.3.

Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query Cover
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/ES/2020/GI_1[P1]/4036_Valencia_nonstructural_polyprotein_RdRp_region_(ORF1)_and_VP1_(ORF2)_genes...	Norovirus GI	NA	122928	592	592	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate BA81265_nonstructural_polyprotein_(ORF1)_gene_partial_cds_and_VP1_(ORF2)_and_VP2_(ORF3)_genes_com...	Norovirus GI	NA	122928	592	592	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate ESP20695_nonstructural_polyprotein_(ORF1)_gene_partial_cds_and_VP1_(ORF2)_and_VP2_(ORF3)_genes_co...	Norovirus GI	NA	122928	592	592	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/SP/2020/GI_1[P1]/4023_Valencia_nonstructural_polyprotein_RdRp_region_(ORF1)_and_VP1_(ORF2)_genes...	Norovirus GI	NA	122928	586	586	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate G19-003_nonstructural_polyprotein_(ORF1)_gene_partial_cds_VP1_(ORF2)_gene_complete_cds_and_VP2_(OR...	Norovirus GI	NA	122928	586	586	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate SCD1044_1_nonstructural_polyprotein_(ORF1)_gene_partial_cds_and_VP1_(ORF2)_and_VP2_(ORF3)_genes_c...	Norovirus GI	NA	122928	586	586	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate G19-002_nonstructural_polyprotein_(ORF1)_gene_partial_cds_VP1_(ORF2)_gene_complete_cds_and_VP2_(OR...	Norovirus GI	NA	122928	580	580	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate G19-001_nonstructural_polyprotein_(ORF1)_gene_partial_cds_VP1_(ORF2)_gene_complete_cds_and_VP2_(OR...	Norovirus GI	NA	122928	580	580	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate 20171211_AS_06_GI.P1_GI.1_nonstructural_polyprotein_RdRp_region_(ORF1)_and_VP1_(ORF2)_genes_parti...	Norovirus GI	NA	122928	577	577	99%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate 20180420_AME_03_GI.P1_GI.1_nonstructural_polyprotein_RdRp_region_(ORF1)_and_VP1_(ORF2)_genes_p...	Norovirus GI	NA	122928	577	577	99%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate 20191213_AM_04_GI.1_VP1_(ORF2)_gene_partial_cds	Norovirus GI	NA	122928	571	571	94%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate CN-2019-22_1st_GI.1_VP1_(ORF2)_gene_partial_cds	Norovirus GI	NA	122928	569	569	95%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate CUHK-NS-2021_nonstructural_polyprotein_RdRp_region_(ORF1)_and_VP1_(ORF2)_genes_partial_cds	Norovirus GI	NA	122928	568	568	93%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate 20171103_AS_01_GI.1_VP1_(ORF2)_gene_partial_cds	Norovirus GI	NA	122928	566	566	94%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate 20180420_AME_04_GI.1_VP1_(ORF2)_gene_partial_cds	Norovirus GI	NA	122928	566	566	94%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate 20180221_AME_01_GI.1_VP1_(ORF2)_gene_partial_cds	Norovirus GI	NA	122928	566	566	94%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate 20171213_AME_03_GI.1_VP1_(ORF2)_gene_partial_cds	Norovirus GI	NA	122928	566	566	94%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate 20171023_AME_01_GI.1_VP1_(ORF2)_gene_partial_cds	Norovirus GI	NA	122928	566	566	94%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate 20190430_DE_02_GI.1_VP1_(ORF2)_gene_partial_cds	Norovirus GI	NA	122928	566	566	94%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate 20181214_ASE_03_GI.1_VP1_(ORF2)_gene_partial_cds	Norovirus GI	NA	122928	566	566	94%

Figura 23. Porcentaje de similitud de la cepa 1 de norovirus proveniente de fresa con las secuencias de la base de datos del NCBI.

Norovirus Genotyping Tool Results

You may bookmark this page to revisit results of this job (461574500) later.

Name	Length	Family Genus Genogroup	BLAST score	polymerase	capsid	Report	genome
HuNoV_GI.1	329	Caliciviridae Norovirus GI	91.489365			Report	

Figura 24. Genotipificación de la cepa 1 de norovirus proveniente de fresa mediante la herramienta Norovirus typing tool.

Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query Cover
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW2045/2805/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW2045/2804/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW2045/2018/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW2010/2018/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW2005/2018/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW1709/2018/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW1702/2018/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW1504/2018/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW0512/2018/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW0222/2018/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW0214/2018/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW2923/2016/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW2814/2016/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW2812/2016/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI isolate Hu/GI.3/TW1512/2016/TWN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes .partial cds	Norovirus GI	NA	122928	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI.3 Hu/GI/JP/2015/GI.3/FS114-2015 POL_VP1 genes for nonstructural polyprotein_capsid protein VP1 .partial cds	Norovirus GI.3	NA	647516	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI.3 Hu/GI/JP/2015/GI.3/FE59-2015 POL_VP1 genes for nonstructural polyprotein_capsid protein VP1 .partial cds	Norovirus GI.3	NA	647516	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI.3 Hu/GI/JP/2015/GI.3/FE47-2015 POL_VP1 genes for nonstructural polyprotein_capsid protein VP1 .partial cds	Norovirus GI.3	NA	647516	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI.3 Hu/GI/JP/2015/GI.3/FE29-2015 POL_VP1 genes for nonstructural polyprotein_capsid protein VP1 .partial cds	Norovirus GI.3	NA	647516	599	599	100%
<input checked="" type="checkbox"/> Norovirus GI.3 Hu/GI/JP/2015/GI.3/FE2-2015 POL_VP1 genes for nonstructural polyprotein_capsid protein VP1 .partial cds	Norovirus GI.3	NA	647516	599	599	100%

Figura 25. Porcentaje de similitud de la cepa 2 de norovirus proveniente de fresa con las secuencias de la base de datos del NCBI.

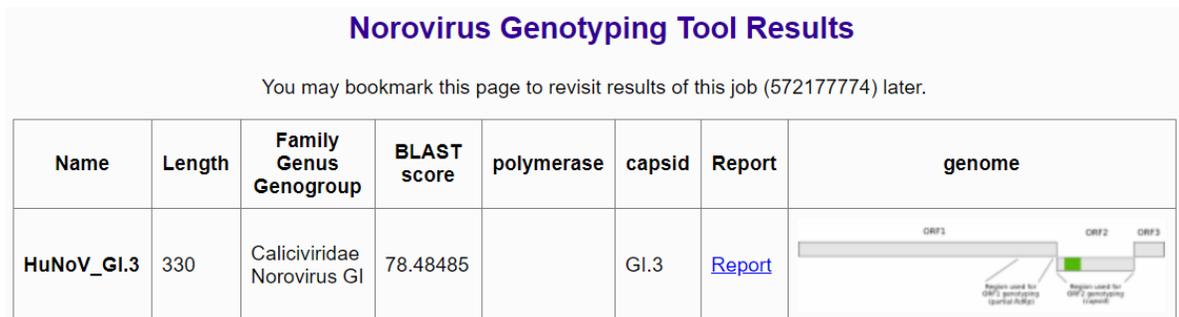


Figura 26. Genotipificación de la cepa 2 de norovirus proveniente de fresa mediante la herramienta Norovirus typing tool.

El análisis de la cepa 1 mostró que es una variante del genogrupo I y genotipo 1 (GI.1). Para la cepa 2 el genogrupo también es el I pero el genotipo es el 3 (GI.3). El genogrupo GII genotipo 4 es el responsable del 70 - 80% de los casos de enfermedad por consumo de alimentos en el mundo (Bae *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2015; NoroNet, 2017). Otros genotipos frecuentes en el mundo son el GII.1, GII.2, GII.3, GII.5, GII.6, GII.7, GII.8, GII.10, GII.12, GII.13, GII.14, GII.15 y

GII.25. Los genotipos GII.P17 y GII.P16.GII.P2 se han vuelto predominantes particularmente en algunas partes de Asia y Alemania respectivamente. (Bae *et al.*, 2011; De Graaf *et al.*, 2015; Niendorf *et al.*, 2017; Moore y Jaykus, 2018). El genogrupo GI (GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GI.5, GI.6, GI.7 y GI.9) también es responsable de casos de enfermedad por consumo de alimentos pero en una proporción mucho menor al genogrupo GII (Calcinet 2017; NoroNet 2017). En un estudio realizado en Estados Unidos del año 2009 al 2015, se determinó que las variantes GII.4 (52%), GII.6 (9%) and GI.3 (8%) fueron las principales en brotes de enfermedad por consumo de alimentos (Marsh *et al.*, 2018). La elevada abundancia de las variantes del GII es en parte por su alta capacidad infectiva (Hasing *et al.*, 2019). Esto implica que al tener gran capacidad de contagio, la variante GII.4, tiene mayor probabilidad de estar presente en un mayor número de huéspedes y ser liberada al ambiente en mayor proporción que la variante GI. Aunque este fenómeno se encuentra reportado, la participación de otros factores como la capacidad de permanecer por largos períodos en una superficie o alimento puede ser otro factor de relevancia. Existen estudios sobre la estabilidad de norovirus en superficies y alimentos, pero recientemente se han descubierto nuevos factores que podrían modular este fenómeno y no han sido estudiados con profundidad. (Almand *et al.*, 2019; Samandougou *et al.*, 2015). Los carbohidratos tipo HBGA podrían contribuir a la estabilidad de los norovirus. La estabilidad de los norovirus depende de la rigidez de la cápside proteica, que se encuentra codificada en el genoma del virus. Por este motivo, inicialmente se generaron árboles filogenéticos con la intención de comparar la secuencia nucleotídica de los norovirus GI.1 y GI.3 con la de otros norovirus del mismo genogrupo y genotipo presentes en las bases de datos y determinar si existen grandes diferencias (Figura 27 y 28). En ambos casos se observó una alta variabilidad entre las cepas, siendo más cercanas solamente a una variante en cada caso. Por lo que es necesario realizar un análisis más profundo de los cambios que experimentan los norovirus con el objetivo de determinar su efecto en la estabilidad de los alimentos. Adicionalmente, la variación estacional advierte una mayor incidencia

en los meses de enero a junio y octubre a diciembre en Europa. De enero a febrero y mayo a diciembre en Africa. Todo el año en Asia, principalmente en los meses de septiembre a diciembre, incluyendo enero y febrero. Y de enero a diciembre en Australia principalmente en los meses de enero y febrero y septiembre a diciembre (NoroNet, 2017). La incidencia es por tanto más frecuente en los meses de frío.

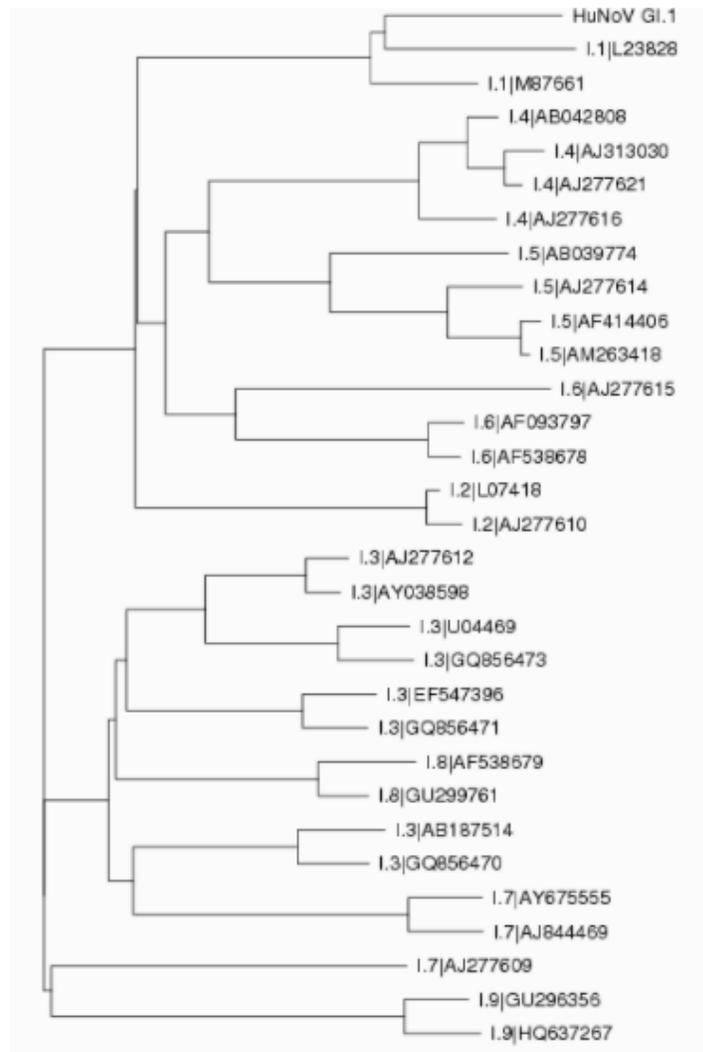


Figura 27. Dendrograma de similitud de la cepa GI.1 de norovirus proveniente de fresa con las secuencias de la base de datos del Norovirus typing tool.

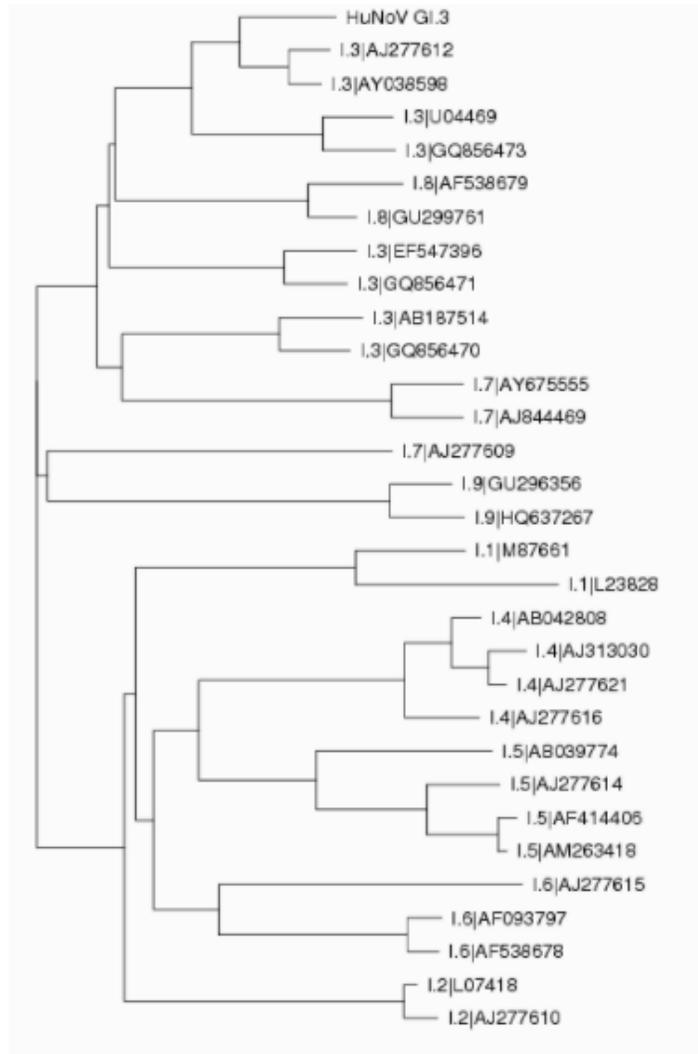


Figura 28. Dendrograma de similitud de la cepa GI.3 de norovirus proveniente de fresa con las secuencias de la base de datos del Norovirus typing tool.

Finalmente, las secuencias fueron registradas en la base de datos del NCBI. Los números de acceso son: MZ224458 y MZ227012 para la variante GI.1 y GI.3 respectivamente. Las secuencias se muestran en la figura 29 y 30 para GI.1 y GI.3. En nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que se realiza sobre detección de norovirus en fresa en Querétaro, México.

Norovirus GI isolate OHH1 nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, partial cds

GenBank: MZ224458.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

```
LOCUS       MZ224458                329 bp    RNA        linear   VRL 23-MAY-2021
DEFINITION  Norovirus GI isolate OHH1 nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1
            (ORF2) genes, partial cds.
ACCESSION   MZ224458
VERSION     MZ224458.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Norovirus GI
  ORGANISM  Norovirus GI
            Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes;
            Picornavirales; Caliciviridae; Norovirus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 329)
  AUTHORS   Hernandez,O. and Medrano,S.M.
  TITLE     Multiple Detection of Human Norovirus, Salmonella spp., Shigella
            spp., and Shiga toxin Producing Escherichia coli from Fresh Produce
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 329)
  AUTHORS   Hernandez,O. and Medrano,S.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (18-MAY-2021) FOOD MICROBIOLOGY, University of Queretaro,
            CERRO DE LAS CAMPANAS S/N CENTRO UNIVERSITARIO, QUERETARO,
            QUERETARO DE ARTEAGA 76010, Mexico
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..329
                     /organism="Norovirus GI"
                     /mol_type="genomic RNA"
                     /isolate="OHH1"
                     /host="strawberry"
                     /db_xref="taxon:122928"
                     /country="Mexico: Queretaro"
                     /collection_date="01-Oct-2020"
                     /collected_by="Omar Hernandez"
     gene             <1..32
                     /gene="ORF1"
     CDS              <1..32
                     /gene="ORF1"
                     /codon_start=3
                     /product="nonstructural polyprotein"
                     /protein_id="QVK82078.1"
                     /translation="PEFVNDGCV"
     gene             16..>329
                     /gene="ORF2"
     CDS              16..>329
                     /gene="ORF2"
                     /note="major capsid protein"
                     /codon_start=1
                     /product="VP1"
                     /protein_id="QVK82079.1"
                     /translation="MMWASKDATSNVDGASGAGQLVPEANTS DPLAMPVAGSSTAVA
            TAGQVNPIDPWIINNFVQAPQGEFTISPINTPGDVLFDSLGLPHLNPFLHLHSQMYNG
            WVG"
ORIGIN
1  tgcccgaatt  cgtaaatgat  gatggcgtct  aaggacgcta  cgtaaacgt  ggatggcgcc
61  agcggcgtgt  gtcagttggt  accggaggct  aatacttctg  acccccttgc  aatggatcct
121  gtagcggggt  cttcgacagc  ggttcgact  gctggacaag  taaaccccat  tgatccttgg
181  ataattaaca  atttgtgca  agctcccaa  ggggaattta  caatctccc  aaataatacc
241  cccggtgatg  ttttatttga  tctgagtta  ggtcccatc  ttaaccctt  cttgtctacat
301  ctgtcaca  tgtacaatgg  ctgggttgg
```

Figura 29. Secuencia FASTA de la proteína VP1 del ORF2 de norovirus GI.1.

Norovirus GI isolate OHH2 nonstructural polyprotein, RdRp region, (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, partial cds

GenBank: MZ227012.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

```

LOCUS       MZ227012                330 bp    RNA    linear   VRL 23-MAY-2021
DEFINITION  Norovirus GI isolate OHH2 nonstructural polyprotein, RdRp region,
            (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, partial cds.
ACCESSION   MZ227012
VERSION     MZ227012.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Norovirus GI
  ORGANISM  Norovirus GI
            Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes;
            Picornavirales; Caliciviridae; Norovirus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 330)
  AUTHORS   Hernandez,O. and Medrano,S.M.
  TITLE     Multiple Detection of Human Norovirus, Salmonella spp., Shigella
            spp., and Shiga toxin Producing Escherichia coli from Fresh Produce
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 330)
  AUTHORS   Hernandez,O. and Medrano,S.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (18-MAY-2021) FOOD MICROBIOLOGY, University of Queretaro,
            CERRO DE LAS CAMPANAS S/N CENTRO UNIVERSITARIO, QUERETARO,
            QUERETARO DE ARTEAGA 76010, Mexico
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..330
                     /organism="Norovirus GI"
                     /mol_type="genomic RNA"
                     /isolate="OHH2"
                     /host="strawberry"
                     /db_xref="taxon:122928"
                     /country="Mexico: Queretaro"
                     /collection_date="01-Oct-2020"
                     /collected_by="Omar Hernandez"
     gene              1..330
                     /note="genotype: GI.3"
                     /gene="ORF1"
     CDS                1..330
                     /gene="ORF1"
                     /codon_start=1
                     /product="nonstructural polyprotein"
                     /protein_id="QV_L01094.1"
                     /translation="LPDYVNDGV"
     mat_peptide        1..30
                     /gene="ORF1"
                     /product="RdRp"
     gene              17..>330
                     /gene="ORF2"
     CDS                17..>330
                     /gene="ORF2"
                     /note="major capsid protein"
                     /codon_start=1
                     /product="VP1"
                     /protein_id="QV_L01095.1"
                     /translation="MMWASKDAPTNMDGTSGAGQLVPEANTAEPISMEPVAGAATAAA
            TAGQVWIMIDPWIMWNYLQAPQGEFTISPWNTPGDILFDLQGPLNPFLLSHLAQMYYNG
            WVG"
ORIGIN
1 ctgcccatt atgtaaatga tgatgctc taaggacgcc ccaacaaca tggatggcac
61 cagtgtgcc gccagctgg taccagaggc aaatacagct gagcctatat caatggagcc
121 cgtggctggg gcagcaacag ctgccgtac tgctggccaa gtaaatatga ttgacccctg
181 gataatgaac aattatctac aggcccccac aggtgaattt accatctgc ctaataaac
241 accagtgat atttgtttg atttacaatt aggcccccac ctaaacctt tcttatctca
301 tttggcccaa atgtataatg gttgggttgg
..

```

Figura 30. Secuencia FASTA de la proteína VP1 del ORF2 de norovirus GI.3.

VIII.6 Determinación del perfil de aminoácidos de la cápside proteica de norovirus, virus de la hepatitis A, y parvovirus y establecer si existe alguna asociación con su estabilidad en las frutas y hortalizas.

Como se mencionó previamente los norovirus detectados en el presente proyecto (GI.1 y GI.3) muestran una enorme variabilidad respecto a los norovirus reportados en la base de datos del NCBI y Norovirus typing tool. Los norovirus experimentan grandes cambios en su material genético por diversas razones. La baja fidelidad de la polimerasa RdRp, recombinación de varias variantes del mismo virus, reagrupamiento del material genético, la velocidad de replicación y las características del huésped, entre otros (Nilsson *et al.*, 2003; Regoes *et al.*, 2013). La mayoría de los cambios se acumulan en el segmento ORF2, particularmente, la región que codifica para la proteína VP1 (Hong y Smith, 2019). La proteína VP1 es la región más externa de la cápside proteica que le permite a los norovirus establecer el proceso de infección a través de la unión a carbohidratos presentes en las bacterias comensales y la superficie de la pared intestinal. Adicionalmente, le permiten evadir la respuesta inmune del cuerpo humano (Green, 2020; Donaldson *et al.*, 2010). La variante GII.4 es el genotipo con la mayor capacidad de cambio genético. También, es la cepa más frecuente en el mundo. Por lo que se sugiere que la mayor diversidad genética resulta en una mayor capacidad para persistir en nuevos ambientes. Más aún, se ha observado la presencia de mutaciones no sinónimas en la región más externa de la proteína VP1, lo cual indica que estos cambios pueden presentarse con el objetivo de evadir la respuesta inmune (Bull *et al.*, 2010). Desde otro ángulo, estos cambios también pueden afectar la estabilidad de los norovirus en las frutas y hortalizas. Para intentar establecer una relación entre el perfil de aminoácidos y la estabilidad de los norovirus en las frutas y hortalizas se procedió a traducir la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína VP1 mediante el software MEGA-X (Figura 31). Para el análisis se consideraron 6 grupos de aminoácidos: hidrofóbico, hidrofílico, con cadena lateral corta, con ruptura de la cadena

secundaria, ramificado y ramificado con anillo aromático (Snowden *et al.*, 2020). Se determinó la abundancia de cada uno de los grupos de aminoácidos con el objetivo de conocer su capacidad de interactuar con moléculas polares, no polares, su flexibilidad y rigidez y la capacidad de polarizarse negativa y positivamente (Smith y Smith, 2019; Snowden *et al.*, 2020). Primariamente se compararon los perfiles de los norovirus aislados en el presente proyecto (GI.1, GI.3) con los norovirus reportados en las bases de datos del NCBI. Se incluyó al GII.4 como perfil de referencia al ser la variante más frecuente en todo el mundo (Cuadro 4). Las variantes GI.3 y GII.4 cuentan con mayor proporción de aminoácidos hidrofílicos que las variantes GI.1, lo que les permite interactuar con el agua mediante puentes de hidrógeno que contribuyen a la estabilidad de la partícula viral. La proporción de aminoácidos hidrofóbicos es menor en la variante GII.4. Al ser la variante más frecuente en todo el mundo, la presencia de aminoácidos hidrofóbicos podría indicar una menor estabilidad en los alimentos (Snowden *et al.*, 2020). Particularmente las frutas y hortalizas, cuya actividad de agua suele ser elevada. Los aminoácidos ramificados, particularmente con anillos aromáticos son estructuras químicamente estables, por lo que su presencia se puede asociar con una mayor rigidez de la cápside proteica (Cao *et al.*, 2022). El genotipo GII.4 cuenta con la mayor proporción de este tipo de aminoácidos. Y finalmente, los aminoácidos de cadena corta y ruptura de la cadena secundaria, confieren flexibilidad y un ordenamiento de la estructura proteica más desdoblado. La variante GII.4 posee la menor proporción en ambos tipos de aminoácidos, que químicamente disminuyen la estabilidad de las proteínas que constituyen (Cao *et al.*, 2022). Aunque en términos generales la proporción de aminoácidos entre los genotipos de norovirus evaluados no parece ser tan fuerte, es la mayor presencia de aminoácidos ramificados con anillos aromáticos y la menor presencia de aminoácidos de cadena lateral corta o no ramificados lo que le permite a la variante GII.4 persistir de mejor forma en el ambiente y las frutas y hortalizas (Smith y Smith, 2019; Snowden *et al.*, 2020). Es importante mencionar que en otros tipos de virus el comportamiento sigue la misma tendencia.

Nucleótidos

Aminoácidos

Figura 31. Fragmento de la traducción de la secuencia nucleotídica de los norovirus GI.1 y GI.3 y su alineamiento mediante el software MEGA-X.

Cuadro 4. Perfil de aminoácidos de norovirus a humanos aislados en el presente proyecto y recuperados de la base de datos del NCBI.

Porcentaje de aminoácidos de norovirus					
Fuente	Aislado en el presente proyecto		Base de datos del NCBI		
Número de acceso del NCBI.	GenBank: MZ224458	GenBank: MZ227012	GenBank: AOO95025.1	GenBank: AZJ17766.1	GeneBank: AIV43156.2
Genotipo	GI.1 (%)	GI.3 (%)	GI.1 (%)	GI.3 (%)	GII.4 (%)
Hidrofílico	43.15	44.36	43.77	45.77	45.74
Hidrofóbico	58.73	58.14	59.43	58.46	57.03
Ramificado	29.44	28.75	30.75	28.68	30.37
Ramificado con anillo aromático	8.48	8.67	8.30	8.64	9.81
Cadena lateral corta	9.19	8.70	9.25	8.64	7.22
Ruptura de la cadena secundaria	9.92	9.73	9.81	9.74	9.81

El virus de la hepatitis A, el parvovirus y los priones, son ejemplos de virus con una gran capacidad para resistir diferentes agentes químicos físicos. Muestran una mayor resistencia que los norovirus prácticamente a todos los tratamientos a los que suelen ser sometidos las frutas y hortalizas, exceptuando la congelación (CDC, 2022). Por lo anterior se procedió a comparar el perfil de aminoácidos de los norovirus a humanos con otros perfiles de otros virus con elevada resistencia a agentes físicos y químicos (Cuadro 5). La resistencia más alta reportada en la literatura es para los priones > hepatitis A > parvovirus > norovirus (CDC, 2022). Se observó que la proporción de aminoácidos hidrofílicos sigue la siguiente tendencia: priones > hepatitis A > parvovirus > norovirus. Y la presencia de aminoácidos hidrofóbicos prácticamente la tendencia opuesta: priones y hepatitis A < parvovirus < norovirus. Se repite la misma tendencia de una elevada proporción de aminoácidos hidrofílicos esta relacionada con una mayor estabilidad. La presencia de aminoácidos ramificados no parece generar una gran influencia en la estabilidad, debido a que norovirus cuenta con la mayor proporción, seguido de hepatitis A, los priones y parvovirus (Smith y Smith, 2019; Snowden *et al.*, 2020). En el caso de los aminoácidos ramificados con la presencia de anillos aromáticos la mayor proporción se observó en hepatitis A, seguido de parvovirus, los priones y norovirus. Como ya se mencionó antes, la presencia de anillos aromáticos implica una mayor estabilidad que las cadenas lineales (Smith y Smith, 2019; Snowden *et al.*, 2020). La presencia de aminoácidos de cadena lateral corta que generan flexibilidad en la cápside proteica fue menor en hepatitis A, seguido de norovirus, los priones y parvovirus. De la misma forma que los aminoácidos ramificados no parece tener un efecto tan intenso como los aminoácidos que generan ruptura en la cadena secundaria. En este caso la menor proporción es de los priones, considerablemente distante a los norovirus e incluso parvovirus. La diferencia con hepatitis A es menor. El efecto de la ruptura de la cadena secundaria es el desenrollamiento, que disminuye directamente la resistencia de la estructura proteica. A mayor plegamiento, mayor orden en la estructura proteica y mayor estabilidad. De esta forma las estructuras superenrolladas como la terciaria

y cuaternaria son las más estables (Snowden *et al.*, 2020). La baja presencia de aminoácidos que interrumpen la estructura secundaria e hidrofóbicos, y la elevada concentración de aminoácidos hidrofílicos y de cadena lateral ramificada principalmente con anillos aromáticos, confiere la mayor estabilidad en los virus. (Smith y Smith, 2019).

Cuadro 5. Comparativa del perfil de aminoácidos de norovirus GII.4, parvovirus, priones y el virus de la hepatitis A.

Porcentaje de aminoácidos de norovirus GII.4, parvovirus y el virus de la hepatitis A.				
Número de acceso del NCBI.	GeneBank: AIV43156.2	GeneBank: 2MV9_A	GeneBank: ACD74579.1	GeneBank: QYV98109.1
Tipo de virus	Norovirus GII.4 (%)	Priones (%)	Hepatitis A (%)	Parvovirus (%)
Hidrofílico	45.74	57.33	50.22	48.83
Hidrofóbico	57.03	48	47.98	48.83
Ramificado	30.37	24.66	30.60	22
Ramificado con anillo aromático	9.81	10	11.07	10.59
Cadena lateral corta	7.22	8.66	6.18	8.94
Ruptura de la cadena secundaria	9.81	4	5.26	8.39

VIII.7 Evaluación del efecto de la temperatura, fuerza iónica, pH, presencia de carbohidratos similares a los antígenos del grupo histosanguíneo (HBGA) y la microbiota en la estabilidad de MNV-1 en fresa y lechuga.

La cuantificación de MNV-1 se realizó mediante la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración (Figura 32) de acuerdo a la metodología de la sección (VI.2.5). El comportamiento de MNV-1 a los diferentes tratamientos se muestra en el cuadro 6 y 7. Para la discusión se consideró la población persistente a las 4 h para 22 °C y a las 72 h para 4 °C. Primariamente se evaluó el comportamiento de MNV-1 a pH = 3 y dos niveles de temperatura (4 y 22 °C). A pH = 3 y temperatura de 4 °C los mejores tratamientos fueron el control (5.97 ± 0.01 Log₁₀ UFP) y el tratamiento con la presencia de carbohidratos HBGA (5.99 ± 0.01 Log₁₀ UFP). MNV-1 es estable en pH ácido y en refrigeración, por lo que el aporte de los carbohidratos HBGA a la estabilidad fue mínimo (Sánchez y Bosch, 2016; Bozkurt *et al.*, 2015, Samandoulgou, 2015). MNV-1 no es afectado por el pH ácido debido a la capacidad de los aminoácidos de la cápside proteica de intercambiar iones H⁺ con el ambiente (Almand *et al.*, 2019; Moore *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2010). El tratamiento a 4 °C, pH = 3 y presencia de bacterias mostró la menor población de MNV-1 (5.71 ± 0.01 Log₁₀ UFP) (Figura 33). A pH = 3 la integridad de las bacterias se ve afectada por lo que los compuestos metabólicos generados por la condición de estrés parecen afectar la estabilidad de MNV-1. Este comportamiento se replicó a 22 °C, pH = 3 y presencia de bacterias, donde MNV-1 mostró la mayor reducción de todos los tratamientos (4.66 ± 0.03 Log₁₀ UFP). Al elevar la temperatura, el metabolismo bacteriano se acelera respecto a la temperatura de refrigeración, y se potencializa el efecto inhibitorio del pH ácido (Lee *et al.*, 2015). Por otra parte, los carbohidratos HBGA estabilizaron notablemente a MNV-1 a 22 °C y pH = 3, logrando mantener una concentración de 5.99 ± 0.01 Log₁₀ UFP. El efecto inhibitorio de la elevada temperatura combinada con el pH ácido es equilibrado por la presencia de los carbohidratos HBGA. Existen reportes donde la presencia de algunos polisacáridos han logrado

estabilizar diferentes tipos de virus (Almand *et al.*, 2019). Para el tratamiento control se observó una menor estabilidad ($5.77 \pm 0.02 \text{ Log}_{10} \text{ UFP}$) respecto al mismo tratamiento a 4 °C, por lo que la baja temperatura ejerce un efecto estabilizante en MNV-1. En resumen, MNV-1 fue estabilizado por los carbohidratos HBGA a 22°C y pH = 3 al mismo nivel que el mejor tratamiento en refrigeración.

De forma contrastante, en la evaluación a pH = 8 el tratamiento a 4 °C con la presencia de bacterias ($5.85 \pm 0.01 \text{ Log}_{10} \text{ UFP}$) sostuvo de mejor forma la estabilidad de MNV-1 que el mismo tratamiento pero con la presencia de carbohidratos ($5.83 \pm 0.01 \text{ Log}_{10} \text{ UFP}$). A un pH más cercano a la neutralidad, las bacterias experimentan un efecto menos dañino que en el pH ácido, lo cual contribuye a mantener la integridad de la pared celular y por tanto la posibilidad de interactuar superficialmente con MNV-1. Aunque la diferencia en la estabilidad de MNV-1 con los carbohidratos HBGA a 4 °C y pH = 8 respecto a la presencia de bacterias con el mismo nivel de pH y temperatura no fue muy grande, el pH ejerce un efecto estabilizante en las bacterias que se traduce en una mayor estabilidad en MNV-1. Por lo tanto, podríamos esperar que en un alimento con un nivel de pH más cercano a la neutralidad MNV-1 presentara una mayor estabilidad con la presencia de bacterias respecto al mismo alimento pero con un pH ácido (Sánchez y Bosch, 2016; Almand *et al.*, 2019). El tratamiento control a pH = 8 mostró un comportamiento intermedio ($5.84 \pm 0.01 \text{ Log}_{10} \text{ UFP}$). Y a temperatura ambiente y pH = 8 el efecto estabilizante de las bacterias ($5.60 \pm 0.02 \text{ Log}_{10} \text{ UFP}$) y los carbohidratos HBGA ($5.59 \pm 0.01 \text{ Log}_{10} \text{ UFP}$) fue propiamente el mismo. Por lo que el pH = 8 en conjunto con la presencia de bacterias estabilizó a MNV-1 al mismo nivel que con la presencia de carbohidratos HBGA. Es decir, se presentó un efecto combinado con la presencia de las bacterias. Por su parte, la temperatura de refrigeración ejerce un efecto estabilizante, alcanzando las menores reducciones para MNV-1 de todas las evaluaciones independientemente el tipo de tratamiento (Figura 34 y 35). Al reducir la temperatura los enlaces se fortalecen

debido a que se incrementa su proximidad y disminuye la energía de ruptura de enlace (Snowden, 2020).

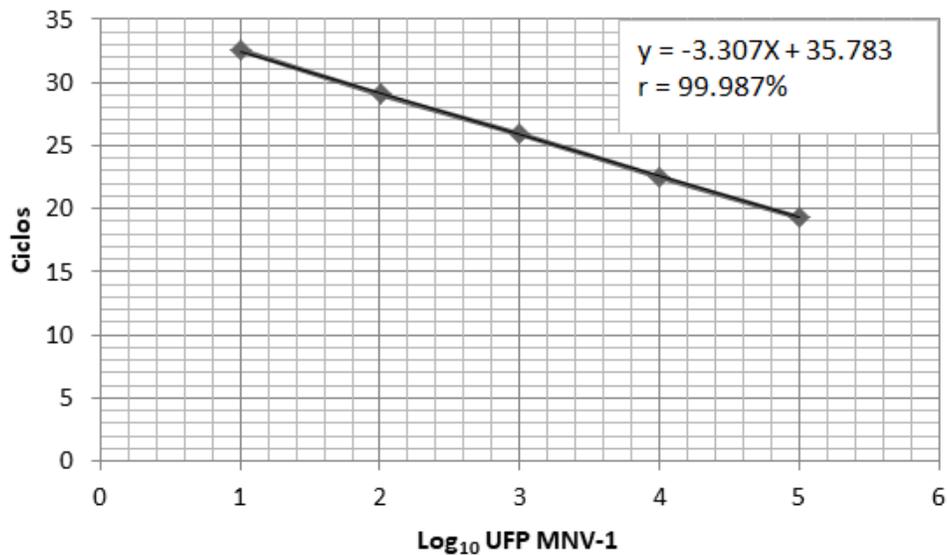


Figura 32. Curva de calibración de MNV-1 por RT-qPCR en la plataforma Rotor Gene de Qiagen utilizando una mezcla SYBR Green Start Jump de Sigma Aldrich.

Cuadro 6. Promedio de la población resistente de MNV-1 (expresada en Log₁₀ UFP) a diferentes niveles de pH, temperatura, microbiota, fuerza iónica y presencia de carbohidratos tipo HBGA en refrigeración.

Temperatura	T = 4 °C					
pH	pH = 3			pH = 8		
Tratamiento	HBGA	<i>E. coli</i> O157:H7	Control	HBGA	<i>E. coli</i> O157:H7	Control
MNV-1 (24 h)	5.99±0.01	5.71±0.01	5.97±0.01	5.84±0.01	5.85±0.01	5.84±0.01
MNV-1 (72 h)	5.99±0.01	5.71±0.01	5.97±0.01	5.83±0.01	5.85±0.01	5.84±0.01

Cuadro 7. Promedio de la población resistente de MNV-1 (expresada en Log₁₀ UFP) a diferentes niveles de pH, temperatura, microbiota, fuerza iónica y presencia de carbohidratos tipo HBGA a temperatura ambiente.

Temperatura	T = 22 °C					
pH	pH = 3			pH = 8		
Tratamiento	HBGA	<i>E. coli</i> O157:H7	Control	HBGA	<i>E. coli</i> O157:H7	Control
MNV-1 (30 min)	5.99±0.01	4.68±0.03	5.78±0.01	5.59±0.01	5.61±0.02	5.69±0.01
MNV-1 (4 h)	5.99±0.01	4.66±0.03	5.77±0.02	5.59±0.01	5.60±0.02	5.68±0.01

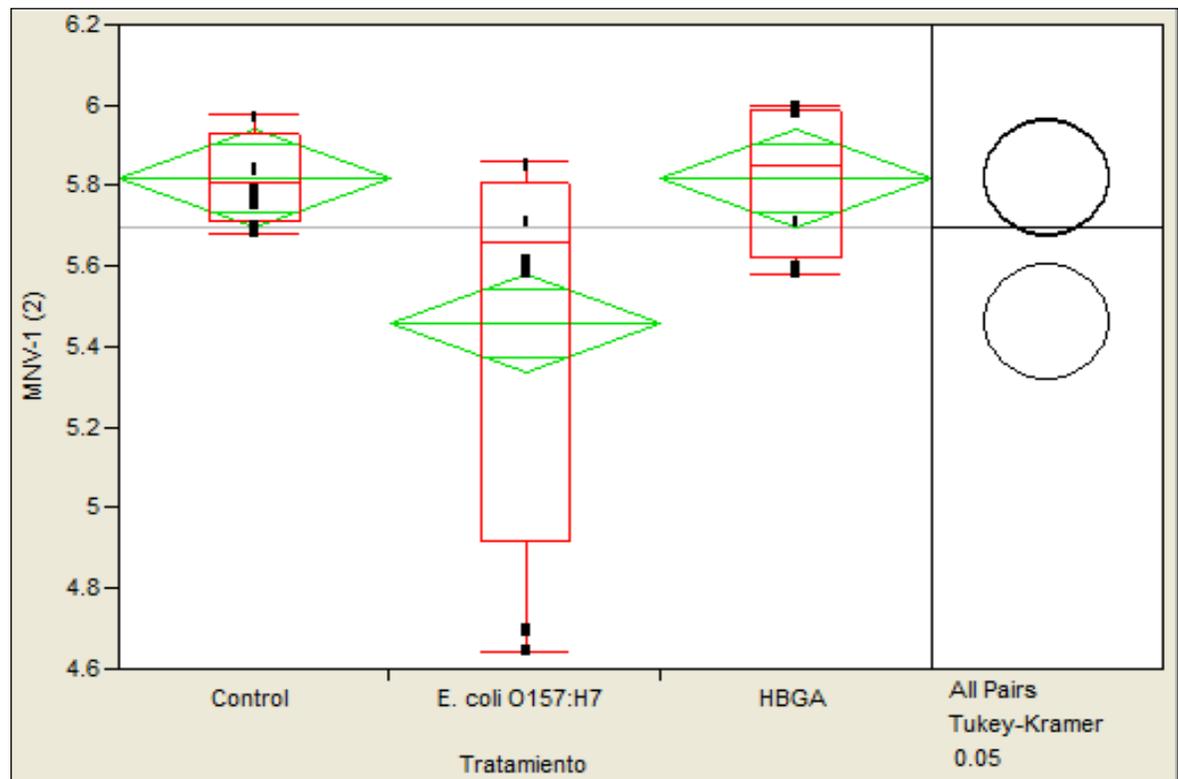


Figura 33. Análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey de los tratamientos evaluados para determinar su efecto en la estabilidad de MNV-1 en un modelo *in vitro*.

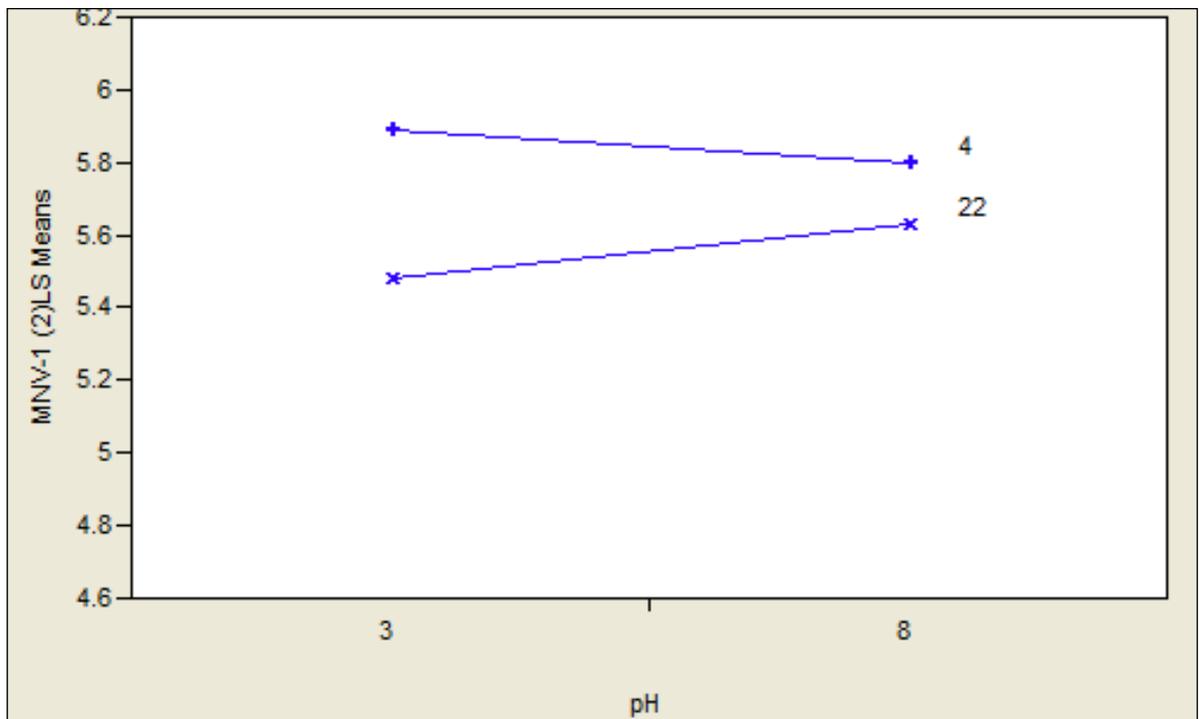


Figura 34. Gráfico de interacción entre el efecto del pH y la temperatura en la estabilidad de MNV-1 en un modelo *in vitro*.

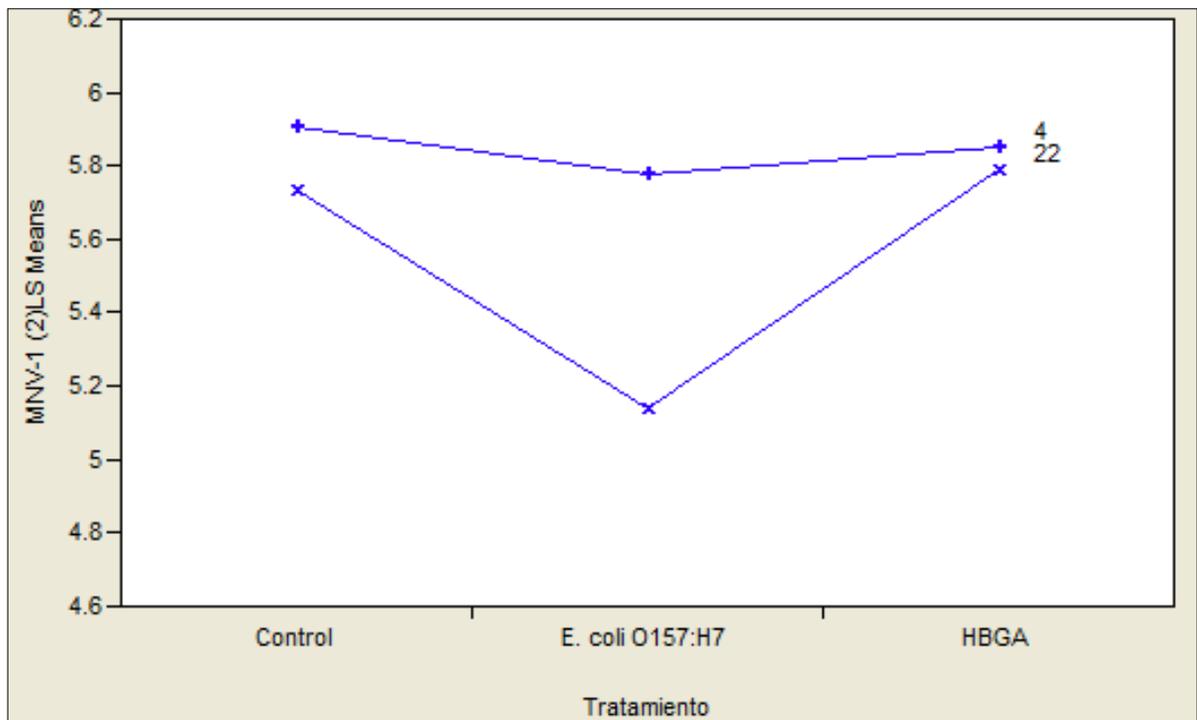


Figura 35. Gráfico de interacción entre el efecto del tipo de tratamiento y la temperatura en la estabilidad de MNV-1 en un modelo *in vitro*.

Los tratamientos a 4 °C y pH = 3 con la presencia de carbohidratos HBGA y el control, mostraron la mayor capacidad estabilizante (Figura 36). El segundo grupo de tratamientos con la mayor capacidad estabilizante fue a 4 °C y pH = 8 con la presencia de *E. coli* O157:H7. El tercer grupo fue a 22 °C, pH = 3 y 8, con la presencia de carbohidratos HBGA y el control. Los carbohidratos HBGA ejercen un mayor efecto a temperatura ambiente que en condiciones de refrigeración. Finalmente, los tratamientos a 4 °C y 22 °C, pH = 3 y 8, con la presencia de *E. coli* O157:H7 mostraron en términos generales el menor efecto protector.

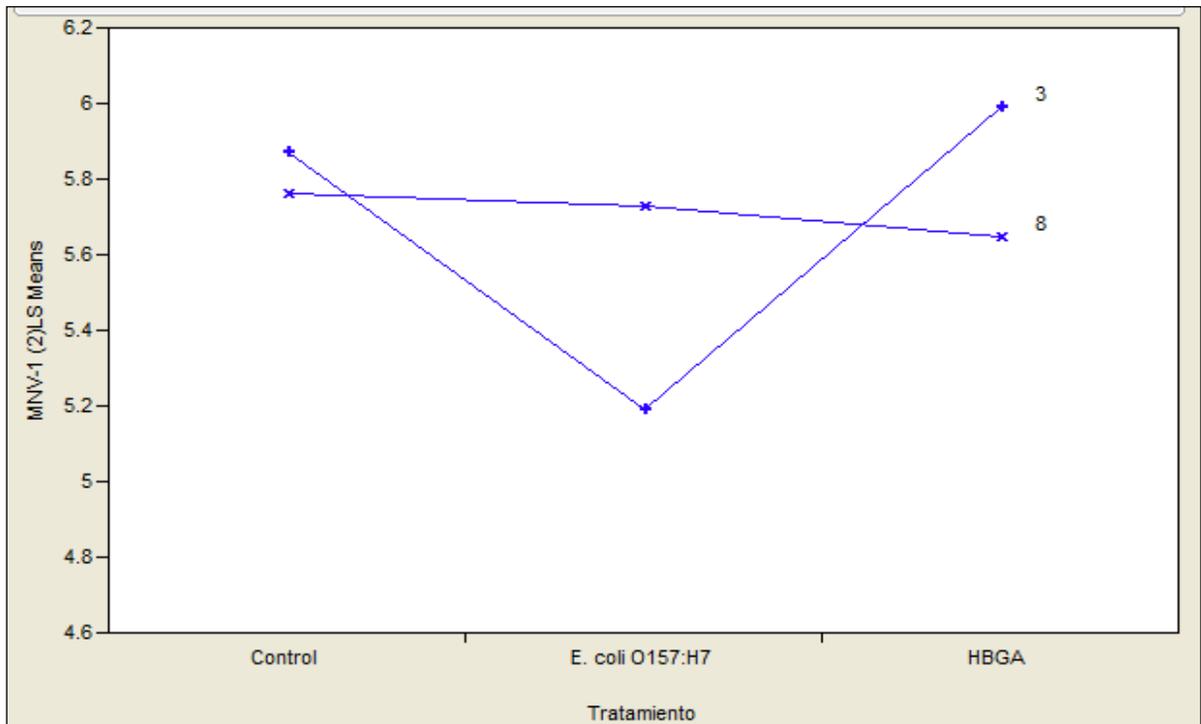


Figura 36. Gráfico de interacción entre el efecto del tipo de tratamiento y el nivel de pH en la estabilidad de MNV-1 en un modelo *in vitro*.

Level		Least Sq Mean
4,3,HBGA,24	A	6.1004167
4,3,HBGA,72	A	6.1001389
4,3,Control,24	A B D	6.0108333
4,3,Control,72	A B C	6.0072222
4,8,E. coli O157:H7,24	A B C D	6.0013889
4,8,E. coli O157:H7,72	A B C D	5.9972222
22,3,HBGA,24	A B C D E	5.8823611
22,3,HBGA,72	A B C D E	5.8770833
4,8,Control,72	A B C D E F	5.8013889
4,8,Control,24	A B C D E G	5.8005556
22,3,Control,24	B C D E F G H	5.7394444
22,3,Control,72	B C D E F G H	5.7358333
22,8,Control,24	B C D E F G H	5.7291667
4,8,HBGA,24	B C D E F G H	5.7251389
4,8,HBGA,72	B C D E F G H	5.7243056
22,8,Control,72	B C D E F G H	5.7222222
22,8,HBGA,24	D E F G H	5.7020833
22,8,HBGA,72	C E F G H	5.6984722
4,3,E. coli O157:H7,24	E F G H	5.5616667
4,3,E. coli O157:H7,72	E F G H	5.5597222
22,8,E. coli O157:H7,24	F H	5.4583333
22,8,E. coli O157:H7,72	G H	5.4530556
22,3,E. coli O157:H7,24	I	4.8252778
22,3,E. coli O157:H7,72	I	4.8166667

Levels not connected by same letter are significantly different

Figura 37: Prueba de Tukey de los tratamientos evaluados para determinar su efecto en la estabilidad de MNV-1 en un modelo *in vitro*. La estructura de los niveles es: temperatura, pH, tratamiento (control, HBGA o *E. coli* O157:H7) y tiempo en su nivel alto y bajo (24 y 72).

En la evaluación de la estabilidad de MNV-1 en la superficie de lechuga y fresa se consideraron los mismos factores en los mismos niveles que en el modelo *in vitro* (Cuadro 8, 9, 10 y 11). El tiempo fue el único factor que se incrementó a 6 h y 24 h a 22 °C y 24 h y 72 h a 4 °C. La estructura proteica de MNV-1 le permite persistir hasta por semanas en superficies vivas e inertes. Son factores como la

temperatura, pH, humedad relativa, microbiota, iones disueltos, radiación, entre otros, los que afectan la estabilidad de MNV-1. En manzana, se observó una reducción de $0.2 \pm 0.76 \text{ Log}_{10}$ UFP cuando fue almacenada a $11 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 días (Mormann *et al.*, 2010). En lechuga se observó una reducción de 0.1 ± 0.15 y 1.78 Log_{10} UFP cuando fue almacenada a $11 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 días y a $7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 días respectivamente (Mormann *et al.*, 2010; Lamhoujeb *et al.*, 2008). La temperatura de refrigeración estabiliza notablemente a las partículas de MNV-1. En fresa no se observó reducción en 7 días de almacenamiento a $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, y a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por el mismo período de tiempo la reducción fue de 0.3 Log_{10} UFP (Sánchez y Bosch, 2016). Una reducción mínima considerando el tiempo de almacenamiento. En zarzamora tampoco se observó reducción en 7 días de incubación a $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, y a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por el mismo período de tiempo se observó una reducción de 0.3 Log_{10} UFP (Sánchez y Bosch, 2016). Enorme estabilidad se observa en las partículas virales de MNV-1 a bajas temperaturas. En salsa de tomate tipo cátsup, no se observó reducción en 58 días a un pH de 4.5 y en ensalada de papa a un pH de 5 a 5.5 se observó una reducción de 1.7 Log_{10} UFP cuando fue almacenada a $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Los autores concluyeron que acidificar un alimento no es una estrategia confiable para la reducción de los norovirus (Mormann *et al.*, 2010). En la evaluación fue la fresa la que mostró una mayor capacidad para estabilizar a MNV-1, especialmente con la presencia de carbohidratos HBGA independientemente de la temperatura. Los tratamientos con *E. coli* O157:H7 mostraron la menor capacidad para estabilizar a MNV-1 en todos los casos. Y es la temperatura de refrigeración, el pH ácido y la presencia de carbohidratos HBGA los factores que estabilizan de mejor forma a MNV-1 en fresa y lechuga (Figura 35 y 36).

Cuadro 8. Promedio de la población resistente de MNV-1 a diferentes niveles de pH, *E. coli* O157:H7 y presencia de carbohidratos tipo HBGA en lechuga en refrigeración.

Temperatura	T = 4 °C					
pH	pH = 3			pH = 8		
Tratamiento	HBGA*	<i>E. coli</i> O157:H7*	Control*	HBGA*	<i>E. coli</i> O157:H7*	Control*
MNV-1 (24 h)	5.99±0.01	5.95±0.01	5.98±0.01	5.96±0.01	5.96±0.01	5.99±0.01
MNV-1 (72 h)	5.99±0.01	5.85±0.01	5.96±0.01	5.93±0.01	5.91±0.01	5.94±0.01

Cuadro 9. Promedio de la población resistente de MNV-1 a diferentes niveles de pH, *E. coli* O157:H7 y presencia de carbohidratos tipo HBGA en lechuga a temperatura ambiente.

Temperatura	T =22 °C					
pH	pH = 3			pH = 8		
Tratamiento	HBGA*	<i>E. coli</i> O157:H7*	Control*	HBGA*	<i>E. coli</i> O157:H7*	Control*
MNV-1 (6 h)	5.98±0.01	5.76±0.01	5.98±0.01	5.93±0.01	5.87±0.01	5.95±0.01
MNV-1 (24 h)	5.97±0.01	5.59±0.01	5.98±0.01	5.86±0.01	5.73±0.01	5.88±0.01

Cuadro 10. Promedio de la población resistente de MNV-1 a diferentes niveles de pH, *E. coli* O157:H7 y presencia de carbohidratos tipo HBGA en fresa en refrigeración.

Temperatura	T = 4 °C					
pH	pH = 3			pH = 8		
Tratamiento	HBGA*	<i>E. coli</i> O157:H7*	Control*	HBGA*	<i>E. coli</i> O157:H7*	Control*
MNV-1 (24 h)	5.99±0.01	5.94±0.01	5.99±0.01	5.98±0.01	5.97±0.01	5.99±0.01
MNV-1 (72 h)	5.99±0.01	5.89±0.01	5.98±0.01	5.96±0.01	5.93±0.01	5.99±0.01

Cuadro 11. Promedio de la población resistente de MNV-1 a diferentes niveles de pH, *E. coli* O157:H7 y presencia de carbohidratos tipo HBGA en fresa a temperatura ambiente.

Temperatura	T =22 °C					
pH	pH = 3			pH = 8		
Tratamiento	HBGA*	<i>E. coli</i> O157:H7*	Control*	HBGA*	<i>E. coli</i> O157:H7*	Control*
MNV-1 (6 h)	5.99±0.01	5.82±0.01	5.99±0.01	5.96±0.01	5.86±0.01	5.98±0.01
MNV-1 (24 h)	5.99±0.01	5.69±0.01	5.98±0.01	5.94±0.01	5.76±0.01	5.97±0.01

Level		Least Sq Mean
4,8,E. coli O157:H7,24	A	6.0091667
4,3,HBGA,24	A B	5.9954167
4,3,HBGA,72	A B C	5.9945833
4,3,Control,24	A B C D	5.9866667
22,3,Control,24	A B C E	5.9825000
22,3,HBGA,24	A B C D E	5.9812500
4,3,Control,72	A B C D E	5.9758333
4,8,Control,24	A B C D E F	5.9591667
22,8,Control,24	A B C D E F	5.9583333
22,3,HBGA,72	B C D E F G	5.9454167
4,8,HBGA,24	B C D E F G	5.9429167
22,3,Control,72	B C D E F G	5.9416667
4,8,Control,72	B C D E F G H	5.9350000
22,8,HBGA,24	C D E F G H	5.9270833
4,8,HBGA,72	D F G H	5.9237500
4,3,E. coli O157:H7,24	E F G H	5.9166667
4,8,E. coli O157:H7,72	F G H I	5.9000000
22,8,Control,72	G H I J	5.8941667
22,8,HBGA,72	H I J	5.8729167
22,8,E. coli O157:H7,24	I J	5.8433333
4,3,E. coli O157:H7,72	J	5.8308333
22,3,E. coli O157:H7,24	K	5.7575000
22,8,E. coli O157:H7,72	K	5.7041667
22,3,E. coli O157:H7,72	L	5.6316667

Levels not connected by same letter are significantly different

Figura 38: Prueba de Tukey de los tratamientos evaluados para determinar su efecto en la estabilidad de MNV-1 en lechuga. La estructura de los niveles es: temperatura, pH, tratamiento (control, HBGA o *E. coli* O157:H7), fuerza iónica y tiempo en su nivel bajo y alto (24 y 72).

Level		Least Sq Mean
22,3,HBGA,24	A	5.9941667
4,3,HBGA,72	A B	5.9908333
4,3,HBGA,24	A B	5.9900000
4,8,Control,72	A B	5.9887500
4,8,E. coli O157:H7,24	A B	5.9883333
22,3,Control,24	A B	5.9879167
22,8,Control,24	A B	5.9854167
4,3,Control,72	A B	5.9845833
4,3,Control,24	A B	5.9837500
4,8,Control,24	A B	5.9795833
22,3,HBGA,72	A B C	5.9716667
22,3,Control,72	A B C D	5.9704167
4,8,HBGA,72	A B C D	5.9650000
22,8,Control,72	A B C D	5.9629167
22,8,HBGA,24	B C D	5.9616667
4,8,HBGA,24	B C D	5.9608333
22,8,HBGA,72	D E	5.9391667
4,3,E. coli O157:H7,24	C D E	5.9375000
4,8,E. coli O157:H7,72	E	5.9175000
4,3,E. coli O157:H7,72	F	5.8733333
22,8,E. coli O157:H7,24	F	5.8441667
22,3,E. coli O157:H7,24	G	5.8066667
22,8,E. coli O157:H7,72	H	5.7566667
22,3,E. coli O157:H7,72	I	5.7091667

Levels not connected by same letter are significantly different

Figura 39: Prueba de Tukey de los tratamientos evaluados para determinar su efecto en la estabilidad de MNV-1 en fresa. La estructura de los niveles es: temperatura, pH, tratamiento (control, HBGA o *E. coli* O157:H7), y tiempo en su nivel bajo y alto (24 y 72).

X. CONCLUSIONES

Las condiciones de preenriquecimiento son capaces de promover el desarrollo simultáneo de *Salmonella*, *Shigella* y ECEH y de inhibir el desarrollo de la microbiota naturalmente presente en cilantro, fresa, lechuga, zarzamora.

La estrategia experimental diseñada en el presente proyecto permite detectar de manera simultánea, específica y con alta sensibilidad a MNV-1, *Salmonella*, *Shigella* y ECEH en cilantro, fresa, lechuga, zarzamora.

Norovirus se encuentra presente en frutas que están siendo comercializadas en Querétaro. Hasta ahora se ha evidenciado en fresa.

Los genotipos detectados corresponden a una de las variantes más frecuentemente reportada en brotes por consumo de alimentos en Estados Unidos. Sin embargo, no corresponden con la principal cepa reportada a nivel mundial.

Una mayor proporción de aminoácidos hidrofílicos, ramificados con anillos aromáticos en sus cadenas laterales y menor proporción de aminoácidos de cadena lateral y que interfieren con la estructura secundaria, indica una mayor estabilidad en norovirus, parvovirus, virus de la hepatitis A, y los priones.

La mayor estabilidad de MNV-1 se observa a pH ácido, temperatura de refrigeración, y presencia de carbohidratos tipo HBGA independientemente de la concentración de bacterias presentes.

MNV-1 persiste más en fresa que en lechuga por las condiciones de pH ácido y mayor presencia de carbohidratos HBGA.

E. coli O157:H7 es capaz de estabilizar a MNV-1 en condiciones básicas.

La aplicación de un tratamiento para oxidar los carbohidratos presentes en la superficie de la fresa y lechuga, es una alternativa a explorar como estrategia de control de los norovirus en las frutas y hortalizas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Adler, J., and Zickl, R. 1969. Winter vomiting disease. *Journal of Infectious Disease*. 119:668-673.

Ahmed, H., Maunula, L., Korhonen, J. 2020. Reduction of Norovirus in Foods by Nonthermal Treatments: A Review. *Journal of Food Protection*. 83(12): 2053–2073.

Almand, A. E., Moore, D. M., Jaykus, L. A. 2019. Characterization of human norovirus binding to gut-associated bacterial ligands. *Biomedcentral research note*. 12: 607.

Ando, T., Noel, J., Fankhauser, R. 2000. Genetic classification of Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Disease*. 181:S336-S348.

Arunrut, N., Kiatpathomchai, W., Ananchaipattana, C. 2018. Multiplex PCR assay and lyophilization for detection of *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in pork products. *Journal of Food Science and Biotechnology*. 27(3): 867–875.

Badui, 2006. *Química de los Alimentos*. Salvador Badui. Editorial Pearson. 4ta edición.

Bae, J. Y., Lee, J. S., Shin, M. H., Lee, S. H., Hwang, I. G. 2011. Effect of wash treatments on reducing human Norovirus on iceberg lettuce and perilla leaf. *Journal of Food Protection*. 74:1908-1911.

Barros Y. A., García L. M., Franco Anaya P. A., AbdElsalam K. A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*. 2:91-95.

Beek, V. J., Graaf, M., Al-Hello, H., Allen, J. D., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Brytting, M., Buesa, J., Cabrerizo, M., Chan, M., Cloak, F., Di Bartolo, I., Guix, S., Hewitt, J., Iritani, N., Jin, M., Johne, R., Lederer, I., Mans, J., Martella, V., Maunula, L., McAllister, G., Niendorf, S., Niesters, H. G., Podkolzin, A. T., Poljsak-Prijatelj, M., Rasmussen, D. L., Reuter, G., Tuite, G., Kroneman, A., Vennema, H., Koopmans, M. P. G., NoroNet. 2018. Molecular surveillance of norovirus, 2005-16:

an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Journal of Lancet Infectious Diseases*. 18(5):545-553.

Bernard, H., Faber, M., Wilking, H., Haller, S., Höhle, M., Schielke, A., Ducomble, T., Siffczyk, C., Merbecks, S. S., Fricke, G., Hamouda, O., Stark, K., Werber, D. 2014. Large multistate outbreak of Norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany. *Euro Surveillance*. 19:20719.

Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M., Estes, M. K. 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of Virology*. 77:11603-11615.

Beuret, C., Kohler, D., Luthi, T. 2000. Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. *Journal of Food Protection*. 63:1576-1582.

Bidawid, S., Malik, N., Adegbunrin, O., Sattar, A. S., Farber, M. J. 2004. Norovirus cross-contamination during food handling and interruption of virus transfer by hand antisepsis: experiments with feline calicivirus as a surrogate. *Journal of Food Protection*. 67:103-109.

Biomerieux, 2018. Norovirus PCR detection kits. <https://www.biomerieux-industry.com/food/ceeramtools-Norovirus-pcr-detection-kits>. Consultado en enero de 2018.

Bozkurt, H., D'souza, D. H., Davidson, P. M. 2015. Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods. *Journal of Food Protection*. 78:1597-1617.

Budicini, R. M., Pfeiffer, K. J. 2022. Bacteria-mediated stabilization of murine norovirus. Department of Microbiology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA. 1:1-16.

Bull, A. R., Eden, J. S., Rawlinson, W. D., White, P. A. 2010. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *Journal Plos Pathogens*. 6(3):e1000831.

CalciNet, 2017. Norovirus reporting and surveillance. <https://www.cdc.gov/norovirus/reporting/calicinet/index.html>. Consultado en Mayo, 2020.

Cardamone, C., Aleo, A., Mammina, C., Oliveri, G. and Di Noto A. M. 2016. Assessment of the microbiological quality of fresh produce on sale in Sicily, Italy: preliminary results. *Journal of Biological Research*. 22:1-3.

Cao, R., Ma, X., Pan, M. 2022. Molecular characteristics of norovirus in sporadic and outbreak cases of acute gastroenteritis and in sewage in Sichuan, China. *Virology Journal*. 19:180.

CDC, 2022. Norovirus. <https://www.cdc.gov/norovirus/>. Consultado en mayo de 2022.

CDC, 2021. Norovirus worldwide global trends. <https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/worldwide.html>. Consultado en abril de 2021.

CDC, 2016. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, Annual Report. <http://www.cdc.gov/foodsafety/fdoss/>. Consultado en enero 2018.

COFEPRIS, 2022. Monitor de inocuidad agroalimentaria. https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2022/abril/MonitorInocuidad28032022_a_cf6ae57-e7d3-45ac-8a2b-e23aa8af6fe9.pdf. Consultado en abril de 2022.

Cook, N., Williams, L., D'Agostino Martin. 2019. Prevalence of Norovirus in produce sold at retail in the United Kingdom. *Journal of Food Microbiology*. 79:85-89.

De Graaf, M., Van Beek, J., Vennema, H., Podkolzin, A. T., Hewitt, J., Bucardo, F., Templeton, K., Mans, J., Nordgren, J., Reuter, G., Lynch, M., Rasmussen, L. D., Iritani, N., Chan, M. C., Martella, V., Ambert-Balay, K., Vinje, J., White, P. A., Koopmans, M. P. 2015. Emergence of a novel GII.17 norovirus— end of the GII.4 era? *Euro Surveill*. 20(26):21178.

Donaldson, F. E., Lindesmith, C. L., Lo Blue, A. D., Baric, R. S. 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Journal of Nature Reviews Microbiology*. 8:231–241.

D'Souza, D. H., Jean, J., Jaykus, L. A. 2006. Methods for the detection of viral and parasitic protozoan pathogens in foods. *Journal of Food Protection*. 12:23-188.

Escudero-Abarca B. I., Suh, S. H., Moore, M. D., Dwivedi, H. P., Jaykus, L. A. 2014. Selection, Characterization and Application of Nucleic Acid Aptamers for the Capture and Detection of Human Norovirus Strains. *PLOS ONE* 9:e106805.

Esseili, M. A., Gao, X., Tegtmeier, S., Saif, L. J., Wang, Q. 2016. Abiotic stress and phyllosphere bacteria influence the survival of human norovirus and its surrogates on preharvest leafy greens. *Applied Environmental Microbiology*. 82:352–363.

Esseili, M. A., Wang, Q., Saif, J. L. 2012. Binding of human GII.4 Norovirus virus like particles to carbohydrates of romaine lettuce leaf cell wall materials. *Applied Environmental Microbiology*. 78:786-794.

Ethelberg, S., Lisby, M., Bottiger, B., Schultz, A. C., Villif, A., Jensen, T., Olsen, K. E., Scheutz, F., Kjelso, C., Muller, L. 2010. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce. *Euro Surveillance*. 15(6):19484.

FDA, 2018. Bacteriological Analytical Manual. <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114664.htm>. Consultado en enero de 2018.

Gehring, A. G., D. M. Albin, A. K. Bhunia, H. Kim, S. A. Reed, and S. Tu. 2012. Mixed culture enrichment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Yersinia enterocolitica*. *Food Control* 26:269–273.

Green, Y. K., Kaufman, S. S., Nagata, B. M., Chaimongkol, N., Kim, Y. D., Levenson, A. E., Tin, M. C., Yardley, A. B., Johnson, J. A., Barletta, F. B. A., Khan, M. K., Yazigi, A. N., Subramanian, S., Moturi, R. S., Fishbein, M. T., Moore, N. I., Sosnovtsev, S. V. 2020. Human norovirus targets enteroendocrine epithelial cells in the small intestine. *Nature Communications*. 11(1):2759.

Hansman, S. G., Oka, T., Li, T. C., Nishio, O., Noda, M., Takeda, N. 2008. Detection of human enteric viruses in japanese clams. *Journal of Food Protection*. 8:1689-1695.

- Hasing, E. M., Lee, B. E., Qiu, Y., Xia, M., Pabbaraju, K., Wong, A., Tripples, G., Jiang, X., Pang, L. X. 2019. Changes in norovirus genotype diversity in gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2012–2018. *Journal of BMC Infectious Diseases*. 19:177.
- Hernández, O., Gutiérrez-Escolano, A. L., Cancio-Lonches, C., Iturriaga, H. M., Pacheco-Aguilar, J. R., Morales-Rayas, R., Arvizu-Medrano, M. S. 2022. *Journal of Food Microbiology*. 102(3):103926.
- Hirneisen, A. K., Kniel, E. K. 2013. Comparing human norovirus surrogates: murine Norovirus and Tulane virus. *Journal of General Virology*. 76:139-143.
- Hofmann, M. F., Olawumi, E., Michaelis, M., Stöbel, U., Hofmann, F. 2020. Significance of norovirus in occupational health: a review of published norovirus outbreaks in Central and Northern Europe. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 93:911–923
- Hong, Q., Smith, J. T. 2019. The dynamic cápside structure of the noroviruses. *Viruses*. 11:235-253.
- Ibrahim, G. F., and Fleet, G. H. 1985. Detection of *Salmonella* using accelerated methods. *International Journal of Food Microbiology*. 2:259–272.
- Inns, T., Wilson, D., Manley, P., Harris, P. J., O’Brien S. J., Vivancos, R. 2020. What proportion of care home outbreaks are caused by norovirus? An analysis of viral causes of gastroenteritis outbreaks in care homes, North East England, 2016 - 2018. 20: 2.
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M. K. 1993. Sequence and Genomic Organization of Norwalk Virus. *Journal of Virology*. 195:51-61.
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D. Y., Estes, M. K. 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology*. 66:6527–6532.
- Kapikian, A., Wyatt, R., Dolin, R., Thornhill, T., Kalica, A., Chanock, R. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infections nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*. 10:1075-1081.

Kim, H. Y., Park, H. J., Ko, G. 2009. Hollow-fiber ultrafiltration for the concentration and simultaneous recovery of multiple pathogens in contaminated foods. *Journal of Food Protection*. 72: 2547–2552.

Kirk, M. D., Pires, S. M., Black, R. E., Caipo, M., Crump, J. A., Devleeschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C. L., Hald, T., Hall, A. J., Keddy, K. H., Lake, R. J., Lanata, C. F., Torgerson, P. R., Havelaar, A. H., Angulo, F. J. 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *Journal PLOS medicine*. 12: e1001940.

Kroneman A, I., Vennema, H., Deforche, K., Avoort, H., Peñaranda, S., Oberste, M. S., Vinjé, J., Koopmans, M. An automated genotyping tool for Enteroviruses and Noroviruses. *Journal of Clinical Virology*. 2011. 51:121-125.

Lamhoujeb, S., Fliss, I., Ngazoa, S. E., Jean, J. 2008. Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using realtime nucleic acid sequence- based amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:3349–3355.

Lee, J. S., Si, J., Yun, S. H., Ko, G. 2015. Effect of Temperature and Relative Humidity on the Survival of Foodborne Viruses during Food Storage. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 81(6): 2075–2081.

Lewis, C. L., Caelli C. C., Andre, G. S. 2014. Mass and Density Measurements of Live and Dead Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Populations. *Applied Environmental Microbiology*. 80:3622-3631.

Liu, P. B., Y. Yuen, H. M. Hsiao, L. A. Jaykus, and C. Moe. 2010. Effectiveness of liquid soap and hand sanitizer against Norwalk virus on contaminated hands. *Applied Environmental Microbiology*. 76:394–399.

Liu, B. L., Clarke, I. N., Caul, E. O., Lambden, P. R. 1995. Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Journal of Virology*. 140:1345-1356.

Lochridge, V. P., Jutila, K. L., Graff, J. W., Hardy, M. E. 2005. Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *Journal of Virology*. 86:2799-806.

Made, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R. 2013. Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. 5(3): 162–168.

Mariita, M. R., Davis, H. J., Randive, V. R. 2022. Illuminating Human Norovirus: A Perspective on Disinfection of Water and Surfaces Using UVC, Norovirus Model Organisms, and Radiation Safety Considerations. Journal of pathogens. 11(2):226.

Marsh, Z., Shah, P. M., Wikswa, E. M., Barclay, L., Kisselburgh, H., Kambhampati, A., Cannon, L. J., Parashar, D. U., Vinjé, J., Hall, A. J. 2018. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks – Unites States, 2009 – 2015. 6(2):58-66.

Moore, D. M., and Jaykus, L. A. 2018. Virus-Bacteria Interactions: Implications and Potential for the Applied and Agricultural Sciences. 10:61-76.

Moore, D. M., Goulter, M. R., Jaykus, L. A. 2015. Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments. Food Science and Tecnology. 6:411-433.

Morales-Rayas, R., Wolfes, G. F. P., Griffiths, W. M. 2009. Anion-exchange filtration and real-time PCR for the detection of a Norovirus surrogate in food. Journal of Food Protection. 72:2178-2183.

Mormann, S., Dabisch, M., Becker, B. 2010. Effects of technological processes on the tenacity and inactivation of norovirus genogroup II in experimentally contaminated foods. Journal of Applied Environmental Microbiology. 76:536–545.

Muller-Hermes, C., Creutzmacher, R., Mallagaray, A. 2020. Complete assignment of Ala, Ile, LeuProS, Met and ValProS methyl groups of the protruding domain from human norovirus GII.4 Saga. Journal of Biomolecular and NMR Assignments. 14:123–130.

NCBI, 2022. Primer designing tool: A tool for finding specific primers. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Consultado en enero 2018.

Niendorf, S., Jacobsen, S., Faber, M., Eis-Hubingüer, A. M., Hofmann, J., Zimmermann, O., Höhne, M., Bock, C. T. 2017. Steep Rise in Norovirus Cases and Emergence of a New Recombinant Strain GII.P16-GII.2, Germany, Winter 2016'. Euro Surveillane. 22(4):30447.

Nilsson, M., Hedlund, K. O., Thorhagen, M., Larson, G., Johansen, K., Ekspong, A., Svensson, L. 2003. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *Journal of Virology*. 77:13117–24.

NoroCORE, 2018. Norovirus Collaborative for Outreach, Research, and Education. <https://norocore.ncsu.edu/>. Consultado en enero de 2018.

NoroNet, 2017. Norovirus surveillance. <https://www.rivm.nl/en/noronet>. Consultado en Mayo, 2020.

Parada-Fabián, J. C., Juárez-García, P., Natividad-Bonifacio, I., Vázquez-Salinas, C., Quiñones-Ramírez, I. 2016. Identification of Enteric Viruses in Foods from Mexico City. *Journal of Food and Environmental Virology*. 8:215–220.

Pogan, R., Dülfer, J., Uetrecht, C. 2018. Norovirus assembly and stability. *Current Opinion in Virology*. 31:59-65.

Prasad, B. V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G., Estes, M, K. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Journal of Science*. 286:287-290.

Regoes, R. R., Hamblin, S., Tanaka, M. M. 2013. Viral mutation rates: modelling the roles of within-host viral dynamics and the trade-off between replication fidelity and speed. *Proceedings Biological Science*. 280:20122047.

Richards, P. G., Watson, A. M., Meade, K. G., Hovan, L. G., Kingsley, H. D. 2012. Resilience of norovirus GII.4 to Freezing and Thawing: Implications for virus infectivity. *Food and Environmental Virology*. 4(4): 192–197.

Robinson, C. M., Jesudhasan, P. R., Pfeiffer, J. K. 2014. Bacterial lipopoly saccharide binding enhances virion stability and promotes environmental fitness of an enteric virus. *Cell Host Microbe*. 15:36–46.

Rozen, S., Skaletsky, J. H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press; Totowa. pp. 365–386.

Samandoulgou, I., Hammami, R., Morales-Rayas, R., Fliss, I., Jean, J. 2015. Stability of Secondary and Tertiary Structures of Virus-Like Particles Representing Noroviruses: Effects of pH, Ionic Strength, and Temperature and Implications for Adhesion to Surfaces. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 81(22):7680-6.

Sánchez, G., Bosch, A. 2016. Survival of Enteric Viruses in the Environment and Food. *Journal of Viruses in Foods*. 26:367–392.

Seah, E. L., Gunsekere, I. C., Marshall, J. A., Wright, P. J. 1999. Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like viruses. *Journal of Virology*. 144:1007–1014.

SEE, 2007. *Epidemiología de las gastroenteritis agudas víricas. Aspectos actuales*. Ed. EMISA. Valencia, España.

Smith, H. Q., Smith, T. J. 2019. The Dynamic Capsid Structures of the Noroviruses. *Journal of Viruses*. 11(3):235.

Snowden, S. J., Hurdiss, L. D., Adeyemi, O. O., Ranson, A. N., Herod, R. M., Stonehouse, N. J. 2020. Dynamics in the murine norovirus capsid revealed by high-resolution cryo-EM. *Journal Plos Biology*. 18(3): e3000649.

Stals, A., Baert, L., Jasson, V., Coillie, V. E., Uyttendaele, M. 2011. Screening of fruit products for Norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR Results. *Journal of Food Protection*. 74:425-431.

Thorne, G. L., and Goodfellow, G. I. 2014. Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*. 95:278-291.

Thornhill, T., Wyatt, R., Kalica, A., Dolin, R., Chanock, R., Kapikian, A. 1977. Detection by immune electron microscopy of 26 to 27 nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Infectious Disease*. 135:20-27.

Thouvenot, P., Vales, G., Bracq-Dieye, H., Tessaud-Rita, N., Maury, M. M., Moura, A., Lecuit, M., Leclercq, A. 2018. MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of *Listeria* species in surveillance: A prospective study. *Journal of Microbiological Methods*. 144:29-32.

Tsuji, S., Iguchi, Y., Shibata, N., Teramura, I., Kitagawa, T., Yamanaka, H. 2018. Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of multiple species from environmental DNA: an application on two Japanese medaka species. *Journal of Scientific Reports*. 9138.

USDA, 2016. NoroCORE: A comprehensive approach to a near perfect human pathogen. <https://www.usda.gov/media/blog/2016/08/25/norocore-comprehensive-approach-near-perfect-human-pathogen>. Consultado en enero de 2018.

Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Williams, K., Lee, D., Vinjé, J. 2011. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks. *Journal of emerging infectious diseases*. 17:8

Vega, E., Smith, J., Garland, J., Matos, A., Pillai, D. S. 2005. Variability of virus attachment patterns to butterhead lettuce. *Journal of Virology*. 68:2112-2117.

Wang, Q., Hirneisen, A. K., Markland, S. M., Kniel, K. E. 2013. Survival of murine norovirus, Tulane virus and Hepatitis A virus on alfalfa seeds and sprouts during storage germination. *Journal of American Society for Microbiology*. 79:7021-7027.

Wei, C. I., Huang, T. S., Kim, J. M., Lin, W. F., Tamplin, M. L., Bartz, J. A. 1995. Growth and Survival of *Salmonella* Montevideo on tomatoes and disinfection with chlorinated water. *Journal of Food Protection*. 58:829-836.

Yilmaz, A., Bostan, K., Altan, E., Muratoglu, K., Turan, N., Tan, D., Helps, C., Yilmaz, H. 2011. Investigations on the frequency of Norovirus contamination of ready-to-eat food items in Istanbul, Turkey, by using real-time reverse transcription PCR. *Journal of Food Protection*. 74:840-843.

Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., Monroe, S. S. 2006. *Journal of Virology*. 346:312-323.

Zheng, Q., Bustandi, C., Yang, Y., Schneider, K. R., Yuk, H-G. 2013. Comparison of Enrichment broths for the recovery of healthy and heat-injured *Salmonella* Typhimurium on raw duck wings. 76:1963-1968.