



Vegetales de hojas como potenciales transmisores de norovirus en la Ciudad de Córdoba, Argentina

María Laura Coluccini.

Tesis - Maestría en Microbiología con Orientación en Investigación en Salud Humana - Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud, 2017

Aprobada: 2017

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Norovirus en vegetales de hoja comercializados en la ciudad de Córdoba, Argentina by María Laura Coluccini is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.



**Maestría en Microbiología con
Orientación en Investigación en Salud
Humana
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba**



**“VEGETALES DE HOJAS COMO POTENCIALES
TRANSMISORES DE NOROVIRUS EN LA CIUDAD
DE CÓRDOBA, ARGENTINA”**



**Maestría en Microbiología con
Orientación en Investigación en Salud
Humana
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba**



**“VEGETALES DE HOJAS COMO POTENCIALES
TRANSMISORES DE NOROVIRUS EN LA CIUDAD
DE CÓRDOBA, ARGENTINA”**

ALUMNA:

Lic. María Laura Coluccini

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Laura Cecilia Martínez

DIRECTORES DE LA MAESTRÍA:

Prof.Dra. Silvia Nates

Prof.Dr.Jorge V. Pavan

DEDICATORIA

A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento.

A mi esposo, que ha sido un pilar incondicional durante el transcurso de la Maestría y mi sostén para la culminación de la misma.

A mis hijos Agustín y Santiago, que son la razón de mi alegría y crecimiento personal.

AGRADECIMEINTOS

A mi Directora de Tesis, Dra. Laura Cecilia Martínez, quien me brindo su colaboración, aportando las pautas necesarias para alcanzar el objetivo de este trabajo.

Al personal Directivo del Instituto de Virología Dr. José María Vanella FCM-UNC, Prof. Dr. Jorge V. Pavan y Prof. Dra. Silvia Nates, por brindarme apoyo y poner a disposición los recursos necesarios para realizar esta labor.

A los docentes de la Cátedra de Microbiología y Parasitología, por el apoyo y estímulo constante.

RESUMEN

Los Norovirus (NoV) son agentes patógenos comunes que causan enfermedad gastrointestinal tanto en niños como en adultos, especialmente en los meses invernales. Se transmiten principalmente por la vía fecal-oral, ya sea de manera directa de persona a persona a través de manos contaminadas, o de manera indirecta mediante alimentos o agua contaminada. Los vegetales frescos son susceptibles de ser contaminados con estos patógenos durante su cultivo al tomar contacto con el agua de riego contaminada o fertilizante orgánico, posterior cosecha, transporte, procesamiento y manipulación. Como la mayoría de ellos se consumen crudos, se observó en estudios en países en desarrollo un incremento en el número de brotes alimentarios asociados al consumo de los mismos.

En un reporte del Centro de Control de Enfermedades (USA) durante el año 2008, los NoV aparecen como el agente más frecuente y confirmado por laboratorio como único patógeno causal en el 49 % de 479 brotes registrados en ese año. Los brotes ocurren particularmente en establecimientos de salud, educación, geriátricos, militares y en otras instituciones donde la transmisión se ve facilitada por la presencia de un gran número de individuos en estrecho contacto. Para investigar la prevalencia de contaminación por NoV en vegetales de hoja comercializados en nuestra ciudad, se tomaron 19 muestras de vegetales de hoja de un mismo puesto del mercado de abasto de la Ciudad de Córdoba desde el mes de junio hasta diciembre del año 2012 con frecuencia quincenal. Se aplicó una técnica de concentración viral validada previamente en nuestro laboratorio basada en sucesivas centrifugaciones-eluciones con polietilenglicol. A los concentrados de las muestras se les extrajo el ARN viral, y se aplicó la técnica de Rt-PCR con primers específicos para identificar Genogrupos I (GI) y II (GII) de Nov. Resultaron positivas 11 de 19 muestras (57,89 %), diez de las cepas detectadas pertenecieron al Genogrupo I (GI) y una del II (GII).

Estos resultados permiten inferir que estos agentes se encuentran frecuentemente en los vegetales de hoja que se comercializan en nuestro medio y constituyen un riesgo potencial para la salud de la población que los consume. El presente estudio es el primer reporte en nuestro país sobre la presencia de estos agentes virales en alimentos.

SUMMARY

Norovirus (NoV) are common pathogen agents that cause gastrointestinal disease in children and adults, especially in the wintry month. It is transmitted primarily by the fecal-oral route either directly from person to person through contaminated hands, or indirectly through contaminated food or water. Fresh vegetables are likely to be contaminated with these pathogens at any stage of the production process, harvesting, transportation and marketing. As most of them are consumed raw, it observed in studies in developing countries an increase in the number of foodborne outbreaks associated with the consumption thereof. In a report by the Center for Disease Control (USA) in 2008, the NoV appear as the most frequent agent and laboratory confirmed as the only causative pathogen in 49% of 479 outbreaks in that year. Outbreaks occur particularly in health, education, nursing homes, military and other institutions where transmission is facilitated by the presence of a large number of individuals in close contact. In order to investigate the prevalence of contamination with NoV in leafy vegetables sold in our city, 19 samples of leafy vegetables were taken from the same post in the Supply Market of the city of Cordoba from June until December 2012 every fifteen days. Viral concentration technique based on successively centrifugations-elutions with polietilenglicol was applied. Molecular techniques were applied with specific primers to identify Genogroup I (GI) and II NoV to the processed samples. Eleven of 19 (57.89%) were positive, ten of the detected strains belonged to Genogroup I (GI) and one strain belonged to Genogroup II (GII). These results allow us to infer that these agents are frequently found in leafy vegetables sold in our environment and are a potential health risk for the population that consumes them.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMEINTOS.....	4
RESUMEN.....	5
SUMMARY.....	6
ÍNDICE.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
OBJETIVOS.....	19
HIPÓTESIS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	28
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXO N° I.....	40
ANEXO N° II.....	43
ANEXO N° III.....	49

INTRODUCCIÓN

Se ha documentado a un gran número de agentes patógenos causantes de brotes alimentarios a nivel mundial. En un principio los estudios se han centrado en las enfermedades bacterianas y no se ha investigado a los virus en profundidad. Es así que en USA se reconocen aproximadamente treinta y un patógenos causantes del 19,7 % de los brotes en ese país. Entre ellos los agentes virales son responsables del 58,7 % de los casos, seguidos por las bacterias (38,8%) y parásitos (2,5%). Entre los agentes bacterianos tan sólo tres de ellos suman un impacto del 30% de los brotes siendo *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens* y *Campilobacter spp.* los principales. (1)

Recién durante las últimas décadas se ha dispuesto de técnicas sensibles para la detección de virus en alimentos, mientras que para los agentes bacterianos ya se disponía de metodologías eficientes hace más de cien años. Las gastroenteritis virales se han considerado en principio enfermedades leves, pasajeras y sin consecuencias para lo que no se disponía de un tratamiento específico y por lo tanto se estimó poco necesario sumar esfuerzos para su estudio. Por otro lado, la amplitud de la contaminación alimentaria y ambiental, junto con la rápida transmisión de persona a persona, dificulta la identificación del alimento inicialmente contaminado y la aplicación de medidas específicas de control y prevención. No obstante, en las últimas décadas, el conocimiento sobre la epidemiología y microbiología de los virus entéricos se ha visto incrementado, en gran medida gracias al aporte de la biología molecular, que permite diagnosticar y tipificar virus. Al aumentar las medidas de prevención y control sobre las clásicas enfermedades bacterianas, la atención se desplaza hacia el resto de causas productoras de brotes alimentarios. En nuestros días las enfermedades causadas por virus entéricos se consideran un problema sanitario importante, aunque persisten muchos retos tales como mejorar las técnicas de laboratorio para su detección, documentar la magnitud y transmisión de las enfermedades y sobre todo evitar este tipo de infecciones.

Entre los virus con posibilidad de transmitirse por alimentos, se incluyen agentes exóticos tales como el de la influenza aviar e incluso el virus Ébola tras el consumo de monos infectados. (2) (3)

Se ha documentado un número relativamente pequeño de agentes virales transmitidos por alimentos, que se pueden agrupar en dos categorías principales: aquellos que causan hepatitis como el virus A y E, y los virus que causan gastroenteritis. Entre éstos últimos, integran la lista los norovirus, sapovirus, rotavirus, adenovirus y astrovirus. Sin embargo, teniendo en cuenta sólo a los agentes virales, el 99,1 % de los brotes en USA son causados por norovirus y se estima un costo anual en cuidados de salud y merma en la productividad laboral de 2 billones de dólares(1). Resultan sumamente escasos los reportes de brotes alimentarios causados por otros agentes virales de gastroenteritis. Los astrovirus han sido reportados como agentes etiológicos en un extenso brote en Japón (4), mientras que los rotavirus han sido implicados en dos brotes en personas adultas, uno asociado al consumo de sándwiches en una Universidad de USA (5), y otro en un restaurant en Japón (6). También se han detectado rotavirus como contaminantes de ostras, pero no se reportaron brotes de infección por rotavirus asociados al consumo de estos bivalvos (7). Los sapovirus, rara vez han sido asociados a brotes alimentarios (8).

La explicación más probable para la aparente ausencia de transmisión alimentaria de la mayoría de los virus entéricos, es que los síntomas se manifiestan principalmente en niños y ocasionalmente en adultos. Ésto, asumiendo que son los adultos los que están en contacto en primer lugar con los alimentos presumiblemente contaminados. Sin embargo, los norovirus presentan una gran diversidad antigénica e inducen una corta inmunidad, son patógenos comunes que causan síntomas tanto en niños como adultos y de esta manera se evidencia un mayor impacto de la enfermedad para el caso de estos agentes.

Gastroenteritis virales por Norovirus: Características generales y presentación clínica. Técnicas de detección, epidemiología y tratamiento.

La gastroenteritis se considera una de las principales causas de morbimortalidad en personas de todas las edades y es más frecuente en niños menores de cinco años. A nivel mundial, se registran cerca de 700 millones de casos de diarrea aguda por año (9), por lo que se considera un importante problema de salud pública, especialmente por los elevados registros de morbilidad y mortalidad en niños. Según el reporte de estadísticas sanitarias mundiales de 2013 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 10% de los niños menores de cinco años mueren por causa de la

gastroenteritis aguda (10). A pesar de los esfuerzos puestos en el mejoramiento de la calidad tanto de los alimentos como del agua, y a la implementación de estrategias de prevención, las diarreas continúan siendo una causa frecuente de enfermedad en todo el mundo. Se cree que produce cerca de 1.8 millones de muertes anuales en niños menores de 5 años; siendo los norovirus responsables del 12% de los casos de gastroenteritis severas tan sólo en este grupo etario. (11)-

En el año 1929, Zahorsky fue el primero en describir la “*Hiperemesishemis*” o “enfermedad del vómito invernal”, una patología caracterizada por el inicio súbito de vómitos autolimitados, y diarrea, que se presentaban con mayor incidencia durante los meses más fríos (12). Sin embargo, no fue hasta el año 1972 que, Kapikian y otros investigadores descubrieron la etiología de este síndrome mediante inmunomicroscopía electrónica de heces de voluntarios expuestos a filtrados fecales de un grupo de estudiantes de escuela primaria, los cuales resultaron afectados por un brote de *Norovirus* (denominado anteriormente como “*virus tipo Norwalk*”)(13).

Desde la aplicación de las técnicas moleculares, se ha podido establecer a los NoV como agentes causales de brotes epidémicos por gastroenteritis en individuos de todas las edades, siendo responsables de más del 90% de las gastroenteritis no bacterianas en todo el mundo, así como también de casos de gastroenteritis esporádica severa (14).

Los brotes de gastroenteritis por NoV generalmente ocurren en instituciones relacionadas al cuidado de la salud, guarderías, cruceros; a su vez se han descrito brotes en escuelas y cárceles, causando una elevada morbimortalidad en estos grupos (15). Se trata de virus altamente contagiosos ya que su dosis infectiva es muy baja, mientras que la cantidad de virus eliminado por individuos infectados es muy alta (9) (16). Además son altamente transmisibles merced a su estabilidad en el ambiente y a su resistencia a la desinfección, por lo que pueden ser transmitidos a través de alimentos y agua contaminada, como también a través del contacto persona a persona o por la exposición a los aerosoles de vómitos infectados (10)(17).

La clonación molecular del genoma del virus Norwalk en el año 1990, condujo a un importante avance en el entendimiento de la virología molecular y epidemiología de los norovirus (NoV), así como en el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular. Aunque los NoV no han podido ser cultivados, y por ende no ha sido posible dosar anticuerpos (Acs) utilizando la técnica de seroneutralización directa, la transcripción reversa, reacción en cadena de la polimerasa (RT- PCR) y el secuenciamiento genómico han demostrado que los NoV son genética y antigénicamente diferentes.

Recientemente se ha propuesto su clasificación en 40 genotipos, los cuales se encuentran incluidos en cinco genogrupos (figura 1, Anexo N° I). La mayoría de las cepas relevantes para el hombre pertenecen a los Genogrupos I y II (18).

El género Norovirus pertenece a la familia *Caliciviridae*. A su vez esta familia contiene los géneros: *Sapovirus*, *Lagovirus* y *Vesivirus*; dentro de los dos últimos se encuentran virus de importancia veterinaria como son el virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos (RHDV) y el *Calicivirus* felino (FCV) respectivamente (19) (20).

El género Norovirus reemplaza los términos de virus Norwalk, virus símil Norwalk y virus de estructura pequeña, redondos. Se clasifican en cinco Genogrupos (GI-V) en función de sus secuencias, subdivididos en al menos 40 genotipos, y numerosos subgrupos. La gran diversidad de cepas se atribuye a la acumulación de mutaciones puntuales asociadas a errores de replicación y recombinación del ARN entre dos virus relacionados. A pesar de esta diversidad, son pocas las cepas, principalmente del genogrupo II, genotipo 4 (GII.4), las que en los últimos años, han sido responsables de la mayoría de los casos y brotes de gastroenteritis. Se han identificado algunos NoV en animales, pero ninguno de éstos ha sido detectado en los seres humanos (20) (21)(Figura 1, Anexo N° II).

Los NoV son virus pequeños (27-40 nm), no envueltos, de simetría icosaédrica, con características relativamente amorfas en su superficie cuando son observados al microscopio electrónico (Figura 2, Anexo N°II).

La estructura de la cápside está formada principalmente por la proteína VP1 y en menor proporción por la VP2 (180 copias de VP1 y 2 de VP2 por virión). Si bien no se conoce la función de VP2, se cree que su presencia aumenta la eficiencia de expresión de VP1 y mejora la estabilidad y maduración de la partícula (22).

La proteína VP1 comprende dos dominios principales: cubierta (S) y protuberancia (P). El dominio S forma parte de la estructura interna de la cápside que envuelve al genoma, y el dominio P forma las protuberancias que surgen de la cubierta (Figura3, Anexo N° II).

Cuando se comparan las secuencias aminoacídicas, se puede observar que el dominio S es relativamente conservado. El dominio P se encuentra subdividido en el dominio P1 y el subdominio P2. Este último corresponde a una región muy variable; además reconoce a los antígenos del grupo histosanguíneo como receptores y confiere especificidad antigénica (20)(22).

Respecto a su genoma, éste está constituido por ARN monocatenario, de polaridad positiva de aproximadamente 7,7 kilo bases (kb), organizado en tres marcos de lectura (*Open Reading Frame*: ORF). Las proteínas no estructurales están codificadas cerca del extremo 5' del genoma en ORF 1; mientras que las proteínas estructurales VP1 y VP2 lo están en el extremo 3' (20) (22) (23).

Los NoV mantienen la infectividad luego de: 1) la exposición de los filtrados de materia fecal a pH de 2,7 durante 3 horas a temperatura ambiente; 2) tratamiento con éter al 20% a 4°C durante 18 horas y 3) incubación a 60°C por 30 minutos. Por otro lado, los NoV son resistentes a la inactivación con hipoclorito en concentraciones de 3,75 a 6,25 mg/L; sin embargo, la inactivación es posible luego del tratamiento con hipoclorito en concentraciones iguales a 10 mg/L. Cabe destacar que la concentración indicada para alcanzar agua bebible “segura” con el agregado de hipoclorito sódico al 5% es de 4 gotas por litro de agua (19) (23).

Debido a la ausencia de un modelo animal y a la imposibilidad de cultivar los NoV, gran parte de los conocimientos sobre la patogénesis de las infecciones por estos virus, así como la susceptibilidad y la inmunidad hacia ellos, proviene de datos de voluntarios que han participado en diferentes estudios.

Aun no se han identificado los sitios y los receptores celulares exactos en que se fijan las partículas virales. Existen datos que sugieren que los carbohidratos de los antígenos de grupo histosanguíneos que se presentan en el epitelio gastroduodenal de personas con el fenotipo secretor pueden actuar como ligandos de los NoV(23)(24).

Las muestras de biopsias de yeyuno proximal de voluntarios enfermos mostraron un ensanchamiento y aplanamiento de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las células de las criptas, vacuolización citoplasmática e infiltración de polimorfonucleares, con células mononucleares de la lámina propia de la mucosa, que se mantiene intacta. La actividad enzimática (fosfatasa alcalina, sacarasa y trehalasa) en el borde en cepillo del intestino delgado se encuentra disminuida, dando como resultado esteatorrea leve y mala absorción transitoria de los hidratos de carbono. En el estómago y en el colon no se han identificado cambios histopatológicos, pero hay retraso en la función motora del estómago, que podría ser responsable de las náuseas y vómitos asociados a esta gastroenteritis (24) (25) (Figura 4, Anexo N°II).

Entre las manifestaciones clínicas, la gastroenteritis causada por los NoV tiene un comienzo repentino, luego de un período de incubación de 24-48 horas. El cuadro clínico dura normalmente entre 2-3 días y comienza por lo general con náuseas,

vómitos, cólicos abdominales, fiebre (sólo en el 37-45% de los casos) y diarrea acuosa; también pueden estar presentes síntomas generales, entre los que se incluyen: cefaleas, escalofríos y mialgias. La enfermedad puede durar hasta 5 días en los brotes nosocomiales y en niños menores de 11 años (22). Los vómitos son más prevalentes en niños mayores de 1 año, mientras que los menores de 1 año, generalmente desarrollan diarrea (18).

Los NoV, al parecer, originan un cuadro más grave que los sapovirus, aunque ambas enfermedades son menos agresivas que las causadas por los Rotavirus (18) (26).

De forma característica, la materia fecal de los enfermos se presenta en forma blanda y acuosa, sin sangre, moco ni leucocitos.

La muerte es poco frecuente y suele ser consecuencia de una deshidratación intensa en grupos vulnerables (26) (27) (28).

El virus puede excretarse en bajos títulos durante varias semanas (hasta 8 semanas) en personas inmunocompetentes y durante más de un año en individuos inmunosuprimidos (22). En pacientes pediátricos oncológicos se ha observado una prolongada excreción viral, acompañada por síntomas tales como vómitos, por períodos mayores a un año (29).

En cuanto a la inmunidad y susceptibilidad del huésped, los norovirus son capaces de reconocer los antígenos del grupo histosanguíneo (ABO, Lewis, y secretoras) con especificidad para cada cepa. Estos antígenos residen en el epitelio de la mucosa del tracto digestivo y se presentan como oligosacáridos libres en la saliva y en la leche. Por lo tanto, la participación de estos antígenos, y en particular el estado secretor, determina la susceptibilidad a las infecciones por norovirus.

Sin embargo, teniendo en cuenta la diversidad de cepas de norovirus, aquellas personas que son resistentes a una cepa podrían ser susceptibles a otras.

Dado que la enfermedad por NoV puede ocurrir a cualquier edad, los adultos pueden continuar susceptibles, ya sea porque su sistema inmune se encuentra debilitado o por la gran diversidad de cepas contra las que no presenta protección cruzada (22).

También se ha demostrado que la inmunidad a la infección por NoV, por lo general es de corta duración (6-14 semanas). Más aún existen evidencias de reinfección al mismo inóculo viral luego de 2-3 años de ocurrida la primo infección (16) (30).

Del análisis de las características comunes observadas en varios brotes ocurridos por NoV, se puede inferir que este virus debe ser tenido en cuenta como agente causal de gastroenteritis cuando a) no se detectan bacterias o parásitos

patógenos, b) existen vómitos en más del 50% de los casos, c) la duración de los síntomas presenta una media entre 12-60 horas, d) el período de incubación es de 24-48 horas (30).

Existen diversos métodos para el estudio de estos virus, entre los que podemos citar:

- Microscopía electrónica: si bien ésta tiene un alto valor diagnóstico, el examen directo de heces obtenidas durante brotes de gastroenteritis, tienen un limitado valor para el diagnóstico de rutina, debido a que las partículas virales, por lo general, están en bajas concentraciones. Más aún, la simple visualización de estas partículas no permite realizar un diagnóstico definitivo si no se llevan a cabo pruebas complementarias, tales como la inmunomicroscopía electrónica (IME) o la inmunomicroscopía electrónica en fase sólida, ya que en materia fecal existen numerosas partículas pequeñas, redondas, de tamaño similar a los NoV y que no corresponden a este género viral (19).
- Inmuno Microscopia Electrónica (IME) e Inmuno Microscopia Electrónica en fase sólida: la IME es altamente específica debido a que se utilizan Acs específicos. En este método, la reacción antígeno-anticuerpo es llevada a cabo en solución; mientras que en la inmunomicroscopía electrónica en fase sólida, los Acs se encuentran unidos a una rejilla del microscopio para capturar las partículas virales. Esta variante presenta la ventaja de que conserva la morfología viral. Sin embargo ambos métodos presentan baja sensibilidad diagnóstica. Otra aplicación de la IME puede ser la detección de Acs en suero, cuando se utilizan antígenos específicos (31).
- Inmunoensayos: la expresión de antígenos de la cápside de *calicivirus* humanos en *baculovirus* recombinantes ha permitido el desarrollo de inmunoensayos para el diagnóstico de estos virus. En estos sistemas, la expresión del gen de la cápside viral de diversas cepas virales da como resultado proteínas de la cápside viral capaces de auto ensamblarse formando partículas símil virus, las cuales son morfológica y antigénicamente idénticas al virus salvaje. Estas partículas se utilizan como inóculo para generar antisuero polivalente. De esta forma, se detecta la presencia de partículas virales empleando los antisueros como

herramienta de captura, como también se pueden emplear las partículas virales para detectar la presencia de anticuerpos en los organismos infectados (31).

A nivel comercial, hay disponibles varios métodos para la detección de norovirus en heces. Por lo general los inmunoensayos son altamente específicos para algunos NoV, pero no lo suficientemente sensibles como para detectar una amplia variedad de los mismos; por lo que son utilizados como método diagnóstico en los brotes, en los que analizando un número reducido de muestras, se los puede caracterizar (22).

Además la sensibilidad de estos métodos depende del genotipo viral y por lo tanto los resultados pueden variar según las cepas que se encuentren circulando en la población en estudio (18).

- Reacción en cadena de la polimerasa por la transcriptasa reversa (RT-PCR): desde la clonación del genoma de virus Norwalk en la década del 90, la RT-PCR se convirtió en el método de referencia para la detección de los norovirus en muestras de materia fecal, agua y alimentos. Este método es ampliamente utilizado, ya que permite la detección viral en muestras en las cuales la carga viral es baja. La RT-PCR seguida del secuenciamiento nucleotídico tiene una gran utilidad en estudios de epidemiología molecular para identificar el origen de la infección. Se debe tener en cuenta, que si bien los cebadores disponibles para estos métodos permiten la detección de una gran variedad de cepas de norovirus, algunas cepas pueden escapar a la detección (18) (26) (31).
- Reacción en Cadena de la Polimerasa por la Transcriptasa Reversa en Tiempo Real: esta metodología está reemplazando a la RT-PCR, ya que además de ser más sensible y rápida, permite confirmar y cuantificar en la misma reacción; por lo que es utilizada tanto en casos de gastroenteritis endémica como epidémica, donde el número de muestras a estudiar es elevado, como así también en muestras ambientales para calcular índices de riesgo (32).

El tratamiento se basa en la administración de soluciones de rehidratación oral suplementadas con azúcares (glucosa o sacarosa) a fin de restablecer la pérdida de líquidos y electrolitos. Los pacientes con signos y síntomas de deshidratación severa,

pueden requerir la administración de estas soluciones por vía parenteral. En la medida que el paciente lo tolere, se debe incorporar la ingesta de alimentos, a fin de mejorar la recuperación de estos individuos (18) (22).

No se ha demostrado que los agentes antiespasmódicos, como la loperamida, disminuyan la pérdida intestinal de fluidos y su uso debe evitarse en niños, ya que en algunos casos puede resultar perjudicial, fundamentalmente en los menores de 3 años (33).

Contaminación Viral de Alimentos

El estudio de virus en el ambiente (incluidas matrices alimentarias) ha demostrado que aún en países altamente industrializados, la prevalencia de virus provoca profundas repercusiones en la salud pública y entraña importantes pérdidas económicas (34).

La transmisión de los virus a través de los alimentos depende de varios factores: el contacto inicial de la partícula con el alimento, la fijación o anexión del virus, la persistencia del virus hasta el consumo e ingestión del alimento por un hospedador susceptible. El contacto inicial puede tener lugar en cualquier etapa del proceso de producción, incluyendo antes de la cosecha, durante el procesado y en el momento de la preparación. Como ejemplos se pueden citar la contaminación de las aguas donde se cultiva marisco debido a un mal funcionamiento de las plantas de depuración de aguas residuales, el empleo de excrementos humanos como fertilizantes para cultivo, el uso de aguas contaminadas con heces para irrigar cultivos, y la deficiente higiene de las manos por parte de un manipulador de alimentos infectado (35) (36) (37) (38).

Potencialmente, todo alimento puede verse implicado, pero en la práctica, un número limitado de alimentos está asociado con mayor frecuencia con la aparición de brotes. Entre ellos está el marisco crudo o parcialmente cocido, las frutas y otros vegetales frescos y los alimentos listos para consumir (sándwiches y ensaladas). Los alimentos listos para consumir, suelen ser contaminados por un manipulador infectado en el momento de preparar el producto, mientras que la contaminación del marisco suele producirse antes de su cosecha o durante su procesado.

La adherencia de los virus a las superficies sería el resultado desde el punto de vista físico químico, de dos fuerzas opuestas: las fuerzas de atracción de Van der Waals

y las fuerzas electrostáticas de repulsión. Entre los factores que afectan a las fuerzas electrostáticas se encuentran el pH y la fuerza iónica de la solución, la presencia de compuestos que compiten por los lugares de adsorción, las propiedades de los virus (por ej. su punto isoeléctrico pI) y las propiedades del sorbente, es decir de la superficie (39). Esta característica ha sido utilizada para eluir virus de un sorbente mediante el aumento del pH de la solución que baña al sorbente hasta superar el valor 9.

Los virus entéricos pueden causar la contaminación de frutas y verduras mediante adsorción tras la exposición a suelos o aguas contaminados por heces. Un estudio en Costa Rica, utilizó un simple lavado para demostrar la presencia de rotavirus y virus de la hepatitis A sobre la superficie de lechugas compradas en el mercado (40). Esa contaminación superficial probablemente sería susceptible de una eliminación de los virus mediante elusión. Otra posible vía de contaminación es la captura de virus mediante el sistema radicular y el posterior transporte hasta las partes comestibles de la planta a través del sistema vascular (xilema y floema). Este mecanismo se ha estudiado para el caso de virus patógenos de plantas, sin embargo para el caso de patógenos entéricos, los estudios son reducidos. El virus de la encefalomiелitis del ratón fue adsorbido en cantidades significativas y fue transportado en ocasiones a la parte aérea de la planta. Los poliovirus también se han detectado en estas áreas del vegetal que habían sido regadas con aguas contaminadas con virus, incluso se ha demostrado también que los poliovirus accedían fácilmente a las plantas a través de heridas en sus partes aéreas, y también tras la lesión de su sistema radicular (41). Resulta de interés resaltar que en el caso de plantas y sistemas radiculares intactos irrigados con una solución conteniendo virus no se produjo el transporte de los virus a la planta en el caso de pimiento, pepino o lechuga. (Murphy W and Syverton J. Absorption and Translocation of Mammalian Viruses by Plants. 1958. *Virology* 6, 623-636.)

Muchas frutas y otros vegetales poseen superficies complejas que impiden la eliminación de sustancias contaminantes mediante el simple lavado (42). Las complejas superficies de determinados vegetales también pueden disminuir los efectos de la desecación que provocan la inactivación de los virus (43).

Se utilizan diversos métodos para intentar reducir el riesgo de la transmisión alimentaria de agentes patógenos, el lavado de los alimentos con agua es una práctica común para eliminar la suciedad y los contaminantes visibles, pero no resulta confiable para eliminar los virus.

Si bien en la actualidad se considera a los virus entéricos humanos como causantes habituales de enfermedades alimentarias, éstos no están contemplados en los controles y regulaciones, los cuales se limitan a los agentes bacterianos. La escasa disponibilidad de técnicas lo suficientemente sensibles y específicas para detectar virus en matrices alimentarias ha retrasado la recolección de información en esta área, y si bien en países altamente desarrollados se cuenta con datos importantes acerca de las transmisiones de enfermedades víricas a través de alimentos, en nuestro país no se cuenta con información al respecto. Está claro que hasta el momento no se está en condiciones de valorar el posible impacto en salud de la transmisión alimentaria de virus en nuestra región y es imperiosamente necesario el comienzo de estudios en este ámbito.

OBJETIVOS

- Determinar la frecuencia de detección de NoV en muestras de alimentos (vegetales de hojas) comercializados en un puesto mayorista del mercado de abasto de la Ciudad de Córdoba.
- Implementar un método de concentración viral con polietilenglicol para la recuperación de partículas virales.
- Caracterizar los genogrupos de NoV involucrados en la contaminación de las verduras estudiadas.
- Elaborar recomendaciones específicas para las prácticas de higiene en las diferentes etapas de la producción y consumo de verduras.

HIPÓTESIS

- Los vegetales de hojas cultivados en los alrededores de la Ciudad de Córdoba, se encuentran contaminados con NoV, y la frecuencia de contaminación viral es mayor al 30% en vegetales de hojas que se comercializan en nuestro medio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar un muestreo de vegetales de hoja para la detección de norovirus, se seleccionó a uno de los nueve proveedores mayoristas, que abastecen a un total de 1680 puestos de venta (verdulerías) catastrados en la ciudad de Córdoba por el Departamento de Bromatología de la Municipalidad de Córdoba. Se tomaron 19 muestras de vegetales de hoja (lechuga, lechuga colorada, acelga, achicoria, rúcula, espinaca), de aproximadamente 800 a 1000 gr cada una, de un mismo proveedor del Mercado de Abasto de la ciudad de Córdoba seleccionado al azar que a su vez provee a 19 verdulerías de la ciudad (figura 1).

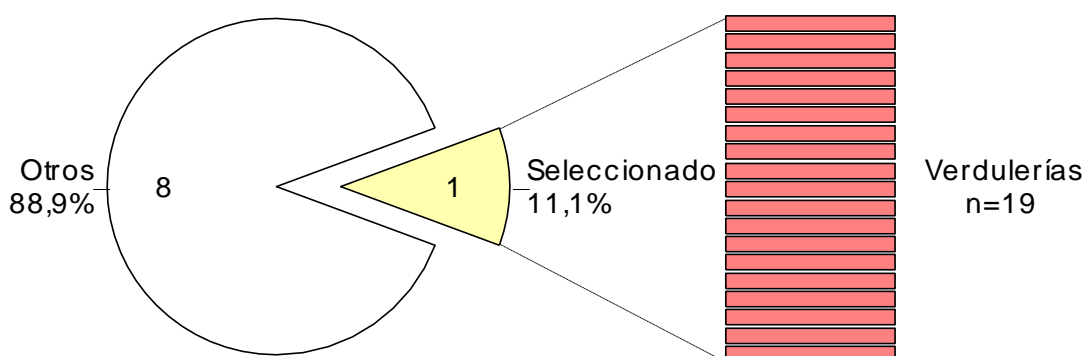


Figura 1: selección de la muestra.

Período de Muestreo

El muestreo se realizó entre junio y diciembre de 2012 con frecuencia quincenal. Cada muestra, una vez adquirida fue inmediatamente procesada en el laboratorio.

Diseño del estudio

Descriptivo observacional, transversal.

Técnica de procesamiento de las muestras

Se aplicó una técnica de concentración viral validada previamente en el laboratorio, con ligeras modificaciones. Brevemente, las partículas contenidas en 1,5 litros de buffer de lavado de muestra fueron concentradas cien veces en un volumen

final de 15 ml mediante centrifugación-elusión con polietilenglicol (Ver Anexo II, Protocolo 1) (44).

La extracción del ácido nucleico se realizó con Trizol-cloroformo y posterior precipitación en alcohol isopropílico, partiendo de 400 µL de concentrado de la muestra (45).

El ARN extraído se desnaturalizó a 97°C durante 7 minutos y se sometió a retrotranscripción con random primers según el protocolo de laboratorio. (Ver Anexo II Protocolo 2).

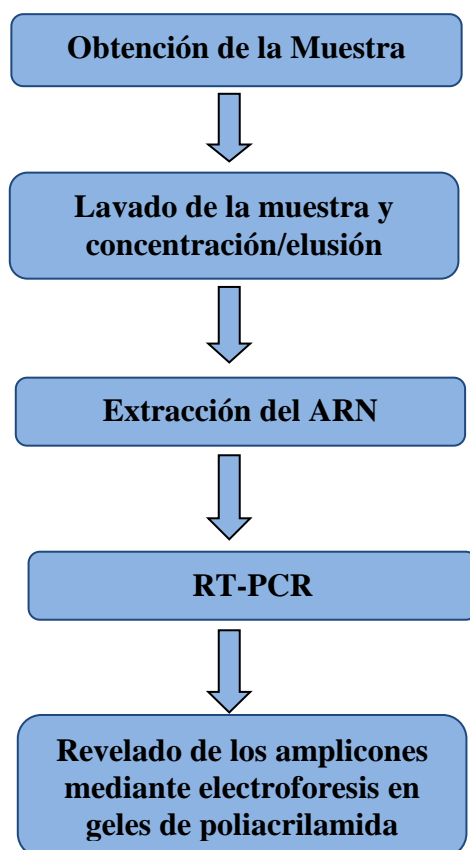
La detección específica de NoV se realizó por semi-nested PCR utilizando primers dirigidos a la región A del gen de la polimerasa viral. La primera reacción detecta los Genogrupos I y II de NoV obteniéndose un producto de 327 pb, mientras que las dos segundas reacciones por separado diferencian los Genogrupos I (187 pb) y II (236 pb) (46).

Las muestras también fueron analizadas mediante una PCR convencional con primers dirigidos a la región de la cápside para detectar genotipos pertenecientes también a los G I y II (47).

Los amplicones fueron revelados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con plata (48).

Los datos se analizaron mediante determinación de frecuencias de detección según las variables estacionales y especie del vegetal.

A fin de cuantificar las copias genómicas, se analizaron también mediante una q-RT-PCR en tiempo real, la totalidad de las muestras con primers dirigidos contra la región que une la ORF1 y ORF2, según los protocolos de Schultz A. 2011. (49) y Xiaoli L (50) en el Laboratorio de Virología Molecular de la Universidad de la República en Salto, Uruguay, gracias a la gentileza de los Dres. Rodney Colina y Matías Victoria.



Esquema 1. la detección de NoV en muestras ambientales.

Procesamiento de los datos

Los datos obtenidos se consignaron en una ficha diseñada para este fin y se analizaron mediante métodos categóricos presentados en tablas de frecuencias y porcentajes.

RESULTADOS

Del total de 19 muestras analizadas, 11 de ellas resultaron positivas para NoV (57,89 %)

Se observó que de las seis especies de vegetales de hoja estudiados, se detectaron muestras positivas en cinco de ellas (lechuga, acelga, achicoria, espinaca y rúcula). Sorprendentemente, cuatro de ellas se consumen crudas. Diez de las cepas detectadas pertenecieron al GI y una al GII. (Figura 2) (Tabla I).

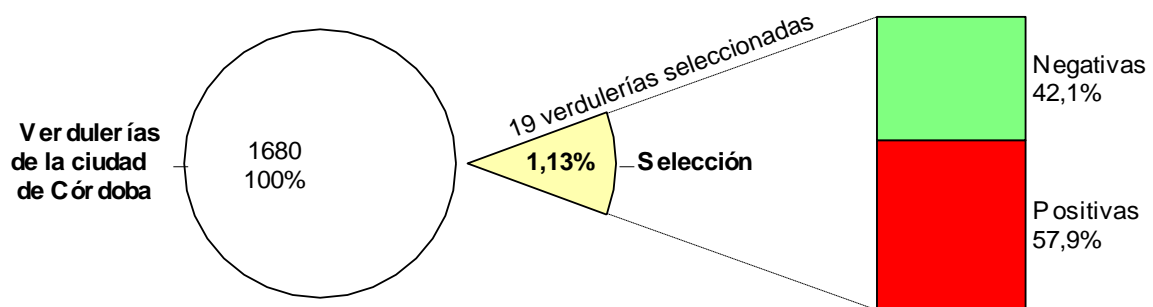


Figura 2: Porcentaje de muestras negativas (en verde) y positivas (en rojo) provenientes de un proveedor mayorista del mercado que abastece a 19 verdulerías de la ciudad de Córdoba.

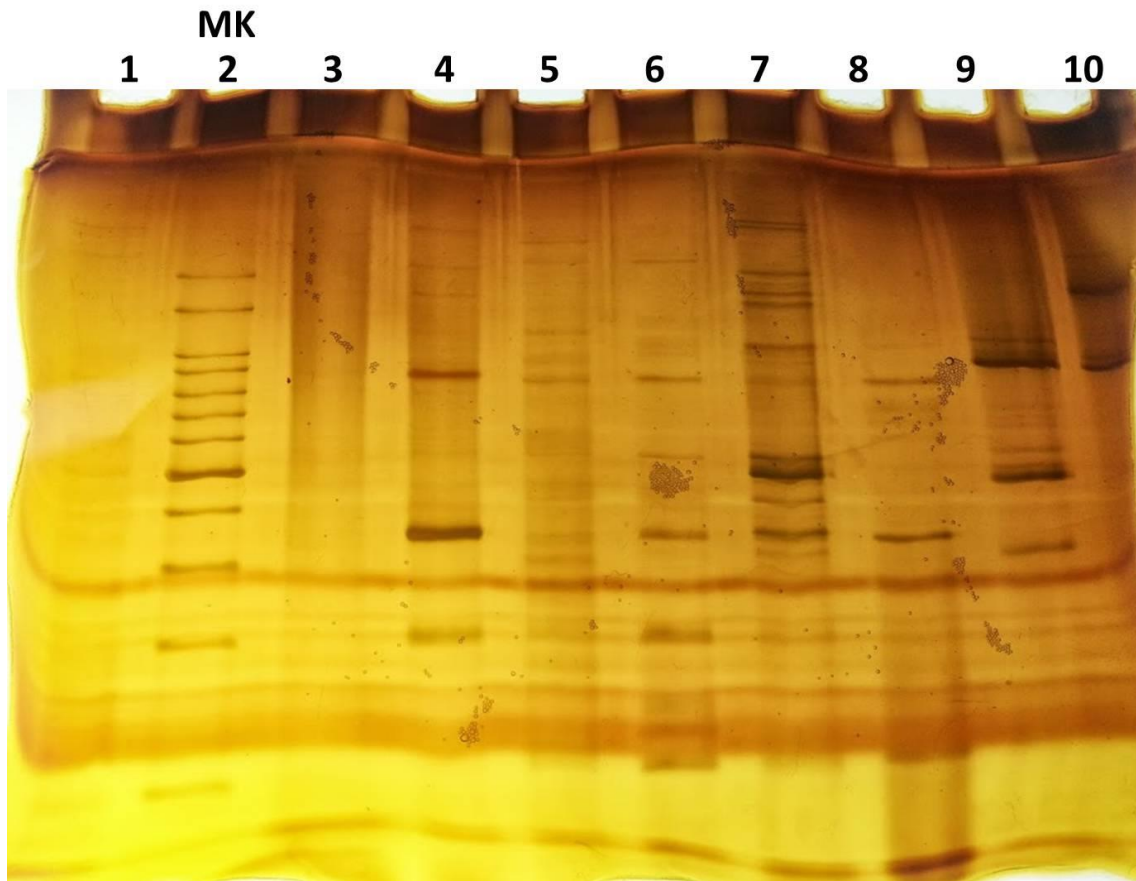


Figura 3: Gel de poliacrilamida con tinción de plata en el que se sembraron los amplicones de PCR. En la calle N° 2 se observa el marcador de peso molecular cuya banda más fuerte indica 250 pb. En las calles N° 4, 6, 7 y 8 muestras positivas para NoV GI (banda de 180 pb)

Tabla I. Resultados por distintos protocolos de RT-PCR de las muestras analizadas.

N° de Muestras	Tipo de vegetal	Mes que se adquirió y cosechó	Resultados por Rt-PCR (Vennema et al 2002) RdRP	Resultados por Rt-PCR (Kojima S y Katayama K, 2002) CP	Resultados por qPCR (Xiaoli L, 2005 y Schultz A. , 2011)
1	Lechuga	12-06-2012	-	-	-
2	Lechuga	27-06-2012	-	-	-
3	Espinaca	08-08-2012	-	-	-
4	Lechuga	15-08-2012	-	-	-
5	Achicoria	15-08-2012	GI	-	-
6	Rúcula	22-08-2012	-	GI	-
7	Espinaca	22-08-2012	-	GI	-
8	Acelga	05-09-2012	-	GI	-
9	Lechuga	05-09-2012	-	GI	-
10	Rúcula	12-09-2012	-	GI	-
11	Espinaca	12-09-2012	-	-	-
12	Acelga	03-10-2012	GI	-	-
13	Lechuga	03-10-2012	-	-	-
14	Acelga	24-10-2012	-	-	-
15	Lechuga colorada	24-10-2012	-	-	-
16	Lechuga	15-11-2012	GI	GII	-
17	Acelga	15-11-2012	GI	-	-
18	Achicoria	28-11-2012	GI	-	-
19	Acelga	28-11-2012	GI	-	-

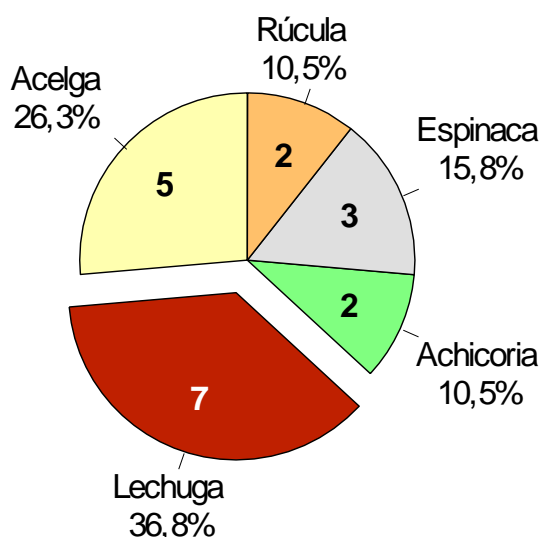


Figura 4: Distribución proporcional de muestras positivas de acuerdo a la especie vegetal contaminada. En el interior de cada porción del gráfico, se indica el número de muestras para cada especie vegetal estudiada.

Se observó presencia de NoV intermitentemente durante todo el periodo estudiado, principalmente en los meses de agosto, septiembre y noviembre. (Figura 5).

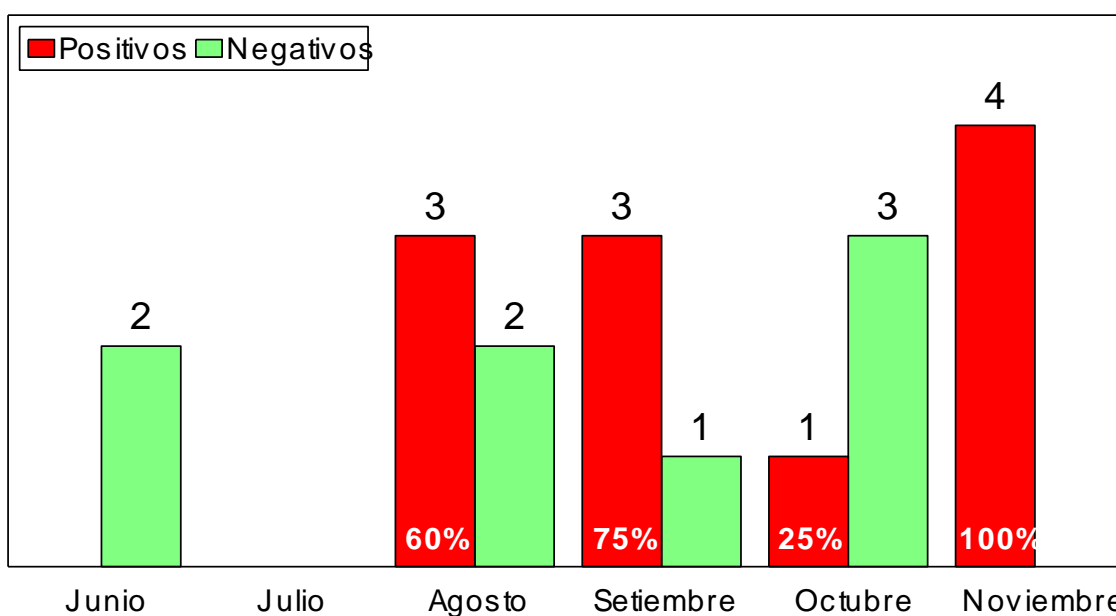


Figura 5: Distribución de muestras positivas y negativas según mes del año en el periodo estudiado (junio-noviembre 2012).

El análisis de las muestras por qRT-PCR arrojó resultados negativos en su totalidad.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la actualidad, y en países con un alto grado de desarrollo, las infecciones virales adquiridas por el consumo de alimentos contaminados constituyen un tema de preocupación tanto para los sectores de la producción y transformación de los alimentos como para el ámbito de la salud. Los patógenos virales implicados son esencialmente los virus entéricos que constituyen un conjunto de virus transmisibles al humano vía los alimentos contaminados, agua y contactos interpersonales (37). Se ha mencionado a más de cien agentes (51), siendo los más comunes norovirus, hepatitis A y rotavirus (52). En el plano epidemiológico, los norovirus son corrientemente reportados entre los casos de gastroenteritis no bacteriana. En el mundo entero, tanto en países en vías de desarrollo como países desarrollados, causan enfermedad moderada a severa afectando todas las edades, con un gran impacto entre los niños: 9 millones de hospitalizaciones y 2 millones de muertes por año entre los menores de cinco años en países en vías de desarrollo y alrededor de 500 mil hospitalizaciones por año en países desarrollados para el mismo grupo etario (23) (53). En Estados Unidos, serían responsables del 58% de los casos anuales de enfermedades transmitidas por alimentos con pérdidas económicas estimadas en 3,7 mil millones de dólares por año (54). Desde hace más de una década, han sido reportados brotes epidémicos de diversa severidad en Canadá (55), y en numerosos países europeos (56). Los datos más recientes dan cuenta de un aumento de las incidencias en Gran Bretaña (57), Países Bajos (58), Japón (59), en Francia, Australia y Nueva Zelanda (60). En los países de América del Sur, no existen programas de eliminación y control de las gastroenteritis producidas por norovirus, por lo tanto los datos son escasos y dispersos. Los rangos de prevalencia reportados en estos países son: Brasil: 14,5%, Venezuela: 16,76%, Chile: 17,4%, Argentina: 24% y Colombia: 32% (61). Es muy probable que las diferencias entre países sean, al menos en parte, debidas a limitaciones en la notificación e investigación de los casos esporádicos en cuanto a la etiología vírica o a la sensibilidad de la técnica empleada. Respecto a la investigación de estos virus en el ambiente, resultó importante el aporte generado por el estudio realizado en ecosistemas acuáticos en Florianópolis, donde se estudió la presencia de NoV en muestras de agua obtenidas a partir de diferentes fuentes (agua de mar y lagos, agua

para consumo humano entre otras). El virus fue detectado en todos los tipos de muestras analizadas, encontrándose en un 23% de las mismas. Se observó la co-circulación de cepas pertenecientes al genogrupo GI y GII (GII.4 y GII.2). Este estudio demuestra la amplia contaminación de esta área geográfica, y el riesgo potencial para la salud humana (62). Por otro lado, el monitoreo de norovirus en una planta de tratamiento de efluentes de Río de Janeiro, detectó una prevalencia de este virus correspondiente al 58%, siendo los Genogrupos GI y GII los hallados con mayor frecuencia. Esto demuestra la diseminación de estos agentes en el ambiente como consecuencia de los procesos de tratamiento de efluentes, constituyendo una fuente de contaminación en brotes de gastroenteritis aguda (63).

En nuestro país, el único antecedente de reporte de brotes fue llevado a cabo en el año 2004, por un grupo de investigadores del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS, Dr “Carlos G. Malbran”. En el mismo se analizaron muestras de materia fecal provenientes de brotes ocurridos durante ese año en distintas provincias (Buenos Aires, Santa Fe, Río Negro, Entre Ríos y La Pampa). Las muestras fueron procesadas por técnicas de RT-PCR y el producto obtenido fue secuenciado. Del análisis de los resultados se pudo concluir que el Genogrupo más frecuentemente hallado fue el GII, lo que coincide con la literatura mundial. Un hallazgo importante fue la detección del subgrupo GII.b, el cual ha sido descrito como emergente en los últimos años en Europa. Este subgrupo no había sido encontrado en nuestro país hasta ese momento (64).

Este mismo grupo de investigadores llevó a cabo otro estudio, realizado también en el año 2004, donde evaluaron la presencia de *Calicivirus*, *Rotavirus*, y *Astrovirus* como posibles agentes causales de gastroenteritis aguda en ocho brotes ocurridos durante ese año en nuestro país. Los datos obtenidos permitieron concluir que las muestras que resultaron positivas para Norovirus pertenecían a los Genogrupos GI, GII y GIV. Los genotipos hallados fueron los siguientes: GIV.1, GII.b, GII.4 y GI. Este fue el primer reporte sobre la epidemiología molecular de los *Calicivirus* humanos asociados a brotes de gastroenteritis en Argentina, asimismo constituyó el primer reporte de circulación de las cepas GII.b y GIV.1 en América del Sur (65).

Un estudio similar fue llevado a cabo los años siguientes, en el cual se analizaron muestras de heces obtenidas durante los brotes ocurridos durante los años 2005 y 2006. El análisis filogenético de las muestras que resultaron positivas para NoV reveló la presencia de cepas pertenecientes a los Genogrupos GI y GII; y dentro de éste,

se identificaron los genotipos GII.4, GIIB y GII.17. Este estudio constituye el primer reporte de circulación del genotipo GII.17 en Argentina (66). Estos datos, si bien son escasos, adquieren relevancia, ya que dan cuenta de la existencia de brotes de gastroenteritis por causa de norovirus en nuestro país, y la posible subestimación que exista de la prevalencia de esta patología. Asimismo, no se cuenta al presente en Argentina con reportes acerca de monitoreo viral en diferentes matrices alimentarias, lo cual resulta fundamental a fin de determinar y perfeccionar técnicas lo suficientemente sensibles y específicas para establecer las potenciales fuentes de contaminación y estimar el riesgo al que la población que consume dichos alimentos está expuesta.

En el año 2013, el *Center for Diseases Control* (CDC) dió a conocer un reporte en el que los norovirus en vegetales de hoja aparecen como primera causa de enfermedad ligada a alimentos en Estados Unidos.^a

Al no existir en nuestro medio ningún reporte acerca de la detección de norovirus en este tipo de vegetales, nos planteamos realizar un estudio de detección de estos agentes en verduras de hoja comercializadas en el mercado de abasto de nuestra ciudad. Sorprendentemente, los resultados arrojaron una prevalencia de 57,89% (11/19), la más alta frente a otros reportes recientes que dan cuenta de una prevalencia del 11,9% en Francia (67), 10% en España (68), 28,2% en Canadá y 33,3% en Bélgica (69), si bien estos estudios difieren en la metodología empleada para el muestreo y detección entre sí, constituyen los escasos reportes con los que se cuenta para establecer una comparación preliminar. Cuatro de las seis variedades de vegetales estudiados, se consumen crudos como lechuga, achicoria, espinaca y rúcula, mientras que la restante fue acelga, que generalmente se consume cocida, si bien como todo alimento es manipulado en la cocina y puede entrar en contacto con utensilios y demás superficies contaminadas. En cuanto a la estacionalidad de las muestras analizadas, se han encontrado especímenes positivos durante los meses fríos como cálidos (junio, agosto, septiembre y noviembre), y no se ha podido advertir un único patrón estacional con picos elevados en invierno como sucede en los muestreos clínicos, sino que similarmente a otros reportes en muestras ambientales, los hallazgos positivos parecerían suceder a lo largo del año y con algún pico primaveral. En el presente trabajo, la mayoría (10/19) de muestras positivas resultaron pertenecer al GI, mientras que tan sólo una, resultó positiva para GII. Este hallazgo a *priori* llama la atención

^a<http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/impact-of-contaminated-foods-508c.pdf>

debido a que se conoce que la mayoría de las cepas que circulan en humanos pertenecen al GII y que GI se encuentra en menor proporción en muestras clínicas. Dependiendo del año, cerca del 75 al 95 % de los brotes de NoV del mundo son debidos a virus GII y del 5 al 25 % se deben a virus GI, mientras que muy rara vez se han identificado virus GIV. Sin embargo, se ha evidenciado que cepas pertenecientes al genotipo GII.4 estarían implicadas en los casos de contaminación de persona a persona, mientras que cepas del genogrupo GI estarían más bien ligadas a productos de mar y vegetales frescos (70). En relación a estudios estructurales y de adhesión a diferentes superficies comparados entre partículas virales de los GI y GII, éstos evidenciarían ciertas diferencias (agregados, hidrofobicidad, estructuras secundarias y terciarias) que podrían explicar el fenómeno de detección en mayor proporción de GI en alimentos frescos (71).

Las muestras se procesaron por la técnica de RT-PCR, en ensayos con diferentes sets de primers, dado que no existe un par de primers universales que genéricamente permitan la detección de todos los genogrupos y genotipos de norovirus. En efecto, la gran diversidad genética de este grupo de virus, resulta en que diferentes ensayos con primers dirigidos hacia regiones distintas del genoma, muestra resultados que a veces erróneamente se pueden interpretar como discordantes (ver tabla I de resultados). En nuestro caso los primers utilizados con el protocolo de Vennema y cols (46) utiliza un set de primers con secuencias dirigidas contra un segmento de la polimerasa ARN dependiente, mientras que el protocolo de Kojima y Katayama (47), utiliza un set de primers dirigido hacia la región de la cápside viral. De manera que los resultados de las muestras que no coinciden en positividad por ambos métodos, también son interpretados como positivas. También a efectos de cuantificar la carga viral, se aplicó la técnica de qPCR en tiempo real. En este caso, todas las muestras resultaron negativas. Una hipótesis para explicar estos resultados es que debido a la presencia de algún agente inhibidor presente en las muestras la reacción haya resultado negativa, lo cual es relativamente frecuente para el caso de las reacciones en tiempo real. Por este motivo, no pudieron ser cuantificados los productos positivos. Se propone para un próximo proyecto la cuantificación de las muestras en este tipo de alimento, para poder así determinar el riesgo al que la población que los consume está expuesta.

El presente, constituye el primer reporte en nuestro país de detección de NoV en vegetales de hoja. Estos resultados preliminares subrayan la necesidad de ampliar las investigaciones en esta materia, tal el caso de estudiar la epidemiología molecular a fin de determinar si las cepas virales detectadas en el muestreo de alimentos se

corresponden a las que están circulando en la población humana en un mismo momento; investigar el ciclo de transmisión viral en la cadena de producción y comercialización de los productos, como así también la implementación de sistemas de control y vigilancia mediante laboratorios especializados con intervención de los sectores de la alimentación y salud.

Conclusiones

- En este primer estudio realizado en Argentina, se detectó NoV en vegetales de hojas que se comercializan en la ciudad de Córdoba con una frecuencia de detección del 57,91%.
- Las cepas detectadas pertenecen mayoritariamente al GI, coincidiendo con otros reportes de NoV en alimentos, mientras que tan solo una cepa resultó pertenecer al genogrupo II (GII).
- La alta frecuencia de detección de NoV en vegetales de hojas pone de manifiesto el riesgo potencial al que la población que los consume esté expuesta.
- Se sugiere continuar con estos estudios, particularmente aplicando técnicas de cuantificación a fin de realizar cálculos de riesgo de infección; como así también secuenciar las cepas detectadas y compararlas con aquellas cepas de muestras clínicas de individuos afectados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Griffin PM, et al. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011, 17:7-15.
2. Mann E, Streng S, Bergeron J, Kircher A. A Review of the Role of Food and the Food System in the Transmission and Spread of Ebolavirus. *PLoS Negl Trop Dis* 2015, 9(12):e0004160.
3. Harder TC, Buda S, Hengel H, Beer M, Mettenleiter TC. Poultry food products a source of avian influenza virus transmission to humans. *Clin Microbiol Infect* 2016, 22(2):141-6.
4. Oishi I, Glass RI, et al. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J Infect Dis* 1994, 170:439-443.
5. CDC. Foodborne Outbreak of Group A Rotavirus Gastroenteritis Among College Students - District of Columbia, March-April 2000. *MMWR* 2000, 49:1131-1133.
6. Lizuka S, Matsuda Y, Hoshina K, Itagaji A. An outbreak of group A rotavirus infection among adults from eating meals prepared at a restaurant, april 2000. *Infectious Agents Surveillance Report*, 21th. Shimane : Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 2000, 145-146.
7. Le Guyader FS, Ruggeri F, et al. Detection of noroviruses in an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol* 2006, 44:3878-3882.
8. Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson MA, Glass RI, Monroe SS. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J Infect Dis* 2006, 193(3):413-21.
9. Al-Ali RM, Chehadeh W, Hamze M, Dabboussi F, Hlais S, Mallat H. First description of gastroenteritis viruses in Lebanese children: a pilot study. *J Infect Public Health* 2011, 4(2):59-64.
10. WHO/UNAIDS. *Estadísticas Sanitarias Mundiales 2010*. World Health Organization, 2012. 180.
11. Kapikian AZ, Estes mk, Chanock RM. Norwalk Group of Viruses. Third Edition. Chapter 25, *Fields Virology*. 1996.
12. González GG, Liprandi F, Ludert JE. . Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. *J Med Virol* 2011, 83(11):1972-82.

13. Jin Y, Cheng W-x, Yang X-m, Jin M, Zhang Q, Xu Z-q, et al. Viral agents associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Lanzhou, China. *J Clin Virol* 2009, 44(3):238-41.
14. Verhoef L, Koopmans M, Depoortere E, Boxman I, Duizer E, van Duynhoven Y, et al. Food Borne Viruses in Europe Network. Emergence of New Norovirus Variants on Spring Cruise Ships and Prediction of Winter Epidemics. *Emerging Infections Diseases* 2008, 14(2):238-243.
15. Siebenga JJ, Vennema H, Duizer E, Koopmans MP. Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, The Netherlands, 1994-2005. *Emerg Infect Dis* 2007, 13(1):144-6.
16. Analysis of Integrated Virological and Epidemiological Reports of Norovirus Outbreaks Collected within the Foodborne Viruses in Europe Network from July 2001 to June 2006. Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Koopmans M, et al. 2008, *J Clin Microbiol*, 46(9):2959-2965.
17. Bellido-Blasco J, García A. Epidemiología de las gastroenteritis agudas víricas. Aspectos actuales. Valencia, España: EMISA, editor. Universidad de Valencia, 2007. 166.
18. Chen SM, Ni YH, Chen HL, Chang MH. Microbial etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Taiwan. *J Formosa Med Assoc* 2006, 105(12):964-70.
19. Lin CY, Chiu NC, Lee HC, Chuang CK, Lin SP, Yeung CY. Lin CY, Chiu NC, Lee HC, Chuang CK, Lin SP, Yeung CY. The emerging importance of norovirus as the etiology of pediatric gastroenteritis in Taipei. *J Microbiol Immunol Infect* 2010, 43(2):105-10.
20. Najafi A, Najafi S, Vahdat K, Kargar M, Javdani N. Importance of viral pathogens in children with acute gastroenteritis in the south of Iran. *Ann Saudi Med* 2013, 33(2):124-9.
21. Guadagnucci MS, Sampaio TM. Norovirus: an overview. *Rev Assoc Med Bras* 2010, 57(4):462-7.
22. Tran A, Talmud D, Lejeune B, Jovenin N, Renois F, Payan C, et al. Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus, and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in northern France. *J Clin Microbiol* 2010, 48(5):1943-6.
23. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 2009, 44(1):1-8.
24. Bitler E, Matthews J, Dickey B, Eisenberg J, Leon J. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol Infect* 2013, 141(08):1563-71.

25. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis* 2004, 39:318-324.
26. Espinosa, SM. Norovirus, principal causa de brotes de gastroenteritis. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* 2007, 21(82):33-4.
27. Blanco Fernández MD, Torres C, Martínez LC, Giordano MO, Masachessi G, Barril PA, Isa MB, Campos RH, Nates SV, Mbayed VA. Genetic and evolutionary characterization of norovirus from sewage and surface waters in Córdoba City, Argentina. *Infect Genet Evol* 2011, 11(7):1631-7.
28. La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Ann Ist Super Sanita* 2010, 46(3):266-73.
29. Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia. Economic costs of outbreaks of acute viral gastroenteritis due to norovirus in Catalonia (Spain), 2010-2011. Navas E, Torner N, Broner S, Godoy P, Martínez A, Bartolomé R, Domínguez A. 2015, *BMC Public Health*, 15(1):999.
30. Hospital admissions due to norovirus in adult and elderly patients in England. Haustein T, Harris JP, Pebody R, Lopman BA, Haustein T, Harris JP, Pebody R, Lopman BA. 2009, *Clin Infect Dis*, 49:1890–1892.
31. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2009, 361(18):1776-85.
32. Lopman BA, Hall AJ, Curns AT, Parashar UD. Increasing rates of gastroenteritis hospital discharges in US adults and the contribution of norovirus, 1996–2007. *Clin Infect Dis* 2011, 52:466–474.
33. Henson SJ, Majowicz SE, Masakure O, Sockett PN, MacDougall L, et al. Estimation of the costs of acute gastrointestinal illness in British Columbia, Canada. *Int J Food Microbiol* 2008, 127:43–52.
34. CDC, Centers of Diseases Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks--United States, 2008. *MMWR* 2011, 60(35):1197-202.
35. Bowen A, Fry A, Richards G, Beauchat L. Infections associated with cantaloupe consumption: a public health concern. *Epidemiol Infect* 2006, 134:675-685.
36. Carter, MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission infection. *J Appl Microbiol* 2005, 98:1354-1380.
37. Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problema. *Int J Food Microbiol* 2004, 36:798-801.

38. Widdowson MA, Glass RI, et al. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg Infect Dis* 2000, 11:95-102.
39. Fate and transport of viruses in porous media. Jin Y, Flury M. 2002, *AdvAgron*, 77:39-102.
40. Hernandez F, Monge R, Jimenez C, Taylor L. Rotavirus and hepatitis A virus in market lettuce (*Latuca sativa*) in Costa Rica. *Int J FoodMicrobiol* 1997, 37:221-223.
41. Le Guyader F, Altmar RL. Fijación e inactivación de los virus sobre y dentro de los alimentos, con atención a la función de su matriz. [aut. libro] Cliver y Bosch Editores Koopmans. *Virus de Transmisión Alimentaria*. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA S.A., 2010.
42. Croci L, De Medici D, Di Pasquale S, Toti L. The survival of hepatitis A virus in fresh produce. *Int J Food Microbiol* 2002, 73:29-34.
43. Rzezutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMSMicrobiol Re* 2004, 28:441-453.
44. Muller JE, Bessaud M, Huang QS, Martinez LC, BarrilPA, et al. Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccines and inactivated poliovirus vaccine use in Cordoba Province, Argentina. *Appl Environ Microbiol* 2009, 75(5):1395-1401.
45. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162(1):156-9.
46. Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol* 2002, 25:233-235.
47. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002, 100(1-2):107-14.
48. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982, 16(3):473-7.
49. Schultz AC, Vegac E, Dalsgaard A, Christensen LS, Norrung B, et al. Development and evaluation of novel one-step Taq Man realtime RT-PCR assays for the detection and direct genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Clin Virol* 2011, 50:230-234.

50. Xiaoli L, Pang X, Preiksaitis JK, Lee B. Short communication Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirusgenogroupsI and II in patients with acute gastroenteritis.J ClinVirol 2005, 33:168–171.
51. Gerba, C. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. Adv App Microbiol 1984, 30:133-168.
52. D’Souza DH, Moe CL, Jakus LA. Foodborne viral pathogens. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Third Edition.Doyle MP and Beuchat LR, (Ed), 2007.581-607.
53. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2014, 14(8):725-30.
54. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens.Emerg Infect Dis 2011, 17(1):7-15.
55. INSPQ, InstitutNational de Santé Publique du Québec. Cas d’infection à Caliciviridaeincluant le norovirus. STATLABO-Statistique d’Analyse du Laboratoire Santé Publique du Québec.INSPQ, 2011. 1-12. Vol. 10.
56. Kroneman HA, Vennema J, Duizer H, van Duynhoven E, Gray Y, et al. Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for foodborne viruses.Eurostat website, 2006.J Public Health 2007, 30:82-90.
57. PHE. Weekly national norovirus and rotavirus report. 2014. Public Health England 2014, 1-8.
58. Havelaar AH, Haagasma J, Magen MJJ, Kemmeren JM, Verhoef LPB, et al. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. Intern J Food Microbiol 2012, 156:231-238.
- 59.National Institute of Infectious Diseases (NIID) 2014. <http://www.nih.go.jp/niid/en/iasr-noro-e.html>. NIID. 2014.
60. Van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, et al, on behalf of NoroNet. Indications for worldwide increased Norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. Eurosurveillance 2013, 18:1.
61. Peláez, D. Enfermedad diarreica aguda (EDA) nuevos agentes virales. Rev MVZ Córdoba 2004, 9(2):470.
62. Victoria M, Rigotto C, Moresco V, de Abreu Correa A, Kolesnikovas C, Leite J Miagostovcht M, Barardi C. Assessment of norovirus contamination in

- environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. *J Appl Microbiol* 2010, 109(1):231-8.
63. Victoria M, Guimarães F, Fumian T, Ferreira F, Vieira C, Shubo T, Leite J, Miagostovicht M. One year monitoring of norovirus in sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health* 2010, 8(1):158-65.
 64. Gomez K, Stupka J, Parra G, Gomez J. Caracterización molecular de cepas de norovirus aislados de brotes de gastroenteritis ocurridos en Argentina durante 2004. *Rev Argent Microbiol* 2005, 37(1):43.
 65. Gomez K, Stupka J, Gomez J, Parra G. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol* 2007, 79(11):1703-9.
 66. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis occurring in Argentina during 2005 and 2006. Gomez K, Stupka J, Diana A, Parra G. 2008, *Rev Argent Microbiol*, 40(4):222-8.
 67. Loutreul J, Cazeaux C, Levert D, Nicolas A, Vautier S, Le Sauvage AL, Perelle S, Morin T. Food Prevalence of human noroviruses in frozen marketed shellfish, red fruits and fresh vegetables. *Environ Virol* 2014, 6(3):157-68.
 68. Pérez-Rodríguez F, González-García P, Valero A, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D. Impact of the prevalence of different pathogens on the performance of sampling plans in lettuce products. *Int J Food Microbiol* 2014, 184:69-73.
 69. Baert L, Mattison K, Loisy-Hamon F, Harlow J, Martyres A, et al. Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? Review. *Int J Food Microbiol* 2011, 151(3):261-9.
 70. Le Guyader FS, Loisy F, Atmar RL, Hutson AM, Estes MK, et al. Norwalk virus specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis* 2006, 12:931-936.
 71. Samandougou, I. Étude structurale et fonctionnelle du phénomène d'adhésion des norovirus. Tesis doctoral. Québec, Canadá: Université Laval, 2015.
 72. Clarke IN, Estes MK, Green KY, Hansman GS, Knowles NJ, et al. Caliciviridae. [aut. libro] A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. King. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Union of Pure and Applied Chemistry*. San Diego: Elsevier, 2012, pp977-986.
 73. Green K, Chanock R, Kapikian A. Chapter 27: Human Caliciviruses. *Fields – Virology 4th Edition*. Fields, 2001, pp 684-709.
 74. Troeger H, Loddenkemper C, Schenider T, Schreier E, Fromm M, Schulzke J-D. Structural and functional. *Gut* 2009, 58:1070-1077.

75. Guévremont E1, Brassard J, Houde A, Simard C, Trottier YL. Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. *J Virol Methods* 2006, 134(1-2):130-5.

ANEXO N° I

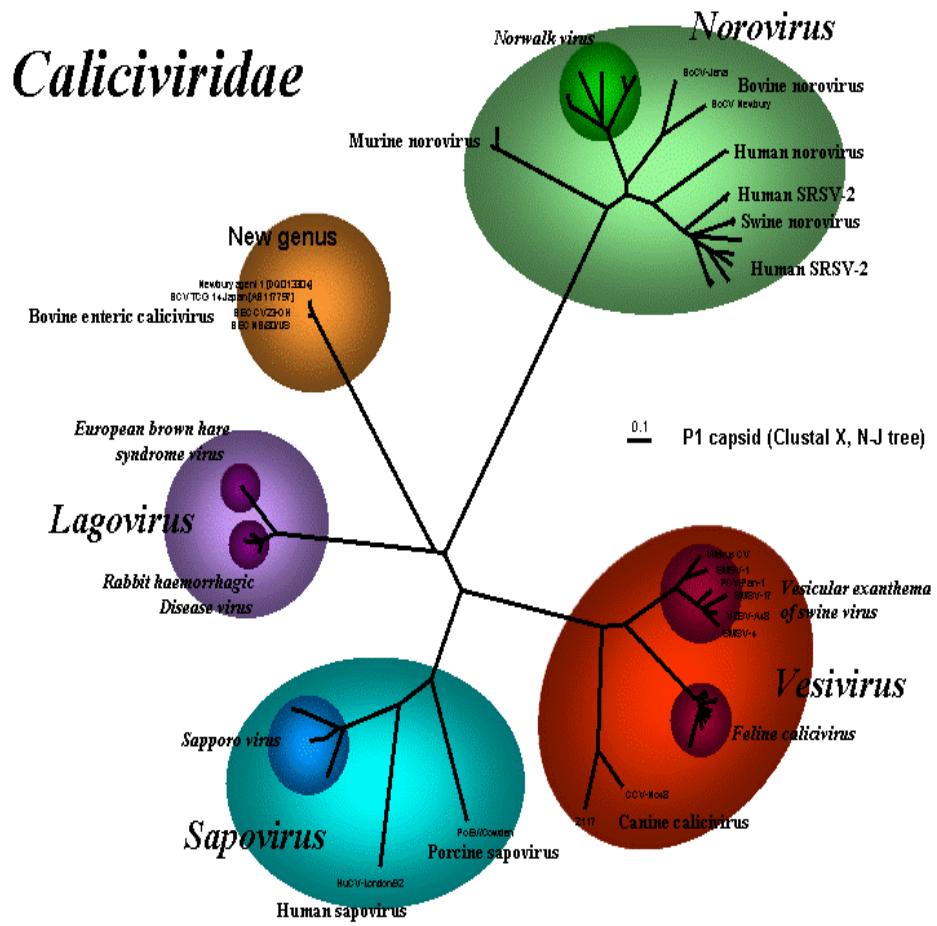


Figura I. Clasificación taxonómica de la familia *Caliciviridae*. (72)

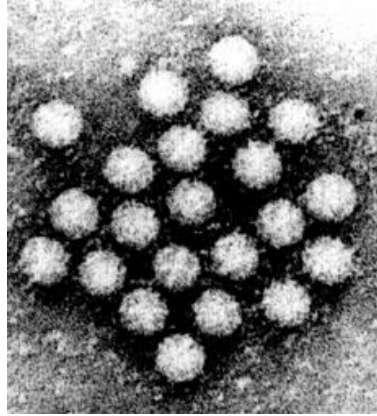


Figura II. Partículas de Norovirus en filtrado de heces observadas por inmunomicroscopia electrónica. (73)

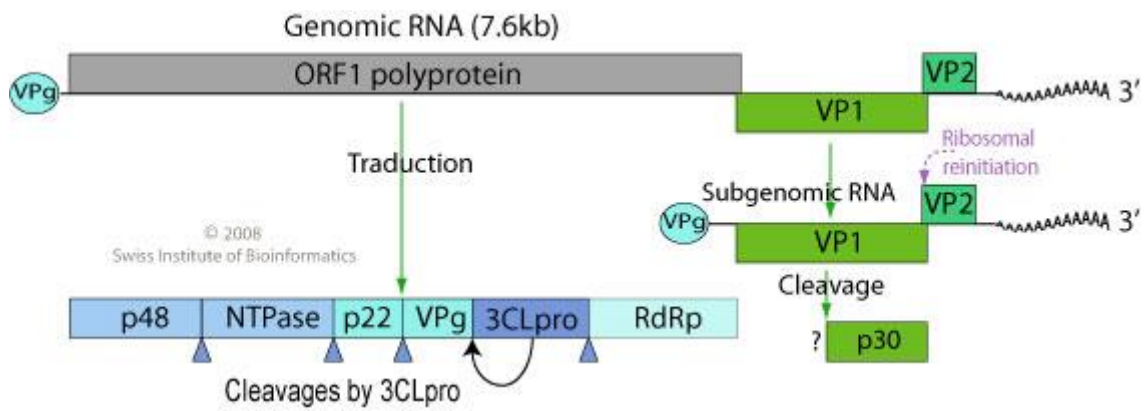


Figura III. Organización genómica de los norovirus^b.

^bTomado de http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/194.html

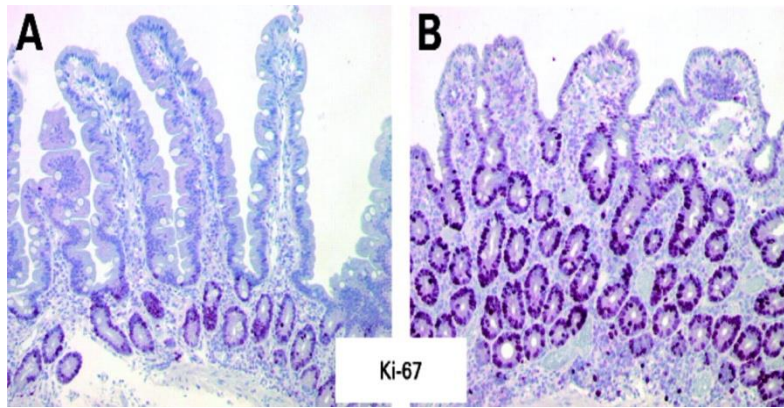


Figura IV. Biopsia duodenal en paciente control (A) y en paciente infectado por norovirus (B).(74)

ANEXO N° II

Protocolo de Lavado de verduras y concentración de partículas virales (75)

Procedimiento

- 1) Las verduras una vez adquiridas, deben conservarse a 4° C hasta su procesamiento preferentemente, no más de 15 horas antes.
- 2) Disponer las hojas (tanto viejas como nuevas, incluso las dañadas, no descartarlas), aproximadamente un atado o atado y medio si son verduras de hoja en un recipiente absolutamente limpio junto con 1 litro y medio de buffer de elución. Sumergir bien todas las hojas y dejar en agitación a temperatura ambiente 30 min. Y después revolver las verduras y dejar otros 30 min. en agitación.
- 3) Retirar las hojas y colocarlas en el recipiente para estrujarlas y escurrir el resto de buffer depositado sobre su superficie, rescatar ese resto de buffer y agregárselo al recipiente original, de manera de juntar todo el volumen inicial de un litro y medio.
- 4) Trasvasar el buffer de elución a un Erlenmeyer de 3 litros previamente esterilizado y agregar PEG 6000 (10% peso/volumen) y Na Cl 2 % (peso/volumen), o sea 150 gr de PEG y Na Cl 30 gr. Para el volumen de 1 litro y medio.
- 5) Introducir un magneto y agitar en heladera al menos 2 horas o toda la noche.
- 6) Repartir el buffer en seis mamaderas (equilibrar antes de acomodar en el rotor) y centrifugar a 12000 r.p.m. por 30 min. A 4° C (para precipitar las partículas virales).
- 7) Recuperar el pellet (precipitado) con un poquito de su sobrenadante, es decir sin descartar absolutamente todo para no perder virus, llevarlo a una sola de las mamaderas, agregar PBS estéril para llegar a 15 ml. finales.
- 8) Incubar 1 h. a temperatura ambiente en agitación.
- 9) Centrifugar (equilibrar con otra mamadera con agua en el rotor) a 8300 rpm durante 20 min. Y el sobrenadante es la muestra concentrada 100 X. Guardar en tubos tipo Kan o crioviales en freezer de -80 preferentemente, debidamente rotulados con fibra indeleble.

Preparación del buffer de elusión

Para 1500 ml de buffer (para lavar una muestra)
43,5 gr. de extracto de carne(2,9 % v/w)
90 gr. Glicina (6 % v/w)
Agua estéril hasta 1500 ml.
Llevar a pH 9,5

Protocolo de Preparación de mezcla (Rt-PCR) para NoV

Retrotranscripción

Para una reacción de 27 μ L de volumen final (12 μ L de Mix y 10 μ L de RNA)

Reactivo	Volumen (ul)
Buffer 5X Rt MMLV	4
DTT	2
Mg Cl2 (50 mM)	1
Random primer (25 pmol/ul)	2
dNTP (10 mM)	2
MMLV (200 U/ul)	1
RNAsin 40 U/ul	0,25

Ciclado:

37° C por 1 hora y 30 minutos

98° C por 5 minutos.

PCR NoV (primera ronda) (Región A de la polimerasa viral)

Para una reacción de 25 μ L de volumen final (20 μ L de mix más 5 μ L de cDNA)

Reactivo	Volumen (ul)
Agua para PCR	12,375
Buffer 5X	5
Primer NV1	1
Primer NV2	1
dNTP (10 mM)	0,5
Taq polimerasa (5 U/ul)	0,125

Ciclado:

1. 94° C por 5 min.

2. 94° C por 30 seg.

3. 37° C por 30 seg.

4. 72° C por 30 seg. (repetir desde el paso 2 por 40 ciclos)

5. 72° C por 10 min.

Fragmento específico que amplifica: 330 pb

PCR segunda ronda

- Para Genogrupo I

Para una reacción de 25 ul de volumen final (23ul de mix más 2 ul de amplicon de 1ª ronda)

Reactivo	Volumen (ul)
Agua para PCR	15,375
Buffer 10X	5
Primer NV2	1
Primer NV3	1
dNTP (10 mM)	0,5
Taq polimerasa)5 U/ul)	0,125

- Para Genogrupo II

Reactivo	Volumen (ul)
Agua para PCR	15,375
Buffer 10X	5
Primer NV1	1
Primer NV4	1
dNTP (10 mM)	0,5
Taq polimerasa)5 U/ul)	0,125

Ciclado:

6. 94°C por 5 min.

7. 94°C por 30 seg.

8. 45°C por 30 seg.

9. 72°C por 30 seg. (repetir desde el paso 2 por 35 ciclos)

10. 72°C por 10 min.

Fragmento específico que amplifica: 330 pb

Revelado en gel de poliacrilamida al 10 %

Fragmento GI: 188 pb

Fragmento GII 237 pb

Protocolo de Detección de NoV GI (región de la cápside viral)

▪ PCR (NoVGI)

Molde 5µL de cDNA. Agregar 20µL de PCR-Mix y llevar a termociclador (Programa **NOV1**: 95°C 3min, 40 ciclos de 95°C 30seg + 50°C 30seg + 72°C 30min; 72°C 10min)

Agua	13,2µL
Buffer 10X	2,5µL
Cl ₂ Mg (25mM)	1,6 µL
dNTP's (10mM)	0,5µL
Primer COG1F (10µM)	1µL
Primer G1SKR (10µM)	1µL
TAQ pol (5U/ µL)	0,2µL
Vol. Final	20 µL

▪ HEMI-NESTED PCR

Molde: 2µL del producto de PCR. Agregar 23µL de hemi-nested PCR-Mix y llevar a termociclador. Ciclado: 95°C 3min, 35 ciclos de 95°C 30seg + 50°C 30seg + 72°C 30min; 72°C 10min)

Agua	16,2 µL
Buffer 10X	2,5 µL
Cl ₂ Mg (25mM)	1,6µL
dNTP's (10mM)	0,5µL
G1SKR (10µM)	1µL
G1SKF (10µM)	1µL
TAQ pol (5U/ µL)	0,2µL
Vol. Final	23µL

▪ PCR (NoV GII)

Molde 5µL de cDNA. Agregar 20µL de PCR-Mix y llevar a termociclador (Programa **NOV1**: 95°C 3min, 40 ciclos de 95°C 30seg + 50°C 30seg + 72°C 30min; 72°C 10min)

Agua	13,2µL
Buffer 10X	2,5µL
Cl ₂ Mg (25mM)	1,6 µL
dNTP's (10mM)	0,5µL
Primer COG2F (10µM)	1µL
Primer G2SKR (10µM)	1µL
TAQ pol (5U/ µL)	0,2µL
Vol. Final	20 µL

- **HEMI-NESTED PCR**

Molde: 2 μ L del producto de PCR. Agregar 9 μ L de hemi-nested PCR-Mix y llevar a termociclador (Programa **NOV 2**:95°C 3min, 35 ciclos de 95°C 30seg + 50°C 30seg + 72°C 30min; 72°C 10min)

Agua	16,2 μ L
Buffer 10X	2,5 μ L
Cl ₂ Mg (25mM)	1,6 μ L
dNTP's (10mM)	0,5 μ L
G2SKR (10 μ M)	1 μ L
G2SKF (10 μ M)	1 μ L
TAQ pol (5U/ μ L)	0,2 μ L
Vol. Final	23μL

ANEXO N°III

Recomendaciones específicas para las prácticas de higiene en las diferentes etapas de la producción de verduras.

Las buenas prácticas son el componente fundamental de inocuidad, y corresponde a una serie de recomendaciones establecidas para asegurar un ambiente limpio y seguro para los trabajadores, así como para minimizar el potencial de contaminación de los productos alimenticios.

- Implementar con los agricultores, empresas productoras y empacadoras de productos vegetales, las buenas prácticas agrícolas y de manufactura a fin de minimizar los riesgos en lo referente a la calidad microbiológica de aguas de riego, abonos orgánicos, higiene de los trabajadores, además de las condiciones sanitarias en los campos, e instalaciones de empaque y en el transporte.

- **Estiércol y Abonos Orgánicos:**
 - Nunca se debe utilizar estiércol fresco como abono para vegetales.
 - Los animales domésticos como vacas, cabras, caballos, perros, etc.; pueden ser fuentes de contaminación y se deberá mantener fuera de los campos de cultivo.
 - Se considera al estiércol y lodos de plantas componteados, como seguros microbiológicamente, sin embargo, resta por determinar su seguridad a nivel virológico, ya que las temperaturas alcanzadas en el proceso de componteado, no asegurarían la eliminación de virus entéricos; por lo tanto, se sugiere la realización de análisis de compostas para demostrar la ausencia de estos virus potencialmente patógenos.

- **Aguas de Riego**
 - Evitar absolutamente la utilización de aguas negras en la producción de vegetales.
 - Se deberá evitar terrenos adyacentes a posibles fuentes de contaminación, como aquellos que reciben escurrimientos de aguas contaminadas o campos cercanos a los rellenos sanitarios o zonas industriales.

- Considerar prácticas que protejan la calidad del agua, como la utilización de tuberías para conducción, mantener limpios los canales, restringir el acceso de animales a los campos.
- Condiciones sanitarias de los trabajadores. En el campo debe existir en número de sanitarios necesarios, con accesibilidad a ellos y en condiciones adecuadas de higiene.

▪ **Etapa de la Manufactura**

- El riesgo de contaminación de los vegetales después de la cosecha es alto, ya que existe una gran manipulación por parte del personal. Además, las contaminaciones del área de empaque y los insumos utilizados pueden ser factor de riesgo.
- Utilización del agua en los procesos de manufactura y lavado.
- La calidad del agua utilizada en el lavado debe ser acorde con el uso que se pretenda hacer de la misma.
- Es recomendable el uso de soluciones desinfectantes en el agua y utensilios que están en contacto con los vegetales. Las soluciones de compuestos clorados deben contener al menos 10mg/L de concentración para la eliminación de los virus.

El tratamiento superficial con agentes antimicrobianos mediante lavado, debe ir seguido de un enjuague con agua limpia para eliminar cualquier residuo.

Debe monitorearse la cantidad de cloro durante el lavado y otras operaciones, para garantizarse la utilización de niveles efectivos.

▪ **Trabajadores**

Los operarios que padecen infecciones y trabajan con vegetales aumentan el riesgo de transmisión de enfermedades por los alimentos. Generalmente los brotes de enfermedades transmitidas por estos han sido normalmente debido a que las mismas han sido contaminadas por materia fecal. Todos los trabajadores deben recibir una capacitación acerca de los principios básicos de higiene y sanidad. Todo trabajador diagnosticado con un caso activo de una enfermedad causada por cualquiera de estos microorganismos debe estar exento de participar en tareas que impliquen contacto con vegetales desde la cosecha hasta el empaque o manufactura de las mismas. Deben considerarse buenas prácticas de higiene, como en correcto lavado de manos. Se deben limpiar las plataformas, recipientes y cubiertas antes de usarlos para transportar vegetales frescos; y también se deberá tener cuidado al empacar el

producto directamente en el campo, para no contaminar los recipientes por contacto con estiércol o tierra.

▪ **Implementación de Sistemas de Trazabilidad**

Si se dispone de un efectivo sistema de rastreo, los inspectores pueden obtener pistas que le conduzcan a una región, instalaciones de empaclado o incluso una unidad de producción específica, en vez de tener que culpar a la totalidad de un producto de una región o país. Por ejemplo, en el caso de contaminación de fresas por hepatitis A, que ocurrió en Estados Unidos en 1997, la falta de identificación de lotes impidió rechazar el supuesto de que la contaminación había ocurrido en San Quintín, Baja California, y en consecuencia, el mercado se cerró para las fresas de ese origen, representando una pérdida económica significativa.^c

Buenas prácticas de compra, preparación y conservación de los alimentos^d.

En la compra:

- En la elección de dónde comprar los alimentos, se debe tener presente que los establecimientos de venta de alimentos deben estar autorizados y bajo el control e inspección periódica de los Servicios de Salud Pública correspondientes. Por ello, la primera garantía de la que debe asegurarse es el de la legalidad del centro donde se adquieren los alimentos.
- La compra directa de alimentos al productor no registrado y autorizado es una práctica de riesgo ya que carece de las garantías de que cumple los reglamentos sanitarios.
- Así mismo, debe ser obligatorio el correcto etiquetado de todos los alimentos, donde debe de aportarse a los consumidores los datos fundamentales de las características del producto: de origen, composición y fechas de consumo o de producción.

^cManual de Buenas Prácticas Agrícolas y de Manufactura en Vegetales, CESAVEG. Comité Estatal de Sanidad vegetal del Gobierno del estado de Guanajuato.1998. Disponible en: www.cesaveg.org.mx

^dGuía de Buenas Prácticas de Higiene Agrícolas y de Manufactura para la producción primaria (cultivo-cosecha), acondicionamiento, empaque, almacenamiento y transporte de frutas frescas. Resolución SENASA 510/02.

Conservación:

- Los alimentos deben de conservarse de acuerdo a las exigencias que establece su etiquetado, y consumirse antes de que se supere la fecha de caducidad o de consumo preferente.
- Es necesario comprobar que la heladera funcione adecuadamente y mantenerla limpia y sin hielo, con espacio entre los alimentos, ubicando los alimentos crudos y cocinados en bandejas separadas y en recipientes cerrados o envueltos. No debe de congelar alimentos descongelados previamente.
- Es especialmente importante la conservación de los huevos y de los alimentos elaborados con ellos en la nevera. Los alimentos elaborados con huevo crudo deben de consumirse inmediatamente tras su preparación y los restos no consumidos preferentemente destruirse o conservarse en la heladera y consumirse muy pronto.
- No debe de conservar en la despensa o en los armarios los alimentos con productos de limpieza. No utilice nunca envases de alimentos para guardar productos químicos o de limpieza. La mayoría de las intoxicaciones químicas por estos productos se deben a la equivocación e ingestión errónea pensando que son alimentos o bebidas, por estar guardados en envases alimenticios.
- Deben de mantenerse las superficies, armarios, espacios y utensilios utilizados para la conservación, preparación o manipulación de alimentos limpios y desinfectados, aireados, con medidas de protección frente a insectos, roedores y animales domésticos.
- Utilice recipientes de basura cerrados, de material impermeable, de fácil limpieza y los utilizados para la conservación, preferiblemente, que se puedan manipular con el pie para evitar tocarlos con las manos mientras manipula los alimentos.

El manipulador

- Debe de cuidar las prácticas higiénicas, lavándose las manos con frecuencia. Si tienen alguna herida en las manos debe de estar cubierta por un apósito impermeable.

- Utilice ropa distinta mientras prepara los alimentos. Los delantales y paños de cocina deben de lavarse asiduamente. Los rollos de papel de cocina son una excelente alternativa desde el punto de vista sanitario a los paños de cocina.
- Utilícelos para limpiar superficies y secarse las manos.
- No se debe de comer ni fumar mientras se preparan los alimentos. En caso de padecer una enfermedad o ser portador debe evitar manipular los alimentos.
- Los manipuladores de alimentos de centros de restauración, de venta o de fabricación de alimentos están obligados a cumplir los requisitos de formación y de control de buenas prácticas exigidas por las empresas.

Para la inocuidad al consumidor

- Lávese las manos antes de iniciar la preparación de los alimentos y con frecuencia mientras los está manipulando;
- Lávese las manos después de ir al baño;
- Lave y desinfecte las superficies y los utensilios que ha utilizado tras la preparación de los alimentos;
- Proteja los alimentos y la zona de preparación de las comidas de insectos, roedores y animales (perros, gatos, etc.);
- Mantenga y conserve separados los alimentos crudos y los cocinados, tanto en la cocina, en la despensa y armarios, como en la heladera;
- Utilice utensilios distintos para los alimentos crudos y cocinados o los lávelos antes de volver a usarlos;
- Prepare los alimentos asegurándose de su cocción completa (superando los 70 grados en su zona central), en especial huevos, pollo, carnes y pescados;
- Recaliente completamente los alimentos superando de nuevo los 70 grados;
- No deje los alimentos a temperatura ambiente por más de 2 horas. Mantenerlos refrigerados inmediatamente tras su preparación si no se van a consumir inmediatamente;
- No guarde durante mucho tiempo los alimentos. Respete las garantías de conservación de los alimentos congelados que marca su congelador;
- No descongele los alimentos a temperatura ambiente. Hágalo en la heladera;
- Compre los alimentos en establecimientos autorizados, con etiquetado y

comprobando las fechas de caducidad;

- Lea atentamente y mantenga los requisitos de conservación y fechas de caducidad de los alimentos.

Recomendaciones para el lavado de verduras^e

Lavado y desinfección

Es muy importante lavar y desinfectar todas las verduras aun cuando las vaya a cocer, ya que el calor no siempre destruye todos los microorganismos y puede transferirlos a su interior.

Ingredientes

- 1 litro de agua
- 1/2 cucharadita de cloro (10 mg/L)

Procedimiento

Lavar la verdura con agua corriente para retirar la tierra y cualquier partícula extraña. Escurrirla en el colador. Colocar la verdura en el recipiente con el agua y el cloro, y dejarla reposar por 30 minutos. Escurrirla nuevamente en el colador y dejar secar.

Importante

No quitar el rabillo de las verduras, hasta que se haya desinfectado, ya que de lo contrario los microorganismos pueden ingresar a su interior y la desinfección no será efectiva. Si la solución de cloro no es suficiente para la cantidad de verdura que se necesita desinfectar, utilizar un recipiente más grande respetando la proporción de cloro por cada litro de agua.

^ehttp://www.profeco.gob.mx/tecnologias/proc_tec/Lavado_desinfec.asp