

# **Evaluación del efecto del hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes genotipos de Norovirus Humano**

**Génesis Yosebeth Chávez Reyes**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

# **Evaluación del efecto del hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes genotipos de Norovirus Humano**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Génesis Yosebeth Chávez Reyes**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2017

## Evaluación del efecto del hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes genotipos de Norovirus Humano

Génesis Yosebeth Chávez Reyes

**Resumen.** Los Norovirus Humanos (HuNoV) son la principal causa de gastroenteritis en Estados Unidos y el mundo, son un agente causal de enfermedades transmitidas por alimentos. Su persistencia a sobrevivir en ambientes salados y de desecación, baja dosis de infección, en conjunto con la ausencia de vacunas para su prevención impulsan investigaciones sobre el control y prevención de brotes a causa de norovirus. El propósito de este trabajo consistió en determinar la eficiencia del hipoclorito de sodio a dos concentraciones (50 y 150 ppm) aplicado en nueve genotipos de norovirus humanos, por uno y cinco minutos. Con ayuda de métodos moleculares (RT-qPCR) se realizó la detección y cuantificación de ARN viral. Se observó que seis (GII.6, GII.13, GII.7, GII.16, GII.3 y GI.5) genotipos expuestos a 150 ppm fueron inactivados por completo a partir de un minuto, con reducciones desde 2.46 hasta 4.59 log ARN, a excepción de los genotipos GII.4 Sydney, GII.4 New Orleans y GI.6, los cuales no mostraron reducciones significativas. La aplicación del hipoclorito por un minuto a 50 ppm inactivó completamente cuatro genotipos pertenecientes al genogrupo II (GII.6, GII.13, GII.16 y GII.3) con reducciones desde 2.31 hasta 4.3 Log RNA. En conclusión, la aplicación de hipoclorito de sodio en HuNoV muestra reducción significativa en sus Log ARN. Sin embargo, los genotipos GII.4 no muestran susceptibilidad a este desinfectante. La importancia de este estudio radica en la aplicación práctica en el control y prevención de brotes, mostrando un amplio espectro acerca de la susceptibilidad o persistencia de los norovirus.

**Palabras clave:** HuNoV, inactivación, RT-qPCR, susceptibilidad, tiempo de contacto, valor CT.

**Abstract.** Human Noroviruses (HuNoV) are the leading cause of non-bacterial gastroenteritis in the United States but also worldwide, as well as being a major causative agent of foodborne diseases. Its persistence to survive in dry and salty environments, low infection dose, in addition the absence of vaccines for its prevention, promotes research on the control and prevention of outbreaks caused by norovirus. The aim of this study was to determine the efficiency of sodium hypochlorite in different concentrations (50 and 150 ppm) and different exposure times (one and five minutes) on different human norovirus genotypes, by molecular methods, using the RT-qPCR. Due to the absence of *in vitro* method cultivation for this virus, it is a challenge to predict how they can behave and survive along the food chain. A panel of nine HuNoV genotypes was exposed to 150 ppm, six genotypes (GII.6, GII.13, GII.7, GII.16, GII.3 and GI.5) were completely inactivated with reductions from 2.46 to 4.59 Log RNA. A 50 ppm sodium hypochlorite solution applied just on the most susceptible genotypes (GII.6, GII.13, GII.16 and GII.3), were completely inactivated from reductions 2.31 to 4.3 Log RNA. In conclusion, the application of sodium hypochlorite HuNoV shows a significant ARN logarithmic reduction. However, the GII.4 genotypes do not show susceptibility to this disinfectant. The relevance of the study is the practical application on the control and prevention of outbreaks, showing a full spectrum of the susceptibility or persistence of viruses.

**Key words:** Contact time, CT value, HuNoV, inactivation, RT-qPCR, susceptibility.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>19</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>21</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>25</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de las muestras clínicas de HuNoV usadas en el experimento (Dr. Collins, Laboratorio de Calicivirus. CDC, Atlanta, GA).....	3
2. Mezcla madre empleada para la detección y cuantificación de ARN viral, específica para el genogrupo GI (master mix) (volumen para una muestra). Paciencia.....	5
3. Mezcla madre empleada en la detección y cuantificación de ARN viral, específica para el genogrupo GII (master mix) (volumen para una muestra). .....	5
4. Descripción de los cebadores y sondas (primers y probes) utilizados para la secuenciación de los genogrupos GI y GII por RT-qPCR.....	5
5. Descripción del perfil térmico y número de ciclos empleados en la reacción de RT-qPCR. ....	6
6. Descripción de las muestras clínicas de HuNoV, genogrupo GII (Dr. Collins, Laboratorio de Calicivirus. CDC, Atlanta, GA).....	8
7. Reactivos utilizados para el tratamiento de RNAsa, volumen para una muestra (para mayor número de muestras se debe multiplicar los valores). .....	9
8. Reducción de HuNoV por exposición a la solución de hipoclorito de sodio a 150 ppm, para 1 y 5 minutos de tiempo de contacto en suspensión, expresada por reducción de Log de ARN.....	11
9. Reducción de HuNoV por exposición a la solución de hipoclorito de sodio a 50 ppm, para 1 y 5 minutos de tiempo de contacto en suspensión, expresada por reducción de Log de ARN.....	11
Figuras	
1. Curva estándar genérica de PCR de tiempo real con 100% de eficiencia. ....	7
2. Reducción de nueve genotipos de norovirus humanos expuestos en suspensión durante 1 y 5 minutos, a hipoclorito de sodio a 150 ppm.....	12
3. HunNoV VPLs (virus like particles), degradadas por efecto del hipoclorito de sodio, por microscopio electrónico de barrido 200 nm. ....	14
4. Genoma de Norovirus Humano. ....	15
5. Inactivación de los Norovirus Humanos GII.2, GII.4, MNV-1 (Murine Norovirus, surrogado), FCV (Feline Calicivirus, surrogado) después de aplicar hipoclorito de sodio a 5, 75, 250, 500 y 1000 ppm. ....	16
6. Efecto del tratamiento de RNasa en el genotipo GII.6 a 150 ppm de hipoclorito de sodio.....	17
7. Tratamiento con RNasa para determinar la integridad de la cápside. ....	18

Anexos	Página
1. Ejemplo de ensayos realizados.....	25
2. Cuadro sintaxis de los resultados emitidos por SAS para todos los ensayos. ....	25
3. Cuantificación de la extracción de ácidos nucleicos después de la aplicación del tratamiento con hipoclorito de sodio a 150 ppm por el equipo Nanodrop. ....	26
4. Cuantificación de la extracción de ácidos nucleicos después de la aplicación del tratamiento con hipoclorito de sodio a 50 ppm por el equipo Nanodrop. ....	26
5. Cuantificación de la extracción de ácidos nucleicos de las muestras testigos del experimento a 150 ppm (HuNoV y DEPC H <sub>2</sub> O) por el equipo Nanodrop.....	27
6. Cuantificación de la extracción de ácidos nucleicos de las muestras testigos del experimento a 50 ppm (HuNoV y DEPC H <sub>2</sub> O) por equipo Nanodrop. ....	27

# 1. INTRODUCCIÓN

Entre 1886 y 1898 los virus fueron reconocidos como organismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA); identificándose algunos como adenovirus, sapovirus y astrovirus (Vasickova *et al.* 2005), sobresaliendo el virus de la hepatitis A y el norovirus causante de gastroenteritis de origen no bacteriano registrados como responsables de la mayoría de los brotes. Los norovirus humanos ocasionan al menos el 66.6% de los brotes en Estados Unidos, comparado con los datos estadísticos de brotes de origen bacteriano: 9.7% para *Salmonella* y 14.2% *Campylobacter* (Mead *et al.* 1999).

El Norovirus Humano HuNoV, fue el primer agente viral en ocasionar gastroenteritis aguda. Anteriormente eran clasificados como Norwalk virus, por el primer brote ocurrido en 1968 en el que 50% de los estudiantes de una escuela primaria en Norwalk-Ohio, Estados Unidos (Robilotti *et al.* 2015). Estos virus pertenecen a la familia *Caliciviridae*, tienen una cápside de forma icosaédrica, son pequeños, no envueltos o desnudos (carentes de membrana lipoproteica), son entéricos y carecen de la habilidad de crecer en cultivos celulares, obstaculizando la caracterización del virión (Green *et al.* 2000). La nomenclatura tradicional del virus está dada por el genogrupo, y genotipo (Knight *et al.* 2015). HuNoV se clasifican en seis genogrupos GI-GVI, de los cuales GI, GII y GIV son patógenos en humanos, identificándose hasta ahora 31 genotipos, de los cuales nueve pertenecen al genogrupo GI, y 22 al genogrupo GII (Moore *et al.* 2015).

Los HuNov son capaces de sobrevivir en ambientes de baja humedad y sal permitiéndoles persistir durante períodos prolongados. Son microorganismos extremadamente contagiosos con baja dosis de infección; entre 10 y 100 partículas de virus son necesarias para inducir a una infección (Wit *et al.* 2001; Seymour y Appleton 2001; Green 2000; FAO/WHO 2008; Doré *et al.* 2010). Las vías de transmisión pueden ser oral-fecal, persona a persona, durante la expulsión del virus en vómito, por consumo de agua y alimentos contaminados (Knight *et al.* 2015; Matthijs *et al.* 2012). El virus afecta a personas de todas las edades, con un período de incubación de entre 24 y 48 horas, los pacientes presentan síntomas agudos como: náuseas, vómito y diarrea. Datos de la Clasificación Internacional de Enfermedades en su novena edición - Modificación Clínica, indican que uno de cada tres casos se diagnostica como gastroenteritis aguda (Scallan *et al.* 2011). Hasta la fecha no existe ninguna vacuna contra el Norovirus (Sato *et al.* 2016). Estos virus lideran como la principal causa de enfermedades transmitidas por alimentos de origen no bacteriano, se han reportado entre 19 y 21 millones de casos, aproximadamente entre 56,000 a 71,000 hospitalizaciones y al menos entre 570 y 800 muertes (CDC 2016).

El uso de alcohol en gel, soluciones cloradas y desinfectantes evita la propagación de patógenos e incluso norovirus. El proceso de lisis en el virus se define como la ruptura de

la cápside, por consiguiente, el ARN queda expuesto generando la degradación del mismo, por su alta susceptibilidad a ese ambiente (Park *et al.* 2016). La efectividad de las sustancias desinfectantes es un reto, basándose en la formulación y no en la acción efectiva del alcohol.

Debido a la inhabilidad de crecer en cultivos celulares, la transcripción reversa de la reacción de cadena de polimerasa (RT-qPCR) permite cuantificar la cantidad de ARN viral presente en las muestras, con tratamiento previo a la extracción del ARN del virus. Siendo una medida proximal para considerar la cuantificación del ARN viral reducido, obteniendo una relación entre la cantidad de ARN reducido y la efectividad del hipoclorito de sodio después del tratamiento. Esto ha sido demostrado con Murine norovirus (microorganismo índice) (Park *et al.* 2016) y la secuenciación de genes que permite emitir diagnósticos virales y clasificación genotípica, tomando en cuenta cebadores (primers) que permiten identificar la mayor cantidad de material genético (Zheng *et al.* 2005).

A partir de una sola copia de una secuencia específica, se da inicio a la transcripción en reversa de la cadena de polimerasa por RT-qPCR que lee el ARN mensajero (mARN), a partir de éste replica el ADN de cadena simple (cADN) a ADN de cadena doble. La reacción emplea cebadores específicos que se pegan a las cadenas de amino ácidos en sentido positivo 5'- 3'. Los cebadores se alinean a la cadena e inician la replicación de ácidos nucleicos, la sonda específica (Taq-man) emite fluorescencia una vez que el fluoróforo es separado del quencher (inhibidor fluorescencia) durante la fase exponencial y así el equipo cuantifica en tiempo real mientras ocurre la reacción. La cuantificación emite valores de Ct (Ct value), definido como el número de ciclos en donde la fluorescencia sobrepasa el límite de detección (Thresold), este es el principio básico de RT-qPCR, a mayor cantidad de material genético menor Ct value (Arya *et al.* 2005; Pfaffl 2004).

En ausencia de cultivos celulares o modelos animales y datos estadísticos limitados de pacientes enfermos por consumo de alimentos, se convierte un reto para la ciencia realizar investigaciones en HuNoV, y como alternativa la mayoría de los experimentos se realizan con muestras clínicas (especímenes fecales). En consecuencia, la interpretación de altos Ct value (treshold cycle, ciclo umbral) emitidos por RT-qPCR representan un problema en conjunto con los bajos límites de detección del equipo, empleando una copia genómica de ARN por reacción de PCR (Moore *et al.* 2015). Estos desafíos enfatizan la importancia de generar investigaciones que provean más datos a favor de la comprensión del comportamiento del virus y el control para prevenir que se siga esparciendo y ocasionando brotes. La información expuesta justifica el propósito de esta investigación en comprender la eficacia del hipoclorito de sodio aplicado en concentraciones conocidas y cuantificando su acción efectiva por medio del uso de RT- qPCR.

Los objetivos de esta investigación fueron:

- Evaluar el efecto del hipoclorito de sodio (150 ppm) y el tiempo de contacto en nueve genotipos de norovirus humanos en suspensión.
- Evaluar el efecto de una concentración menor (50 ppm) de hipoclorito de sodio en cuatro genotipos de norovirus humanos.
- Comparar el efecto del tratamiento de RNasa en un genotipo susceptible al hipoclorito de sodio con su control.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del ensayo.

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular en el Centro de Investigación de Biomasa, del Departamento de Food Science de la Universidad de Arkansas, en la ciudad de Fayetteville, estado de Arkansas, Estados Unidos de Norteamérica.

### Fase I. Exposición de nueve genotipos de HuNoV a 150ppm de Hipoclorito de Sodio (NaOCl 7.85%) en suspensión.

**Genotipos de HuNoV.** Las muestras fecales provenientes de pacientes con gastroenteritis aguda infectadas por el virus se obtuvieron a través del CDC (Center of Disease Control and Prevention, por sus siglas en inglés) (Cuadro 1). Las muestras fueron recibidas en una solución al 10% buffer de fosfato (pH 7.4), se almacenaron a -80 °C (Thermo Scientific Ultra low temperature freezers TSU series, Asheville, NC, USA) hasta su uso. En el proceso de clarificado las muestras se descongelaron a temperatura ambiente (15-25 °C) y luego se llevaron al vortex hasta lograr que el virus se desprendiera de la materia orgánica, seguido por centrifugación a 4,000 rpm (3000 × g) durante 10 min a 10°C. El sobrenadante que contenía HuNoV fue removido a tubos eppendorf estériles de 1.5 ml, etiquetados y almacenados a -80°C hasta su uso.

Cuadro 1. Descripción de las muestras clínicas de HuNoV usadas en el experimento (Dr. Collins, Laboratorio de Calicivirus. CDC, Atlanta, GA).

Tipo de espécimen	Genogrupo	Genotipo	Concentración de RNA (ng/μl)
Fecal	GII	3	11.4
	GII	4 New Orleans	12.2
	GII	4 Sydney	20.9
	GII	6	10.0
	GII	7	8.0
	GII	13	9.5
	GII	16	5.8
	GI	5	6.9
	GI	6	10

**Tratamiento con hipoclorito de sodio a 150 ppm.** Las muestras de sobrenadantes de los nueve genotipos de HuNoV almacenadas a -80 °C (muestras criogenizadas), fueron descongeladas a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de realizarse el experimento. Se preparó una solución madre a 1000 ppm de hipoclorito de sodio con cloro comercial (Clorox® a 7.85% NaCl) diluida en buffer de fosfato (pH 7.4) y, a partir de ella se realizaron diluciones con agua DEPC (Diethyl pyrocarbonate) y se agregaron 20 µl del sobrenadante del virus en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, para obtener 200 µl de volumen total. Se llevó al vortex por tres segundos y fueron centrifugados a 6000 rpm (2000 × g) por 10 segundos. Las unidades experimentales se incubaron a temperatura ambiente (15-25 °C) por 1 y 5 minutos. Finalizados los tiempos de incubación se tomaron 20 µl del experimento para ser neutralizados, se depositaron en otro tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, se añadieron 180 µl de FBS (Fetal Bovine Serum, por sus siglas en inglés) (GE Health Care Life Sciences, HyClone Laboratories, Logan, Utah, USA).

De forma simultanea se aplicó el experimento a muestras testigo: conteniendo agua DEPC y 20 µl de HuNoV, para un volumen total de 200 µl, depositados en tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. El control negativo del experimento se realizó a partir de diluciones de la solución madre de 1000 ppm de hipoclorito de sodio (Clorox® 7.85% NaCl) y agua DEPC para un volumen total de 200 µl. Se aplicó el mismo protocolo hasta la neutralización.

**Extracción de ARN viral y medición de la extracción de ácidos nucleicos, después del tratamiento con hipoclorito de sodio.** Se realizó seguido al proceso de neutralización. Con el uso del Mini Kit, QIAamp DNA Blood, (QIAGEN Hilden, Germany), la extracción se realizó de acuerdo con el protocolo de manufactura. Se extrajo un volumen final de 80 µl de ácidos nucleicos, por muestra, depositados en tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, debidamente etiquetados y almacenados a -80 °C hasta su lectura. La extracción de ácidos nucleicos se realizó en las muestras con tratamiento, testigos y control negativo.

Las muestras criogenizadas se descongelaron a temperatura ambiente (15-25 °C), se tomaron 2 µl y se colocaron en equipo NanoDrop™1000 Spectrophotometer, a una absorbancia de 260/280 nm. Esta medición de ácidos nucleicos se realizó para confirmar que el proceso de extracción de ARN de las muestras.

**Detección- cuantificación de ARN viral por RT-qPCR.** Se realizaron diluciones de las muestras en el factor  $10^{-1}$ , en tubo eppendorf estéril de 1.5 ml con agua libre de ARN, los tubos fueron debidamente etiquetados. Como siguiente etapa se preparó la solución master mix, empleada en la detección y cuantificación de ARN, para los genogrupos GI y GII, respectivamente (Cuadros 2 y 3). Las sondas y primers específicos para cada genogrupo se detallan en el cuadro 4 (Biosearch Technologies, Petaluma CA, USA).

Cuadro 2. Mezcla madre empleada para la detección y cuantificación de ARN viral, específica para el genogrupo GI (master mix) (volumen para una muestra). Paciencia

Master Mix	Volumen
DEPC H <sub>2</sub> O	5.5
Quantitect RT-PCR	12.5
RT Mix	0.25
Rnase Inhibitor	0.25
50 µM <b>Cog 1 F</b> primer	0.5
50 µM <b>Cog 1 R</b> primer	0.5
10 µM <b>Ring 1A</b> sonda	0.25
10 µM <b>Ring 1B</b> sonda	0.25
Total	20.0 µl

Cuadro 3. Mezcla madre empleada en la detección y cuantificación de ARN viral, específica para el genogrupo GII (master mix) (volumen para una muestra).

Master Mix	Volumen
DEPC H <sub>2</sub> O	5.5
Quantitect RT-PCR	12.5
RT Mix	0.25
Rnase Inhibitor	0.25
50 µM <b>Cog 2 F</b> primer	0.5
50 µM <b>Cog 2 R</b> primer	0.5
10 µM <b>Ring 2</b> sonda	0.5
Total	20.0 µl

Cuadro 4. Descripción de los cebadores y sondas (primers y probes) utilizados para la secuenciación de los genogrupos GI y GII por RT-qPCR

Genotipo	Primers y Sondas	Secuencia, (5'-3')	Sentido	Locación
GI	Cog 1 F primer	CGY TGG ATG CGL TTY CAT GA	+	5291
	Cog 1 R primer	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	-	5375
	Ring 1A sonda	<sup>9</sup> FAM-AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA- <sup>9</sup> BHQ	-	5340
	Ring 1B sonda	<sup>9</sup> FAM-AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA- <sup>9</sup> BHQ	-	5340
GII	Cog 2 F primer	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	+	5003
	Cog 2 R primer	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	-	5100
	Ring 2 sonda	<sup>9</sup> FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT- <sup>9</sup> BHQ	+	5048

<sup>9</sup>FAM, colorante indicador de 6-carboxifluoresceína

<sup>9</sup>BHQ, tinte quencher de agujero negro

Fuente: Trujillo *et al.* 2006.

En un microplato de 96 pocillos se depositaron 20 µl de master mix más 5 µl de ARN (por pocillo) correspondientes a cada muestra y a los testigos, leídos por duplicado; sin diluir y en la dilución 10<sup>-1</sup>. Controles negativos fueron incluidos dentro de cada plato para descartar contaminación en el agua, hipoclorito de sodio y master mix. Una vez lleno el plato se cubrió usando un film plástico, teniendo cuidado al momento de manipular el plato, para evitar contaminación. Fue refrigerado aproximadamente por 10 minutos a 4 °C. La identificación de cada pocillo se introduce en el software Eppendorf Realplex MasterCycler (Eppendorf, *Hauppauge*, NY), luego se coloca el perfil térmico (Cuadro 5). Posteriormente se inició la reacción PCR tomando un tiempo de aproximadamente tres horas por cada plato.

Cuadro 5. Descripción del perfil térmico y número de ciclos empleados en la reacción de RT-qPCR.

Pasos	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	30:00	50
2	15:00	95
3	00:15	95
4	01:00	60
Repetir pasos 3-4 por 45 veces en total		

**Procesamiento de resultados.** Los resultados en valores de CT (Thershold Cycle) reportados por el equipo fueron utilizados para estimar la reducción de ARN expresada en Log10 RNA, a esto se le denomina análisis relativo. En una cuantificación relativa se analiza el cambio en la expresión del gen en comparación con una muestra tratada y no tratada. Los datos se tabularon en Microsoft Excel, en donde se realizó la diferencia aritmética de las muestras tratadas con hipoclorito y la muestras no tratadas, en la dilución 10<sup>-1</sup> para 1 y 5 minutos de exposición. Dicha diferencia en valores de CT fue convertida a logaritmos de reducción. La pendiente de la curva estándar es usada para determinar la eficiencia de la reacción en RT-qPCR, gráficamente representada por una línea de regresión semi-logarítmica, en el eje y se digitan los valores de CT versus el logaritmo de la dilución de ácidos nucleicos en cada muestra, eje x. Sí el valor obtenido de la pendiente es -3.32 en la curva, indica 100% de eficiencia en la reacción (figura 1.), lo que hace referencia a que por el incremento en el factor de dilución (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, etc.) cada 3.32 ciclos durante la fase exponencial en la amplificación del gen será equivalente a: log<sub>2</sub> 10= 3.3219 (Applied Biosystems 2004). Una vez obtenida la diferencia entre los valores CT de la muestra y CT del testigo, se divide entre 3.3, lo que se traduce como el logaritmo de reducción de ARN en cada muestra:

$$\log = ((CT \text{ muestra} - CT \text{ testigo})/3.3) \quad [1]$$

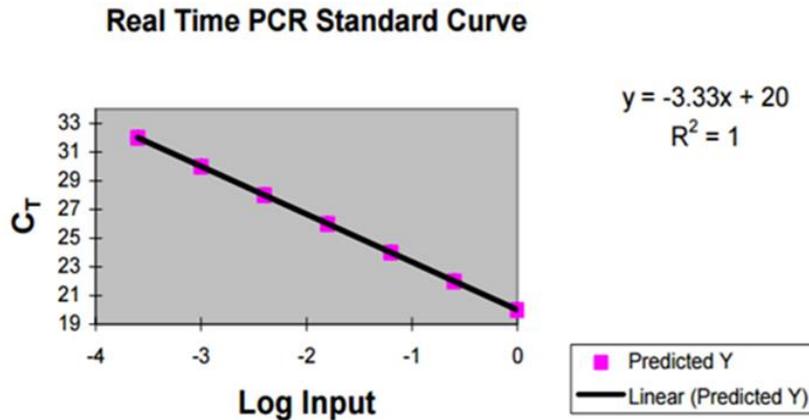


Figura 1. Curva estándar genérica de PCR de tiempo real con 100% de eficiencia.  
Fuente: Applied Biosystems 2004.

**Diseño experimental.** Se usó un DCA (Diseño Completamente al Azar), con un arreglo factorial de 9 x 2. Nueve genotipos de HuNoV, por dos tiempos de contacto (1 y 5 minutos) con hipoclorito de sodio en suspensión. Usando el programa estadístico SAS® 9.4, y a través de un análisis de varianza se determinó la significancia del modelo. La prueba Duncan se usó para determinar si existen diferencias estadísticas entre los tiempos de contacto en la inactivación del virus y si existió diferencia significativa en la reducción logarítmica para cada genotipo después de aplicar el tratamiento. El experimento se realizó por duplicado y cada muestra fue leída por duplicado. Los datos utilizados en el análisis son únicamente los emitidos por el equipo en la dilución  $10^{-1}$ , para un total de 36 unidades experimentales: 9 genotipos, por 2 repeticiones, por 2 tiempos.

**Fase II. Exposición de cuatro genotipos de HuNoV a 50 ppm de hipoclorito de sodio en suspensión.**

**Tratamiento con hipoclorito de sodio a 50 ppm.** Basado en un experimento previo realizado en el laboratorio se tomó la decisión de aplicar esta concentración a 4 genotipos que mostraron susceptibilidad a una concentración de 100 ppm de hipoclorito de sodio (Cuadro 6), con el propósito de conocer la concentración inicial a la cual se inactivan los genotipos seleccionados.

Cuadro 6. Descripción de las muestras clínicas de HuNoV, genogrupo GII (Dr. Collins, Laboratorio de Calicivirus. CDC, Atlanta, GA).

Tipo de especimen	Genogrupo	Genotipo	RNA(ng/ul)
Fecal	GII	3	11.4
	GII	6	10.0
	GII	13	9.5
	GII	16	5.8

El protocolo de aplicación del tratamiento de hipoclorito de sodio (Clorox<sup>®</sup> 7.85% NaCl) a 50 ppm se desarrolló de la misma forma en la que se describe en la sección 2.1, esto es equivalente en la extracción viral de ARN, medición de la extracción de ácidos nucleicos (sección 2.2) y la detección-cuantificación de ARN viral por PCR de tiempo viral (sección 2.3). Los resultados fueron procesados al igual que se describió en la sección 2.4.

**Diseño experimental.** Se usó un DCA (Diseño Completamente al Azar), con un arreglo factorial de 4 x 2. cuatro genotipos de HuNoV, por dos tiempos de contacto (1 y 5 minutos) con hipoclorito de sodio en suspensión. Usando el programa estadístico SAS<sup>®</sup> 9.4, y a través de un análisis de varianza se determinó la significancia del modelo. La prueba Duncan se usó para determinar si existen diferencias estadísticas entre los tiempos de contacto en la inactivación del virus y las diferencias significativas en la reducción logarítmica para cada genotipo después de aplicar el tratamiento. El experimento se realizó por duplicado y cada muestra fue leída por duplicado. Los datos analizados son únicamente los emitidos por el equipo en la dilución 10<sup>-1</sup>, para un total de 16 unidades experimentales: 4 genotipos, por 4 lecturas, por 2 tiempos.

**Fase III. Aplicación del tratamiento de RNAsa a un genotipo completamente inactivado en la fase I a 150 ppm.** Este tratamiento se aplicó con fines de remover ARN dañado (ARN de virus inactivado, no protegido por la cápside). Para que durante la reacción RT-qPCR solo exista cuantificación de ARN de cápside intacta. Este experimento pretende demostrar las diferencias entre una muestra tratada con RNAsa y no tratada.

**Tratamiento con hipoclorito de sodio (Clorox<sup>®</sup> 7.85% NaOCl) a 150 ppm.** De forma aleatoria se aplicó el tratamiento al genotipo GII.6 a 150 ppm, el cuál fue completamente inactivado con la aplicación del tratamiento a 150 ppm de hipoclorito de sodio. El protocolo de aplicación del tratamiento de hipoclorito de sodio (7.85% NaOCl) a 150 ppm se llevó ejecuto al igual que se describió en la fase I. Esto es equivalente en la extracción viral de ARN y medición de la extracción de ácidos nucleicos (fase I) y la detección-cuantificación de ARN viral por PCR de tiempo real (fase I). Con la diferencia de la aplicación del tratamiento de RNasa descrito en la fase I se aplica antes de realizar la extracción de viral de ARN.

**Tratamiento con RNasa.** Se aplicaron 49 µl de mezcla de RNasa (Cuadro 7) a cada muestra del tratamiento. Las muestras se incubaron en un bloque de calentamiento a 37 °C durante una hora, la reacción se detuvo agregando 2 µl de RNasin<sup>R</sup> Plus RNase Inhibitor

40u/μl (Promega N261B. Madison, WI) a cada tubo eppendorf. Los resultados emitidos por el software, se procesaron siguiendo lo planteado en la fase I de materiales y métodos.

Cuadro 7. Reactivos utilizados para el tratamiento de RNAsa, volumen para una muestra (para mayor número de muestras se debe multiplicar los valores).

Reactivos	Volumen (μL)
DEPC water	33
RNase One™ Ribonuclease	1
10x RNase buffer (Promega, Madison, WI)	15
Total	49

**Prueba estadística.** Los datos de la fase III fueron analizados usando una prueba *t* student, con fines de determinar la diferencia entre ambos tratamientos para medias independientes, con el programa SAS® 9.4, usando el factor de 0.05 de probabilidad para aceptar o rechazar la hipótesis nula.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cuantificación de la pureza de ácidos nucleicos en las muestras se realizó con el quipo nanodrop, por medio de absorbancia a 260 nm. Esta medición es un factor determinante en la replicación de ARN. El índice de pureza a 260/280 nm es utilizado para determinar la contaminación de proteínas en una muestra de ácidos nucleicos, debido a que las proteínas tienen absorbancia a 280 nm, para mayor pureza de muestra se toma de referencia los valores arriba de 2.1, razones menores indican alta presencia de proteína, es decir extracción de ácidos nucleicos deficiente (Thermo Scientific 2009). Todos los resultados de índice de pureza a 260/280 nm de absorbancia, emitieron valores superiores a 2.1.

#### **Fase I. Repuesta de la exposición de nueve genotipos de HuNoV a 150ppm de Hipoclorito de Sodio (NaOCl 7.85%) en suspensión.**

La respuesta de cada genotipo durante su exposición a 150 ppm de hipoclorito de sodio (7.85% NaOCl) fue estadísticamente diferente ( $p < 0.001$ ). Los valores de reducción oscilaron entre 0.09 y 4.59 Log RNA (cuadro 8.). No existió diferencia significativa en los tiempos de contacto ( $p = 0.3017$ ), mientras que en la interacción genotipo\*tiempo tampoco mostró diferencia estadística ( $p = 0.6261$ ).

#### **Fase II. Respuesta de la exposición de cuatro genotipos de HuNoV a 50 ppm de Hipoclorito de Sodio en suspensión.**

Se aplicó el tratamiento a cuatro genotipos (GII.6, GII.13, GII.16 y GII.3), con el objetivo de saber si son susceptibles a concentraciones menores debido a que fueron inactivados a 100 y 150 ppm. Se observó diferencia estadística en la respuesta de cada genotipo ( $P < 0.0001$ ). Se alcanzaron reducciones entre 2.31 y 4.30 Log RNA (cuadro 9) a 50 ppm. El tiempo de contacto entre el virus y la solución de hipoclorito de sodio no mostró diferencia significativa ( $P = 0.3404$ ), al igual que la interacción genotipo\*tiempo ( $P = 0.4780$ ).

Cuadro 8. Reducción de HuNoV por exposición a la solución de hipoclorito de sodio a 150 ppm, para 1 y 5 minutos de tiempo de contacto en suspensión, expresada por reducción de Log de ARN.

Genotipo	CT value muestra testigo	CT value después de 1 minuto de contacto	CT value después de 5 minutos de contacto	<sup>o</sup> Reducción en Log de ARN ng/μl	Agrupación Duncan <sup>&amp;</sup>
GII.13	24.82	0	0	4.59 ± 0.22	A
GII.16	26.42	0	0	4.11 ± 0.39	B
GII.6	26.48	0	0	4.09 ± 0.14	B
GII.3	27.29	0	0	3.85 ± 0.17	B
GII.7	29.37	0	0	3.22 ± 0.38	C
GI.5	31.87	0	0	2.46 ± 0.18	D
GII.4 N.O. <sup>©</sup>	28.47	29.36	29.31	0.76 ± 0.66	E
GI.6	33.97	35.22	35.18	0.45 ± 0.31	E
GII.4 Syd. <sup>£</sup>	23.95	24.03	24.07	0.09 ± 0.10	F
CP GII <sup>†</sup>	29.32				
CP GI <sup>‡</sup>	30.10				
CN <sup>§</sup>	0 <sup>§</sup>				

<sup>©</sup>GII.4 New Orleans, <sup>£</sup>GII.4 Sydney, <sup>†</sup>CP GII: control positivo genotipo GII, <sup>‡</sup>CP GI: control positivo genotipo GI, <sup>§</sup>CN value control negativo, <sup>o</sup>Reducción en Log ARN ng/μl: diferencias en CT de la muestra testigo y el CT value después del tiempo de contacto. Los valores representan el total de 72 datos, realizado por replicado y leído por duplicado con su desviación estándar., <sup>&</sup>Agrupación de genotipos por el análisis de medias DUNCAN (genotipos con la misma letra no presentan diferencia significativa).

Cuadro 9. Reducción de HuNoV por exposición a la solución de hipoclorito de sodio a 50 ppm, para 1 y 5 minutos de tiempo de contacto en suspensión, expresada por reducción de Log de ARN.

Genotipo	CT value muestra testigo	CT value después de 1 minuto de contacto	CT value después de 5 minutos de contacto	<sup>o</sup> Log RNA ± <sup>£</sup> DE	Agrupación Duncan <sup>&amp;</sup>
GII.13	25.79	0	0	4.30 ± 0.26	A
GII.16	26.54	0	0	4.07 ± 0.33	A
GII.6	26.68	0	0	4.03 ± 0.09	A
GII.3	32.70	0	0	2.31 ± 0.63	B
CP GII <sup>†</sup>	28.88				
CN <sup>§</sup>	0 <sup>§</sup>				

<sup>†</sup>CT value control positivo genotipo GII, <sup>§</sup>CT value control negativo, <sup>o</sup>Log de Reducción: diferencias en CT de la muestra testigo y el CT value después del tiempo de contacto. Los valores representan el total de 36 datos, realizado por replicado y leído por duplicado con sus desviaciones estándares, <sup>&</sup>Agrupación de genotipos por el análisis de medias DUNCAN (genotipos con la misma letra no presentan diferencia significativa).

El tratamiento aplicado a 150 ppm de hipoclorito de sodio, logró completa inactivación de los genotipos: GII. 3, GII.6, GII.7, GII.13, GII.16, GI.5, con reducciones desde 2.46 hasta 4.59 Log RNA (cuadro 8). La diferencia en logaritmos de reducción de estos seis genotipos, se debe a la cantidad inicial de material genético presente en cada muestra. Los genotipos que fueron completamente inactivados, pertenecen a los genogrupos GI y GII. Los resultados concuerdan con que no existe diferencia significativa ( $p=0.3017$ ) en los tiempos de contacto, señalando que el virus es susceptible a partir del primer minuto de tiempo de exposición (figura 2).

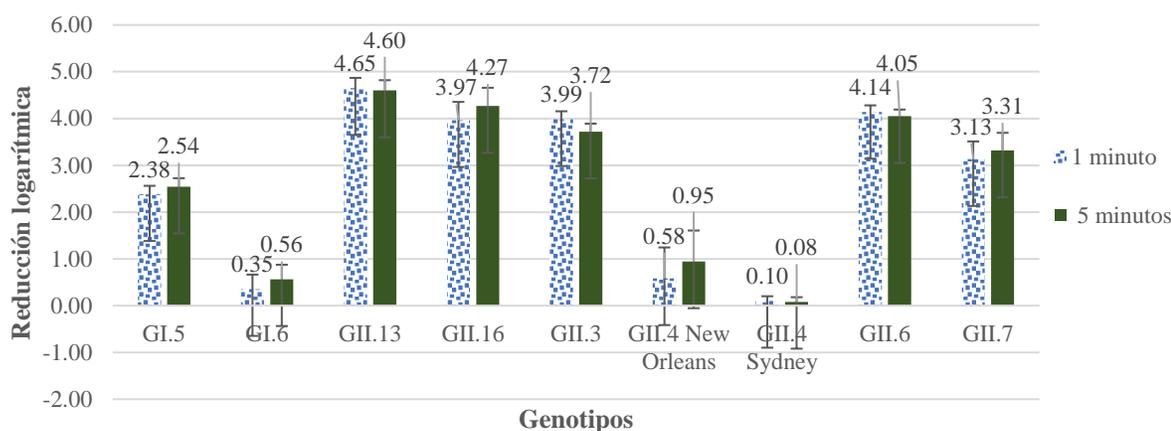


Figura 2. Reducción de nueve genotipos de norovirus humanos expuestos en suspensión durante 1 y 5 minutos, a hipoclorito de sodio a 150 ppm.

El mayor número de reducción se alcanzó en GII.13 (4.6 Log) y el menor en GI.5 (2.5 Log) (figura 2). El propósito de este estudio se enfoca en comparar la eficiencia del hipoclorito de sodio a 150 ppm al poner en contacto un panel de nueve genotipos de norovirus humanos, expuestos en suspensión (Cuadro 8). Como resultado de estudios previos realizados en el mismo laboratorio (durante 2016-2017, datos aun no publicados), a 100 ppm se observó que el mismo grupo de genotipos (GII) fue susceptible, al igual que a 150 ppm. Por consiguiente, se realizó un experimento a una concentración menor (50 ppm). Los resultados muestran que existe una clara relación con los datos anteriores y en 50 ppm de hipoclorito (cuadro 9). En donde los siguientes genotipos fueron inactivados por completo: GII.13, GII.16, GII.6 y GII.3, con valores de 4.30, 4.07, 4.03 y 2.31 Log RNA, respectivamente. En general se observó que bajas concentraciones de hipoclorito de sodio pueden inactivar por completo este grupo de genotipos a partir de 1 minuto de tiempo de exposición.

Diversos ingredientes activos de productos, son utilizados para evaluar su efecto biocida en feline calicivirus y murine norovirus en superficies (guantes y acero inoxidable) y en suspensión, Kenochlore® compuesto halógeno que tiene hipoclorito de sodio como ingrediente activo. Zonta *et al.* (2015) reportan una reducción de 3.85 Log en suspensión en murine norovirus y 4.70 Log en feline calicivirus, similares a los datos obtenidos en este estudio, donde los genotipos fueron completamente inactivados (figura 2).

Es necesario destacar la inhabilidad de norovirus humano para ser cultivados por métodos *in vitro* siendo este es el factor limitante más importante (Moore *et al.* 2015); lo que en consecuencia impide la realización de experimentos que generen datos para derivar su naturaleza, patrones de infección, mutaciones, etc. En alternativa a las necesidades de investigar el comportamiento del virus, su persistencia al ambiente, búsqueda del control y prevención de ETAs (en especial gastroenteritis de origen no bacteriano) y considerando que hasta la fecha no existen vacunas, únicamente el uso de HuNoV surrogados o índices y partículas virales VLPs (Virus like particles) han permitido llevar a cabo una serie de experimentos. Algunos virus surrogados como: feline calicivirus, murine norovirus, tulane virus, porcine enteric calicivirus, rabbit hemorrhagic disease virus, poliovirus y hepatitis A, han sido agentes potenciales en investigaciones para la caracterización de HuNoV, evaluando su respuesta a pH, tratamientos térmicos, altas presiones, soluciones cloradas, ingredientes activos de desinfectantes y sanitizantes. En pocos casos comparados con HuNoV, estudios realizados a partir de especímenes fecales de pacientes infectados con el virus resultan muy valorados, como es el caso de esta investigación (Moore *et al.* 2015; Park *et al.* 2015). En desventajas resultan ser muy costosos, toman mucho tiempo y requieren de rigurosas aprobaciones, tomando en cuenta la confidencialidad sobre la información de cada paciente, la uniformidad de las muestras y la influencia de la materia orgánica en los resultados.

En otro estudio, Sato *et al.* (2016) evaluó el efecto del hipoclorito de sodio en partículas virales de HuNoV (VLPs, virus like particles) (surrogados). En el análisis de los cambios morfológicos no se observaron diferencias después de 30 y 60 segundos de contacto a 200 ppm de hipoclorito, mientras que a 500 ppm después de 30, 60 y 180 segundos en contacto las partículas morfológicamente se deforman e interrumpen y a una concentración de 1000 ppm de hipoclorito no se observó ninguna partícula. La diferencia entre partículas virales (VLPs) y el virus es que están formados por proteínas virales pero sin material genético (Cadena 2014).

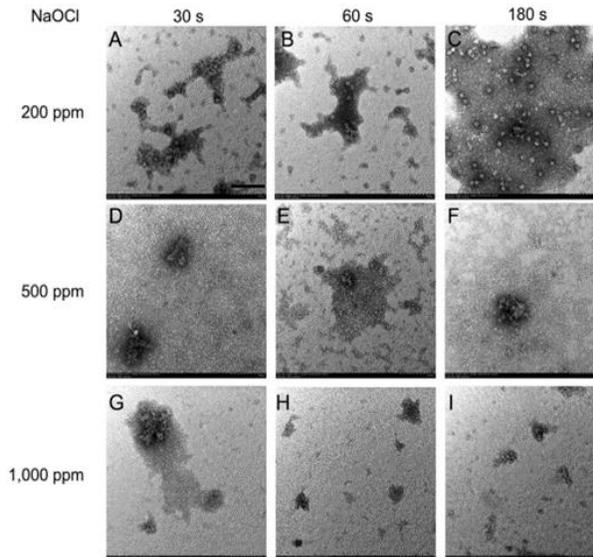


Figura 3. HunNoV VPLs (virus like particles), degradadas por efecto del hipoclorito de sodio, por microscopio electrónico de barrido 200 nm.  
Fuente: Sato *et al.* 2016.

Otros estudios reportan inactivación completa en VLPs feline calicivirus (HuNoV surrogado) expuesto a 1000 ppm de hipoclorito de sodio (Doultree *et al.* 1999). El CDC establece el uso de hipoclorito de sodio en concentraciones de 1000 ppm para desinfectar superficies, utensilios de cocina, muebles, pisos y ambientes (Hall *et al.* 2011).

Los compuestos clorados son ampliamente utilizados como agentes sanitizantes, dentro de estos compuestos se encuentra el hipoclorito de sodio, cloro gaseoso e hipoclorito de calcio. Hirneisen *et al.* 2010 muestran una compilación de investigaciones que presentan resultados de inactivación logarítmica en norovirus humano y surrogados. Se discute la diferencia en resultados en los experimentos debido a la baja dosis de infección del virus, lo que podría requerir concentraciones bajas de hipoclorito, mientras que en estudios donde se tratan altas concentraciones de virus con bajas concentraciones de compuestos clorados no se da una reducción significativa, expresado como una hipótesis. El hipoclorito ataca la cápside del virus liberando el ARN viral, provocando degradación del mismo por su alta susceptibilidad a condiciones ambientales.

Sigstam *et al.* 2013 utiliza dióxido de cloro ( $\text{Cl}_2$ ) como desinfectante, en donde obtiene como resultados que no genera daños en el genoma del virus, pero sí a la cápside, esto se explica porque el dióxido de cloro actúa rápido contra amino ácidos y no nucleótidos, mientras que con el tiempo observan daño al genoma, el virus se inactiva porque el material genético queda expuesto.

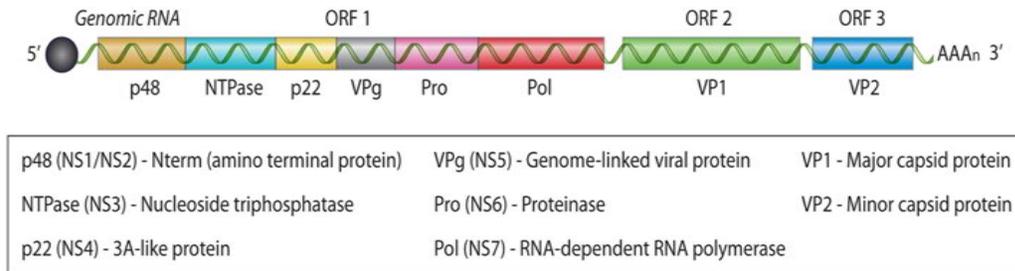


Figura 4. Genoma de Norovirus Humano.

Es de forma lineal, transcripción en sentido positivo 5´- 3´, con una unión covalente al genoma viral de la proteína (círculo negro), y poliadenilado al final de 5´y al final de 3´. Existen tres marcos abiertos (ORF1, ORF2, y ORF3) que codifican 8 proteínas virales, ORF1 codifica 6 proteínas no estructurales (NS) procesadas de forma proteolítica procesadas, por la codificación viral de la proteinasa cisteína, ORF2 y ORF3 codifican los componentes estructurales del virión, proteína viral 1 (VP1) y VP2, respectivamente.

Fuente: Robilotti *et al.* 2015

Se atribuye que la estructura del virus interfiera en su persistencia a los agentes químicos, por lo que, se describe lo siguiente: el genoma viral va en sentido positivo, del extremo 5´- 3´, está compuesto por tres marcos abiertos de lectura (ORF: open reading frames), ORF1 codifica seis poliproteínas no estructurales. ORF2 Y ORF3 codifican los componentes estructurales del virión, proteínas estructurales VP1 y VP2 (major capsid protein), además de formar la cápside que contiene el virus. La diversidad genética entre genogrupos y en los genotipos, se atribuye a la secuencia de amino ácidos de VP1 (el componente más importante), presente en seis genogrupos y más de 40 genotipos (Graaf, *et al.* 2016; Robilotti *et al.* 2015).

La cápside icosaédrica está compuesta por 90 dímeros, agregados por dominio; cubierta (S, shell) y protuberancia (P, protruding), el dominio P es responsable de ligar con los grupos antígenos de la sangre, esto influye en la capacidad antigénica (producir una respuesta inmune específica) (Graaf *et al.* 2016). En un genogrupo la secuencia de la cadena de amino ácidos (VP1) de la cápside varía en un 40%, en otros casos 50% (Donaldson *et al.* 2010). Lindesmith *et al.* 2008 discute en sus resultados que la persistencia del genotipo GII.4 se debe a las mutaciones en la complejidad de la cápside que recubre al gen, codificado por el subdominio P.

Por otra parte, los genotipos GII.4 Sydney, GII.4 New Orleans y GI.6 no mostraron susceptibilidad a 150 ppm, generando valores <1 log (0.09, 0.76 y 0.49 log, respectivamente). En efecto, surge la hipótesis de realizar experimentos con los genotipos persistentes, incrementado el tiempo de contacto y la concentración de hipoclorito de sodio.

Los resultados de la investigación de Tung *et al.* (2013) exponen dos genotipos del genogrupo GII (GII.2 y GII.4) y dos surrogados (feline calicivirus y murine norovirus) a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (5, 75, 250, 500 y 1000 ppm) (Figura 5). Los resultados indican la persistencia del virus al hipoclorito de sodio, a diferencia de los surrogados, en donde se logran alcanzar reducciones significativas entre el rango de 5-500

ppm. El genotipo GII.4 fue susceptible a altas concentraciones, en 1000 ppm se observó una reducción de 4.5 log. En relación con los datos de la figura 2, donde no se observó reducción significativa debido a que se aplicó una concentración menor a 1000 ppm (150 ppm).

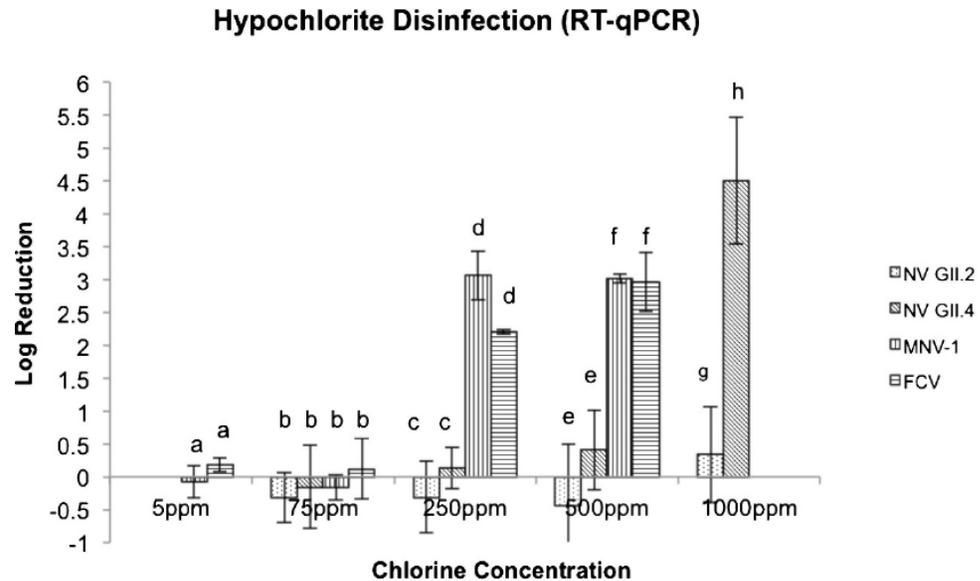


Figura 5. Inactivación de los Norovirus Humanos GII.2, GII.4, MNV-1 (Murine Norovirus, surrogado), FCV (Feline Calicivirus, surrogado) después de aplicar hipoclorito de sodio a 5, 75, 250, 500 y 1000 ppm.

Funete: Tung *et al* 2013.

La inefectividad del hipoclorito de sodio a bajas concentraciones (150 ppm) sobre los genotipos GII.4 Sydney y New Orleans, es comprobada con los resultados obtenidos por Tung *et al.* (2013). Al mismo tiempo los resultados por RT-qPCR indican que no hay efecto significativo a causa del tratamiento. Duizer *et al.* (2004) reportaron la efectividad del hipoclorito de sodio en concentraciones >300 ppm durante 10 minutos a temperatura ambiente, aplicados en suspensión a feline calicivirus y canine calicivirus (HuNoV surrogados). Es decir que ocurre una reducción sustancial a medida que incrementa la concentración de hipoclorito. En contraste con estos resultados, se observa una reducción después de 10 minutos de contacto, lo cual es el doble de tiempo usado en este experimento (5min).

**Fase III. Respuesta de la aplicación del tratamiento de RNAsa a un genotipo completamente inactivado en la fase I a 150 ppm.**

La RNasa tiene como principio, eliminar el ARN de cápside dañada, de tal forma que el equipo solo pueda cuantificar ARN viral de cápside completa, con fines obtener mejor calidad en la muestra evitando sobre estimación de la cantidad de RNA cuantificada. Se

realizó una prueba *t* de estudiante de una sola cola, en donde se observan diferencia estadística entre el tratamiento con RNasa y sin RNasa ( $P < 0.001$ ).

El tratamiento de RNasa tiene como principio generar mejor calidad de muestra, purificando el material genético, y eliminando a través de enzimas ARN viral de cápside incompleta, destruida o dañada, con fines de no sobre estimar la cantidad de ARN presente en la muestra. Por la alta sensibilidad de RT-qPCR el equipo es capaz de identificar fragmentos muy pequeños de ARN, lo que en ciertos casos puede generar datos fuera del valor real. Los resultados de la prueba *t* para esta investigación indican que existe diferencia estadística entre las muestras tratadas con RNasa y las muestras no tratadas (Figura 6). Manuel *et al.* (2015) comparan los resultados de HuNoV y HuNoV VLPs con y sin tratamiento de RNasa; encontraron que sí existe diferencia significativa (con una diferencia de 2 Log de reducción), añadiendo que ocurre rápida inactivación en las muestras con RNasa.

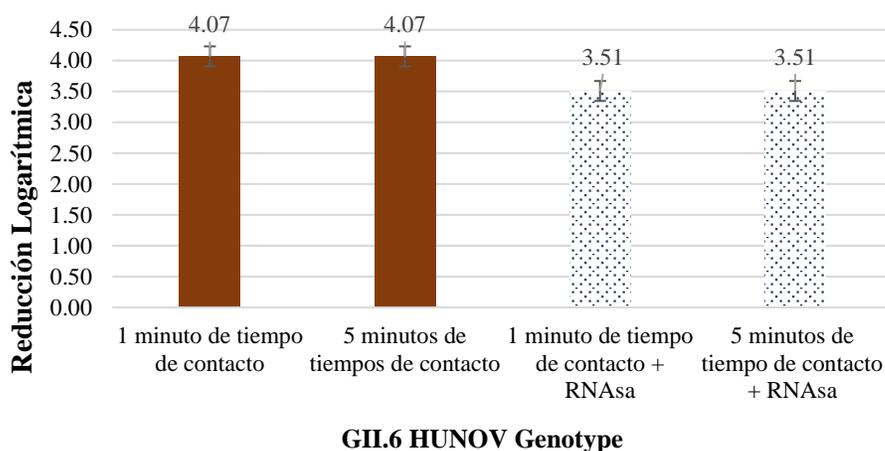


Figura 6. Efecto del tratamiento de RNasa en el genotipo GII.6 a 150 ppm de hipoclorito de sodio.

En otro estudio similar por Warnes *et al.* (2015) realizaron inactivación de murine norovirus sobre superficies y compararon la diferencia entre la aplicación de RNasa y no RNasa; encontrando diferencias significativas en la inactivación del virus sobre cobre (copper). A partir de ello sostienen la hipótesis de que pudo haberse generado alguna interacción con el metal debido a que no existió diferencia para ambos tratamientos (RNasa y no RNasa) cuando se realizó el experimento sobre acero inoxidable (stainless steel) (Figura 7).

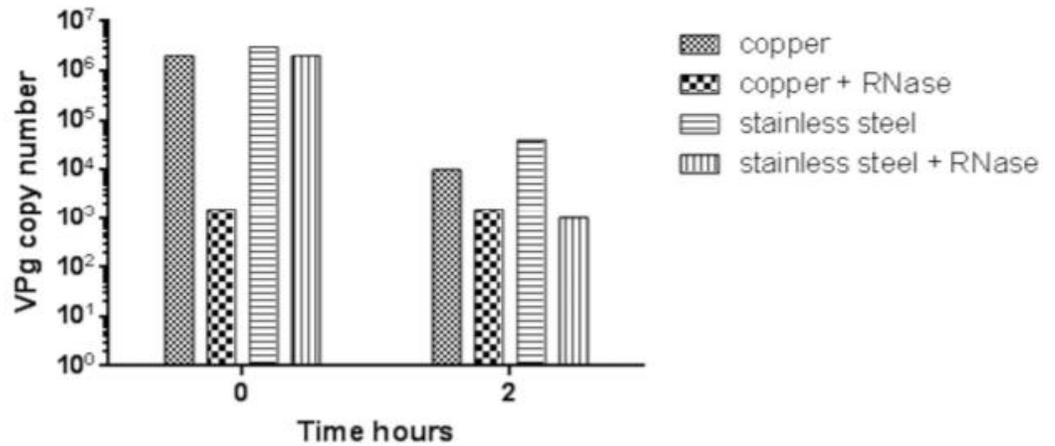


Figura 7. Tratamiento con RNasa para determinar la integridad de la cápside.

Fuente: Warnes *et al.* 2015

El tratamiento de RNase se aplicó únicamente al genotipo GII.6, el cuál fue completamente inactivado a 150 ppm y a 50 ppm. Debido a limitantes de tiempo y reactivos, no se realizó el experimento con otros genotipos, por lo cual no es posible generalizar los resultados, planteando como futuros experimentos la aplicación del tratamiento sobre otros genotipos para poder determinar si los resultados son estadísticamente diferentes, además conocer si existe o no sobre estimación en la cuantificación de ARN.

## 4. CONCLUSIONES

- El uso de hipoclorito de sodio a 150 ppm logró una inactivación completa de los genotipos GII.3, GII.6, GII.7, GII.13, GII.16 y GI.5, a partir de un minuto de tiempo de contacto. Sin embargo, los genotipos GII.4 que han destacado por ser la principal causa de infección en humanos no fueron inactivados por el tratamiento.
- La eficacia del hipoclorito de sodio depende de diferentes factores como la concentración de la solución y la influencia de la materia orgánica entre otros factores ambientales
- Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras RNasa tratados y no tratados.
- La relevancia de este estudio radica en la diversidad de comportamiento de los genotipos de norovirus humano en respuesta al tratamiento, generando información para la creación de estrategias de prevención y control de enfermedades.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Secuenciar la cadena de amino ácidos de cada genotipo.
- Evaluar el efecto de la RNasa en más genotipos y determinar si existe sobre estimación del material genético.
- Evaluar concentraciones mayores de hipoclorito de sodio en los genotipos persistentes.
- Evaluar el incremento en el tiempo de contacto en los genotipos persistentes a 1 y 5 minutos.
- Conducir el experimento con mayor número de replicados para realizar una regresión líneal que permita evaluar más concentraciones para observar si existe o no un patrón en respuesta del norovirus al hipoclorito.

## 6. LITERATURA CITADA

- Applied Biosystems. 2004. Guide to performing Relative Quantification of Gene expression using Real time Quantitative PCR. [place unknown]: [publisher unknown]. [https://icmb.utexas.edu/images/ICMB/Facilities/DNA\\_Sequencing\\_pdfs/Guide\\_to\\_Relative\\_Quantitation.pdf](https://icmb.utexas.edu/images/ICMB/Facilities/DNA_Sequencing_pdfs/Guide_to_Relative_Quantitation.pdf).
- Arya M, Shergill I, Williamson M, Gommersall M, Arya N, Patel H. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5(2).
- CDC (Center of Disease Control and prevention). 2016. Prevent the spread of norovirus. <https://www.cdc.gov/Features/Norovirus/>
- Cadena R, 2014. Partículas tipo virus y su aplicación en la bionanotecnología. *Mundo Nano.* 7(13):[www.mundonano.unam.mx](http://www.mundonano.unam.mx).
- Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. 2010. Viral shape-shifting: Norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.* 8(3):231–241. eng. doi:10.1038/nrmicro2296.
- Doré B, Keaveney S, Flannery, Rajiko-Nenow P. 2010. Management of health risk associated with oysters harvested from a norovirus contamination area, Ireland February-March 2010. *Eurosurveillance.* 15(19):1–4.
- Doultree J, Druce J, Birch C, Bowden D, Marshall. 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J of hospital infect.* 41:51–57.
- Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, Groot A de, Twisk F, Koopmans M. 2004. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol.* 70(8):4538–4543. eng. doi:10.1128/AEM.70.8.4538–4543.2004.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization). 2008. Viruses in food: Scientific advice to support risk management activities. Microbiology risk assessment series 13, meeting report. Geneva: World Health Organization.
- Graaf M, van Beek J, Koopmans M. 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology.* 14:421–433. doi:10.1038/nrmicro.2016.48.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel H-J. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis.* 181 Suppl 2:S322-30. eng. doi:10.1086/3155

Hall A, Vinjé J, Lopman B, Park GW, Yen C, Gregoricus N, Parashar U. 2011. Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines. Atlanta, Georgia: CDC. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6003a1.htm> Hirneisen K, Black E, Cascarino J, Fino V, Hoover D, Kniel K. 2010. Viral Inactivation in Foods: A review of traditional and novel food-processing technologies. *CRFSFS.* 9:3–20.

Hirneisen K, Black E, Cascarino J, Fino V, Hoover D, Kniel K. 2010. Viral Inactivation in Foods: A review of traditional and novel food-processing technologies. *CRFSFS.* 9:3–20.

Knight A, Haines J, Stals A, Li D, Uyttendaele M, Knight A, Jaykus L-A. 2015. A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *Int J Food Microbiol.* 216:40–49. eng. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.015.

Lindesmith L, Donaldson E, LoBue A, Cannon J, Zheng D, Vinje J, Baric R. 2008. Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations. *PLoS One.* 5(2):269–290. doi:10.1371/journal.pmed.0050031.

Manuel CS, Moore MD, Jaykus LA. 2015. Destruction of the Capsid and Genome of GII.4 Human Norovirus Occurs during Exposure to Metal Alloys Containing Copper. *Appl Environ Microbiol.* 81 (15):4940–4946. eng.

Mathijs E, Stals A, Baert L, Botteldoorn N, Denayer S, Mauroy A, Scipioni A, Daube G, Dierick K, Herman L, van Coillie E, Uyttendaele M, Thiry E. 2012. A Review of Known and Hypothetical Transmission Routes for Noroviruses. *Food and Environ Virol.* 4(4):131–152. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-012-9091-z>. doi:10.1007/s12560-012-9091-z.

Mead P, Slutsker L, Dietz V, McCaig L, Bresee J, Shapiro C, Griffin P, Tauxe R. 1999. Food-related illness and death in the United States: Center for Disease Control and Prevention. *Emerg Infect Dis.* 5(6):840–842. eng. doi:10.3201/eid0506.990624.

Moore MD, Goulter RM, Jaykus L-A. 2015. Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments. *Annu Rev Food Sci Technol.* 6:411–433. eng. doi:10.1146/annurev-food-022814-015643.

Park GW, Collins N, Barclay L, Hu L, Prasad BVV, Lopman BA, Vinje J. 2016. Strain-Specific Virolysis Patterns of Human Noroviruses in Response to Alcohols. *PLoS One.* 11(6):e0157787. eng. doi:10.1371/journal.pone.0157787.

Pfaffl M. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In: SA Bustin. *A-Z of Quantitative PCR.* Freising (Alemania). 87–112.

- Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. 2015. Norovirus. *Clin Microbiol Rev.* 28(1):134–164. eng. doi:10.1128/CMR.00075-14.
- Sato J, Miki M, Kubota H, Hitomi J, Tokuda H, Todaka-Takai R, Katayama K. 2016. Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation. *Microbiol Immunol.* 60(9):609–616. eng. doi:10.1111/1348-0421.1243
- Scallan E, Griffin PM, Angulo FJ, Tauxe RV, Hoekstra RM. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Unspecified Agents. *Emerg. Infect. Dis.* 17(1):16–22. doi:10.3201/eid1701.P21101.
- Seymour I, Appleton H. 2001. Foodborne viruses and fresh produce. *J of Appl Microbiol.* 91(5):759–773.
- Sigstam T, Gannon G, Cascella M, Pecson B, Wigginton K, Kohn T. 2013. Subtle Differences in Virus Composition Affect Disinfection Kinetics and Mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (11):3455–3467. doi:10.1128/AEM.00663-13.
- Thermo Scientific. 2009. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. Wilmington, Delaware: [publisher unknown]. 97 p. [http://rai.unam.mx/manuales/lgen\\_ND2000\\_user-manual.pdf](http://rai.unam.mx/manuales/lgen_ND2000_user-manual.pdf).
- Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng D-P, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. 2006. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol.* 44(4):1405–1412. eng. doi:10.1128/JCM.44.4.1405–1412.2006.
- Tung G, Macinga D, Arbogast J, Jaykus L-A. 2013. Efficacy of commonly used disinfectants for inactivation of human noroviruses and their surrogates. *J Food Prot.* 76(7):1210–1217. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-532.
- Vasickova P, Dvorska L, Lorencova A, Pavlik I. 2005. Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature. *Veterinary Medicine- Czech.* 50(3):89–104.
- Warnes SL, Summersgill EN, Keevil CW. 2015. Inactivation of murine norovirus on a range of copper alloy surfaces is accompanied by loss of capsid integrity. *Appl Environ Microbiol.* 81(3):1085–1091. eng. doi:10.1128/AEM.03280-14.
- Wit MAS de, Koopmans MPG, Kortbeek LM, Wannet WJB, Vinjé J, van Leusden F. et al. 2001: Sensor, a Population-based Cohort Study on Gastroenteritis in the Netherlands: Incidence and Etiology. En: *American Journal of Epidemiology* 154 (7), pág. 666–674. DOI: 10.1093/aje/154.7.666.
- Zheng D-P, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. 2005. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 346(2):312–323. eng. doi:10.1016/j.virol.2005.11.015.
- Zonta W, Mauroy A, Thiry E. 2015. Comparative Virucidal Efficacy of Seven Disinfectants Against Murine Norovirus and Feline

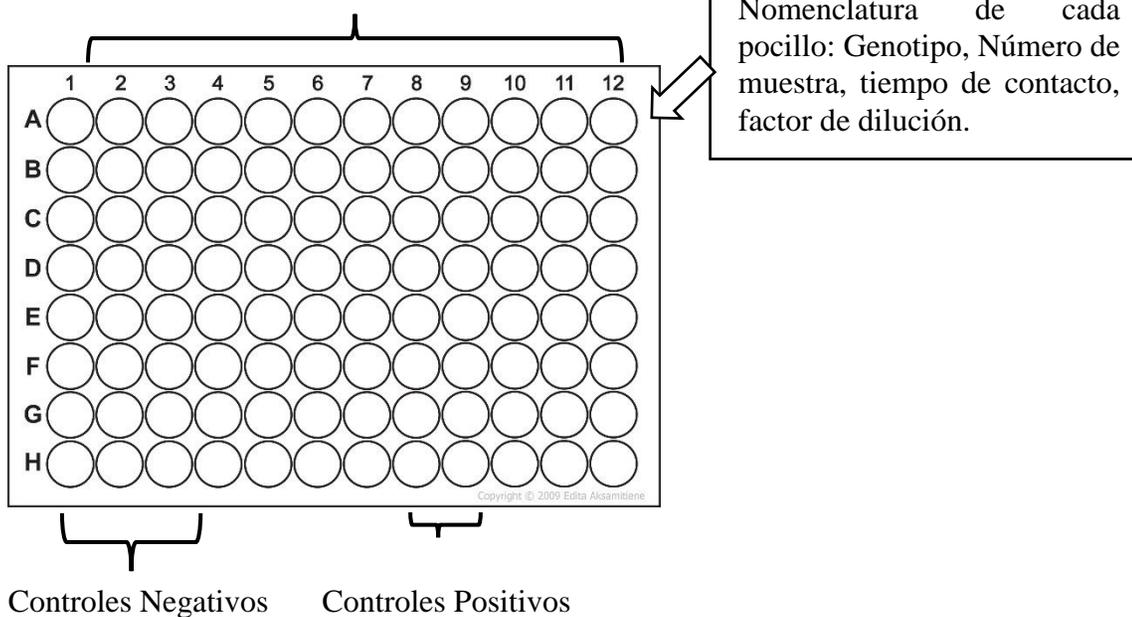
Calicivirus, Surrogates of Human Norovirus. *Food Environ Virol.* doi:10.1007/s12560-015-9216-2.

Zonta W, Mauroy A, Thiry E. 2015. Comparative Virucidal Efficacy of Seven Disinfectants Against Murine Norovirus and Feline Calicivirus, Surrogates of Human Norovirus. *Food Environ Virol.* doi:10.1007/s12560-015-9216-2.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Ejemplo de ensayos realizados.

Muestras con tratamiento y no tratadas (testigos)



### Anexo 2. Cuadro sintaxis de los resultados emitidos por SAS para todos los ensayos.

	$R^2$	Coefficiente de Variación	Desviación estándar	Media de Log ARN
Tratamiento con hipoclorito de sodio a 150 ppm	0.9700	12.8178	0.3370	2.6295
Tratamiento con hipoclorito de sodio a 50 ppm	0.8520	10.1303	0.3775	3.7270

**Anexo 3.** Cuantificación de la extracción de ácidos nucleicos después de la aplicación del tratamiento con hipoclorito de sodio a 150 ppm por el equipo Nanodrop.

Concentración de ARN Muestras con tratamiento			
Genotipo	Tiempo (minutos)	Concentración de ácidos nucleicos ng/μl	Índice de pureza 260/280 nm
GII.4 Sydney	1	55.3	2.82
	5	59.1	2.99
GII.3	1	50.2	2.89
	5	39.7	2.84
GII.4 New Orleans	1	56.6	2.55
	5	55.6	2.93
GII.16	1	60.3	3.19
	5	55.6	3.23
GII.6	1	52.4	3.16
	5	47.6	3.18
GII.13	1	43.6	3.17
	5	38.4	3.06
GII.7	1	79.5	3.34
	5	88.3	3.30
GI.5	1	56.8	2.74
	5	58.0	2.82
GI.6	1	52.8	2.90
	5	54.5	3.00

**Anexo 4.** Cuantificación de la extracción de ácidos nucleicos después de la aplicación del tratamiento con hipoclorito de sodio a 50 ppm por el equipo Nanodrop.

Concentración de ARN Muestras con tratamiento			
Genotipo	Tiempo (minutos)	Concentración de ácidos nucleicos ng/μl	Índice de pureza 260/280 nm
GII.3	1	54.1	3.205
	5	32.3	3.14
GII.6	1	52.4	3.16
	5	47.6	3.18
GII.16	1	38.7	3.20
	5	39.9	3.20
GII.13	1	52.85	3.16
	5	54.55	3.09

**Anexo 5.** Cuantificación de la extracción de ácidos nucleicos de las muestras testigos del experimento a 150 ppm (HuNoV y DEPC H<sub>2</sub>O) por el equipo Nanodrop.

Concentración de ARN de las muestras testigos			
Genotipo	Tiempo (minutos)	Concentración de ácidos nucleicos ng/μl	Índice de pureza 260/280 nm
GII.4 Sydney	1	51.9	3.29
	5	56.6	3.06
GII.3	1	61	2.93
	5	51.9	2.80
GII.4 New Orleans	1	67.7	3.04
	5	42.2	2.60
GII.16	1	48	3.21
	5	52.1	3.11
GII.6	1	62	3.13
	5	44	3.20
GII.13	1	32.2	3.20
	5	41.1	3.19
GII.7	1	49.2	3.32
	5	57.6	3.21
GI.5	1	44.4	2.79
	5	81.6	2.91
GI.6	1	46	2.97
	5	66.2	3.01

**Anexo 6.** Cuantificación de la extracción de ácidos nucleicos de las muestras testigos del experimento a 50 ppm (HuNoV y DEPC H<sub>2</sub>O) por equipo Nanodrop.

Concentración de ARN de las muestras testigos			
Genotipo	Tiempo (minutos)	Concentración de ácidos nucleicos ng/μl	Índice de pureza 260/280 nm
GII.3	1	63.9	2.92
	5	40.5	2.69
GII.6	1	62.0	3.13
	5	44.0	3.20
GII.16	1	44.7	3.00
	5	45.5	3.20
GII.13	1	38.9	3.10
	5	40.4	3.28