

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Detección molecular de virus entéricos en ostión (*Crassostrea* sp.)

Amira Sofía Salazar Freire

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 20 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

Detección molecular de virus entéricos en ostión (*Crassostrea* sp.)

Amira Sofía Salazar Freire

Nombre del profesor, Título académico

Lorena Mejía Castañeda, PhD y Sonia Zapata Mena, PhD

Quito, 20 de diciembre de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Amira Sofía Salazar Freire

Código: 00213718

Cédula de identidad: 0604291534

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos, causadas por patógenos como los virus entéricos, representan una amenaza seria para la salud pública. Los mariscos, incluyendo los ostiones, son organismos filtradores conocidos por ser portadores de virus entéricos debido a su capacidad para acumular microorganismos. En este estudio se evaluó la presencia de cuatro virus entéricos (rotavirus, adenovirus, norovirus GI y norovirus GII) mediante la técnica molecular RT-qPCR en muestras de ostiones crudos (*Crassostrea* spp.) comercializados en el Distrito Metropolitano de Quito. Además, se buscó determinar la eficacia del uso de *E. coli* y colifagos como indicadores de contaminación fecal en las muestras. Los resultados revelaron un total de 42 muestras positivas para virus entéricos, siendo rotavirus el más frecuente (27%), seguido por norovirus GI (14%), adenovirus (5%). No se encontró norovirus GII. En cuanto a *E. coli*, se obtuvo un total de 66% de muestras positivas. La presencia de colifagos en las muestras analizadas, incluso en aquellas sin *E. coli*, subraya la necesidad de considerar este método para evaluar la seguridad microbiológica en alimentos que provienen del mar. Estos resultados resaltan la viabilidad de los virus entéricos en las muestras analizadas y su capacidad infectiva, lo que representa un riesgo tras consumir este tipo de alimentos sin tratamiento térmico. Además, se resalta el uso de estos moluscos filtradores como un recurso valioso para monitorear la contaminación en aguas.

Palabras clave:

Enfermedades transmitidas por alimentos, Virus entéricos, moluscos bivalvos, ostión, rotavirus, adenovirus, norovirus, *Escherichia coli*, colifagos.

ABSTRACT

Foodborne illnesses caused by pathogens such as enteric viruses pose a serious threat to public health. Seafood, including oysters, are known as filter-feeding organisms that can carry enteric viruses due to their ability to accumulate microorganisms. This study assessed the presence of four enteric viruses (rotavirus, adenovirus, norovirus GI, and norovirus GII) using the RT-qPCR molecular technique in raw oyster samples (*Crassostrea* spp.) expended in the Metropolitan District of Quito. Additionally, the effectiveness of using *E. coli* and coliphages as indicators of fecal contamination in the samples was investigated. The results revealed a total of 42 positive samples for enteric viruses, with rotavirus being the most prevalent (27%), followed by norovirus GI (14%), adenovirus (5%). Norovirus GII was not detected. Regarding *E. coli*, 66% of samples tested positive. The presence of coliphages in the analyzed samples, even in those without *E. coli*, underscores the need to consider this method for assessing microbiological safety in seafood. These results highlight the viability of enteric viruses in the analyzed samples and their infective capacity, posing a risk when consuming such untreated seafood. Furthermore, the use of these filter-feeding mollusks as a valuable resource for monitoring water contamination is emphasized.

Key words:

Foodborne diseases, enteric viruses, bivalve mollusks, oysters, rotavirus, adenovirus, norovirus, *Escherichia coli*, coliphages

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	11
Métodos.....	15
Resultados.....	18
Discusión.....	19
Conclusiones.....	23
Tablas.....	24
Figuras.....	26
Referencias bibliográficas.....	28
Anexos.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de virus entéricos y <i>E. coli</i> en muestras de ostión sin concha.....	24
Tabla 2. Distribución de virus entéricos y <i>E. coli</i> en muestras de ceviche de ostión.....	24
Tabla 3. Frecuencia de <i>E.coli</i> y colifagos en muestras de ostión sin concha y ceviche.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultados positivos de la amplificación por RT-qPCR de virus entéricos.....	26
Figura 2. Presencia de calvas de fagos en muestra de ceviche (C) y ostión sin concha (T), positivas para <i>E. coli</i>	26
Figura 3. Presencia de calvas de fagos en muestra de ceviche (C) y ostión sin concha (T), negativas para <i>E.coli</i>	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Reacción de transcripción inversa.....	38
Anexo 2. Primers y sondas para reacción de amplificación por qPCR múltiplex.....	38
Anexo 3. Solución de sondas para qPCR múltiplex.....	39

INTRODUCCIÓN

El consumo de agua y alimentos contaminados con microorganismos patógenos como virus, bacterias, parásitos, mohos, entre otros, es el principal causante de infecciones, intoxicaciones o infecciones mediadas por toxinas (Organización Mundial de la Salud, 2022). Cada año, más de 200 diferentes agentes causan enfermedades que afectan a 600 millones de personas que en su mayoría pertenece a niños menores de 5 años y personas inmunocomprometidas y con menos recursos y, de esta población mueren inevitablemente alrededor de 420.000 personas al año (Organización Panamericana de la Salud, 2015). Los virus entéricos como los norovirus, los rotavirus y los adenovirus, son agentes causantes de gastroenteritis (Martínez, et al., 2017), que forman parte de este problema y se transmiten principalmente a través del consumo de alimentos contaminados como mariscos crudos (Espinoza, et al., 2022).

Los ostiones (*Crassostrea* spp.) son moluscos bivalvos filtradores utilizados como fuente de alimento en Ecuador. Estos se encuentran en diversas regiones costeras, a menudo adheridos a superficies duras, como rocas (Chávez, 2014). Estos cuerpos de agua son salobres y marinas ya que se forman cuando las aguas dulces provenientes de ríos fluyen hacia el océano (Bendaña, 2023). Aquí, los ostiones encuentran el equilibrio adecuado entre agua dulce y salada y las condiciones óptimas para su crecimiento y reproducción (Harwell, 2010). Debido a la ubicación de su hábitat natural y al ser organismos filtradores, los ostiones son propensos a ser portadores de microorganismos patógenos como los virus entéricos.

La viabilidad de los microorganismos patógenos en el ambiente es un factor crítico. Los virus entéricos pueden sobrevivir a diversas condiciones y esto aumenta la posibilidad de contaminación de alimentos (Montaño, et al., 2010). Sin embargo, su tasa de sobrevivencia está influenciada por diversos factores. Según Espinosa & Solano, los

virus entéricos son más estables cuando tienen partículas sólidas a las cuales adherirse debido a que las proteínas virales externas les permiten establecer interacciones. Sin embargo, cuando hay una constante exposición a valores altos de pH, el virus se puede inactivar debido al aumento de la repulsión electrostática (2008). El virus también se puede inactivar cuando estos son expuestos a la luz ultravioleta y a temperaturas altas, ya que, pueden causar daños en las proteínas del virus, por lo que generalmente estos sobreviven más en temperaturas cercanas a la congelación (Bonilla & Mosquera, 2007). De igual forma, los procesos de manipulación, procesamiento de alimentos o la contaminación cruzada son factores representativos para determinar la prevalencia de virus en diferentes entornos (Espinoza, et al., 2022).

Para comprender el riesgo asociado a los virus entéricos en ostiones, es fundamental considerar la dosis infectiva de los virus asociados a gastroenteritis causada por alimentos, es decir, la cantidad mínima de virus necesaria para causar infección (Rodríguez, 2017). Norovirus (NoV), virus de ARN monocatenario sin envoltura, es conocido por tener una dosis infectiva extremadamente baja. Se calcula que 10 partículas virales son suficientes para causar enfermedad (Ribes & Buesa, 2010). En cuanto a Adenovirus (HAdV), virus de ADN bicatenario sin envoltura, la dosis varía de 10 a 10^3 según el serotipo específico del virus, pero en general, la dosis infectiva también es baja (Dominguez, et al., 2009). Por último, en el caso de Rotavirus (RV), virus de ARN bicatenario sin envoltura, se estima que se necesitan alrededor de 10 a 100 partículas virales para causar infección en humanos (Greenberg & Estes, 2009).

A raíz de esto, en Ecuador se han implementado medidas preventivas frente a la infección de virus entéricos. En el caso de rotavirus, se implementó el Plan Nacional de Inmunizaciones, el cual incluye la administración de una vacuna diseñada para proteger contra los serotipos más comunes de rotavirus que circulan en la población y de esta

manera, prevenir infecciones en infantes (Ministerio de Salud Pública, 2021). La efectividad de las vacunas comerciales RotaTeq y Rotarix radica en su capacidad para abarcar múltiples serotipos y, por lo tanto, reducir la incidencia de múltiples cepas de virus. Los serotipos cubiertos por RotaTeq son G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8], mientras que Rotarix se dirige principalmente al serotipo G1P[8] (World Health Organization, 2021). En cuanto a adenovirus, existen vacunas dirigidas a serotipos diferentes a los causantes de gastroenteritis (HAdV serotipo 40 y 41). Estas se utilizan en contextos específicos como entornos militares o regiones donde adenovirus causa problemas significativos (Tesini, 2022). Con respecto a las vacunas contra norovirus, actualmente no existe una vacuna disponible para prevenir estas infecciones, su naturaleza altamente variable y su capacidad para cambiar rápidamente han limitado el proceso. Esto destaca la importancia de contar con métodos efectivos para identificar la presencia de estos virus en alimentos y muestras clínicas y así evitar la propagación de estos patógenos (Carrizo, et al., 2023).

De igual forma, para prevenir enfermedades causadas por agentes patógenos como los virus entéricos es recomendable tener buenas prácticas de higiene durante el procesamiento y manipulación de los alimentos, una cocción adecuada para eliminar agentes infecciosos y el uso de agua inocua. En la industria de mariscos se emplean varios métodos para tratar moluscos antes de su consumo (FAO & OMS, 2012). La Ley Orgánica para el Desarrollo de la Acuicultura y pesca del Ecuador (2021), establece el Plan Nacional de Sanidad Animal Acuícola con el fin de “diagnosticar, caracterizar, vigilar y controlar el estado de salud de los cultivos acuícolas”, esto con el fin de evitar poner en riesgo la sostenibilidad del producto y de esta manera prevenir o controlar enfermedades potenciales. Se plantean técnicas de depuración que consisten en mantener a los moluscos en instalaciones donde se controlan las condiciones de agua para potenciar

su capacidad de filtración y que estos, expulsen contaminantes intestinales, evitando la recontaminación y garantizando la efectiva eliminación de impurezas (FAO, 2010).

Por otro lado, *Escherichia coli* es una bacteria coliforme presente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales y, aunque muchas cepas son inofensivas, algunas pueden causar enfermedad (Rock & Rivera, 2014). Estas bacterias pueden ser utilizadas como indicadores de contaminación fecal en el agua y otros entornos, ya que, al ser comunes en el tracto gastrointestinal, su presencia indica contaminación fecal (Larrea, et al., 2013) o el posible contacto con aguas residuales (Pérez, et al., 2013). En Ecuador, el límite establecido para garantizar la inocuidad del agua destinada para el consumo humano es la ausencia de *E. coli* en 100 ml de muestra (Norma Técnica Ecuatoriana, 2012).

Por otra parte, los fagos son virus que infectan y se replican en bacterias (Ballesté, et al., 2022), incluyendo bacterias como *E. coli*. Estos, conocidos como colifagos, son indicadores de la posible presencia de patógenos entéricos, ya que su presencia también sugiere contaminación fecal (Pullés, 2014). La detección de fagos es un método indicador de la calidad microbiológica viable, ya que, tienen la ventaja de ser fácilmente cultivables y su detección es económicamente factible (Tobón, et al., 2017). Algunos colifagos pueden ser resistentes (más que algunas bacterias como *E. coli*) a condiciones ambientales adversas debido a estructura sin envoltura (Gómez, et al., 2023), a su tendencia de adhesión a superficies y, además, gracias a que su capacidad de lisis le permite multiplicarse a medida que infectan más bacterias (Paz y Miño, et al., 2003).

A raíz de esto, el objetivo de este trabajo es evaluar la presencia de virus entéricos (rotavirus, adenovirus, norovirus GI y norovirus GII), en ostiones crudos expendidos en mercados del Distrito Metropolitano de Quito.

MÉTODOS

Muestreo

Se tomaron un total de 100 muestras de ostión crudo (50 ceviches de ostión y 50 muestras de ostión sin concha) de un mercado del Distrito Metropolitano de Quito durante el año 2023 (de abril a septiembre). Las muestras fueron adquiridas directamente en los puestos de mercado y se transportaron inmediatamente al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, donde fueron mantenidas a 4 °C.

Recuento *E. coli* como indicador de contaminación fecal

Las muestras fueron analizadas para determinar la presencia de *E. coli*. Estos análisis se realizaron por duplicado en placas Compact Dry EC (NISSUI Pharmaceutical Co Ltd. Tokyo, Japan). Brevemente, en una funda estéril, se diluyeron 11 gramos de cada muestra en agua peptonada tamponada al 0.1% y se homogeneizó durante 2 minutos. Tras la incubación a 37 °C durante 24 hrs, se identificaron colonias de color azul/azul púrpura pertenecientes a *E. coli*. Se expresó el resultado de cada duplicado en UFC/g.

Extracción viral

Basado en el método estandarizado ISO 15216-1 (Organización de Normalización, 2017), para la extracción de ácidos nucleicos se extrajeron $2,0 \pm 0.2$ g de las glándulas digestivas de los ostiones (10 ostiones componen una muestra) utilizando pinzas y bisturíes estériles. Se troceó finamente las glándulas digestivas y se transfirió la pasta a una placa Petri estéril. La muestra homogeneizada se colocó en tubos Falcon e inmediatamente se añadió 2 mL de la solución de proteinasa K grado RNA (20 mg/mL) de *Invitrogen*TM para luego incubar a 37°C con agitación (300 rpm) durante 60 minutos en un baño de agua y se realizó una segunda incubación de las muestras a 60 °C durante 15 minutos en un baño de arena. Luego, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril. La

extracción del material genético se realizó utilizando el Kit *ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System* omitiendo el tratamiento de DNasa (para la posterior detección de HAdV). Una vez extraído el material genético se eluyó el resultante en 50 µl de agua libre de nucleasas y se realizaron alícuotas de 5 µl que fueron almacenadas a -80 °C.

PCR de transcripción inversa

Cada muestra obtenida se sometió a transcripción inversa mediante la enzima *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Cat. No. 18064-014, Invitrogen) con las concentraciones de reactivos establecidas en el Anexo 1. Se diluyeron los primers (Cat.No. 48190011, Invitrogen) a una concentración de 300 ng/µl y los dNTPS (Cat No, U151B, promega) a 2.5 mM.

Los tubos con 5 µl del material genético fueron incubados en un termociclador Bio-Rad a 97 °C durante 5 minutos, brevemente centrifugados y colocados inmediatamente en una gradilla refrigerada. La solución de reactivos fue mezclada con las alícuotas de material genético mediante pipeteo y fueron sometidas a retrotranscripción bajo las siguientes condiciones: 25 °C por 10 minutos, 42 °C por 50 minutos, 70 °C por 15 minutos y se mantuvo a 4 °C. El cDNA se mantuvo a -20 °C.

Amplificación por qPCR múltiple.

Para la amplificación se utilizó el método *qPCR multiplex EVPrPCR* planteado por Pang, Preiksaitis & Lee (2014). Se evaluó la presencia o ausencia de Rotavirus (RV), Adenovirus (HAdV), Norovirus GI (NoVGI) y Norovirus GII (NoVGII) utilizando primers y sondas específicas que se describen en el Anexo B. Dentro de la cabina de flujo laminar, se preparó un mix sonda-primer (PP-mix) para cada par de virus, que se describe en el Anexo C. Para la amplificación de qPCR para una muestra, en la cabina de flujo laminar se preparó una solución que contenía 2x TaqMan™ (Fast Universal PCR Master Mix- Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific), 2 µl de PP-mix y 3 µl de cDNA

(3 µl de agua en el caso del control negativo). Para el control positivo se utilizó 3 µl de un control sintético (gBlocks gene fragment-Integrated DNA Technologies). Las muestras fueron corridas en el termociclador *Bio-Rad CFX96 Touch Real Time PCR Detection System* en condiciones de ciclado de 95 °C por 20 seg para la denaturación, seguido de 45 ciclos de 95 °C por 3 seg y 60 °C por 30 seg. Los resultados positivos para virus entéricos fueron determinados en base a la calidad de la curva obtenida en la qPCR (Figura 1) y en base al número de ciclos necesarios de amplificación necesarios para que se emita una señal de fluorescencia o Cq. Se consideró como positivo las muestras con un Cq < 42.

Detección de colifagos

Se realizó el aislamiento de fagos de cuatro muestras, dos muestras positivas para *E. coli* y dos muestras negativas para *E. coli* (dos muestras de ostión sin concha y dos de ceviche). Se realizó el enriquecimiento utilizando 5 ml del medio DSPB y 5 ml de *E. coli* (previamente incubada en TSB) en 40 ml de muestra de ceviche y de ostión sin concha previamente trituradas y aforadas con agua estéril, y se incubó a 37°C por 24 horas. Se centrifugó la mezcla a 4000 rpm durante 20 minutos y se filtró la muestra con ayuda de una bomba de vacío a través de membranas de 0.45 µl y después con membranas de 0.22 µl. Se realizaron 4 diluciones seriadas en base 10. En un tubo con 5ml de agar nutritivo (AN) semisólido, se colocó 200 µl de *E. coli* previamente incubada en TSB. Después, se colocó el contenido del tubo sobre una caja de AN sólido y, una vez solidificado el agar, se colocó 10 µl de fagos a diferentes diluciones sobre el agar semisólido, se dejó reposar por una hora y se incubó a 37°C por 24 horas. La presencia de fagos se determinó gracias a la formación de un halo o calva en el agar.

RESULTADOS

De las 100 muestras analizadas, 66 muestras de ostiones (66%) mostraron recuentos de *E. coli* ≥ 10 UFC/g. De estas, 35 muestras pertenecen a ceviche de ostión (70%) y 31 a ostión sin concha (62%).

En cuanto a los resultados de virus entéricos, se obtuvo un total de 42 muestras positivas en ambos tipos de muestras, 20% de ostión sin concha y 22% de muestras de ceviche. Tanto en ceviche como en ostión crudo no se logró detectar Norovirus GII y en ninguno de los casos hubo coinfección o la presencia de más de un virus. En la Tabla 1, se puede observar la distribución de virus entéricos y *E. coli* en 50 muestras de ostión sin concha, siendo rotavirus el virus más frecuente. En la Tabla 2, se observa la distribución de estos agentes en ceviche de ostión. En general, el virus más frecuente es rotavirus, con un total de 27 muestras positivas (27%). Por otro lado, el virus con menos prevalencia es adenovirus con solo 5 muestras positivas (5%). En los dos tipos de muestras, se observa que *E. coli* es más frecuente en muestras positivas para rotavirus.

En el caso de colifagos, en las dos muestras con *E. coli* se lograron observar halos en las diferentes diluciones. En el caso del ceviche (C) se observó la formación de halos en la muestra sin diluir y en la muestra 10^{-1} y en cuanto a la muestra de ostión sin concha (T) se observó la formación de halos en la muestra sin diluir y en todas las diluciones (Figura 2). Por otro lado, en la figura 3 se observan los resultados de las muestras que no presentaron *E. coli*. Se pudieron observar halos en todas las diluciones de ostión sin concha mientras que, en el caso del ceviche, se observó solo en la muestra sin diluir.

DISCUSIÓN

Los moluscos bivalvos, como los ostiones, son considerados fuente de alimento en diferentes partes del mundo (FAO, 2007). Su consumo se atribuye a que estos poseen diversos componentes que son beneficiosos para la salud humana y, además, son muy versátiles en la cocina y son atractivos para diferentes gustos culinarios, siendo consumidos crudos con mayor frecuencia (Alvarez, et al., 2008). Debido a esto, existe una gran necesidad de implementar medidas de detección de patógenos en moluscos destinados a la comercialización con el fin de garantizar un consumo seguro.

En la presente investigación, se logró detectar diferentes virus entéricos en 42% de muestras de ostión crudo. Entre los virus analizados, el rotavirus fue el que se detectó con mayor frecuencia 22% y 32% en las muestras de ostión sin concha y ceviche de ostión, respectivamente. En América latina, se ha reportado la detección de este virus en diferentes tipos de moluscos bivalvos como es el caso de Panamá que reportó un 60% en muestras de conchas negras (*Anadara tuberculosa*) (Bourdett, et al., 2022), o en Brasil (Keller, et al., 2019) que reportó un 65,4% de rotavirus en diferentes moluscos bivalvos, incluyendo 46,2% en *Crassostrea rhizophorae*. De igual forma, se reportó 21% en muestras de *Crassostrea gigas* en Argentina (Mozgovoij, 2022) y 33.3% en *Crassostrea virginica* en México (Quiroz, et al., 2014).

A pesar de la efectividad de la vacuna frente a rotavirus, se puede observar una alta prevalencia del virus en los diferentes países. Esto, según Aguilar y colaboradores (2020), puede deberse a la presión selectiva del virus frente a las vacunas, causada por el intento de los virus por evolucionar y tratar de evadir la inmunidad que la vacuna brinda. Además, la diversidad genotípica de rotavirus confiere un reto al momento de

intentar crear una vacuna efectiva (Hasing, et al., 2009). Lo más probable es que los serotipos circulantes de rotavirus no son cubiertos por las vacunas actuales.

A nivel mundial, Norovirus se encuentra entre los virus que más problemas gastrointestinales causa. Según Jiménez y colegas, este es el motivo detrás del 16,6% de las hospitalizaciones por gastroenteritis en niños menores de 5 años (2021). En este estudio, se obtuvo un 14% y 6% de NoV GI en las muestras de ostión sin concha y ceviche de ostión, respectivamente. Varios países reportan la prevalencia de este genogrupo en moluscos bivalvos, como es el caso de China con un 11.1% (Zhou, et al., 2017) y de Reino Unido con un 20.9% en *Cassostrea gigas* (Lowther, et al., 2012).

Por otro lado, el genogrupo II es más prevalente en muestras clínicas y ha causado brotes epidémicos en distintas partes del mundo (Montenegro, et al., 2014). En nuestro caso, no se obtuvieron resultados positivos para NoV GII en ninguno de los dos tipos de muestras. La cuantificación de norovirus en moluscos está sujeta a problemas de inhibición por los componentes presentes en el tejido del marisco (Le Guyader et al., 2008). Además, se menciona la persistencia de GI frente al GII en tejido de *Crassostrea gigas* debido a componentes, como los carbohidratos, que facilitan la unión de los virus dependiendo del tejido del molusco (Le Guyader, 2012).

En el caso de adenovirus, las muestras analizadas por este estudio demuestran una frecuencia del 5%. Este virus se ha reportado en diferentes tipos de muestras de mariscos alrededor del mundo como es el caso de Brasil con un 24,7% en almejas y mejillones, 23% en *Crassostrea rhizophorae* (Gonçalves et al., 2022 ; Keller, et al., 2019), 52.3% en almejas en Marruecos (Upfold, et al.,2021) y 26% en mejillones y almejas en Túnez (Elamri, et al., 2006). En base a estos reportes se sugiere que el porcentaje de frecuencia

de virus puede depender del género de molusco bivalvo debido a los componentes de los tejidos de los mismos, como plantea Le Guyader, et al. (2012).

Los resultados obtenidos muestran prevalencia similar de virus en los dos diferentes tipos de muestras, 20% en ostión sin concha y 22% en ceviche de ostión. Rzeżutka & Cook, mencionan la capacidad de los virus para retener infectividad en diferentes ambientes por tiempos prolongados (2004). La estabilidad de los virus en alimentos depende de varios factores como la temperatura, el pH, la exposición a la luz del sol, la superficie a la que se adhieren, entre otros (Sánchez & Bosch, 2016). Los virus entéricos sin envoltura pueden sobrevivir a diferentes ambientes, ya sean alimentos o superficies en contacto con agua o alimentos, durante largos periodos de tiempo (Kotwal & Cannon, 2014). Muchos mariscos pueden ser portadores de virus entéricos, sin embargo, la cocción de los mismos antes del consumo ayudaría a eliminar a los patógenos en pocos minutos (Rzeżutka & Cook, 2004).

En cuanto al análisis bacteriano, de las 100 muestras se obtuvo un 66% de muestras positivas para *E. coli*. Según Córdova (2015), algunas de las áreas en las que se encuentran los ostiones, están expuestas a contaminación de aguas residuales. *E. coli* ha sido utilizada como indicador de contaminación de moluscos bivalvos en diferentes países como en Tailandia que se encontró *E. coli* en un 93,1% de muestras de *Crassostrea lugubris* y *Cassostrea belcheri* (Jeamsripong & Atwill, 2019), 100% de muestras de *Crassostrea rhizophorae* en Brasil (Rubião, et al., 2017) y en Canadá 23,8% en muestras de ostras y mejillón (Rees, et al., 2015). La presencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal sugiere la entrada de aguas residuales en el lecho de moluscos bivalvos lo que implica la necesidad de implementar prácticas adecuadas para eliminar este tipo de contaminación (Florini, et al., 2020).

Si bien es cierto, el uso de bacterias como indicadores de contaminación fecal es considerada una alternativa; varios estudios mencionan que existen limitaciones relacionadas al uso de bacterias como su sensibilidad ante ciertas condiciones ambientales y su debilidad frente a procesos de desinfección en comparación a otros agentes como los virus (Murrell, et al., 2013). Además, representa una limitante debido a que las concentraciones de las bacterias varían dependiendo del espacio-temporada (Ogburn & White, 2009).

Según Murrell, et al. (2013), los microorganismos indicadores de contaminación fecal son aquellos que comparten similitudes patógenas como los virus entéricos. Un buen indicador, debe cumplir con el requisito de ser constituyente normal del microbiota intestinal de los individuos (Boehm & Soller, 2013). En base a esto, el uso de fagos como indicadores de la presencia de virus entéricos es viable debido a su comportamiento similar y ventaja de identificación eficiente (Arcos, et al., 2005). En el análisis realizado en los dos diferentes tipos de muestras, se pudieron detectar colifagos en las muestras con y sin *E. coli*, lo que demuestra la eficiencia del uso de fagos como mejores indicadores en este tipo de muestras. Un estudio realizado por Romero y colaboradores en 2014, resalta mayor prevalencia de virus entéricos y colifagos en muestras de agua residual después del tratamiento, en comparación con las bacterias indicadoras. Además, debido al similar comportamiento entre los bacteriófagos y los virus entéricos, su cultivo sugiere la viabilidad de los mismos (Bellesté, et al., 2022) por lo que el consumo de alimentos crudos representa un riesgo.

Los resultados de este estudio resaltan la significativa prevalencia de patógenos entéricos en moluscos bivalvos lo que plantea un riesgo considerable para la salud pública. Es importante recalcar que estos alimentos se consumen crudos, por lo que la presencia de estos patógenos implica un grave riesgo de infección en los consumidores.

CONCLUSIONES

La técnica molecular RT-qPCR proporciona una herramienta valiosa para la identificación de material genético viral en las muestras analizadas debido a su capacidad para detectar y amplificar secuencias específicas.

La investigación realizada revela preocupantes niveles de contaminación por virus entéricos, especialmente rotavirus, en ostiones crudos, expendidos en el Distrito Metropolitano de Quito. A pesar de la efectividad de las vacunas contra rotavirus, la alta positividad sugiere desafíos adicionales en el desarrollo de estrategias para evitar un riesgo significativo para la salud pública debido a estos patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales.

Adicionalmente, la presencia de *E. coli* en las muestras sugiere la contaminación fecal en las áreas de cultivo de ostiones, lo que subraya la importancia de mejorar las prácticas de control de calidad y saneamiento en la cadena alimentaria. Por otro lado, a pesar de que *E. coli* es utilizada como indicador de contaminación fecal, la detección de colifagos en las muestras, incluso aquellas sin presencia de *E. coli*, destaca la necesidad de considerar a los fagos como un método más sensible, que, además, indica la viabilidad y capacidad infectiva de los virus en las muestras analizadas.

De igual forma, es crucial reconocer el papel significativo que los ostiones desempeñan como indicadores de calidad de agua debido a su capacidad de concentrar microorganismos patógenos presentes en su entorno. Estos resultados destacan la importancia de implementar medidas que garanticen la inocuidad de los productos y, además, resalta la urgencia de medidas mejoradas de detección y prevención para garantizar una buena salud pública.

TABLAS

Tabla 1. Distribución de virus entéricos y *E. coli* en muestras de ostión sin concha.

<i>E. coli</i> (UFC/g)	Virus entéricos <i>n</i> = 50		
	Rotavirus	Adenovirus	Norovirus GI
Ausencia <i>n</i> =19	2	1	7
10-100 <i>n</i> =12	4	-	-
>100 <i>n</i> =19	5	1	-
Positivos	11 (22%)	2 (4%)	7 (14%)
Negativos	39 (78%)	48 (96%)	43 (86%)

*No se encontraron coinfecciones ni la presencia de Norovirus GII

Tabla 2. Distribución de virus entéricos y *E. coli* en muestras de ceviche de ostión.

<i>E. coli</i> (UFC/g)	Virus entéricos <i>n</i> = 50		
	Rotavirus	Adenovirus	Norovirus GI
Ausencia <i>n</i> =15	-	1	2
10-100 <i>n</i> =24	12	1	1
>100 <i>n</i> =11	4	1	-
Positivos	16 (32%)	3 (6%)	3 (6%)
Negativos	34 (68%)	47 (94%)	47 (94%)

*No se encontraron coinfecciones ni la presencia de Norovirus GII

Tabla 3. Frecuencia de *E.coli* y colifagos en muestras de ostión sin concha y ceviche.

Muestra	<i>E. coli</i> UFC/ml	Título viral
Ostión sin concha	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$
Ceviche de ostión	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
Ostión sin concha	Ausencia	$1,0 \times 10^4$
Ceviche de ostión	Ausencia	10

FIGURAS

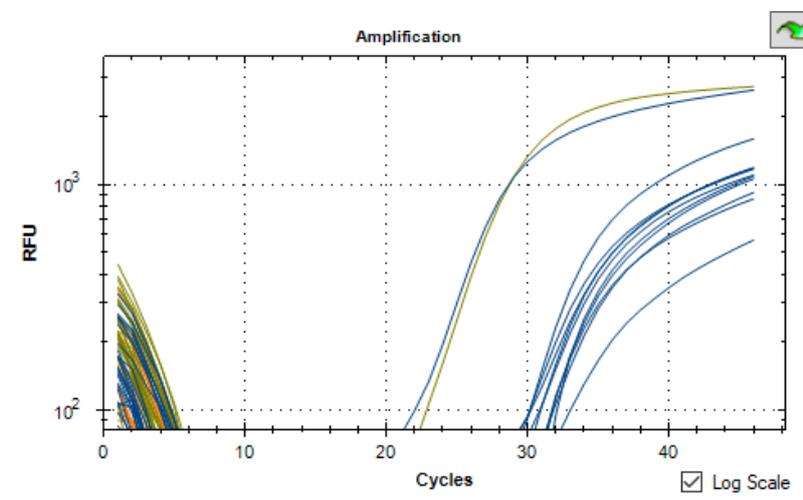


Figura 1. Resultados positivos de la amplificación por RT-qPCR de virus entéricos. Las curvas de color azul corresponden a muestras positivas para rotavirus mientras que, la curva de color verde corresponde al control positivo de adenovirus.

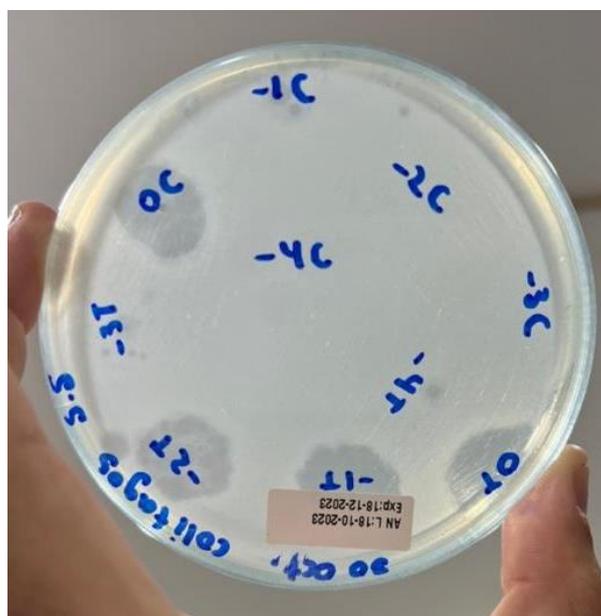


Figura 2. Presencia de calvas de fagos en muestra de ceviche (C) y ostión sin concha (T), positivas para *E. coli*

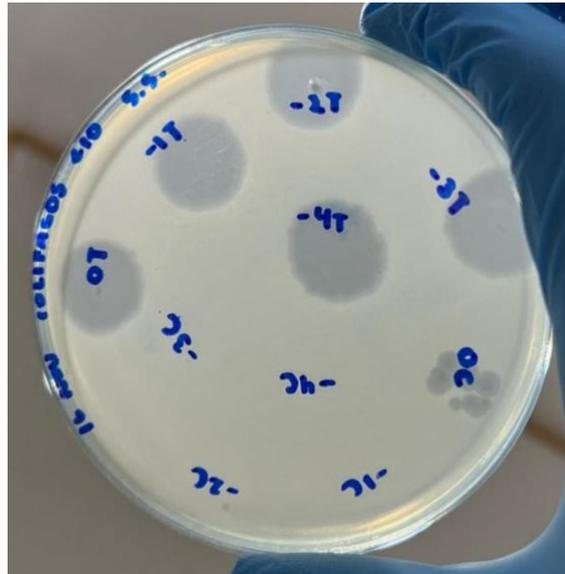


Figura 3. Presencia de calvas de fagos en muestra de ceviche (C) y ostión sin concha (T), negativas para *E.coli*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, F., Becerra, L., Guevara, G., & Mera, K. (2020). *Vista de gastroenteritis de etiología viral en la era posvacunal frente a rotavirus: un estudio transversal retrospectivo de 5 años en un hospital al norte del Perú*. REM.
<http://rem.hrlamb.gob.pe/index.php/REM/article/view/426/262>
- Alvarez, L., Cobo, R., Sonnenholzner, S., & Stern, S. (2008). *Estado actual de la acuicultura de moluscos bivalvos en Ecuador*. FAO.
<https://www.fao.org/3/i0444s/i0444s.pdf#page=145>
- Arcos, M., De Navia, S., Torres, S. E., & Prieto, A. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova*, 3(4).
<https://doi.org/10.22490/24629448.338>
- Ballesté, E., Blanch, A., Muniesa, M., García-Alfaro, C., Rodríguez-Rubio, L., Martín-Díaz, J., Pascual, M., & Jofre, J. (2022). Bacteriophages in sewage: Abundance, roles, and applications. *FEMS microbes*, 3.
<https://doi.org/10.1093/femsmc/xtac009>
- Bendaña, G. (2023). *Las lagunas costeras del mar caribe de Nicaragua* (181.^a ed.).
https://www.researchgate.net/profile/Lilly-Soto-Vasquez/publication/370440983_rtn-181_-_mayo_2023/links/64502fc497449a0e1a6ef9f3/rtn-181-mayo-2023.pdf#page=19
- Boehm, A. B., & Soller, J. A. (2012). Recreational water risk: pathogens and fecal indicators. En *Springer eBooks*. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5764-0_16
- Bonilla, M., & Mosquera, M. (2007). *Seguimiento de la presencia de rotavirus a un proceso de compostaje realizado a partir de residuos orgánicos*. Pontificia

Universidad Javeriana.

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8950/tesis97.pdf?sequence=>

Bourdett, L., Cuevas, M., Ferrera, A., & Durant, A. (2022). *View of rotavirus in oysters, lettuce, and feces in children with diarrhea from Panama*. Journal in advances in Microbiology. <https://journaljamb.com/index.php/JAMB/article/view/615/1232>

Carrizo, J., Izaguirre, J., & Levy, J. (2023). *Vacunas de virus y bacterias enteropatógenas*. IV Consenso Venezolano sobre Enfermedad Diarreica en Pediatría. http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/revista_avpp/article/view/25387

Chávez, J. (2014). *Cultivo de ostión Crassostrea gigas: análisis de 40 años de actividades en México*. Scielo. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972014000300002&lng=es&tlng=es

Córdova, S., & Del Rio, M. (2015) *Cuantificación de coliformes fecales en extractos de moluscos bivalvos utilizando el gen Lac Z*. Cicese Repositorio. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/72>

Domínguez, Á., Godoy, P., Torner, N., Cardeñosa, N., & Martínez, A. (2009). *Las gastroenteritis víricas: un problema de salud pública*. https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1135-57272009000500009&script=sci_arttext&tlng=pt

Elamri, D. E., Aouni, M., Parnaudeau, S., & Guyader, F. S. L. (2006). Detection of human enteric viruses in shellfish collected in Tunisia. *Letters in Applied*

Microbiology, 43(4), 399-404. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2006.01978.x>

Espinosa, A., & Solano, S. (2008). *Detección de rotavirus por medio de la técnica de RT-PCR en muestras de compost elaborado a partir de biosólidos y residuos vegetales*. Pontificia Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8248/tesis234.pdf?sequence=1>

Espinoza, T., Quevedo, R., & Ávila, Y. (2022). Los alimentos como transmisores de virus: una revisión. *Scielo Perú*. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172022000100025

FAO. (2007, agosto). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura*. Taller Técnico Regional de la FAO. <https://www.fao.org/3/i0444s/i0444s.pdf>

FAO. (2010). *Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura. <https://www.fao.org/documents/card/es?details=2a0bc23e-d643-59d0-a31e-52debfbc9c4d#:~:text=La%20depuraci%C3%B3n%2C%20o%20purificaci%C3%B3n%2C%20es,expulsar%20as%C3%AD%20el%20contenido%20intestinal>

FAO & OMS. (2012). *Código de prácticas para el pescado y los productos pesqueros*. Codez alimentarius. <https://www.fao.org/3/i2382s/i2382s.pdf>

- Florini, S., Shahsavari, E., Ngo, T., Aburto-Medina, A., Smith, D. J., & Ball, A. S. (2020). Factors influencing the concentration of fecal coliforms in oysters in the River Blackwater Estuary, UK. *Water*, *12*(4).
<https://doi.org/10.3390/w12041086>
- Gómez, E., Guerrero, J., Troya, D., López, A., Pantoja, E., & García, M. (2023). *Escherichia coli* y *colifagos* somáticos. Universidad de Nariño.
<https://sired.udenar.edu.co/10365/1/Escherichia%20coli%20y%20colifagos%20somáticos.pdf>
- Gonçalves, L., Kahwage, Leonardo, R., Bautista, Correia, De Oliveira, J., Rezende, Coutinho, R., Miagostovich, M., & Machado. (2022). Detection and molecular characterization of enteric viruses in bivalve mollusks collected in arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brazil. *Viruses*, *14*(11).
<https://doi.org/10.3390/v14112359>
- Greenberg, H., & Estes, M. (2009). *Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination*. PubMed Central. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3690811/>
- Harwell, H., Kingsley, P., Kellogg, M., Allen, S., Meritt, D., Paynter, K., & Luckenbach, M. (2010). *A Comparison of Crassostrea virginica and C. ariakensis in Chesapeake Bay: Does Oyster Species Affect Habitat Function?* BioOne: digital library. <https://bioone.org/journals/Journal-of-Shellfish-Research/volume-29/issue-2/035.029.0201/A-Comparison-of-iCrassostrea-virginica-i-and-iC-ariakensis-i/10.2983/035.029.0201.short>
- Hasing, M. E., Trueba, G., Baquero, M. I., Ponce, K., Cevallos, W., Solberg, O. D., & Eisenberg, J. N. (2009). Rapid changes in rotaviral genotypes in Ecuador.

Journal of Medical Virology, 81(12), 2109-2113.

<https://doi.org/10.1002/jmv.21632>

Jeamsripong, S., & Atwill, E. R. (2019). Modelling of indicator *Escherichia coli* contamination in sentinel oysters and estuarine water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11), 1971.

<https://doi.org/10.3390/ijerph16111971>

Jimenez, R., Agustinelli, S., & Sánchez, G. (2021). Índices de riesgo en relación a la transmisión de gastroenteritis aguda a partir de alimentos contaminados con norovirus. *Revista chilena de nutrición*, 48(2). <https://doi.org/10.4067/s0717-75182021000200266>

Keller, R., Pratte-Santos, R., Scarpati, K., Martins, S. A., Loss, S. M., Fumian, T. M., Miagostovich, M. P., & Cassini, S. T. A. (2019). Surveillance of enteric viruses and thermotolerant coliforms in surface water and bivalves from a mangrove estuary in southeastern Brazil. *Food and Environmental Virology*, 11(3), 288-296. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09391-3>

Kotwal, G., & Cannon, J. L. (2014). Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Current Opinion in Virology*, 4, 37-43.

<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.12.003>

Larrea, J., Rojas, M., Álvarez, B., Rojas, N., & Heydrich, M. (2013). *Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura*. Redalyc- Revisa Cenic.

<https://www.redalyc.org/pdf/1812/181229302004.pdf>

- Le Guyader, F., Saux, J. L., Ambert, K., Kröl, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., & Atmar, R. L. (2008). Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French Oyster-Related gastroenteritis outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12). <https://doi.org/10.1128/jcm.01044-08>
- Le Guyader, L., Atmar, R. L., & Pendu, J. L. (2012). Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Current Opinion in Virology*, 2(1). <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.02>
- Ley Órganica para el Desarrollo de la Acuicultura y pesca del Ecuador (2021) Plan Nacional de Sanidad Animal Acuícola. *Ministerio de Producción* https://produccion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2021/04/Propuesta-Normativa-Acuerdo-Ministerial-Categorizacion-Depuracion-de-moluscos-bivalvos_12_04_2021.pdf
- Lowther, J., Gustar, N. E., Powell, A., Hartnell, R., & Lees, D. N. (2012). Two-Year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16). <https://doi.org/10.1128/aem.01046-12>
- Martínez, O., Vázquez, L., Buyo, P., Díaz, R., & Moldes, L. (2017). Gastroenteritis agudas y virus entéricos: impacto de la detección de norovirus. *Anales de Pediatría*. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2016.08.006>
- Ministerio de Salud Pública. (2021). *Lineamientos de la campaña de vacunación y recuperación del esquema regular*. Gobierno del encuentro, Ecuador.

https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/04/Lineamiento_plan_recuperacion_de_vacunacion_version_30_09_2021-signed-signed-signed.pdf

Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). *Los microorganismos: pequeños gigantes*. Redalyc. <https://www.redalyc.org/pdf/294/29411989003.pdf>

Montenegro, S., Pineda, S., Enríquez, I., Enríquez, N., Rivera, N., & Delgado, C. (2014). Detección de norovirus en niños con diarrea adquirida en la comunidad o nosocomial en el Hospital Guillermo Grant Benavente de Concepción, Chile. *Revista Chilena De Infectología*, 31(3). <https://doi.org/10.4067/s0716-10182014000300008>

Mozgovej, M. V., Miño, S., Barbieri, E., Tort, F., Montero, M., Frydman, C., Cap, M., Barón, P., Colina, R., Matthijnsens, J., & Parreño, V. (2022). GII.4 human norovirus and G8P[1] bovine-like rotavirus in oysters (*Crassostrea gigas*) from Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 365, 109553. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109553>

Murrell, J., Rojas, M., Alvarez, B., Rojas, N., & Heydrich, M. (2013). *Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura*. Redalyc. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181229302004.pdf>

Norma técnica ecuatoriana. (2012). *CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES Y E. coli*. INEN. <https://ia803007.us.archive.org/22/items/ec.nte.1529.8.1990/ec.nte.1529.8.1990.pdf>

- Ogburn, M., & White, I. (2009). *Evaluation of Fecal Pollution Indicators in an Oyster Quality Assurance Program: Application of Epidemiological Methods*. BioOne digital library. <https://bioone.org/journals/journal-of-shellfish-research/volume-28/issue-2/035.028.0208/Evaluation-of-Fecal-Pollution-Indicators-in-an-Oyster-Quality-Assurance/10.2983/035.028.0208.short>
- Organización mundial de la Salud: WHO. (2022, 19 mayo). *Inocuidad de los alimentos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Pan American Health Organization. (2015). *WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths*. PAHO. <https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-cha-who-estimates-global-foodborne-diseases.pdf>
- Pang, X., Preiksaitis, J. K., & Lee, B. E. (2014). Enhanced enteric virus detection in sporadic gastroenteritis using a multi-target real-time PCR panel: a one-year study. *Journal of Medical Virology*, 86(9), 1594-1601. <https://doi.org/10.1002/jmv.23851>
- Paz-y-Miño, M., Barzola, C., Lazcano, C., Ponce, M., & León, J. (2003). *Colifagos como indicadores de contaminación fecal y de remoción bacteriana en la potabilización del agua*. Scielo. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332003000200004&lng=es&tlng=es
- Pérez, L., Gómez, Y., Beltrán, J., & Alvarez, R. (1994). *Indicadores bacteriológicos de contaminación fecal en la Bahía de la Habana*. Redalyc. <https://www.redalyc.org/pdf/1694/169428420006.pdf>
- Pullés, R. (2014). *Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable en cuba*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181230079005.pdf>

- Quiroz, C., Vázquez, C., Natividad, I., Barrón, B., & Quiñones, E. (2014). Rotavirus G2P[4] detection in fresh vegetables and oysters in Mexico City. *Journal of Food Protection*, 77(11). <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-13-426>
- Rees, E., Davidson, J., Fairbrother, J. M., St Hilaire, S., Saab, M., & McClure, J. T. (2015). Occurrence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in oysters and mussels from Atlantic Canada. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(2). <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1840>
- Ribes, J., & Buesa, J. (2010). *Infecciones por norovirus*. Elsevier Doyma. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/viromicromol/ccs-2008-virologia.pdf>
- Rock, C., & Rivera, B. (2014). *La Calidad deL agua, E. coli y su saLud*. The University of Arizona. <https://extension.arizona.edu/sites/extension.arizona.edu/files/pubs/az1624s.pdf>
- Rodriguez, D. (2017, mayo). *Los virus entéricos como riesgos emergentes en la cadena alimentaria: el virus de la hepatitis E como ejemplo de la estrategia «una salud»*. Buleria-Universidad de León. <https://buleria.unileon.es/handle/10612/6702>
- Romero, R., Galindo, A., Díaz, O., Rivero, Z., Bracho, M., Soler, M., & Suarez, M. (2014). *Detección de virus entéricos en un sistema piloto de tratamiento de aguas residuales municipales*. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222014000100006

Rzeżutka, A., & Cook, N. (2004). Survival of human enteric viruses in the environment and food. *Fems Microbiology Reviews*, 28(4), 441-453.

<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.02.001>

Rubião, C. A., Franco, R. M., Marques De Mesquita, E., Lemos, M., Cabral, C. C., & Fonseca, A. (2017). Enterococcus spp. resistant to multiple antimicrobial drugs and determination of fecal contamination levels in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60(0).

<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160127>

Sánchez, G., & Bosch, A. (2016). Survival of enteric viruses in the environment and food. En *Springer eBooks* (pp. 367-392). https://doi.org/10.1007/978-3-319-30723-7_13

Tesini, B. L. (2022, 15 noviembre). *Infecciones por adenovirus*. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/virus-respiratorios/infecciones-por-adenovirus>

Tobón, S., Agudelo, R., & Gutiérrez, L. (2017). *Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano*.

Redalyc. <https://www.redalyc.org/journal/120/12052447008/12052447008.pdf>

Upfold, N., Luke, G. A., & Knox, C. (2021). Occurrence of human enteric viruses in water sources and shellfish: A focus on Africa. *Food and Environmental Virology*, 13(1), 1-31. <https://doi.org/10.1007/s12560-020-09456-8>

World Health Organization. (2021). *Rotavirus vaccines: WHO position paper – July 2021*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/342904/WER9628-eng-fre.pdf>

Zhou, Z., Tian, Z., Li, Q., Tian, P., Wu, Q., Wang, D., & Shi, X. (2017). *In Situ Capture RT-qPCR: A New Simple and Sensitive Method to Detect Human Norovirus in Oysters*. *Frontiers in microbiology*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5376551/pdf/fmicb-08-00554.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Reacción de transcripción inversa

Reactivo	Concentración final
5x first-strand buffer	1X
0.1 mM DTT	5 mM
Rnase Out™ (40U/ul)	1 U
Random Primer (300 ng/ul)	30 ng
dNTP (2.5 mM each)	0,375 mM
SuperScript™ III (200 U/ul)	5 U
dH ₂ O	N/A

Anexo 2. Primers y sondas para reacción de amplificación por qPCR múltiplex

Primers y sondas para la detección de Norovirus GI y GII			
Nombre	Objetivo	Sentido	Secuencia 5'-3'
NoV1-Fb	Norovirus GI	Primer forward	TYC GYT GGA TGC GNT TYC ATG A
NoV1-R	Norovirus GI	Primer reverse	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C
NoV2-F	Norovirus GII	Primer forward	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG
NoV2-R	Norovirus GII	Primer reverse	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA
NoVG1c-P (VIC/TAMRA)	Norovirus GI	Sonda	VIC-AGA TYG CGR TCY CCT GTC CA- TAMRA
NoV2-P (FAM/TAMRA)	Norovirus GII	Sonda	FAM-TGG GAG GGY GAT CGC AAT CT- TAMRA
Primers y sondas para la detección de Rotavirus y Adenovirus			
Rota-F	3	Primer forward	ACC ATC TAC ACA TGA CCC TC
Rota-F-GII	3	Primer forward	ACC ATC TTC ACG TAA CCC TC
Rota-R	3	Primer reverse	GGT CAC ATA ACG CCC C
Rota-P (FAM/TAMRA)	3	Sonda	FAM-ATG AGC ACA ATA GTT AAA AGC TAA CAC TGT CAA-TAMRA

Ad2-F	roteína 3	Primer forward	CCA GGA CGC CTC GGA GTA
Ad2-R	Hexon	Primer reverse	AAA CTT GTT ATT CAG GCT GAA GTA CGT
Ad2-P (VIC/TAMRA)	Hexon	Sonda	VIC-AGT TTG CCC GCG CCA CCG-TAMRA
Ad4-F	Hexon	Primer forward	GCA CAG GAC GCT TCG GAG TA
Ad4-R	Hexon	Primer reverse	CTT GTT CCC CAG ACT GAA GTA GGT
Ad4-P (VIC-TAMRA)	Hexon	Sonda	VIC- CAGTTCGCCCCGYGCMACAG-TAMRA

Anexo 3. Solución de sondas para qPCR múltiplex

Norovirus GI/GII duplex PP mix #1	
Reactivo	1X
NoV1-Fb	200 µm
NoV1-R	200 µm
NoVG1c-P (VIC/TAMRA)	100 µm
NoV2-F	200 µm
NoV2-R	200 µm
NoV2 P (FAM/TAMRA)	100 µm
PCR dH2O	-
Rotavirus (NVP)/Adenovirus (Ad-g) multiplex PP mix #2	
Rota-F	200 µm
Rota-F-GII	200 µm
Rota-R	200 µm
Rota-P (FAM/TAMRA)	100 µm
Ad2-F	200 µm
Ad2-R	200 µm
Ad2-P (VIC/TAMRA)	100 µm
Ad4-F	200 µm
Ad4-R	200 µm
Ad4-P (VIC/TAMRA)	100 µm
PCR dH2O	-