



Universidad Autónoma del Estado de México

**Doctorado en Ciencias Agropecuarias y
Recursos Naturales**

**Genotipificación de Norovirus presente en conejos
del Estado de México**

TESIS

Que para obtener el título Doctora en Ciencias
Agropecuarias y Recursos Naturales

Presenta:

M en CARN. Gabriela López Aguado Almazán

Comité de tutores:

Directora:

Dra. Linda Guillian Bautista Gómez

Co- Director:

Dr. José Simón Martínez Castañeda

Asesor:

Dr. Salvador Fonseca Coronado

Amecameca, Estado de México, Julio 2021

RESUMEN

El Estado de México es una entidad líder en producción cunícola, sin embargo las explotaciones se ven afectadas por diversas enfermedades siendo las de origen entérico, las principales patologías relacionadas a mortalidad y pérdidas económicas, también se ha descrito que son multifactoriales, actuando en concomitancia virus, bacterias y parásitos. Norovirus es un virus perteneciente a la familia *Caliciviridae*, agente viral común presente en cuadros diarreicos en diversas especies mamíferas incluidos el hombre, en México existe evidencia molecular de que está presente en conejos con este tipo de cuadros clínicos. Esta investigación sugiere que Norovirus de esta especie pertenece al genotipo GI o presenta una cercanía filogenética a este genotipo, existiendo la posibilidad de que pueda ser asignada a un genogrupo propio de la especie, tal cual se ha hecho para otras especies como caninos, humanos o los de reciente propuesta a este género: león marino.

ABSTRACT

The Mexico State is a leading place in rabbit production, however farms are affected by various diseases being of enteric origin the principal pathologies, causing mortality and economic losses, it has also been described what's multifactorial, acting in association with viruses, bacterias and parasites. Norovirus is a virus belonging to the family *Caliciviridae*, viral agent present in diarrhea diseases in various mammals, including humans, in México exists molecular evidence of the present in rabbits with this type of clinical condition. This research suggests that Norovirus of this species belongs to the GI genotype presents phylogenetic proximity to this genotype, with the possibility of the assigned to a genogroup of the species, how has it been done of the other species, in canines and of recent proposal to this genus: sea lion.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para ser posible mis estudios a nivel doctorado, el resultado de esta investigación se espera que tenga un impacto positivo en la mejora de diagnóstico de la cunicultura en México.

A la Universidad Autónoma del Estado de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, por haberme dado la oportunidad nuevamente de ser su alumna y permitir el desarrollo de este proyecto académico.

A la Dra. Linda Guiliana Bautista Gómez que fungió como mi tutora académica, por la oportunidad que me brindo de pertenecer como alumna en su equipo de trabajo y agradezco de manera infinita el que compartiera sus conocimientos, su tiempo, dedicación y entrega, así como su apoyo incondicional, siendo una persona a la que siempre voy a admirar, querer y respetar, siendo un ejemplo a seguir como profesional y persona.

Al Dr. José Simón Martínez Castañeda y Dr. Salvador Fonseca Coronado que como mis tutores adjuntos, hicieron aportes para la mejora de este proyecto y por el tiempo dedicado.

Índice

	Página
Resumen	I
Abstract	II
Agradecimientos	III
1. Introducción	1
2. Revisión de literatura	2
2.1 Antecedentes de Norovirus	2
2.2 Taxonomía	2
2.3 Conformación genómica	3
2.4 Características de los receptores Histo-blood Group Antigen (HBGAs), relación modo de infección y replicación viral.	8
2.5 Mecanismos de evolución	13
2.6 Potencial zoonótico y antropozoonótico de Norovirus	14
2.7 Técnicas de diagnóstico	16
3. Planteamiento del problema	18
4. Justificación	20
5. Hipótesis	21
6. Objetivos	22
6.1 General	22
6.2 Específicos	22
7. Material y método	23
7.1 Área de estudio	23
7.2 Tipo de investigación, población bajo estudio y tipo de muestreo	23
7.3 Toma y procesamiento de muestras	23
7.4 Análisis de resultados	24
8. Resultados	25
9. Discusión	36
10. Conclusión	42
11. Productos	43
12. Bibliografía	49

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Gel de agarosa 3x, que muestra amplicones positivos a NoV de conejos	25
Figura 2. Conejos positivos a Norovirus de conejos y su signología	26
Figura 3. Análisis múltiple de secuencias software MEGA X	28
Figura 4. Árbol filogenético construido por el método de Neighbor Joining, utilizando mil repeticiones de boopstrap, de secuencias de NoV de conejos en México	29
Figura 5. Árbol filogenético construido por el método de Neighbor Joining, de secuencias de NoV de conejos en México (Rabbit NoV) por genogrupos	30
Figura 6. Asignación del genogrupo GIV a la secuencia C1 Mex Rabbit NoV	31
Figura 7. Asignación del genogrupo GIV a la secuencia C4 Mex Rabbit NoV	32
Figura 8. Asignación del genogrupo GIV a la secuencia C10 Mex Rabbit NoV	32
Figura 9. Árbol filogenético construido por el método de Neighbor Joining de secuencias C10 Mex Rabbit NoV	33
Figura 10. Gel de agarosa 3x muestras positivas a VP1 región parcial	34

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Relación de número de muestras y municipio de procedencia	25
Tabla 2. Relación de muestras positivas por la región parcial NS7 y municipio de procedencia	26
Tabla 3. Secuencias de NoV región parcial NS7 presentes en conejos	27
Tabla 4. Relación de muestras positivas por la región parcial VP1 y municipio de procedencia	34

1.- INTRODUCCIÓN

Norovirus es un virus RNA monocatenario, su genoma mide de 7.5 a 7.7 kilobases, se ha reportado en humanos como el primer causal de enfermedades entéricas de origen vírico a nivel mundial, atribuyéndole pérdidas económicas por atención médica y disminución de la productividad de aproximadamente 2 mil millones de dólares anuales, la importancia de su estudio molecular radica en sus características genómicas que le permite presentar eventos de recombinación reordenamientos o mutaciones, mismos que se ven implicados en su extensa diversidad genética característica de este género, aunado a ello la complejidad de la obtención del cultivo celular y que no exista una vacuna le ha permitido a Norovirus posicionarse en este sitio. Los receptores de unión para este virus son comunes, presentes en mamíferos, en células epiteliales intestinales o secretados en formas menos complejas en leche y saliva, teniendo como característica la presencia de polimorfismos, dicho mecanismo resulta ser complementario para que este virus sea aún más diverso. Su estudio en conejos con signología entérica, se ha reportado solo una vez en México, presentando similitud con secuencias de la especie humana genotipo GII.4, sin embargo aún no ha sido genotipificado (Drake, 1993; Worobey *et al.*, 1999; Nystrom *et al.*, 2011; Thorne y Goodfellow, 2014; López Aguado *et al.*, 2017).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS DE NOROVIRUS

En el año de 1929 fue nombrada a la infección ocasionada por Norovirus, enfermedad del vómito de invierno, debido a su presencia estacional y principal síntoma desarrollado por los pacientes (Adler y Zickl, 1969); para su identificación se realizó en muestras de heces en humanos obtenidas durante un brote de gastroenteritis en Norwalk, Ohio y fue descrito como primer agente causal de origen vírico de enfermedades entéricas (Kapikian *et al.*, 1972) es importante mencionar que no siempre fue clasificado dentro de la familia *Caliciviridae*, ya que en el año de 1982 se encontraba adjunto a un solo grupo de virus denominado: small round-structured viruses (SRSV), grupo que se conformaba por otros virus causales de gastroenteritis como: astrovirus, rotavirus y adenovirus, sin embargo no fue hasta el año 1991, que se reportó que su genoma era RNA monocatenario y en 1995 se confirmó, mediante técnicas moleculares, realizando una comparación de proteínas y secuencias de RNA, en células infectadas, dando reconocimiento a las familias *Caliciviridae* y *Picornaviridae* (Dedman *et al.*, 1998).

2.2 TAXONOMÍA

Su clasificación de acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) en el 2021, se encuentra como miembro del reino Riboviria, en el cual se incluyen a los virus de genoma RNA y viroides, asignado a la familia *Caliciviridae*, compartiendo sus 5 géneros clásicos: Norovirus, Lagovirus, Sapovirus, Vesivirus, Nebovirus y 6 nuevos géneros aprobados en el 2018: Bavovirus, Minovirus, Nacovirus, Recovirus, Salovirus y Valovirus, así contando con un total de 11 géneros para esta familia.

Filogenéticamente según Chhabra *et al.*, (2019), se pueden clasificar en grupos P y tipos P de acuerdo a secuencias totales o parciales de la proteína no estructural

RDRP (RNA dependiente de RNA polimerasa) o en genotipos basados en la diversidad de aminoácidos del gen VP1 o mediante la amplificación de genomas completos. Utilizando criterios de desviación estándar, se propuso la ampliación en el número de genogrupos del GI al GX y el número de genotipos a 49 (9 GI, 27 GII, 3 GIII, 2 GIV, 2 GV, 2 GVI y 1 genotipo para GVII, GVIII, GIX, de los virus para los que actualmente solo hay una secuencia disponible en las bases de datos públicas; en esta propuesta se describen nuevos genogrupos tentativos (GNA1 y GNA2) y genotipos (GII.NA1, GII.NA2 y GIV.NA1) ya asignados de forma definitiva en espera de secuencias adicionales relacionadas.

Basado en la diversidad de nucleótidos en la región RdRp, norovirus se puede dividir en 60 tipos P (14 GI, 37 GII, 2 GIII, 1 GIV, 2 GV, 2 GVI, 1 GVII y 1 GX), 2 grupos P y 14 tipos P tentativos

Las cepas que infectan a los humanos se clasifican en los genogrupos GI, GII y GIV; norovirus porcino se encuentra en GII, bovino y ovino GIII, norovirus murino se agrupa en GV (Wang *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005), los caninos pertenecen al genogrupo GIV (Martella *et al.*, 2008), GVI (Ford-Siltz *et al.*, 2019) y GVII (Lizasoain *et al.*, 2015) y norovirus GIX antes GII.P15, reportado en China para humanos (Chhabra *et al.*, 2019).

2.3 CONFORMACIÓN GENÓMICA

El genoma de NoV mide aproximadamente 7.7 Kb, es RNA monocatenario sentido positivo, se conforma por tres marcos de lectura abiertos ORF's (Open Reading Frame) y cuatro marcos descritos para el caso de NoV Murino, llamado ORF 4 (MacFadden *et al.*, 2011). El marco de lectura ORF1 codifica proteínas no estructurales que en total son seis, mientras que ORF 2 codifica a la proteína mayor de la cápside (VP1) y ORF3 codifica a la proteína menor de la cápside (VP2) (Hardy *et al.*, 2005).

Proteínas no estructurales de NoV: las proteínas no estructurales están relacionadas directamente a la síntesis viral de NoV que van de la NS1 a la NS7 o pueden ser nombradas por la proteína que sintetiza, de acuerdo al orden de codificación del extremo N-terminal a C-terminal serían: p48, NTPasa, p22, VPg, 3CLpro y RdRp. (RNA dependiente de RNA polimerasa) (Hardy *et al.*, 2005).

NS1-NS2, P48: se ubica en la región N-terminal de la poliproteína y cuando es escindida por la proteasa viral da origen a una proteína madura NS1-NS2, que está compuesta por una región rica en prolina que tiene uniones específicas dirigidas al Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I, un dominio hidrófobo, la caja H y la familia NlpC/60, que son peptidasas con diversas capacidades enzimáticas; entre ellas la disminución de la degradación por caspasas e incremento de su estabilidad (Hall *et al.*, 2013; Alhatlani *et al.*, 2015). Se sugiere que cuando p48 se fusiona, interactúa con SNARE que es un regulador de VAP-P (Proteínas de membrana asociadas a vesículas asociadas a proteínas A) regulando el acoplamiento y fusión del virus (Ettayebi y Hardy, 2003).

Otra función atribuible es la intervención en las cascadas de señalización p53, PI3K y JAK-STAT e interacción con los receptores tipo Toll, citosinas y quimosinas (Lateef *et al.*, 2017).

NS3, NTPasa: es una proteína no estructural altamente conservada de NoV, posee motivos en común con la super familia tres de helicasas, de las seis que existen (SF1-SF6) (Rok *et al.*, 2018)

Las helicasas tienen actividad de NTPasa, estas proteínas se puede unir a nucleósidos trifosfatados e hidrolizarlos (Pfister y Wimmer, 2001), aunque también se ha descrito actividad enzimática relacionada con la replicación viral y actividad como proteínas chaperonas (Li *et al.*, 2018). Las helicasas y las chaperonas del RNA son proteínas remodeladoras de este, la diferencia radica en que las últimas descritas no requieren unión a NTP o hidrolisis para activarse, además de no compartir secuencias ni motivos consenso, siendo capaces de estabilizar o desenredar el dúplex de RNA, promoviendo su formación correcta a partir de

estructuras de RNA mal plegados (Musier,2010; Rajkowitsch *et al.*, 2013). Rok *et al.*, (2018), reporta que la NS3 de NoV tiene actividad de tipo chaperona.

NS4, p22, 3A-like: se ha demostrado que p22 inhibe la remodelación del citoesqueleto de actina en células epiteliales tras su expresión (Hillenbrand *et al.*, 2010), otra función implicada se relaciona a un motivo específico que emite una señal de exportación al retículo endoplásmico, lo que resulta en el desmontaje del aparato de Golgi (AG), las señales de exportación del retículo endoplasmático es aprovechada por un subconjunto de proteínas para salir del RE por absorción directa en vesículas COPII, para su transporte al AG (Sharp *et al.*, 2010).

NS5, VPg: se ubica en el extremo 5´ del RNA genómico y subgenómico (Wobus *et al.*, 2004), varias funciones en el ciclo de replicación se le atribuyen; una de ellas es adicionando un hidroxilo libre que puede ser extendido por el RdRp, también recluta factores de inicio para la traducción de la célula huésped y paralelamente iniciar la traducción de proteínas virales, así como prevenir que el virus sea detectado por receptores de reconocimiento del huésped específicamente las proteína RIG-1(Subba-Reddy *et al.*, 2011; Chaudhry *et al.*, 2006) y la proteína quinasa R, que estimulan una respuesta antiviral y de la misma forma se han reportado regiones desordenadas que se asocian a múltiples funciones (Hebrard *et al.*, 2009).

NS6, 3CLpro: su papel como proteasa es la escisión de proteínas involucradas en la replicación del genoma viral, influye en la patogenia viral e interactúa con factores celulares del huésped. El proceso de escisión se conforma en 2 etapas una temprana relacionadas a p48 y p22 y una tardía con p22 y VPg (Hardy *et al.*, 2002; Blakeney *et al.*, 2003). Se ha descrito que tiene una forma precursora intracelular llamada ProPol que se ha evidenciado actividad proteasa y polimerasa (Scheffler *et al.*, 2007).

NS7, RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp): La polimerasa de los norovirus es una enzima clave responsable de la transcripción y replicación del genoma viral, se ha descrito que posee un precursor presente en el genotipo GII.4

llamado MD145-12 ProPol que tiene actividades de polimerasa y proteinasa (Belliot *et al.*, 2005), esta región se ha utilizado para designar los tipos P de NoV en humanos (Chhabra *et al.*, 2019).

La síntesis de RNA del hospedero y su relación con NS7 es fundamental ya que es un mecanismo para prevenir la pérdida de información genética viral (Kahan *et al.*, 2011) y se da mediante una serie de pasos sumamente conservados descritos por Ng *et al.*, (2004), iniciando con la unión de NS7 a NTP's complementarios para abrir un complejo ternario dando un cambio en su conformación para que este complejo pase de ser abierto a cerrado, posteriormente debido a la acción de una nucleotidil transferasa y translocación del templado resulta en un cambio conformacional del complejo, por acción de la activación del pirofosfato permite que otro NTP se una al sitio activo. Las actividades del RdRp también se encuentran moduladas por las proteínas de cápside VP1 mejorando la síntesis de esta proteína, ya que VP1 trabaja como estimulante (Subba-Reddy *et al.*, 2012).

Cabe mencionar que NS7 en su región C-terminal posee Apo-enzimas (Ng *et al.*, 2014).

Proteínas estructurales de NoV: la cápside de norovirus tiene forma icosaédrica y se conforma por dos proteínas estructurales: compuesta por 180 subunidades que forman 90 dímeros de la proteína VP1 (proteína mayor de la cápside) y una o dos copias de VP2 proteína menor de la cápside (Prasad *et al.*, 1999).

VP1: se conforma por dos dominios S (Shell) que es altamente conservado y P (Protruding) que sobresale, a su vez este último cuenta con dos subdominios denominados P1 y P2 que es hipervariable y se encuentra expuesto en la superficie (McFadden *et al.*, 2011), también se ha demostrado que el residuo 296 de este subdominio, es el responsable de regular la virulencia en el caso NoV murino y una lisina en esa misma posición pero de la cepa MNV-1 se asocia de igual forma a virulencia (Bailey *et al.*, 2008; Strong *et al.*, 2012), además P2 contiene un sitio de unión a los receptores HBGA (Histo-Blood Group Antigen)

que es su primera interacción con el huésped y sitio específico de unión para NoV (Cao *et al.*, 2007).

Subba-Reddy *et al.*, (2012), reportó que VP1 interactúa con NS7, a través de su dominio S, que posee un regulador dependiente de la traducción y síntesis de ARN, sugiriendo una vez que el virus entra a las células y se desmonta la cápside, VP1 se libera aumentando la actividad de RdRp continuando su efecto durante el ciclo de replicación. VP1 en su última instancia alcanza un umbral para la oligomerización, la reducción gradual de la señalización en la replicación, inicio del montaje y encapsidación del genoma.

VP2: mide de 208 a 268 de aminoácidos y posee una extensa variabilidad genética entre cepas. Se describió por primera vez en un estudio enfocado a la Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (RHDV) y posteriormente en NoV, seguido de otros miembros de la familia *Caliciviridae* y aunque para VP2 no se ha reportado que sea necesario para el ensamblaje de las partículas del virus, es indispensable para la producción de partículas virales infecciosas (Seah *et al.*, 1999; Wirblich *et al.*, 1996; Sosnovtsev *et al.*, 2005).

Aunque las copias de VP2 son escasas juegan un papel importante en el ciclo de vida del virus y se ha demostrado que brinda estabilidad en la estructura de los VLP's. La interacción de ambas proteínas de cápside podría regular e incluso incrementar su expresión (Vongpunsawad *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014).

ORF 4: en el caso de NoV murino, es un marco de lectura abierto superpuesto; la proteína que codifica se denomina VF1, que es un factor de virulencia, en cultivo celular se ha observado que no es esencial para la replicación viral, sin embargo también se ha descrito que contribuye a la regulación de la apoptosis inducida por el virus y se describe como mecanismo del virus para incrementar el potencial de codificación de su genoma, como otros virus RNA lo han adoptado (MacFadden *et al.*, 2011).

2.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS RECEPTORES HISTO-BLOOD GROUP ANTIGEN (HBGAs), RELACIÓN MODO DE INFECCIÓN Y REPLICACIÓN VIRAL.

Los calicivirus poseen una extensa diversidad genética, amplio rango de hospederos, diversos puntos de tropismo y varios de ellos tienen receptores HBGA en común (Wang *et al.*, 2005).

Los receptores HBGA son glicanos presentes en varios tipos de células, incluidos los glóbulos rojos y las células endoteliales vasculares, así como los epitelios del tracto gastrointestinal, urogenital y respiratorio. También pueden estar presentes en forma soluble en fluidos biológicos como la saliva y la leche. Los receptores HBGA se sintetizan a partir de una serie de estructuras precursoras mediante la adición por etapas de unidades de monosacáridos a través de un conjunto de glucosiltransferasas. Tres familias de este conjunto se ven involucradas en la biosíntesis: GT11, GT10 y GT6 que codifican para: α 1,2,3 y 4 fucosiltransferasa. Las dos primeras se relacionan con los grupos A y B del sistema ABO. Algunos de los genes correspondientes son polimórficos, mientras que otros se expresan de una manera específica de la especie. En humanos, la interacción pleiotrópica de los alelos se encuentran en 3 loci: FUT1, FUT2 y FUT3 que determinan los fenotipos Lewis, Secretor y ABO, respectivamente (Marionneau *et al.*, 2001).

El primer evento involucrado en la replicación, se regula por la interacción entre la superficie celular del huésped y proteínas virales (Lindesmith *et al.*, 2008). Para calicivirus felino y norovirus murino, la partícula viral reconoce la parte del receptor que posee ácido siálico, que es un monosacárido que se incorpora a proteínas o lípidos durante el proceso de glucosilación en las células, la carga es negativa, actuando como señalizador intercelular, su receptor es JAM-1 (Taube *et al.*, 2009).

Estudios iniciales de receptores para la familia *Caliciviridae*, se llevaron a cabo en otro miembro de esta familia los Lagovirus, responsable de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV). Se ha demostrado que norovirus y el RHDV se unen a los antígenos del grupo histo-sanguíneo (HBGA) (Cao *et al.*, 2007), por lo que los conejos podrían desarrollar una infección por NoV. El gen FUT 2, que codifica para fucosiltransferasa, encargado de agregar una fucosa al final de los oligosacáridos, puede dar origen a H y a los antígenos A -B, dependiendo de la glicoproteína o monosacárido al cual se una, en el caso del antígeno A a N-acetilgalactosamina o el antígeno B a D-Galactosa, como se expresa en los humanos, para generar HBGA, A o B. Un estudio realizado por Nystrom *et al.*, (2011), mediante la obtención de cepas G1-G6, de proteínas de cápside VP60, evaluó la unión de estas cepas a azúcares sintéticos, así como la expresión de antígenos ABH en tejidos intestinales (duodeno) del conejo, reportó las características de hemoaglutinación de las cepas G1-G6, determinando que la cepa G1 se unía al antígeno tipo A, las cepas G2 y G3, al antígeno H tipo 2 y las cepas G4 a la G6 al tipo B2, concluyó que todos los conejos de este estudio expresaban algún tipo de antígeno H tipo 2, A y B, sin embargo no se encontró ningún animal con un patrón claro, como en NoV de humanos, en conejos la expresión de A generalmente era más fuerte que B y que a diferencia de NoV que solo necesita de 1 a 10 partículas virales para causar infección, en Lagovirus es dosis-dependiente, una dosis más baja podría tener efectos positivos en la tasa de supervivencia de los conejos infectados, evento que podría ser totalmente contrario a NoV de conejo.

En bovinos reconoce el motivo Gal α 1,3 (alfa-galactosidasa 1,3) del receptor y la unión de las VLP's a los epítopes de alfa-galactosidasa: Gal-alpha 3, beta Gal, beta-4GlcNAc y beta-R. El motivo Gal α 1,3, se expresa en todas las especies de mamíferos con excepción de la familia *Hominidae* debido a la inactivación del gen: alpha 1,3-lactosiltransferasa (GGTA1). También se une específicamente a un grupo llamado xenoantígeno, un motivo de sacarosa que se asemeja al antígeno del grupo sanguíneo B, presente en la superficie del intestino delgado de las

vacas, el ligando de hidrato de carbono NB2 está ausente de los tejidos humanos y aunque se expresa en células endoteliales vasculares porcinas, se ha reportado que a diferencia de las vacas, no está presente en las células epiteliales intestinales, lo que sugiere que ni el hombre ni el cerdo podrían ser infectados por al menos por algunas cepas bovinas (Zakhour *et al.*, 2009).

En porcinos tanto el genotipo característico, como los llamados cerdos gntobióticos, poseen receptores HBGA, así como los antígenos A y H en la superficie de las mucosas. Dichos animales comparten características con los humanos en cuestión anatómica, fisiológica e inmunología, los cerdos infectados con genotipos para humano han logrado diseminación del virus, desarrollado cuadros de diarrea, seroconversión y viremia transitoria (Cheetman *et al.*, 2007).

Para los caninos Caddy *et al.*, (2014) demostró que las partículas virales, se unen al grupo H del receptor HBGA, expresado en las células epiteliales, la cápside pueden ensamblar a el antígeno A (N-acetilgalactosamina) y Lewis (1-3 / 1-4 fucosa), pero no el antígeno B (galactosa).

El dominio de unión de Norovirus ha sido localizado, en el subdominio P2 de la proteína de la cápside, puede reconocer antígenos del grupo HGBA y sus receptores (Tan *et al.*, 2003).

Cuando el virus logra penetrar a la célula, su liberación puede ser dependiente de clatrina (proteína que su función principal es recubrir las vesículas en el proceso de transporte de membrana) formada en la membrana plasmática, que por acción de la GTPasa dynamain II, vacía su contenido en los endosomas tempranos (Corner y Schmid, 2003; citado en Perry y Gobus, 2010). La acidificación del endosoma es necesaria para la liberación del genoma de Norovirus al interior del citoplasma del huésped. Sin embargo pueden utilizar otras vías independientes que son ricas en colesterol (Perry *et al.*, 2009).

Para empezar la traducción la proteína no estructural VPg se une al extremo 5' e interactúa con eIF4 y eIF33 que son factores de inicio de la traducción y activación de complejos de pre-iniciación (Goodfellow *et al.* 2005; Herbert *et al.* 1997). La poliproteína que conforma a ORF 1 es escindida por la proteasa viral NS6 que da como resultado la liberación de proteínas listas para la síntesis viral: 3CLpro, Vpg, p22, NTPasa, p48 y RdRp (Hardy, 2005). Los sitios de corte de ORF1 reportados son: Q330 / G331 y Q696 / G697 correspondientes a la región N- terminal, mientras que el precursor p20VPgProPol hidroliza en sus componentes en E875 / G876, E1008 / A1009 y E1189 / G1190. Recientemente en un estudio in vitro de Norovirus ha propuesto que NS6 se une al extremo C terminal en la hendidura de unión al péptido de una molécula vecina, lo que le brinda como característica de péptido proteasa presentando diversas funciones (Belliot *et al.*, 2003; Hardy, 2005; Leen *et al.*, 2012).

Las organelos de replicación viral son retículo endoplasmático (RE), red trans de Golgi y endosomas (Hyde y Mackenzie, 2010). p22 contiene una señal de exportación para el retículo endoplasmático, promoviendo su incorporación de vesículas COPII y se transporte del RE al aparato de Golgi. Esta proteína se relaciona en el desmontaje de Golgi y proteínas de secreción, mientras que p48 actúa como p22 en una vía alterna (Ettayabi y Hardy, 2003; Sharp *et al.*, 2010).

Norovirus al tener un RNA en sentido positivo, la replicación del genoma se produce a través de un RNA en sentido negativo y es realizado por el RdRp viral (Hogbom *et al.*, 2009).

Subba-Reddy *et al.*, (2012), propone que la iniciación de Novo-RdRp que se utiliza para la síntesis de ARN en sentido negativo y subgenómico, a partir de la interacción con VP1 y es dependiente a la concentración.

En el caso de que la vía sea por VPg-RdRp, inicia la síntesis de ARN por una unión covalente de VPg a través de un enlace fosfodiéster. El nucleótido iniciador de la familia Calciviridae es guanina, a este proceso se le llama: guanilación. Esta

plantilla es la que inicia la síntesis de ARN y la vinculación es primordial para la infectividad, así como la remoción oportuna de VPg (Subba-Reddy *et al.*, 2011).

Según Belliot *et al.*, (2005), algunos RNA's virales compiten con los RNA mensajeros (RNAm) celulares para poder ser traducidos o inhiben simultáneamente la traducción de los ARNm.

La traducción de las proteínas virales VP1 y VP2, se crean a partir del ARN subgenómico, como estrategia viral se producen altos niveles de VP1 para el ensamblaje, se forma el icosaedro conformado por 180 copias de VP1 dispuesto en 90 dímeros. El ARN subgenómico es elevado en células infectadas (Prasad *et al.*, 1994; citado en Thorne y Goodfellow, 2014).

Al término de la traducción de VP1 inicia la traducción de VP2, es un mecanismo de terminación y reinicio, debido a que el ARN subgenómico que lo conforma es policistrónico, el codón de inicio de VP2 (AUG), se superpone al codón de parada de VP1 (UAA) que va río arriba, en el pentanucleótido UAAG (Naphtine *et al.*, 2009).

Finalmente Norovirus induce la apoptosis, no sin antes procesar NS 1 y 2 durante la última etapa del ciclo viral. La inducción se asocia con un regulador de supervivencia, seguido por la activación de caspasas, catepsina B y citocromo C (Bok *et al.*, 2009).

2.5 MECANISMOS DE EVOLUCIÓN

Varios mecanismos se han visto involucrados en la evolución de NoV, el primero de ellos está relacionado directamente al virus y el segundo a los receptores de unión de los hospederos (De Rougemont *et al.*, 2011; Lindesmith *et al.*, 2008).

Las mutaciones son el proceso fundamental de evolución para Norovirus y otros virus RNA, presentando una tasa de mutación de 10^{-3} , debido al carente mecanismo de corrección del RdRp (Domingo *et al.*, 1997), esta RNA polimerasa incorpora nucleótidos de baja fidelidad y alta velocidad, siendo estas dos propiedades que dan paso a la formación de cuasiespecies (Domingo *et al.*, 2012) Según Domingo *et al.*, (2000), el termino cuasiepecie vírica corresponde a un virus de genoma RNA que evoluciona como distribuciones variables complejas pero estrechamente relacionados genéticamente, no teniendo un genoma definido precisamente porque el genoma consenso es un promedio de variantes, dando como resultado alteraciones en el tropismo celular, anulación antiviral y evasión de anticuerpos, por lo que existe la probabilidad de expandirse en la población dando lugar incluso a pandemias.

La recombinación de ARN es otra fuente de evolución viral (Cooper *et al.*, 1974) y en el caso de NoV suelen ser de dos tipos: intergenotípicas e intragenotípicas, ocurriendo en dos ubicaciones, la primaria está ubicada en la superposición entre los marcos de lectura abiertos ORF1-ORF2, siendo también el sitio de inicio de la transcripción del ARN subgenómico y la secundaria (Bull *et al.*, 1997) se encuentra en la unión del ORF2 y ORF3 (Eden *et al.*, 2013).

La deriva antigénica es otro mecanismo de evolución desarrollado por NoV y esta mayormente descrito para el genotipo GII.4 que es el más prevalente a nivel mundial en humanos, se sugiere que este genotipo en especial se puede unir a una gama más amplia de antígenos del grupo HBGA (Kroneman *et al.*, 2013; De Rougemont *et al.*, 2011).

2.6 POTENCIAL ZONÓTICO Y ANTROPOZONÓTICO DE NOROVIRUS

El género Norovirus posee la habilidad de infectar a diversas especies mamíferas, entre las más estudiadas se encuentran los humanos, cerdos y bovinos; esta capacidad se relaciona directamente a las características propias del virus, receptores y hospederos, brindándole a NoV la posibilidad de transmisión zoonótica que puede ser de manera directa o indirecta; también se ha reportado que para la infección transmitida animal-humano, los casos suelen ser más graves que si fuese una infección por cepas propias de la especie (Meslin *et al.*, 2000). Existen virus de referencia a nivel mundial con potencial zoonótico entre los que perfilan el Virus de Influenza Aviar (H5N1) y el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) ocasionado por Coronavirus (Yue *et al.*, 1998; Stavrínides y Guttman, 2004), por lo que Mattison *et al.*, (2007) propone que si NoV tiene potencial zoonótico es importante el monitoreo de cepas virales emergentes y conocer sus factores de virulencia, para disminuir el impacto sobre la salud pública.

Existen diversos reportes donde se menciona el potencial antropozoonótico y zoonótico de NoV, así como el papel de los animales como vector, por ejemplo en perros debido a la cercanía como mascota y a los médicos veterinarios tratantes (Caddy *et al.*, 2014; Di Martino *et al.*, 2014). Un estudio realizado por Caddy *et al.*, (2013), en Reino Unido con caninos que eran llevados a consulta, perros de los mismos centros y de albergues, fueron sometidos a estudios de seroprevalencia y posteriormente a pruebas moleculares, reportando 2 cepas de interés, una perteneciente a Ucrania y otra a Portugal donde fueron asignados al genotipo GIV, sin embargo la primera cepa tenía una identidad del 51.6%, que era la más alta en este estudio, con una cepa de NoV humano recombinante de intergenotipo GII. Summa *et al.*, (2012) realizó un estudio donde 92 caninos mascota, fueron muestreados; como criterio de inclusión los caninos o humanos presentarían signología entérica, específicamente diarrea o vómito, de los cuales cuatro caninos resultaron positivos y habían estado en contacto con humanos enfermos,

de las heces de estos perros, tres fueron clasificadas en el genotipo GII.4, el más prevalente a nivel mundial en humanos y GII.12, dos de estos perros mostraron leve signología, sin embargo la dificultad de cultivo de NoV, aún no permite saber si el perro puede replicar el genotipo GII.4 de humanos o solo pueda ser transitorio en el tracto intestinal del canino, lo que sí es comprobable en este estudio es que si existe la transmisión de NoV humano al perro en este caso, aunque Ford-Slitz *et al.*, (2019), mediante la amplificación de genomas completos dirigidos al genotipo GIV de perros y gatos obtuvieron 2 cepas relacionadas GIV.2 y GIV.1, donde determinan que estos NoV presentan restricciones de recombinación, encontradas en la región de la cápside y en proteínas no estructurales y este suceso podría limitar la transmisión interespecie en el genogrupo GIV, caninos, felinos y hombre, sin embargo aún existe discrepancia respecto a este tema debido al gran número de cepas que posee NoV.

Wang *et al.*, (2005) realizó un estudio en heces de cerdos adultos, utilizando cebadores universales para calicivirus obteniendo un total de seis muestras positivas de 275 y en el análisis de secuencias una muestra potencial recombinante y la otra se relacionó con cepas humanas, la cual fue replicada en cerdos gnotobióticos, lo que sugirió que esta especie puede actuar como reservorio y el potencial de recombinantes GII entre cerdos y humanos.

Las cepas de bovinos están menos relacionada con el NoV humano. Los NoV bovinos producen recombinantes de manera similar a los NoV humanos, por lo que una vaca coinfectada tanto con cepas bovinas como humanas de NoV podría producir posiblemente un virus recombinante con propiedades de virulencia alteradas (Oliver *et al.*, 2003; Etherington *et al.*, 2006).

2.7 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El uso de la microscopia electrónica de transmisión dirigida a estudios virales alcanzó su auge en las década de 1970, en relación a los virus de origen entérico, el primero identificado fue el virus Norwalk (NoV), en Ohio (Kapikian *et al.*, 1972), posteriormente se descubrieron virus con morfología similar llamados: virus similares a Norwalk, antes de ser nombrado oficialmente NoV (Dedman *et al.*, 1998).

La microscopia electrónica de tinción negativa para el procesamiento de las muestras utiliza suspensiones acuosas donde las partículas biológicas son depositadas en rejillas recubiertas de carbón y teñidas con sales de metales pesados: como acetato de uranilo o ácido fosfotúngstico, para la visualización de dichas partículas. Entre las ventajas que ofrece la tinción negativa es que se puede distinguir la partícula viral y proporciona información morfológica por ejemplo: simetría y la presencia o ausencia de una envoltura, otra ventaja que ofrece es que no requiere reactivos muy específicos para el diagnóstico (Caul y Appleton, 1982).

Kirby e Iturriza-Gómara, (2012), realizan un estudio haciendo una comparativa en las pruebas que se utilizan para el diagnóstico de NoV, que abarcan desde un examen médico ofreciendo como ventajas información rápida, el no uso de consumibles y como desventajas resultados inconsistentes y regularmente se debe confirmar con otro test, pruebas inmunológicas como ELISA e ICG que son específicas y no requieren un equipamiento muy especializado en el laboratorio, aunque reportan sensibilidad moderada hacia al genogrupo GI, RT-PCR, PCR en tiempo real son altamente sensibles y específicas, se pueden cuantificar y se obtienen productos que son secuenciables para la obtención de información genética y por último la secuenciación masiva que de igual forma es sensible y específica y brinda bastante información genética, la desventaja de estos últimos

es que se tiene que tener equipamiento específico para el procesamiento de muestras y el costo.

Respecto al uso de pruebas diagnósticas y su capacidad de detección, un estudio realizado por Vinje *et al.*, (1996) refiere menor sensibilidad al diagnóstico por microscopia electrónica, al examinar un total de 22 muestras positivas del total de su estudio, el 86% fue positivo por microscopia electrónica contra el 91% de positivos detectados mediante la técnica de RT-PCR, obteniendo un 5% más de positivos, mientras que Gonin *et al.*, (2000) a partir de muestras fecales obtuvo 52 muestras positivas por microscopia electrónica contra 152 diagnósticas por RT-PCR, mostrando mayor especificidad y sensibilidad para esta técnica, sin embargo al ser un virus de naturaleza no cultivable, dificulta la posibilidad de establecer una prueba estándar o de oro, pero si se ha realizado comparativas de estudios determinando que la prueba de RT-PCR y PCR en tiempo real brindan mayor sensibilidad, especificidad e información genética seguido de métodos de inmunoensayo, confirmando esto en un estudio realizado en Canadá donde se analizaron un total de 440 investigaciones relacionadas a brotes de gastroenteritis en un periodo de noviembre de 2006 a marzo de 2007, asociando un total de 73.7% a NoV de los cuales el número de positivos por ME es del 0.6% y por RT-PCR 64%, también se seleccionaron un total de 189 especímenes al azar de los cuales 50.3% fueron positivos por RT-PCR, inmunoensayo 39.1% y 7.5% por microscopia electrónica Fisman *et al.*, (2009).

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México la cunicultura se ve afectada por diversas patologías en orden de importancia se encuentran las de origen respiratorio, pero con mayor frecuencia las de tipo entérico, no solo en este país sino a nivel internacional (Deeb y DiGiacomo, 2000; Olivares *et al.*, 2009). Los patógenos relacionados a gastroenteritis en esta especie son de tipo: bacteriano, parasitario y viral siendo Rotavirus, Astrovirus y Norovirus los que se han reportado presentes en granjas productoras del Estado de México identificados en animales con signología entérica (García *et al.*, 2017; Reynoso *et al.*, 2019; López Aguado *et al.*, 2017) y en otros países se ha descrito morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas por este tipo de asociaciones (Peeters *et al.*, 1984). En humanos se estima que las infecciones por este virus causan pérdidas económicas por atención médica y disminución de la productividad de aproximadamente 2 mil millones de dólares anuales (Glass *et al.*, 2009; Moe *et al.*, 1999); en bovinos se ha reportado que en países como Argentina, Estados Unidos y alrededor del mundo es causal de pérdidas económicas sustanciales en este tipo de industria (Mohamed *et al.*, 2017; Ferragut *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2019).

La importancia de su estudio molecular radica en su conformación genómica, debido al tipo de genoma RNA que posee algunas características como la incapacidad de sus RNA polimerasas para corregir errores durante la replicación, mismo que le confiere ventajas evolutivas, entre ellas que el porcentaje de mutación sea hasta 1000 veces mayor en comparación con un virus de tipo DNA que varía entre 10^{-3} y 10^{-4} sustituciones de nucleótidos por año, que esto a su vez es un factor importante que contribuye a la diversidad genética característica de NoV y por los eventos de recombinación, reordenamientos o mutaciones que puede presentar (Drake, 1993; Worobey *et al.*, 1999), ejemplo de ello es el genotipo GII.4 que es el miembro de esta familia que posee un mayor número de mutaciones sinónimas y no sinónimas, además es el genotipo que está presente en el 80% de los casos de gastroenteritis de origen vírico por Norovirus a nivel

mundial (Parra *et al.*, 2017), Existen un antecedente de que NoV está presente en conejos de México, López Aguado *et al.*, (2017), reporta que las secuencias obtenidas en este estudio dirigidos a la región RdRp muestran relación filogenética con las descritas para el genotipo GII.4 de humano, lo cual resulta de interés por la características propia de la cepa y porque para este genotipo se ha reportado potencial de zoonosis y antropozoonosis.

Aunado a esto se ha estimado la probabilidad de enfermedades sintomáticas desde 1 a 10 partículas virales y una infección típica por este virus dando como resultado diarreas y vomitos que contienen de 10^6 a 10^9 viriones no envueltos estables, por mililitros de excreta, aumentado así las posibilidades de infección (Teunis *et al.*, 2008; Cotten *et al.*, 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

México es un país líder en la producción de diversas especies agropecuarias, respecto a la industria cunícola a nivel mundial se posiciona en el octavo lugar y el primero en Latinoamérica, contando con un inventario anual total de 15, 000 toneladas de carne siendo el Estado de México la principal entidad productora incluyendo a los municipios de: Amecameca, Texcoco, Teotihuacán, Valle de Toluca, Jilotepec y Atlacomulco. (SIAP, 2016; FAO, 2018).

La reciente incorporación de nuevos géneros a la familia *Caliciviridae* y para el género NoV la adición de secuencias y especies (Chhabra *et al.*, 2019; ICTV, 2021), aunado a lo común de los receptores de unión HBGA (Tan y Xiang, 2010), evidencia la capacidad del virus para poder desarrollarse en diferentes hospederos y alentar el estudio en otras especie donde no se tenía el conocimiento tal como es el caso de león marino (Teng *et al.*, 2018) y NoV en conejos (López Aguado *et al.*, 2017).

Para NoV de conejos no se ha realizado alguna investigación que proponga la asignación de algún genotipo en esta especie, por lo este trabajo busca aportar información que sirva para ratificar que NoV en conejos está presente y poder proponer algún genogrupo al que pueda pertenecer.

5. HIPÓTESIS

Norovirus está presente en conejos con signología entérica procedentes del Estado de México y pertenecerá al genogrupo GII de este género.

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Genotipificar Norovirus presentes en conejos con signología entérica pertenecientes al Estado de México.

6.2 ESPECÍFICOS

- 1.- Amplificar un fragmento parcial dirigido a la proteína NS7 y VP1 de NoV.
- 2.- Secuenciar los fragmentos amplificados.
- 3.- Analizar filogenéticamente las secuencias obtenidas comparadas con lo reportado a nivel mundial.
- 4.- Asignación de genotipo de NoV de las muestras encontradas en conejos.

7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1 ÁREA DE ESTUDIO

El muestreo se realizó en un periodo comprendido del mes de agosto de 2017 a diciembre de 2019 en los municipios de: Amecameca, Texcoco y Teotihuacán. (INAFED, 2015).

7.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN, POBLACIÓN BAJO ESTUDIO Y TIPO DE MUESTREO

El corte del estudio es transversal debido a que se llevó a cabo en un periodo corto de tiempo, es de carácter descriptivo ya que no cuenta ninguna clase de modificación a las variables y comparativo al realizar la filogenia de cada secuencia y su análisis. La población bajo estudio fueron conejos pertenecientes a los principales municipios productores del Estado de México; Como criterios de inclusión: animales que presenten cuadros entéricos y como criterios de exclusión aquellos que hayan sido medicados 7 días anteriores al muestreo y que no mostraron signología entérica. El tipo de muestro fue no probabilístico, ya que este tipo de muestreo puede ser utilizado cuando se quiere demostrar que existe un rasgo determinado por la población.

7.3 TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Los conejos fueron remitidos al anfiteatro del Centro Universitario UAEM Amecameca donde se les realizó una evaluación médica ante-mortem y posterior sacrificio humanitario de acuerdo a lo establecido en la NOM-033-SAG-ZOO-2014, se colectaron muestras de duodeno y contenido intestinal, ya obtenidas las muestras fueron transportadas en refrigeración al Laboratorio de Biotecnología,

Biología Molecular y Genética del CU UAEM Amecameca donde se llevó a cabo el análisis molecular.

La extracción del RNA viral se realizó con la técnica de fenol-cloroformo con Trizol (Invitrogen) y la RT con el kit Improm Reverse Transcription System (Promega), ambos de acuerdo a instrucciones del fabricante,

Para la RT-PCR se utilizaron cebadores dirigidos a una región parcial de la proteína NS7 de NoV, reportados por Mesquita *et al.*, (2012): NoVForGip TGACAATGTAATCATCACCATA y NoVRevGip TGACGATTTTCATCATCACCATA

Los primers utilizados dirigidos a la región de la cápside, para la genotipificación de NoV en conejos, fueron los reportados por Mesquita *et al.*, (2010): JV102 TGG GAT TCA ACA CAG CAG AG y JV103 TGC GCA ATA GAG TTG ACC TG y Kojima *et al.*, (2002) para el genotipo GI: G1SKF CTGCCCGAATTYGTAATGA y G1SKR CCAACCCARCCATTRTACA y genotipo GII: G2SKF CNTGGGAGGGCGATCGCAA y G2SKR CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT.

Los fragmentos amplificados a través de la RT-PCR, fueron purificados a partir del gel utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), según instrucciones del fabricante, ya purificados fueron clonados en células competentes E.coli; la ligación se realizó con el kit pGEM® - T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI) y los plásmidos recombinantes se purificaron con el kit Vivantis GF1-Plasmid DNA Extraction kit, según a instrucciones del fabricante. Los fragmentos clonados y purificados fueron secuenciados en el ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (AppliedBiosystem).

7.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las secuencias obtenidas se compararon en una alineación múltiple de secuencias incluyendo las reportadas a nivel mundial; el análisis molecular y

filogenético se realizó utilizando el software MEGA X y para la genotipificación de NoV se utilizó el software NoroNet. (Kumar *et al.*, 2019; Xue *et al.*, 2017).

8. RESULTADOS

Se obtuvo un total de 106 muestras de conejos con signología entérica, pertenecientes a los principales municipios productores de carne de conejo del Estado de México (Tabla1).

Conejo identificación	Municipio de procedencia
C1-C22	Amecameca
C23-C40	Texcoco
C41-C68	Amecameca
C64-C77	Texcoco
C78-C83	Teotihuacán
C84-C90	Texcoco
C-90-C-106	Amecameca

Tabla. 1 Relación de número de muestras y municipio de procedencia

De las 106 muestras procesadas se obtuvieron un total de cinco amplicones para la región parcial NS7 a una altura de 300 pb (Figura 1), también se describe la relación de muestras positivas y procedencia, cabe mencionar que se obtuvieron conejos positivos de todos los municipios muestreados (Amecameca, Texcoco y Teotihuacán) que se muestran en la tabla 2.

9. DISCUSIÓN

Norovirus es un agente viral de amplia distribución mundial (CDC, 2021) no solo en humanos, si no en las diversas especies animales, en cerdos por ejemplo existen reportes de la presencia de NoV en países como: Brasil (Cunha, 2010), Nicaragua (Bucardo *et al.*, 2016), Nueva Zelanda (Wolf *et al.*, 2009), Hungría (Reuter *et al.*, 2006), Corea (Keum *et al.*, 2009), de bovinos en Alemania (Otto *et al.*, 2011), Egipto (Mohamed *et al.*, 2018), China (Guo *et al.*, 2017), reportes de la presencia de NoV canino en Grecia (Ntafis *et al.*, 2020), Portugal (Martella *et al.*, 2011), de felinos en Italia (Di Martino *et al.*, 2016) y Estados Unidos (Pinto *et al.*, 2012), lo que demuestra que NoV puede infectar a una amplia gama de hospederos y de diversas zonas geográficas con características muy diferentes entre sí, mientras que para los conejos, solo existe un reporte de referencia (López Aguado *et al.*, 2017), que demuestra la presencia de NoV en esta especie. A nivel mundial el virus que posee una mayor cercanía al que sería NoV de conejo, es el virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo ya que ambos forman parte de la familia *Caliciviridae*, además de compartir hospedero y el otro es el Lagovirus no patógeno del conejo o Rabbit Calicivirus (Le Gall-Reculé *et al.*, 2011), este último se presentan en dos variantes una asintomática que corresponde a la cepa RCVA1, que tiene tropismo solo por células del intestino delgado a diferencia de RHDV (Strive *et al.*, 2009), pero es del mismo tropismo que tiene NoV. En este estudio tiene coincidencia ya que las muestras positivas fueron amplificadas a partir de tejido de intestino delgado (duodeno), pero la diferencia con el reporte de la cepa RCVA1, los conejos de este estudio si presentaron signología entérica y filogenéticamente se asocian a NoV, mientras que la otra cepa MRCV que es una variante de la no patógena y los animales presentan una signología con mayor similitud a RHDV como lo son: congestión conjuntival, cianosis, diarrea, signología neurológica y en hembras gestantes hemorragia vulvar (Abrantes *et al.*, 2010). En este estudio el único signo que compartieron fue diarrea, nuevamente demostrando que las cepas encontradas en los conejos mexicanos pertenecen a NoV.

Estudios iniciales de receptores para la familia Caliciviridae, tuvieron inicio en cepas de Lagovirus, demostrando que NoV en especial el genogrupo GII y el RHDV son similares respecto a que se unen a los antígenos del grupo histo-sanguíneo (HBGA) (Cao *et al.*, 2007), por lo que con esta característica, los conejos podrían desarrollar una infección por NoV. El gen FUT 2, que codifica para fucosiltransferasa, encargado de agregar una fucosa al final de los oligosacáridos, que puede dar origen a H y a los antígenos A -B, dependiendo de la glicoproteína o monosacárido al cual se una, en el caso del antígeno A a N-acetilgalactosamina o el antígeno B a D-Galactosa, como se expresa en los humanos, para generar HBGA, A o B. Un estudio realizado por Nystrom *et al.*, (2011), mediante la obtención de cepas G1-G6, de proteínas de cápside VP60, evaluó la unión de estas cepas a azúcares sintéticos, así como la expresión de antígenos ABH en tejidos intestinales (duodeno) del conejo, reportó las características de hemoaglutinación de las cepas G1-G6, determinando que la cepa G1 se unía al antígeno tipo A, las cepas G2 y G3, al antígeno H tipo 2 y las cepas G4 a la G6 al tipo B2, concluyó que todos los conejos de este estudio expresaban algún tipo de antígeno H tipo 2, A y B, sin embargo no se encontró ningún animal con un patrón claro, como en NoV de humanos.

Respecto al número de muestras positivas y signología para lo descrito en la tabla 1 y 2, figura 2, en relación a la signología presentada en los conejos del Estado de México, con un total de 106 muestras analizadas y 4.72 % de muestras positivas y de ese último porcentaje todos los conejos presentaron diarrea, difiriendo con lo reportado por Mesquita *et al.*, (2010), donde en este estudio se analizó un total de 105 muestras de caninos y obtuvo un 9% de muestras positivas con animales que presentaron diarrea y en el porcentaje total también es diferente ya que obtuvo un 40% para muestras positivas en perros con y sin signología entérica y en comparación con otro estudio realizado por Zimsek *et al.*, (2010), donde se analizaron un total de 108 muestras de bovinos dirigidas a la región del RdRp similar al número de muestra de este estudio obtuvo un porcentaje más bajo con un total de positivos del 1.9% incluyendo muestras de asintomáticos y para cerdos de un

total de 406 muestras obtuvo 1.2% de positivos, de igual forma un porcentaje menor al de este estudio. El porcentaje de positivos puede verse influenciado por la toma de muestra que en esta caso para los tres estudios la procedencia fue heces, la región a amplificar y la presencia o ausencia de signología.

Para el caso de la tabla 4 donde se señala que el porcentaje de positivos en este estudio difiere con el estudio de Zimsek *et al.*, (2010), que obtuvo el mismo número de positivos para la región de RdRp y cápside teniendo el 1.9% de positivos de un total de 108 muestras en comparación a las 106 muestras de este estudio con el 4.72% de positivos por RdRp y para la cápside 14.15%.

Otro estudio realizado por Lowmoung *et al.*, (2017) con un total de 256 ostras obtuvieron tejidos intestinales y utilizando los mismos primers de cápside para este estudio los reportados por Kojima *et al.*, (2002) G1SKF-G1SKR y G2SKF-G2SKR, su porcentaje de positivos para GI fue de 14.2% muy similar al presentado en este estudio con el 14.1%, para GII obtuvieron un porcentaje más bajo siendo del 10.3%, mientras que en este estudio no se obtuvieron positivos.

Algunas de las secuencias pertenecientes a conejos mexicanos tuvieron una relación del 100% al 96% de porcentaje de identidad, con NoV de otras especies, las cuales algunas pertenecen al genotipo GI, GII o GII.4, este último el más prevalente a nivel mundial en humanos. Un estudio realizado por Parra *et al.*, (2017), reporta que este genotipo puede presentar un mayor número de mutaciones con un total de 20 mutaciones descritas al día 21 post-infección,, mientras que en relación con otros genotipos GII.6 y GII.17, presentaron solo cuatro y dos substituciones en el mismo tiempo. La alta tasa de mutación de este tipo de virus RNA les confiere una gran diversidad genética y esto permite que NoV altere su perfil de unión a antígenos y receptores en respuesta a una presión de selección (Hardy, 2005; Tan y Jiang, 2005). Los genogrupos GI y GII se unen a HBGA en la misma región del dominio P2, los sitios de unión se conservan dentro de ambos genogrupos, y el gen que expresa puede ser FUT 2, uniéndose a A N-acetil-D-galactosamina y H de igual manera (Cao *et al.*,

2007; Bu *et al.*, 2008) sin embargo existe diferencia en el modos de unión y los aminoácidos que involucra en el proceso de o-glicosilación y en la interacción son completamente diferentes: cabe recordar que NoV humanos siempre presentaran patrones únicos; las secuencias de cerdo de igual forma por qué también pertenecen al genotipo GII. Algunas de estas características se asemejan a lo expresan algunos receptores de conejos, como la expresión del gen FUT 2, la unión a H y A N-acetil-D-galactosamina (Nýstrom *et al.*, 2011), motivo por lo cual este puede ser uno de los factores que las secuencias de conejos en México, guarde cierta relación con estos genogrupos, sin embargo la misma secuencia en si presenta diversidad. La herramienta de genotipado Noronet (Xue *et al.*, 2017), cataloga, a la secuencias C1 Mex Rabbit NoV 1 y C4 Mex Rabbit NoV, en el genogrupo GIV, en el cual se encuentra clasificados secuencias de humanos, perros y gatos, misma situación que resulta ser de importancia debido a que se ha planteado potencial zoonótico, aunadas a sus características genómicas. Existen diversos reportes donde se menciona el papel y potencial que puede tener el perro como vector y transmisor de NoV a humanos y viceversa antropozoonosis , debido a la cercanía como mascota o a médicos veterinarios tratantes (Caddy *et al.*, 2014; Di Martino *et al.*, 2014) en cambio Ford-Slitz *et al.*, (2019), mediante la amplificación de genomas completos dirigidos al genotipo GIV de perros y gatos obtuvieron 2 cepas relacionadas GIV.2 y GIV.1, donde determinan que estos NoV presentan restricciones de recombinación, encontradas en la región de la cápside y en proteínas no estructurales y este suceso podría limitar la transmisión interespecie en el genogrupo GIV, caninos, felinos y hombre.

El genotipo GIV al cual fueron asignadas las cepas de conejos en México conforme a su secuencia parcial dirigida al RDRP, nos permite establecer tres puntos: el primero fue comprobar que los conejos con signología entérica pueden presentar NoV y pudiesen tener asignación a un genogrupo propio, el segundo que pudiesen estar adjuntas al genotipo GIV, tal como lo describe Ford-Slitz *et al.*, (2019) con las especies caninas en dicho estudio o la tercera es que pudiese presentar alguna clase de potencial zoonótico o eventos de

recombinación, por la relación con las otras secuencias. La secuencia con número de acceso GQ856455.1, Hu/GII.4/Beijing/55058/2007/CHN, que guarda relación con secuencias del presente estudio, menciona que en el genogrupo GII existen puntos hotspots de mutaciones en el residuo 414 y su potencial de recombinación (Jin *et al.*, 2011), mientras que Chhabra *et al.*, 2010, con la secuencia denominada Hu/GII/2-37/Tokyo/1987/JPN genes for polyprotein capsid protein VP1 capsid protein VP2 partial cds, número de acceso EU921353.2, también con relación a las secuencias presentadas en este estudio, muestra la evidencia de recombinantes en NoV, y a diferencia de Jin *et al.*, (2011), en esta investigación donde se utilizaron 766 nt de la región dirigido al RDRP y 598 nt dirigidos a la proteína VP1, por lo que las secuencias reportadas en este estudio en conejos, podrían ser utilizadas, para complementarse y de determinar si Nov de conejos puede presentar eventos de recombinación o potencial de rebasar la barrera interespecies o sólo pertenecer al genotipo GIV como propia de la especie si solo se tomara en cuenta la herramienta de genotipado Noronet y la alineación múltiple de secuencias.

En el árbol filogenético de la figuras 4 y 5 se observa que las secuencias de conejo son más cercanas al genotipo GI de humanos aunque diversas, ya que se agrupan en un cluster diferente y la figura 11 presenta los fragmentos positivos a las proteínas de cápside GI, confirmarían que el genotipo de conejos podría ser GI, contrario a lo obtenido a la herramienta de genotipado Noronet que asigna las secuencias al genogrupo GIV, si bien la herramienta coincide perfectamente en la región del RdRp y confirma que las secuencias de conejo pertenecen a NoV, presenta una desventaja que el número de secuencias en su base de datos que es de 16635 incluidos los genogrupos GI, GII y GIV (Green, 2018), contra la base de datos de GenBank que posee un total de 52,412 secuencias para NoV (NCBI, 2021), encontrando una mayor asociación a secuencias que estén reportadas y que sean genogrupo GI, aunque sería pertinente tener las secuencias de los fragmentos de VP1 para verificar con Noronet que se tenga algún otro resultado y no existan

recombinantes, ya que eso también podría explicar el por qué por Noronet asigne por RdR al genotipo GIV y a la cápside a GI.

De acuerdo a lo reportado por García *et al.*, (2017), en su estudio realizado en México describe la presencia de otro agente viral en conejos: rotavirus y los patógenos concomitantes presentes en este estudio fueron: *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Klebsiella Spp*, entre otros y parasitarios a la coccidia del género *Eimeria spp*, estos mismos patógenos se encontraron en concomitancia pero con NoV de este estudio.

10. CONCLUSIÓN

Las cepas de NoV de conejos en México pueden pertenecer al Genogrupo GI debido a la cercanía de las secuencias a este grupo y amplicones obtenidos con los primers específicos para el genotipo GI. En esta investigación se aporta evidencia para sustentar que NoV de conejo presenta mayor similitud a GI a diferencia de los antecedentes que mencionan que era semejante al genogrupo GII. Sin embargo NoV en esta especie se podría clasificar dentro del genogrupo GI o formar un nuevo genogrupo tal como se ha reportado para otras especies recientemente, por ejemplo la secuencia de león marino forma un patron similar a los arboles filogeneticos en este estudio cercanos a NoV de otras especies en un cluster diferente, siendo asignado a su propio genogrupo.

Es importante recordar que debido a las características genéticas del virus, receptores y hospederos para la familia *Caliciviridae* y el género NoV está en constante ingreso de secuencias y de nuevas especies, por lo que se recomienda dar continuidad el estudio de NoV en conejos para conocer su conformación genómica completa que permitirá un mayor alcance de conocimiento de su origen y comportamiento genético, asociación de signología, patógenos concomitantes e impacto económico.

La signología presentada en los conejos positivos y asociación con otros patógenos corresponde a los reportados para NoV en México de esta especie y tambien para algunos otros virus relacionados a enteritis en conejos.

11. PRODUCTOS

Participación en el Congreso de Academia Journals Chiapas 2021.

Memorias del Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Chiapas 2021.

ISSN 1946-5351, Vol. 13, No.6, 2021.

Presencia de Agente Patógeno viral Miembro de la Familia Caliciviridae, en Conejos con Signología Entérica, Pertencientes a la Zona Sur-Oriente del Estado de México.



Presencia de Agente Patógeno viral Miembro de la Familia *Caliciviridae*, en Conejos con Signología Entérica, Pertenecientes a la Zona Sur-Oriente del Estado de México

M en C. Gabriela López Aguado Almazán¹, Dra. Linda Bautista Gómez^{1*}, Dr. José S. Martínez Castañeda², Dr.
Salvador Fonseca Coronado³

Resumen—El estado de México es una entidad líder en producción porcícola, sin embargo las explotaciones se ven afectadas por diversas enfermedades siendo las de origen entérico, las principales patologías relacionadas a mortalidad y pérdidas económicas, también se ha descrito que son multifactoriales, actuando en concomitancia virus, bacterias y parásitos. Norovirus es un virus perteneciente a la familia *Caliciviridae*, agente viral común presente en cuadros diarreicos en diversas especies mamíferas. Este artículo sugiere la presencia de norovirus en esta especie. **Objetivo:** Identificar norovirus en muestras de tejido intestinal. **Métodos:** Se analizaron 106 muestras de tejido duodenal de conejos, mediante la técnica de RT-PCR. **Resultados:** Un total de 5 muestras fueron amplificadas a una altura de 300 pb que corresponde a la región de RdRp, evidenciando la posible presencia de este virus. **Conclusión:** se sugiere que Norovirus está presente en el 8.5% de las muestras procedentes de conejos con signología entérica.

Palabras clave—norovirus, cunicultura, zoonosis entérica, RT-PCR.

Introducción

La cunicultura en México es una actividad que ha presentado un crecimiento importante en los últimos años, demostrando un incremento de la producción promedio de 1.5 millones anuales reflejados del año 2014 al 2016 de acuerdo al Servicio de Información Agroalimentario y Pesquero (2016). El Estado de México se encuentra posicionado como uno de los principales productores de carne y subproductos (CNSPC, 2021). Dentro de las producciones suelen presentarse enfermedades de diversos tipos, entre ellas: la Enfermedad Hemorrágica del conejo causada por un virus del género *Lagovirus* perteneciente a la familia *Caliciviridae*, de reciente rebrote en México y de reporte obligatorio (SAGARPA, 2021 y ICTV, 2021), las de tipo respiratorio y con mayor frecuencia las gastroentéricas (Deeb y DiGiacomo, 2000). Las patologías de origen digestivo suelen ser multifactoriales asociadas a virus, bacterias y parásitos (García et al. 2017). Los virus mayormente reportados asociados a enteritis en esta especie son: rotavirus (Raynoso et al. 2019), astrovirus (Martella et al. 2011) y coronavirus (Osterhaus et al. 1982).

Norovirus (NoV) es un virus que pertenece a la familia *Caliciviridae*, al igual que *Lagovirus*, *Nobovirus* y *Vesivirus* (ICTV, 2021), su genoma mide de 7.5 Kb a 7.7 Kb de RNA monocatenario (Thorne y Goodfellow, 2014), cuenta con tres marcos de lectura abiertos denominados ORF 1 (Open Reading Frame), el primero es denominado ORF 1 y sintetiza 6 proteínas no estructurales relacionadas a la síntesis viral que van de la NS1 a la NS7, o pueden ser mencionadas por el nombre de la misma, por ejemplo la proteína NS3 es NTPasa o la NS7 es RdRp (RNA dependiente de RNA polimerasa). El marco de lectura abierto ORF 2 codifica una proteína llamada VP1 o proteína mayor de la cápside que se divide en dos dominios: S (Shell) y P (Protruding). El dominio P se subdivide en dos subdominios P1 y P2, este último ase una a antígenos del grupo histo-sanguíneo (HBGA), que son carbohidratos poliméricos que se sintetizan mediante monosacáridos específicos, que se encuentra en células del epitelio intestinal de los mamíferos y en conejos este tipo de receptor lo posee en la superficie del duodeno y en otras áreas, como la tráquea y los conductos biliares; cabe mencionar que *Lagovirus*, virus de la enfermedad hemorrágica tiene afinidad por este tipo de receptor en los conejos y se ha demostrado un mecanismo similar a *Norovirus* humanos del genogrupo GI que es el más prevalente a nivel mundial, proponiendo a esta especie como modelo estudio de *Norovirus* humano. ORF 3 sintetiza la proteína VP2 o proteína menor de la cápside cuenta con una longitud de 1000 pb (Cotton et al. 2014 y Leuthold et al. 2014).

¹ M en C. Gabriela López Aguado Almazán. Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética del Centro Universitario UAEM Amecameca de la Universidad Autónoma del Estado de México. gah-fla@hotmail.com

² Dra. Linda Guiliiana Bautista Gómez. Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética del Centro Universitario UAEM Amecameca de la Universidad Autónoma del Estado de México. lin_hag@yahoo.com.mx (autor correspondiente)

³ Dr. José S. Martínez Castañeda. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. josejimorras@hotmail.com

⁴ Dr. Salvador Fonseca Coronado. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. fonsecaacoronado@yahoo.com

Envió de artículo a la Revista PLOS Pathogens

Factor de impacto: 6.218, Q1.

First molecular identification of Norovirus in rabbits

PLOS Pathogens
First molecular identification of Norovirus in rabbits
–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	First molecular identification of Norovirus in rabbits
Short Title:	Norovirus in rabbits
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Virology
Keywords:	Mexico, Norovirus, rabbit, zoonosis
Corresponding Author:	Linda Gulliana Bautista Gómez, Dr Universidad Autónoma del Estado de México - Centro Universitario Amecameca Amecameca, México MEXICO
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autónoma del Estado de México - Centro Universitario Amecameca
First Author:	Gabriela López Aguado Almazán
Order of Authors:	Gabriela López Aguado Almazán Linda Gulliana Bautista Gómez, Dr José Simón Martínez-Castañeda Salvador Fonseca-Coronado Juan Diego Pérez de la Rosa Marlo Aguilar Domínguez Juan Carlos Vázquez Chagoyan Emmanuel Reynoso Ultrera
Abstract:	<p>Background Human norovirus (NoV) are leading cause of acute nonbacterial gastroenteritis worldwide, in mammals its presence has been demonstrated because the receptor for this virus are common and the characteristics of the virus allow its replication, in rabbits viral pathogens have been involved as causal of enteric signology, however there are no reports of the presence of norovirus in this species, therefore the objective of this study was to evidence norovirus in rabbits using molecular techniques as from intestinal tissue.</p> <p>Methods In total 90 intestinal tissue (duodenum) samples were collected from rabbits belonging to the main rabbit meat producing farms in the State of México, for the identification of norovirus in rabbits the technique RT-PCR was performed using primers for partial amplification of a region corresponding the RdRp (RNA dependent RNA polymerase), the analysis genetic is realized by used software MEGA X and databases GenBank and Noronet.</p> <p>Results Where the presence of norovirus was evidenced in five of the intestinal tissues of rabbits with enteric signology and two sequences are phylogenetically relationship to the genogroups GI, GII and assigned to the genotype GIV.</p> <p>Conclusion This is the first study identifying to our knowledge, of norovirus in rabbits in the worldwide, which means that enteric diseases that affect cunicola production and their zoonotic potential due to the similarity of their sequences with those of humans must be considered in the diagnosis or consider the creation of a group for this species.</p>
Suggested Reviewers:	Andrea Mücke Moreno University of São Paulo, Brazil. morenoam@usp.br Ellynn Alshaykh Editorial Manager and Production Manager® from Ardes Systems Corporation London School of English - Saudi Arabia

First molecular identification of Norovirus in rabbits

1GABRIELA LÓPEZ AGUADO ALMAZÁN,*1LINDA G BAUTISTA GÓMEZ, 2 JOSÉ
S MARTÍNEZ CASTAÑEDA, 3SALVADOR FONSECA CORONADO.

1Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México.

2Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, C.P. 50090, Estado de México, México.

3 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54740, Estado de México, México.

*lin_bag @yahoo.com.

Short title: Norovirus in rabbits

Background

Human norovirus (NoV) are leading cause of acute nonbacterial gastroenteritis worldwide, in mammals its presence has been demonstrated because the receptor for this virus are common and the characteristics of the virus allow its replication, in rabbits viral pathogens have been involved as causal of enteric signology, however there are no reports of the presence of norovirus in this species, therefore the objective of this study was to evidence norovirus in rabbits using molecular techniques as from intestinal tissue.

Envió de artículo a la Revista Veterinarski arhiv

Factor de impacto: 0. 492, Q4.

Evidende Molecular of Norovirus Presents in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) From México.

ail/0/inbox/id/AQMkADAwATY3ZmYAZS1hNGQ1LWRmOTUtMDACLTAwCgBGAAADI7eY2MBvGE6Ad2JSR7jgMAcARKvkex12DEKfNzNqDs1wtQAAAgEM/

Buscar Reunirse ahora

Responder | Eliminar | Archivo | No deseado | Limpiar | Mover a | Categorizar

← **Fw: [VA] Manuscript submitted (VA.1039 EVIDENCE MOLECULAR OF NOROVIRUS PRESENTS IN RABBITS (Oryctolagus cuniculus) FROM MÉXICO)**

This is to acknowledge the receipt of your manuscript entitled:

EVIDENCE MOLECULAR OF NOROVIRUS PRESENTS IN RABBITS (Oryctolagus cuniculus) FROM MÉXICO

Gabriela López Aguado-Almazán, Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico
Linda Guiliana Bautista Gómez*, Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico
José Simón Martínez-Castañeda, Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico
Camilo Romero-Núñez, Hospital Veterinario DERMAVET, Mexico
Salvador Fonseca-Coronado, Universidad Nacional Autónoma México, Mexico
Juan Diego Pérez De La Rosa, Universidad Nacional Autónoma México, Mexico
Mario Aguilar-Dominguez, Clínica Médica, Nuestra Señora Del Rosario, Mexico

for Veterinarski Arhiv journal.

The reference number of your manuscript is: VA. 1039

Please quote reference number on all correspondence.

The manuscript is being read by our scrutineers and we shall contact you again as soon as we receive their reports.

Sincerely,
Editor-in-Chief

Responder | Reenviar

EVIDENCE MOLECULAR OF NOROVIRUS PRESENTS IN RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*) FROM MÉXICO

Gabriela López Aguado¹, Linda G Bautista¹, José S Martínez², Camilo Romero³.

¹Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Genética. Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México; ²Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, C.P. 50090, Estado de México, México; ³Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Amecameca-Ayapango km 2.5, Amecameca, CP. 56900, Estado de México, México.

ABSTRACT

Norovirus is one of the main viral ethiological agents that cause diarrhea in numerous species. In humans is one of the leading causes of viral gastroenteritis worldwide and responsible for substantial morbidity, mortality and healthcare costs. In rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), it has not been studied, in Mexico nor worldwide, there are no reports of the presence of Norovirus in this species, therefore, in the present study we used molecular identification of the virus by means of RT-PCR and partial amplification of the open Reading frame gene (ORF1). We confirmed the presence of the virus in 28% of studied samples, the sequences of the samples, relating the sequences with members of the family Caliciviridae, genus Norovirus corresponding to genotypes GII.4, GIV and GIV.I, to the most prevalent strain worldwide in humans, dogs and cats, this highlights the importance of considering Norovirus as a potential infection agent in enteric disease diagnosis and his zoonotic potential.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrantes, J., Esteves, P. J., 2010. Not-So-Novel Michigan Rabbit Calicivirus. *Emerg. Infect. Dis.* 16 (8): 1331-1332.

Abrantes, J., Loo, W., Pendu, J., Esteves, P., 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Vet Res.* 19 (1): 1.

Adler, J. L., 1969. Winter vomiting disease. *J Infect Dis.* 119 (6): 668-73.

Alhatlani, B., Vashist, S., Goodfellow, I., 2015. Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Res.* (1) 206:134–43.

Bailey, D., Thackray, L. B., Goodfellow, I. G., 2008. A single amino acid substitution in the murine norovirus capsid protein is sufficient for attenuation in vivo. *J Virol.* 82: 7725–7728.

Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Mitra, T., Hammer, C., Garfield, M., Green, K. Y., 2003. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol.* 77 (20): 10957–74.

Belliot, G., Sosnovtsev, S., Chang, K., Babu, V., Uche, U., Arnold, J., Cameron, C., Green, K., 2005. Norovirus proteinase polymerase and polymerase are both active forms of RNA dependent RNA polymerase. *J Virol.* 11 (1): 2393.

Blakeney S. J., Cahill, A., Reilly, P, A., 2003. Processing of Norwalk virus non-structural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology.* 308 (2): 216-24.

Bok, K., Prikhodko, V., Green, K., Sosnovtsev, S., 2009. Apoptosis in murine norovirus infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. *J Virol.* 9 (1): 3650.

Bucardo, F., González, Y., Reyes, P., Blandon, L., Saif, J., Nordgren., 2016. Seroprevalence in Household Raised Pigs Indicate High Exposure to GII Noroviruses in Rural Nicaragua, 2016. *Zoonoses Public Health.* 68 (3): 600-607.

Bull, R., Tanaka, M., White, P., 2007. Norovirus recombination. *J Gen Virol.* 88: 3347–335.

Caddy, S., Breiman, A., Le Pendu, J., Goodfellow, I., 2014. Genogroup IV and VI canine noroviruses interact with histo-blood group antigens. *J Virol.* 88 (18): 10377-10391.

Cao, S., Lou, Z., Tan, M., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Z., 2007. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol.* 81 (11): 5949–5957.

Caul, E. O., Appleton, H., 1982. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol.* 9 (4): 257-265.

Center for Disease Control and Prevention. 2021. <https://www.cdc.gov/norovirus/index.html>. Consultado: 1 de Jul 2021.

Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, I. G., Chi-Wai, M. C., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, A. P., Katayama, K., Vennema, H., Marion P. G., Koopmans, M. P.G., Vinjé, J., 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol.* 101 (8): 893.

Chaudry, Y., Nayak, A., Bordeleau, M., Tanaka, J., Pelletier, J., Belsham, G., Roberts, L., Goodfellow, I., 2006. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J Biol Chem.* 281 (1): 25315.

Cheethman, S., Souza, M., McGregor, R., Meulia, T., Wang, Q., Saif, S., 2007. Binding patterns of human norovirus-like particles to buccal and intestinal tissues of gnotobiotic pigs in relation to A/H Histo Blood Group Antigen expression. *J Virol.* 81 (7): 3535-3544.

Cooper, P. D., Steiner-Pryor, A., Scotti, P. D., Delong, D., 1974. On the nature of poliovirus genetic recombinants. *J Gen Virol.* 23: 41-49.

Conner, S. D., Schmid, S. L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422: 37-44.

Cotten, M. V., Petrova, M. V. T., Phan, M. A., Rabaa, S. J., Watson, S. H., Ong, P. K., Baker, S., 2014. Deep Sequencing of Norovirus Genomes Define Evolutionary Patterns in an Urban Tropical Setting. *J of Virol.* 88 (19): 11056-11069.

Cunha, J. B., de Mendonca, M. C., Miagostovich, M. P., Leite, J. P., 2010. First detection of porcine norovirus GII.18 in Latin America. *Res Vet Sci.* 89 (1): 126–129.

- Dedman, D., Laurichesse, H., Caul, O., Wall, G., 1998. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales 1900-1995. *Epidemiol Infect.* 10 (2): 130-131.
- Deeb, B. J., DiGiacomo, R. E., 2000. Respiratory Diseases of Rabbits. *Vet Clin N Am - Exot Anim Pract.* 3 (2): 465-480.
- De Rougemont, A., Ruvoen-Clouet, N., Simon, B., Estienney, M., Elie-Caile, C., Aho, S., Pothier, P., Le Pendu, J., Boireau, W., Belliot, G., 2011. Analysis of the binding of GII.4 norovirus variants on to human blood group antigens. *J Virol.* 85: 4057–4070.
- Di Martino, B., Di Profio, F., Ceci, C., Di Felice, E., Green, K. Y., Bok, K., De Grazia, S., Giammanco, G. M., Massirio, I., Lorusso, E., Buonavoglia, C., Marsilio, F., Martella, V., 2014. Seroprevalence of norovirus genogroup IV antibodies among humans, Italy, 2010–2011. *Emerg Infect Dis.* 20 (11): 1828-32.
- Di Martino, B., Di Profio, F., Melegari, I., Sarchese, V., Cafiero, M. A., Robetto, S., Aste, G., Lanave, G., Marsilio, F., Martella, V., 2016. A novel feline norovirus in diarrheic cats. *Infect Genet Evol.* 38 (132-137)
- Drake, J. W., 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90 (9):4171–5.
- Domingo, E., Baranowski, E., Núñez, I. J., Ruiz-Jarabo C. M., Sierra, S., Molina, N., Sobrino, F., 2000. Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19 (1): 55-63.
- Domingo, E., Menéndez-Arias, L., Holland, J. J., 1997. RNA virus fitness. *Rev Med Virol.* 87– 96.
- Domingo, E., Sheldon, J., Perales, C., 2012. Viral Quasispecies Evolution. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76 (2):159–216.
- Eden, J. S., Tanaka, M. M., Boni, M, F., Rawlinson, W. D., White, P. A., 2013. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol.* 87: 6270–6282.
- Etherington, G. J., Dicks, J., Roberts, I., 2006. High throughput sequence analysis reveals hitherto unreported recombination in the genus Norovirus. *Virol.* 345 (1): 88-95.

Ettayebi, K., Hardy, M. E., 2003. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol.* 8 (2): 11790-11793.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura. 2019. <http://www.fao.org/home/es/>. Consultado: 30 Sept 2019.

Ferragut, F., Vega, C. G., Mauroy, A., Conceicao-Neto, N., Zeller, M., Helen, E., Uriarte, E. L., Bilbao, G., Bok, M., Matthijssens, J., 2016. Molecular detection of bovine noroviruses in Argentinean dairy calves: circulation of tentative new genotype. *Infect Gen Evol.* 40: 144-50

Fisman, D. N., Greer, A. L., Brouhanski, G., Drews S. J., 2009. Of gastro and the gold standard: evaluation and policy implications of norovirus test performance for outbreak detection. *J Transl Med.* 7: 23.

Ford-Slitz, L. A., Mullis, L., Sanad, Y. M., Tohma, K., Lepore, C. J., Azevedo, M., Parra, G. I., 2019. Genomics Analyses of GIV and GVI Noroviruses Reveal the Distinct Clustering of Human and Animal Viruses. *Viruses.*11: 3.

García, R. V. G., Bautista, G. L. G., Martínez, C. J. S., Romero, N. C., 2017. Multicausal etiology of the síndrome in rabbits from México. *Rev Argent Microbiol.* 49 (2): 132-138.

Glass, R. I., Parashar, U. D., Estes, M. K., 2009. Norovirus Gastroenteritis. *N Engl J Med.* 361:18.

Gonin, P., Covillard, M., d'Halewyn M. A. 2000. Genetic diversity and molecular epidemiology of Norwalk-Like viruses. *Journal Infectious Disease.* 182: 691-697.

Goodfellow, I., Chaudry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberte, F. J., Roberts, L., 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Reports.* 6 (10): 968-72.

Green, K. Y., 2018. Norovirus surveillance comes of age: the impact of NoroNet. *Lancet Infect Dis.*18 (5): 482–483.

Guo, Z., H, Q., Yue, H., Zhang, B., Tang, C., 2017. First detection of Nebovirus and Norovirus from cattle in China. *Arch Virol.* 163 (2): 475-478.

Hall, A. J., Lopman, B. A., Payne, D. C., Patel, M, M., Gastanaduy, P. A., Vinje, J., Parashar, U. D., 2013. Norovirus disease in the United States. *Emerg Infect Dis.* 19 (8): 1198–205.

Hardy, M. E., Crone, T. J., Brower, J. E., Ettayebi, K., 2002. Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinase. *Virus Res.* 89: 29–39.

Hardy, M., 2005. Norovirus protein structure and function. *Microbiology Letters.* 8 (1): 3.

Hebrard, E., Bessin, Y., Michon, T., Longhi, S., Uversky, V. N., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Romero, P., Walter, J., Declerck, N., Fargette, D., 2009. Intrinsic disorder in Viral Proteins Genome-Linked: experimental and predictive analyses. *Virol J.*; 6: 23.

Herbert, T. P., Brierley, I., Brown, T. D. K., 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline Calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol.* 78 (5): 1033-40.

Hillenbrand, B., Gunzel, D., Richter, J. F., Hohne, M., Schreier, E., Schulzke, J. D., Mankertz, J., 2010. Norovirus non-structural protein p20 leads to impaired restitution of epithelial defects by inhibition of actin cytoskeleton remodelling. *Scand J Gastroenterol.* 45: 1307–1319.

Hogbom, M., Jäger, K., Robel, I., Unge, T., Rohayem, J., 2009. The active form of the norovirus RNA dependent RNA polymerase is a homodimer with cooperative activity. *J Gen Virol.* 11 (1): 281.

Hyde, J., Mackenzie, J., 2010. Subcellular localization of the MNV-1 ORF 1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex. *Virology.* 1 (10): 138.

International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV. 2021. <https://talk.ictvonline.org>. Consultado: 27 Jun 2021.

International Nucleotide Sequence Database Collaboration GenBank. 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Consultado: 30 Sept 2019.

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal., 2015. México, www.inafed.gob.mx

Jin, M., Chen, J., Hong, Z. X., Zhang, M., Ying, H., Xia, W. C., Liu, N., Tan, M., Jiang, T., Duan, J. Z., 2011. Genetic diversity of noroviruses in Chinese adults: potential recombination hotspots and GII-4/Den Haag-specific mutations at a putative epitope. *Infect Genet Evol.* 11 (7): 1716-26.

Kahan, S.M., Liu, G., Reinhard, M.K., Hsu, C.C., Livingston, R.S., Karst, S.M., 2011. Comparative murine norovirus studies reveal a lack of correlation between intestinal virus titers and enteric pathology. *Virology* 421(2), 202-210.

Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., Chanock, R. M., 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* 10 (5): 1075-81.

Keum, H. O., Moon, H. J., Park, S. J., Kim, H. K., Rho, S. M., Park, B. K., 2009. Porcine noroviruses and sapoviruses on Korean swine farms. *Arch Virol.* 154 (11): 1765-74-

Kirby, A., Iturriza-Gómara, M., 2012. Norovirus diagnostics: options, applications and interpretations. *Expert Rev Anti Infect.* 10 (4): 423–433.

Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Fuminori, B., Hoshino, A., Shinoara, B. M., Uchida, B, K., Natori, C. K., Takeda, C. N., Katayama, D. K., 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* 100: 1-2.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 35:6.

Lateef, Z., Gimenez, G., Baker, E. S., Ward, V. K., 2017. Transcriptomic analysis of human norovirus NS1-2 protein highlights a multifunctional role in murine monocytes. *BMC Genomics.* 18:39.

Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P. A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., Koopmans, M., 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol.* 58 (10): 2059-68.

Leen, E., Baeza, G., Curry, S., 2012. Structure of a murine norovirus N56 protease product complex revealed by adventitious crystallisation. *PLoS one.* 7 (1): 1.

Le Gall-Reculé, G., Zwingelstein, F., Fages, M. P., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Aubineau, J., Roobrouck, A., Botti, G., Lavazza, A., Marchandeu, S., 2011. Characterisation of a non-pathogenic and nonprotective infectious rabbit lagovirus related to RHDV. *Virology*. 410 (2): 395-402.

Li, T. F., Hosmillo, M., Schwanke, H., Shu, T., Wang, Z., Yin, L., Curry, S., Goodfellow, I. G., Zhou, X., 2018. Human norovirus NS3 has RNA helicase and chaperoning activities. *J Virol*. 92: 5.

Lin, Y., Fengling, L., Lianzhu, W., Yuxiu, Z., Yanhua, J., 2014. Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genogroup II norovirus at different pH levels: Function of VP2 protein in the stability of NoV VLPs. *J Microbiol*. 52:970

Lindesmith, L., Donaldson, E., LoBue, D; Cannon, J., Zheng, D., Vinje, J., Baric, F., 2008. Mechanisms of GII.4 Norovirus of persistence in human population. *PLoS Medicine*. 1 (22): 209

Lizasoain, A., Tort, L. F., García, M., Gómez, M. M., Leite, J. P., Miagostovich, M. P., Cristina, J., Berois, M., Colina, R., Victoria, M., 2015. Surveillance reveals the presence of canine GVII norovirus and canine astrovirus in Uruguay. *Arch Virol*. 160 (11): 2839-43.

López Aguado, A. G., 2017. Diagnóstico molecular de Norovirus y Astrovirus en conejos de la zona sur-oriente del Estado de México. Tesis. Universidad Autónoma del Estado de México. Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/67847>, Consultado: 9 Sep 2019.

Lowmoung, T., Pombubp, K., Duangdee, T., Tipayamongkholgul, M., Kittigul, L., 2017. Distribution of Naturally Occurring Norovirus Genogroups I, II, and IV in Oyster Tissues. *Food Environ Virol*. 9: 415–422.

McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., Heeney, J., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Macdonald, A., Goodfellow, I., 2011. Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLOS Pathog*. 7 (12): e1002413.

Marionneau, S., Cailleau, T., Rocher, J., Le Moullac, B., Ruvoen, N., Clement, M., Le Pendu, J., 2001. ABH and lewis histo-blood group antigens a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of changing world. *Biochimie*. 83 (7): 565-73.

Martella, V., Moschidou, P., Pinto, P., Catella, C., Desario, C., Larocca, V., Circella, E., Bányai, K., Lavazza, A., Magistrali, C., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2011. Canine Noroviruses. *Emerg Infect Dis.* 7 (2): 2887-2889.

Martella, V., Lorusso, E., Decaro, N., Elia, G., Radogna, A., D'Abamo, M., Desario, C., Cavalli, A., Corrente, M., Camero, M., Germinario, C., Banyai, K., Di, B., Marsilio, F., Carmichael, L., Buonavoglia, C., 2008. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis.* 14 (8): 1306-8.

Martino, B., Marsilio, F., Carmichael, L., Buonavoglia, C., 2008. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis.* 3 (2): 1307-1308.

Mattison, Kirsten., Shukla, A., Cook, A., Pollari, F., Friendship, R., Kelton, D., Bidawid, S., Farber, M. J., 2007. Human Noroviruses in Swine and Cattle *Emerg Infect Dis.* 13 (8): 1184–1188.

Meslin, F. X., Stohr, K, Heymann, D., 2000. Public health implications of emerging zoonoses. *Rev Sci Tech.* 19 (1): 310-7.

Mesquita, J., Barclay, L., Nascimento, M., Vinjé, J., 2010. Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 3 (2): 981-982.

Moe, C. L., Sobsey, M. D., Stewart, P. W., Crawford-Brown, D., 1999. Estimating the Risk of Human Calicivirus Infection from Drinking Water; Proceedings of the International Workshop on Human Caliciviruses; Atlanta, GA, USA. 29–31 Marzo; pp. P4–P6.

Mohamed, F., Mansour, S. M. G., El-Araby, I. E., Mor, S. K., Goyal S. M. 2017. Molecular detection of enteric viruses from diarrhea calves in Egypt. *Arch Virol.* 162 (1): 129-37.

Mohamed, F. F., Gamelat, K. F. K., Mohamed, E. A. I., Ahmed, A. H. A, Sagar M. G., Phylogeny of bovine norovirus in Egypt based on VP2 gene. *International Journal of Veterinary Science and Medicine.* 6 (1): 48-52.

Musier, F. K., 2010. RNA remodeling by chaperones and helicases. *RNA. Biol.* 7: 632–633.

National Institute for Public Health and the Environment. 2019. <http://www.noronet.nl/noronet/>. Consultado: 30 Sept 2019.

Ntafis, V., Xylouri, E., Radogna, A., Buonavoglia, C., Martella, V., 2010. Outbreak of Canine Norovirus Infection in Young Dogs. *J Clin Microbiol.* 48 (7): 2605-2608.

Naphtine, S., Lever, R., Powell, M., Jackson, R., Brown, D., Brierley, I., 2009. Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy. *PLoS one.* 4 (12): e8390.

Ng, K.K., Pendas-Franco, N., Rojo, J., Boga, J.A., Machin, A., Alonso, J.M., Parra, F., 2004. Crystal structure of norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the activesite cleft. *J Biol Chem* 279 (16): 16638-16645.

Nyström K, Le Gall-Recule G, Grassi P, Abrantes J, Ruvoen-Clouet N, et al. Histo-Blood Group Antigens Act as Attachment Factors of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Infection in a Virus Strain-Dependent Manner. *PLoS Pathogens.* 2011;7:8.

NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014. Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26%2F08%2F2015. Consultado: 20 Abr 2021.

Olivares, R., Gómez, M., Schwentesius, R., Carrera, B., 2009. Alternativas a la producción y mercadeo para la carne de conejo en Tlaxcala, México. *Región y sociedad.* 17 (1): 199.

Oliver, S. L., Dastjerdi, A. M., Wong, S., El-Attar, L., Gallimore, C., Brown, D. W., Green, J., Bridger, J. C., 2003. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol.* 77: 2789–98.

Oliver, S. L., Wood, E., Asobavire, E., Whates, D. C., Brickell, J. S., Elschner, M., Otto, P., Lambden, P. R., Clarke, I. N., Bridger, J. C., 2007. Serotype 1 and 2 Bovine Noroviruses Are Endemic in Cattle in the United Kingdom and Germany. *J Clin Microbiol.* 45 (9): 3050-3052.

Otto, P., Clarke, I., Lambden, S., Salim, O., Reetz, J., Tenorio, E., 2011. Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain gena virus: an experimental model to study pathogenesis of norovirus infection. *J Virol.* 8 (1): 12013.

Parra, G. I., Squires, R. B., Karangwa, C. K., Johnson, J. A., Lepore, C. J., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., 2017. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog.* 13 (1): e1006136.

Perry, J., Wobus, C., 2010. Endocytosis of murine Norovirus I into murine macrophages is dependent of dynamin II and cholesterol. *J Virol.* 14 (1): 6163.

Perry, J., Taube, S., Wobus, C., 2009. Murine Norovirus I entry into permissive macrophages and dendritic cell is pH independent. *Virus Res.* 9 (1): 1.

Peeters, J. E., Pohl, P., Charlier, G., 1984. Infectious agents associated with diarrhea in commercial rabbits: a field study. *Ann Rech Vet.* 15 (3): 335-340.

Pinto, P., Wang, Q., Ning. Chen., Edward, J. D., ,Joshua, B. D., L., Millward, L. M., Buonavoglia, C., Martella, V., Saif, J. L., 2012. Discovery and Genomic Characterization of Noroviruses from a Gastroenteritis Outbreak in Domestic Cats in the US. *PLOS ONE* 7(2): e32739.

Prasad, V., Hardy, M., Dokland, T., Bella, J., Rossman, M., Estes, M., 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science.* 4 (2): 287-289.

Pfister, T., Wimmer, E., 2001. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol.* 75:1611–9.

Rajkowitsch, L., Schroeder, R., 2007. Dissecting RNA chaperone activity. *RNA.* 13 (12): 2053–2060.

Rok, H. K., Lee, H. J., Gowda, K. G., Ho, J. K., Sook C. M., Kang, S., Hwang. S., Hyun, K., 2018. Nucleotide triphosphatase and RNA chaperone activities of murine norovirus NS3. *J Gen Virol.* 99(11): 1482–1493.

Reuter, G., Bíró, H., Szúcs, G., 2007. Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. *Arch Virol.* 152: 611–614 .

Reynoso U. E., Bautista, G. L. B., Martínez, C. J. S., López-Aguado, A. G, Romero, N. C., García, R. V.G., 2019. Análisis de la presencia de Rotavirus en conejos del Estado de México. *Rev Mex Cienc Pecu.*10:2.

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

Scheffler, U., Rudolph, W., Gebhardt, J., Rohayem, J., 2007. Differential cleavage of the norovirus polyprotein precursor by two active forms of the viral protease. *J Gen Virol.* 88: 2013-2018.

Sharp, T., Guix, S., Katayama, K., Crawford, S., Estes, M., 2010. Inhibition of cellular protein secretion by Norwalk virus nonstructural protein p22 requires a mimic of an endoplasmic reticulum export signal. *PLOS ONE.* 15 (4): 1, 4-7.

Shi, Z., Wang, W., Xu, Z., 2019. Genetic and phylogenetic analyses of the first GIII.2 bovine norovirus in China. *BMC Veterinary Research.* 15: 311.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). en <https://www.gob.mx/siap>. Consulta: 9 Jun 2021.

Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Onwudiwe, O., Green, K. Y., 2005. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J. Virol.* 79: 4012–4024.

Sosnovtsev, S., Belliot, G., Chang, K., Prikhodko, V., Thackray, L., Wobus, C., Karst, S., Virgin, H., Green, K., 2006. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol.* 16 (1): 7816.

Stavrínides, J., Guttman, D. S., 2004. Mosaic evolution of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* 78: 76–82.

Strive, T., Wright, J. D., Robinson, A. J., 2009. Identification and partial characterisation of a new Lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology* 384 (1): 97-105.

Strong, D. W., Thackray, L. B., Smith, T. J., Virgin, H. W., 2012. Protruding domain of capsid protein is necessary and sufficient to determine murine norovirus replication and pathogenesis in vivo. *J Virol.* 86: 2950–2958.

Subba-Reddy, C., Goodfellow, I., Kao, C., 2011. VPg primed RNA synthesis of Norovirus RNA dependent RNA polymerase by using a novel cell based assay. *J Virol.* 11 (2): 3029,3031.

Subba-Reddy, C., Yunus, M., Goodfellow, I., Kao, C., 2012. Norovirus RNA synthesis is modulated by an interaction between the viral RNA dependent RNA polymerase and the major capsid protein, VP1. *J Virol.* 12 (4): 10141-10144.

Summa, M., von Bonsdorff, C, H., Maunula. L., 2012. Pet Dogs--A Transmission Route for Human Noroviruses?. *J Clin Virol.* 53-3.

Taube, S., Perry, W., Yetming, K., Patel, P., Auble, H., Shu, L., Nawar, H., Lee, H., Connell, D., Shayman, A., Wobus, C., 2009. Ganglioside-Linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors of murine noroviruses. *J Virol.* 83 (9): 4092-4101.

Tan, M., Jiang, X., 2005. The P domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol.* 14 (1): 14017.

Tan, M., Jiang, X., 2010. Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. *PLoS Pathog.* 6: 8.

Teng, J. L. L., Martelli, P., Chan, W. M., Lee, H. H., Hui, S. W., Lau, C. C. Y., Tse, H., Yuen, K. Y., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., 2018. Two novel noroviruses and a novel norovirus genogroup in California sea lions. *J Gen Virol.* 99 (6): 777-782.

Teunis, P. F., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J., Calderon, R. L., 2008. Norwalk virus: how infectious its?. *J Med Virol.* 80 (8): 1468-76.

Thorne, L., Goodfellow, I., 2014. Norovirus gene expression and replication. *Journal of Virology.* 14 (1): 281.

Vinje, J., Koopmans, M. P. G., 1996. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis.* 174: 610-615.

Vongpunsawad, S., Prasad, V., Estes, M., 2013. Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. *Journal of virology.* 8 (5): 4819-4823.

Wang, H., Constantini, V., Saif, J., 2005. Porcine enteric Calicivirus: genetic and antigenetic relatedness to human Calicivirus, diagnosis and epidemiology. *Vaccine*. 22 (1): 1.

Wang, H., Han, M., Cheetham, S., Souza, M., Funk, J., Saif, L., 2005. Porcine norovirus related to human norovirus. *Emerg Infect Dis*. 11 (12): 1874-1881.

Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y., Virgin, H. W., 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol*. 2 (12): e432.

Worobey, M., Holmes, E. C., 1999. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol*. 80 (10): 2535-43.

Wirblich, C., Thiel, H. J., Meyers, G., 1996. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J. Virol*. 70: 7974-7983.

Wolf, S., Williamson, W., Hewitt, J., Lin, S., Rivera-Aban, M., Ball, A., Scholes, P., Savill, M., Greening, E. G., 2009. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Vet Microbiol*. 133 (1-2): 184-189.

Xue, L., Wu, Q., Dong, R., Cai, W., Wu, H., Chen, M., Chen, G., Wang, J., Zhang-Shou, J., 2017. Comparative phylogenetic analyses of recombinant noroviruses based on different protein-encoding regions show the recombination associated evolution pattern Liang. *Sci Rep*. 7: 4976.

Yuen, K. Y., Chan, P. K., Peiris, M., Tsang, D. N., Que, T. L., Shortridge, K. F., Cheung, P. T., To, W. K., Ho, E. T., Sung, R., Cheng, A. F., 1998. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*. 351: 467-71.

Zakhour, M., Clouet, N., Charpilienne, A., Langpap, B., Poncet, D., Peters, T., Bovin, N., Le Pendu, J., 2009. The alphaGal epitope of the histoblood group antigen family is a ligand for bovine norovirus newbiru 2 expected to prevent cross species transmission. *PLOS Pathogens*. 5 (7): 1504.

Zheng, D., Ando, T., Fankhauser, R., Beard, R., Glass, R., Monroe, S., 2005. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 12 (1): 316.

Zimzek, M. J., Polisak-Prijateli, M., Steyer, A., Barlic-Maganja, D., Koren, S., 2010. Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. *Infect Genet Evol.* 10 (3): 413-420.