

Detección de genotipo II de norovirus en diferentes matrices alimentarias de riesgo por real time RT-PCR.

Detection of Genotype II of Norovirus in different food matrix by real time RT-PCR

✉ Viviana Cachicas¹, Mariel Lopez Moya², Luis Gavilanes¹, Pablo Baeza¹, Hector Galeno²

✉ 1. Sección Microbiología de Alimentos, Subdepartamento Alimentos y Nutrición, Departamento Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública de Chile.
2. Sección Virus entéricos, Subdepartamento Enfermedades Virales, Departamento Laboratorio Biomédico, Instituto de Salud Pública de Chile.
3. Centro Nacional de Referencia Inocuidad Microbiológica de Alimentos Inciensa, Costa Rica.

✉ Viviana Cachicas, vcachica@ispch.cl

RESUMEN

Diferentes alimentos como moluscos, vegetales y aguas, se han identificado como vehículos de transmisión de Norovirus causantes de grandes brotes de gastroenteritis. Cada matriz alimentaria presenta dificultades para extraer las partículas virales y eventuales inhibidores de la matriz pueden arrastrarse durante el proceso y estar presentes en la detección molecular por PCR en tiempo real generando falsos negativos. Con el objetivo de evaluar matrices alimentarias de interés por su consumo interno, exportación e importancia en brotes masivos de gastroenteritis, se analizaron en forma simultánea mediante metodología validada ISO15216-2:2017, cuatro matrices alimentarias chilenas: dos bayas por su diferente pigmentación (arándanos y frutilla), vegetal verde (lechuga), hepatopáncreas de moluscos y agua de regadío ultrafiltrada. La capacidad de extracción y recuperación de las partículas virales fue analizada incorporando al proceso el virus subrogado murino avirulento Mengo (MC0 /ATCC®VR-1597™) que permite cuantificar la concentración viral de una muestra si su recuperación es mayor a un 1%. Para evaluar la interacción de la matriz con el analito de interés y su eventual pérdida durante el proceso de extracción, en forma simultánea junto a virus Mengo, se adicionó a las matrices de Arándano, hepatopáncreas y agua, ~6,4x10⁴ partículas virales (pv) de norovirus Genotipo GII (NoV-GII), presente en una muestra fecal. En la etapa de detección y cuantificación, se evaluó el arrastre de inhibidores durante el proceso de cada extracto viral, adicionando ~45 copias de genoma (cg) de ARN de GII sintético a duplicados de cada extracto de ácidos nucleicos en dos diluciones. Los resultados observados mostraron la recuperación de virus subrogado y partículas virales de NoV-GII de muestra clínica fue solo mayor al 1% en muestra de hepatopáncreas. Adicionalmente, la matriz de lechuga y agua fueron las más complejas en relación a la recuperación de ambos virus e inhibición del PCR. Estos resultados obligan a verificar cada matriz alimentaria en relación a la recuperación de virus y arrastre de inhibidores y muestran las dificultades analíticas que tiene un alimento para su cuantificación en relación a su carga viral.

ABSTRACT

Palabras Claves:

Diarrea; Virus; Comida; agua

Keywords:

Diarrhea; Virus; Food; water.

Different foods, such as mollusks, vegetables and water, have been identified as Norovirus transmission vehicles that cause major outbreaks of gastroenteritis. Each food matrix presents difficulties in extracting the viral particles and possible matrix inhibitors can creep during the process and be present in the molecular detection by real-time PCR generating false negatives. With the objective of evaluating food matrices of interest for their internal consumption, export and importance in massive outbreaks of gastroenteritis, four Chilean food matrices were analyzed simultaneously using validated methodology ISO15216-2: 2017: two berries for their different pigmentation (blueberries) and strawberry, green vegetable (lettuce), mollusc hepatopancreas and ultrafiltered irrigated water. The ability to extract and recover viral particles was analyzed by incorporating the Mengo avirulent murine subrogated virus into the process (MC0 / ATCC®VR-1597™) that allows quantifying the viral concentration of a sample if its recovery is greater than 1%. To evaluate the interaction of the matrix with the analyte of interest and its eventual loss during the extraction process, simultaneously with Mengo virus, cranberry, hepatopancreas and water matrices, ~ 6.4x10⁴ viral particles (pv) were added) of norovirus Genotype GII (NoV-GII), present in a stool sample. In the detection and quantification stage, inhibitor entrainment was evaluated during the process of each viral extract, adding ~ 45 genome copies (cg) of synthetic GII RNA to duplicates of each nucleic acid extract in two dilutions. The results observed showed the recovery of subrogated virus and viral NoV-GII particles from the clinical sample was only greater than 1% in a hepatopancreas sample. Additionally, the lettuce and water matrix were the most complex in relation to the recovery of both viruses and PCR inhibition. These results make it necessary to verify each food matrix in relation to virus recovery and inhibitor carryover and show the analytical difficulties that a food has for its quantification in relation to its viral load.V

INTRODUCCIÓN

La transmisión de agentes infecciosos como virus a través del agua y los alimentos mediante contaminación oral-fecal es altamente reconocida (1). Sin embargo, su detección y aislamiento desde el ambiente y alimentos, ha tenido un lento desarrollo a pesar de la alta resistencia de los virus a las condiciones ambientales de temperatura, humedad, materia orgánica etc (1–3). El principal desafío ha sido detectar una baja concentración de partículas virales en grandes volúmenes de muestra de diverso origen (4,5) y luego determinar si la partícula es viable e infecciosa (6). En la década de los 70, se realizaron múltiples investigaciones que detectaron partículas virales asociada a una enfermedad, gracias a la visualización directa por microscopía electrónica cuando no hubo un aislamiento bacteriano que justificara la diarrea de los pacientes (1). Han pasado 50 años y esa tecnología, aún vigente a nivel de investigación, nunca llegó a ser un método de rutina para un laboratorio de ensayo o control por su complejidad técnica y excesivo costo. Más de 100 tipos de virus patógenos pueden ser transportados en el ambiente a través de napas subterráneas, aguas de estuarios, océanos, ríos, etc. Estos virus son colectivamente denominados virus entéricos y transmitidos vía oral-fecal y replicados en el tracto gastrointestinal del hospedero, él que puede eliminar entre 10⁵ y 10¹¹ partículas virales por gramo de heces (1). Los grupos más estudiados pertenecen a las familias Picornaviridae (poliovirus, enterovirus, coxsakievirus, virus de hepatitis A y echovirus), Adenoviridae (adenovirus), Caliciviridae (norovirus o NoV, calicivirus, astrovirus) y Reoviridae (reovirus y rotavirus) (1)

Chile ha sufrido brotes masivos de gastroenteritis causados principalmente por el Genotipo II de norovirus (NoV-GII), especialmente en el brote masivo de gastroenteritis en áreas de alta restricción hídrica, como el de la ciudad de

Antofagasta el año 2010 (6) asociado a aguas de regadío con insuficientes niveles de cloración y el de Ovalle el año 2013 asociado a aguas insuficientemente potabilizadas (7). Ambos con más de 30 mil y 4 mil casos respectivamente. En relación a la producción y exportación de alimentos, el país ha perdido la capacidad de exportación de moluscos crudos como ostras, asociadas a brote por nexo epidemiológico en Nueva Zelandia en 1998 (5) y detección en destino de norovirus en ostras crudas en China en el año 2007 (8). Estudios en Chile de 142 deposiciones asociados a brotes del periodo 2013-2017, muestran a NoV GII como más prevalente en la población (74,6%), junto a Rotavirus (14,7%), Saporovirus (7%) y Norovirus Genotipo I (3,5%) (9).

Actualmente, la detección de virus en los laboratorios se realiza mediante métodos moleculares siendo el PCR en tiempo real la metodología más utilizada (10,11). En ella se detecta la presencia de secuencias específicas del genoma viral que no reflejan su patogenicidad ni viabilidad. Esta limitación metodológica del PCR, junto con su alto costo y la baja concentración del virus en muestras ambientales, ha permitido su detección y secuenciación a nivel de investigación y así contrastar aislados clínicos y ambientales. Sin embargo, solo recientemente hay una propuesta de modelo celular para evaluar la inactivación del virus (12) que permitiría avanzar en relación a los límites de aceptación máximo por gramo o mL de alimento y asegurar un alimento inocuo en su consumo.

El año 2017, la Unión Europea y Estados Unidos publicaron resultados de metodologías validadas en relación a su reproducibilidad y repetibilidad en matrices específicas como mejillones, ostras, lechuga, frutilla, cebollines, aguas embotelladas y superficies (ISO 15216-2:2017) (10) y cebollines (BAM FDA para Hepatitis A) (11). Estas metodologías permiten ser verificadas mundialmente con matrices locales.

Este estudio tiene como objetivo estudiar matrices de interés nacional, dado su alto consumo en el país y verificar la robustez del método frente a características importantes para un análisis cuantitativo, como es la capacidad de recuperar el virus de interés y de un virus subrogado desde las matrices alimentarias, así como analizar la presencia de inhibidores eventualmente presentes en la detección, que han sido arrastrados en el proceso generando eventuales falsos negativos en el ensayo. Con este objetivo se utilizó ARN de NoV-GII sintético en un duplicado de la muestra. Los alimentos estudiados fueron lechuga (*Lactuca sativa*), frutilla (*Fragaria ananassa*), arándano (*Vaccinium myrtillus*), almeja (*Venus antiqua*), ostra chilena (*Tiostrea chilensis*), ostra japonesa (*Crassostrea gigas*), mejillón (*Choromytilus chorus*) y agua de regadío de turbidez mayor a 100 Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU) por su importancia en la transmisión de brotes masivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las muestras de alimentos fueron analizadas según ISO 15216-2:2017 (10) excepto el agua de regadío que fue previamente concentrada por ultrafiltración y ultracentrifugación, según las recomendaciones de CDC (13,14) & BAM FDA on *line Chapter 24B* (11). La preparación del extracto viral fue diferente para cada matriz. En cada muestra se incorporó el virus control de proceso Mengo® al inicio de cada extracción viral.

Extracción partícula virales desde Agua: Ultrafiltración y Ultracentrifugación

Veinte litros de agua fue ultrafiltrada tangencialmente hasta ~ 100 mL utilizando filtros de diálisis SmartFluxhep230/Medica.CE/MO3540 y bomba peristáltica modelo Master flex™ Millipore, con flujo no superior a 2L/min, en un rango entre 1 psi y 8 psi, en mangueras siliconizadas para evitar la adherencia de virus.

El concentrado fue ultracentrifugado a 170.000 g 60 min en ultracentrífuga Sorvall WX ultra serie *Thermo Scientific*. Para liberar las partículas virales del pellet, este se resuspendió en 4 ml de tampón glicina 0,05M pH 9,5 con agitación constante por 30 min a 4°C: El pellet se resuspendió en igual volumen de PBS 2X para mantener la isotonicidad y se centrifugó a 4800 rpm 20 min 4°C para obtener un sobrenadante lo más limpio posible. Esta suspensión fue nuevamente ultracentrifugada a 170.000 xg por 60 min a 4°C.

Extracción de partículas virales desde arándano y frutilla

Una porción de un pool de 25 g de berries fue resuspendido en tampón TGBE (Tampón Tris 1M/glicina 0,05M /extracto carne 1% pH 9.5) para la liberación de los virus desde la superficie del fruto, evitando la destrucción tisular (2,5 gramos en 10 mL de TGBE). Las muestras se agitaron a T ambiente por 20 min a ~60 oscilaciones/min previa incorporación de 1 mg de pectinasa de *Aspergillus niger* de concentración 24,5 U/mg (13,14). El pH fue chequeado cada 10 min verificando que se mantuviera a 9,5± 0,5. Los virus fueron precipitados con Polietilen Glicol (500 gr/L PEG 8000, 1,5 mL/L NaCl) mediante agitación por 60 min a 5°C y 60 oscilaciones/min. Las muestras fueron centrifugadas 10.000 g durante 30min y mantenido a 5°C, luego el pellet fue resuspendido en 500 µL de PBS para la extracción de ácidos nucleicos.

Extracción de partículas virales desde lechuga

Una porción de trozos de área 2,5 x 2,5 cm² de lechuga de un pool de 25 gr fue resuspendido en tampón TGBE para la liberación de los virus evitando la destrucción tisular (2,5 gramos en 10 mL de TGBE). Las muestras se agitaron a T° ambiente durante 20 min a ~60 oscilaciones/min. Los virus fueron precipitados con Polietilen Glicol (500 gr/L PEG 8000, 1,5 ml/L NaCl) mediante agitación por 60 min a 5°C y 60 oscilaciones/min. Las muestras

fueron centrifugadas 10.000 g durante 30 min a 5°C y el pellet fue resuspendido en 500 µL de PBS para la extracción de ácidos nucleicos.

Extracción de partículas virales desde hepatopáncreas de moluscos

Una fracción de 2 gr de un pool de hepatopáncreas de moluscos fueron tratados enzimáticamente con proteinasa K (PtK 30 UI, Merck) e incubados por 1 hr a 37°C y 320 rpm. La PtK fue inactivada sometiendo a la muestra a 60°C durante 15 min. y centrifugadas 5 min. a 3.000 g. El volumen de sobrenadante se midió y se reservó 500 µL para la extracción de ácidos nucleicos.

Extracción de Ácidos nucleicos

La preparación de extractos de ácidos nucleicos se realizó según recomendaciones de Anexo F de la ISO 15216-1 (10), utilizando el sistema NucliSENS® con pipeta GeneUp® siguiendo las recomendaciones del fabricante (BioMerieux®). Quinientos µL de extracto viral se resuspendieron en 2 mL de tampón de lisis (50% Isotiocianato de guanidina, < 2% Tritón X-100 y <1% EDTA) e incubados por 10 min a T° ambiente. A esta suspensión, se le adicionó 50 µL de solución de sílica magnética según lo descrito por Boom y cols (15). Luego de una incubación de 10 min a temperatura ambiente (T° amb.) los ácidos nucleicos fueron extraídos por lavados con pipeta GeneUp® y eluido en 100 µL.

Detección y cuantificación de virus

La detección de secuencias específicas de NoV-GII y virus Mengo®, fue realizada en 5 µL del extracto viral utilizando las secuencias de partidores y sondas recomendadas en ISO 15216-1-2017 (10) y confeccionadas a pedido a IDTDNA™ y Eurogentec™ (Tabla 1). Para la amplificación se utilizó el kit comercial LC 480 RNA Master Mix Roche®, utilizando ciclos de amplificación recomendados por el fabricante en termociclador Biorad XF 960 consistentes en una retrotranscripción de 3 min. a 63°C, *Hot start* 30 seg a 95°C cuyo ciclo de termociclado fue de: denaturación a 95°C por 30 seg, alineamiento a 60°C por 30 seg., una extensión a 72°C por 10 seg por un total de 45 ciclos y una extensión final a 40°C por 10 seg. La concentración de partidores para 25 µL de volumen final de reacción fue de 0,5; 0,9 y 0,25 pmol/µL para *forward* (FW), *reverse* (REV) y la sonda (PROBE) respectivamente. Para la cuantificación de copias de genoma (cg) por muestra, se confeccionaron curvas estándar utilizando diluciones seriadas con factor de dilución 1:10. Para NoV-G2, se utilizó estándar comercial de cDNA como ADN de doble hebra (dsADN) de Ceeram-Biomeriux® en concentración 2x10⁶ cg/µL (gráfico 1). Para virus Mengo® se utilizó una suspensión 1.46x10⁷ cg/µL (Ceeram-Biomeriux®) realizando la curva estándar previa inactivación por calentamiento del virus puro a 95°C por 5 min. según recomendaciones del fabricante. Para

Tabla 1
Secuencias de partidores y sondas recomendadas en ISO 15216-1-2017 (10) y confeccionadas a pedido a IDTDNA™ y Eurogentec™.

Norovirus GII	Secuencia
QN1F2(FW)	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA
COG2R (REV)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA
QN1Fs (PROBE)	AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG
Mengo Virus	
Mengo 110 (FW)	GCG GGT CCT GCC GAA AGT
Mengo 2019 (REV)	GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC
Mengo 147 (PROBE)	ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC

evaluar la inhibición de la matriz en la detección por RTqPCR, se utilizó un ARN sintético de GII (ATCC®VR3235SD Synthetic Norovirus GII RNA) con una concentración de $4,4 \times 10^5$ cg/ μ L.

Para caracterizar el proceso hasta la extracción de ácidos nucleicos, cada muestra fue inoculada con un 1.46×10^7 partículas virales (pv) de virus Mengo® al inicio de cada proceso. Paralelamente con el objeto de caracterizar la capacidad de detección del genotipo GII en las diferentes matrices alimentarias, las muestras de arándano, hepatopáncreas A y agua fueron contaminadas artificialmente con $6,4 \times 10^4$ millones de partículas virales de NOV-GII presentes en una

muestra fecal.

Para determinar el efecto inhibitorio de la matriz alimentaria, en la etapa de detección molecular a un duplicado de ácidos nucleicos de cada muestra se adicionó ~45,5 copias de ARN de norovirus GII sintético. Los cálculos de inhibición fueron realizados según el porcentaje de recuperación de las copias del genoma a partir de la curva de calibración. Cada muestra fue analizada en duplicado y en diluciones seriadas según recomendación de ISO 15216-1:2017 (10).

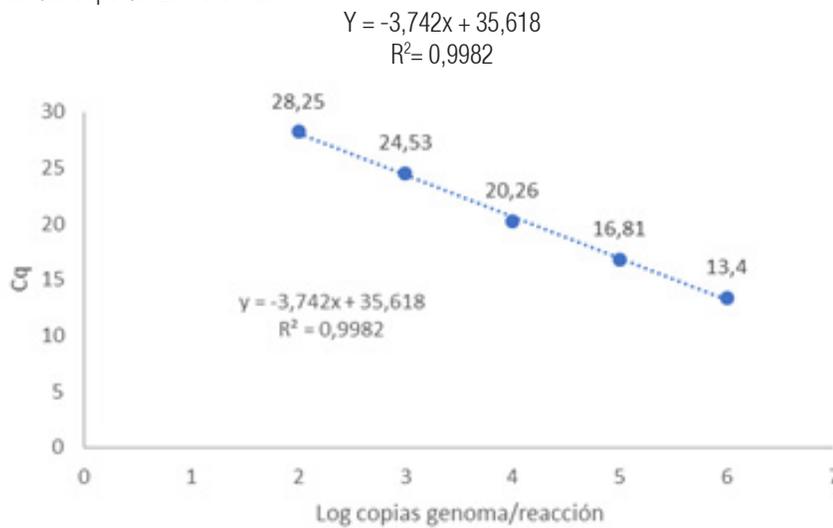
RESULTADOS

Los resultados se evaluaron a partir de las curvas estándar utilizando ADN de doble hebra de norovirus GII ® y virus Mengo® con valores de R^2 superiores a 0,98 (figuras 1).

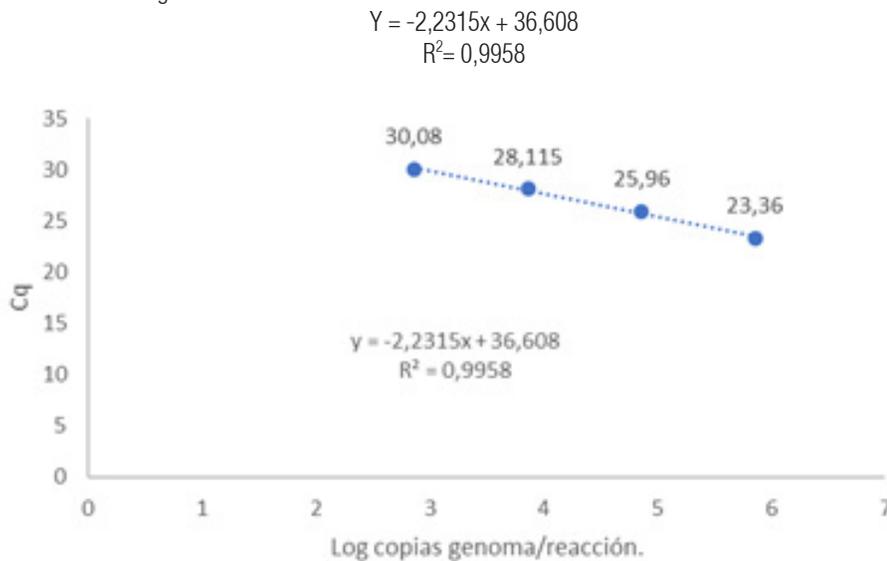
Figura 1

Curva de calibración de los de genotipo II de Norovirus (NoV-GII) y virus Mengo con sus respectivos valores de R^2 y C_q en función de las copias de genoma. v

(a) Curva estándar de Genotipo GII de Norovirus



(b) Curva estándar de Virus Mengo



El hepatopáncreas es la matriz menos afectada en relación a la pérdida de virus durante el proceso y al arrastre de inhibidores. A pesar que en ambas muestras de Hepatopáncreas no hubo inhibición, si hubo diferencia en la recuperación de los virus en dos magnitudes logarítmicas (tabla 1,2).

El agua de irrigación se presenta como una matriz compleja: Durante la extracción, no fue posible recuperar el virus subrogado y la recuperación de NoV-GII fue menor al 1%. En la detección se observó un 100% de inhibición en el retro PCR de la matriz sin diluir (tabla 1,2).

En el caso de los dos berries analizados, arándano y frutilla; el número de copias de Mengo recuperadas fue en ambos, menor al 1% y se observó un 100% de inhibición en la detección de NoV-GII en el extracto de ácidos nucleicos sin diluir de la frutilla, lo que permitió detectar NoV-GII pero fuera del rango de cuantificación (tabla 2). Este evento de inhibición fue eliminado parcialmente diluyendo la muestra, obteniendo entre 0 y 20% de inhibición.

En el caso de la lechuga a pesar de no observarse inhibición, no fue posible recuperar copias del genoma del virus Mengo (tabla 1).

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran las dificultades analíticas que se presentan en la verificación de una metodología cuantitativa validada aplicada a matrices alimentarias locales. Este estudio tuvo la posibilidad, no recomendada para ningún laboratorio de ensayo, de contaminar artificialmente las muestras con la partícula viral de interés. Esta fortificación, evidenció la gran dificultad de recuperar las partículas de norovirus GII en las diferentes muestras de alimentos: En el método de extracción se incorporaron más de 14 millones de partículas virales (pv) de Mengo y 64.000 pv de NoV-GII y los valores máximos de recuperación se observaron para la muestra de hepatopáncreas, artificialmente contaminado con ambos virus. Los valores de recuperación fueron de solo un 2,36% de partículas virales de Mengo (345.000 pv) y 1,84% de recuperación de NoV-GII (1190 pv). Si estos resultados se hubiesen obtenido en un laboratorio de ensayo, las muestras con menos de 1% de recuperación de virus subrogado podrían informarse solo como resultados cualitativos, según recomendaciones de ISO (15216-1:2017) (10) y coincide su mayor porcentaje de recuperación ya que es una de las matrices más estudiadas para el cual el método

Tabla 2
Recuperación de copias de genoma de virus NoV-GII, virus Mengo (Me).

Matriz alimentaria	Fortificación con Virus Me (+/-) (1,46x10 ⁷ pv)	Me (Cq)	Me (cg/muestra)	Recuperación virus (%)
Arándano	+	30,62*	9,8x10 ³	6,7x10 ⁻⁴
Frutilla	+	33,18	7x10 ²	4,8x10 ⁻⁵
Lechuga	+	0	0	0
Hepatopáncreas A	+	28,23*	3,45x10	2,36
Hepatopáncreas B	+	32,18*	5,8x10 ³	3,97x10 ⁻⁴
Agua irrigación	+	0	0	0
Muestra fecal	NA	NA	NA	NA

*= ARN sin diluir.

NA: no aplica, nd: No determinado, Cq: Ciclo de cuantificación, cg: copias de genoma, pv: partículas virales

Tabla 3
Recuperación de copias de genoma de ARN sintético de NoV-GII desde muestras de alimentos.

Matriz aliementaria	Fortificación (+/-) con Virus NoV- GII ($6,4 \times 10^4$)	GII (Cg)	GII (cg/muestra)	Recuperación GII %	Inhibición Matriz Sin diluir (%)	Inhibición Matriz 1/10 (%)
Arándano	+	36,5*	<1	0	46,8	0
Frutilla	-	NA	NA	NA	100	20
Lechuga	-	NA	NA	NA	22,62	0
Hepatopáncreas A	+	31,6*	$1,19 \times 10^3$	1,84	0	0
Hepatopáncreas B	-	NA	NA	NA	0	0
Agua irrigación	+	39,4	<1	0	100	52,5
Muestra fecal	NA	22,4	$6,4 \times 10^4$		NA	NA

*= ARN sin diluir.

NA: no aplica, nd: No determinado, Cq: Ciclo de cuantificación, cg: copias de genoma, pv: partículas virales

fue diseñado (16,17). En el caso de los tres vegetales analizados, las recomendaciones para la extracción de los ácidos nucleicos están muy dirigidas a no romper la estructura del fruto para intentar liberar las pv desde su superficie (18,19) y evitar la acidificación en el caso de los frutos o ruptura de componentes inhibitorios de la célula vegetal en el caso de la lechuga. Esta eventual acidificación y recomendaciones de mantener el pH es crítica durante el proceso y la incorporación de pectinasa ayuda a disminuir los interferentes de la reacción de PCR, según lo estudiado por Bartsch et al (19).

Conclusiones

Desde el punto de vista metodológico, la verificación de estas metodologías validadas en los parámetros analizados, como es la recuperación de virus subrogado y virus en estudio, así como la inhibición de la detección molecular, muestran las dificultades para la extracción de los virus desde las matrices y hace necesario un estudio más profundo de cada matriz por la diversas características específicas de cada una.

Para el país, los avances tecnológicos como la ultrafiltración tangencial para aguas con ciertos límites de turbidez y la ultracentrifugación, han permitido avanzar en la concentración de partículas virales desde volúmenes hasta 100

Litros de muestra (13,14), obteniendo mayores probabilidades de detección. Del mismo modo, el desarrollo de técnicas moleculares para identificar secuencias específicas de un genoma, como es la detección por retro PCR en tiempo real y secuenciación han permitido comparar los aislados ambientales y clínicos del mismo lugar y temporalmente cercanos, especialmente en estudios de brote (6,7). Las tecnologías de PCR en tiempo real digital (16) y secuenciación masiva (17), son los actuales desafíos analíticos para contar con una concentración absoluta y detección/proporción con otros agentes virales y así, avanzar en las necesidades de regulación para fortalecer el comercio internacional y en el consumo interno de cada país (20,21).

AGRADECIMIENTOS

Laboratorios de Referencia de California y Alabama de BAM-FDA; SARDI Australia, IFremer Francia y Cefas de UK. Especialmente William Burkhardt, Catherine McLeod, Soizick Le Guyader y James Lowther. Proyectos concursables de bienes públicos Corfo 09CN14-5951.y Corfo 16BPE-62273. Especial agradecimientos a Oficiales FAO de Roma: Lourdes Costarica y Iddya.karunasagar quienes han facilitado interactuar entre las regiones con el objetivo de

un avance tecnológico mundial.

REFERENCIAS

- Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2004 Jan 1;90(1):23–41. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14672828>
- WHO, FAO. Microbiological Risk Assessment Series.13. ISSN 1726-5274. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities [Internet]. 2008. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i0451e.pdf>
- Price-Hayward M, Hartnell R. Summary Report of Joint Scientific Workshop on Foodborne Viruses. EFSA Support Publ [Internet]. 2016 Oct;13(10). Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1103>
- Bouwknegt M, Verhaelen K, Roda Husman AM de, Rutjes SA. Quantitative risk profile for viruses in foods. RIVM report 3303710008/2013. [Internet]. 2013. Disponible en: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/330371008.pdf>
- Greening G, Lake R, Hudson A, Cressey P. RISK PROFILE: NOROVIRUS IN MOLLUSCA (RAW) [Internet]. 2009. Disponible en: <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/35346/direct>
- Díaz T J, Solari G V, Cáceres C O, Mena A J, Baeza P S, Muñoz U X, et al. Brote de gastroenteritis aguda en la Región de Antofagasta, Chile: 2010. Vol. 29, Revista chilena de infectología. *scieloc*; 2012. p. 19–25.
- SEREMI M, Departamento de epidemiología M. REPORTE DE BROTE DE GASTROENTERITIS AGUDA POR NOROVIRUS REGIÓN DE COQUIMBO, COMUNA DE OVALLE, SEPTIEMBRE DE 2013 [Internet]. 2013. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.minsal.cl/bitstream/handle/2015/1014/3134.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Impacto Acuícola de Norovirus y otros patógenos en el cultivo y exportación de Ostras, Mitílidos y otros cultivos-Castro. In: Taller Sectorial Nodo en Biotecnología Acuícola. 2007.
- ISP. Resultado de Vigilancia de Laboratorio de Norovirus. Chile 2013-2017.
- ISO 15216-1, Microbiology of the food chain-Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR-Part 1: Method for quantification. First edition 2017-03.
- FDA, Williams-Woods J, Hartman G, Burkhardt III W. BAM 26B: Detection of Hepatitis A Virus in Foods. Laboratory Methods (Food). 2014.
- Costantini V, Morantz EK, Browne H, Ettayebi K, Zeng X-L, Atmar RL, et al. Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2018 Aug;24(8):1453–64. Disponible en: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/8/18-0126_article.htm
- Ikner LA, Gerba CP, Bright KR. Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food Environ Virol* [Internet]. 2012/05/31. 2012 Jun;4(2):41–67. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23412811>
- Mull B, Hill VR. Recovery of diverse microbes in high turbidity surface water samples using dead-end ultrafiltration. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2012 Dec;91(3):429–33. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701212003247>
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1990 Mar;28(3):495–503. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1691208>
- Polo D, Vilariño ML, Manso CF, Romalde JL. Imported Mollusks and Dissemination of Human Enteric Viruses. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2010 Jun;16(6):1036–8. Disponible en: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/6/09-1748_article.htm
- Butot S, Putallaz T, Pinto R. Development evaluation and standardization of a real time TaqMan RT-PCR assay for quantification of hepatitis A in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(3846–55).
- Bartsch C, Szabo K, Dinh-Thanh M, Schrader C, Trojnar E, Johne R. Comparison and optimization of detection methods for noroviruses in frozen strawberries containing different amounts of RT-PCR inhibitors. *Food Microbiol* [Internet]. 2016 Dec;60:124–30. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074000201630329X>
- Mäde D, Trübner K, Neubert E, Höhne M, Johne R. Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. *Food Environ Virol* [Internet]. 2013 Sep 26;5(3):162–8. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s12560-013-9118-0>
- Polo D, Schaeffer J, Fournet N, Le Saux J-C, Parnaudeau S, McLeod C, et al. Digital PCR for Quantifying Norovirus in Oysters Implicated in Outbreaks, France. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2016 Dec;22(12):2189–91. Disponible en: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/12/16-0841_article.htm
- Nieuwenhuijse DF, Koopmans MPG. Metagenomic Sequencing for Surveillance of Food- and Waterborne Viral Diseases. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Feb 15;8. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00230/full>