

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN VIRAL APLICABLE AL CONTROL DE LA INOCUIDAD AGROALIMENTARIA

DEVELOPMENT OF A DETECTION SYSTEM OF ENTERIC VIRAL CONTAMINATION FOR FOOD SAFETY CONTROL

María Dolores Blanco Fernández, Carolina Torres, Robertina Viviana Cammarata, Melina Elizabeth Barrios y Viviana Andrea Mbayed (Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires / CONICET) - Argentina

Resumen

La Comisión del Codex Alimentarius, perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), ha propuesto guías para el control de la contaminación por virus entéricos en alimentos. Señalan como virus prioritarios para la salud pública a norovirus (NoV) y al virus de hepatitis A (HAV). El virus de hepatitis E (HEV) es otro virus de creciente interés durante los últimos años, dado su potencial riesgo zoonótico. Estos virus causantes de gastroenteritis y hepatitis aguda con transmisión fecal-oral pueden estar presentes aun cuando los estándares bacterianos indicaran buena calidad microbiológica.

Las técnicas empleadas en la detección de virus en alimentos se basan en la elusión y concentración de los virus desde matrices sólidas o líquidas seguidas de técnicas moleculares para la detección de ácidos nucleicos. Distintos países han implementado normativas para controlar la presencia de virus en alimentos, pero en la Argentina no existe aún un desarrollo de la metodología apropiada para estos análisis. El objetivo de este proyecto es implementar técnicas útiles para el control virológico de productos alimenticios y para la investigación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) de origen no bacteriano.

Palabras clave: virus entéricos, enfermedad de transmisión alimentaria, detección viral.

Abstract

The World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) have proposed a guideline for the control of viral contamination in food, to be added to the Alimentary Codex. These institutions have been identified as priority for public health norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV). Hepatitis E virus (HEV) has attracted increasing concern given its zoonotic potential. These viruses are transmitted through the faecal-oral route primarily by ingesting contaminated food or water or by person to person contact with infected individuals. NoV causes acute gastroenteritis, whereas HAV and HEV cause self-limited acute hepatitis which can progress to a fulminant hepatitis in some cases. These viruses can be found in the food even if the bacteriological standards indicate a good microbiological quality

The techniques used in the detection of viruses in food are based on the concentration of the virus from solid or liquid matrices followed by molecular techniques for detecting nucleic acids.

Different countries implemented regulatory food controls for the presence of viruses; however, in Argentina there is no approved methodology for this purpose.

The objectives of this project focus on the development and standardization of methodology useful for the virological control of food and for the investigation of nonbacterial foodborne disease outbreaks.

Keywords: enteric viruses, foodborne disease, viral detection.

Introducción

Los virus entéricos humanos son uno de los principales agentes causales de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) a nivel mundial. Entre los alimentos frecuentemente asociados a ETA virales se encuentran las verduras de hojas, frutas blandas y moluscos (CDC, 2010, 2013; Eurosurveillance editorial team, 2012). La importancia de estos patógenos como responsables de brotes de ETA suele ser subestimada por la falta de

búsqueda o detección de estos agentes etiológicos en los alimentos bajo sospecha de contaminación viral. A su vez, la falta de información disponible sobre brotes de ETA virales podría contribuir negativamente en la toma de acciones para controlar su transmisión.

La contaminación viral de alimentos puede ocurrir durante toda la cadena de producción alimentaria: en etapas previas a la cosecha, durante esta o durante el procesamiento. La contaminación previa a la cosecha puede ocurrir por contacto de los alimentos con agua o abono contaminados, escenario de riesgo principalmente para moluscos, frutas y verduras. En nuestro país, se ha descrito la presencia de diversos virus entéricos en aguas superficiales de distintas regiones, que constituyen recursos hídricos que podrían actuar como fuente de contaminantes (Blanco Fernández *et al.*, 2011; Blanco Fernández *et al.*, 2012; Blanco Fernández *et al.*, 2012; Poma *et al.*, 2012; Wassaf *et al.*, 2014). Los virus entéricos pueden estar presentes en los alimentos sin alterar sus propiedades organolépticas y aun cuando los estándares bacterianos indicaran buena calidad microbiológica. Además, debido a sus bajas dosis infectivas, pocas partículas virales son necesarias para generar la infección (Teunis *et al.*, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) han señalado como virus por priorizar en la prevención de brotes asociados a alimentos a norovirus (NoV) y al virus de hepatitis A (HAV) (FAO/WHO, 2008, 2012). El virus de hepatitis E (HEV) es otro virus de interés dado su potencial riesgo zoonótico (Yugo y Meng, 2013). Estos virus son transmitidos por la ruta fecal-oral, principalmente por la ingesta de comida o agua contaminada.

NoV pertenece al género *Norovirus* de la familia *Caliciviridae* y es el agente etiológico más frecuente de gastroenteritis que afecta a personas de todas las edades alrededor del mundo. NoV ocasiona brotes de gastroenteritis principalmente en los meses fríos de climas templados, aunque su circulación es continua a lo largo del año. La infección por NoV tiene un período de incubación de entre 24 y 48 horas y se caracteriza por un comienzo agudo con náuseas,

vómitos, calambres abdominales, mialgias y diarrea no sanguinolenta. A menudo, los casos primarios de un brote resultan de la exposición a comida o agua contaminados, mientras que la diseminación persona a persona a partir de los casos primarios propagarían la epidemia. Además, la transmisión a través del vómito por aerosoles o de superficies, su baja dosis infecciosa, su excreción prolongada en heces, su alta estabilidad en el ambiente y la posible reinfección ante una nueva exposición facilitan su alta diseminación en lugares cerrados (Siebenga *et al.*, 2009).

El HAV pertenece al género *Hepatovirus* de la familia *Picornaviridae*. La infección producida por este virus tiene un curso agudo sin pasar a la cronicidad. En niños, la infección con HAV suele ser asintomática, mientras que en adultos el desarrollo de la enfermedad es más común. Una de las complicaciones más severas de estas infecciones son las hepatitis fulminantes, que pueden llevar a la necesidad de trasplante debido a la falla hepática. La prevalencia de HAV varía entre diferentes regiones del mundo, es especialmente alta en los países en vías de desarrollo con malas condiciones sanitarias y falta de acceso al agua potable. Los números de casos han disminuido notablemente en los países con programas de inmunización. En nuestro país, la vacuna contra HAV se incorporó al calendario de vacunación en junio de 2005. Desde entonces, se comenzó a observar un descenso en la notificación de casos de hepatitis A, de 6,86 casos cada 100.000 habitantes en 2005 a 0,22 casos cada 100.000 habitantes en el 2010 (Ministerio de Salud, 2011).

El HEV se clasifica en el género *Hepevirus* de la familia *Hepeviridae*. Es agente causal de hepatitis aguda, con mayor prevalencia en regiones sin acceso a agua potable segura y con malas condiciones higiénico-sanitarias. Sin embargo, casos esporádicos y autóctonos también se registran en países industrializados de Europa, Asia y América del Norte. Además de infectar humanos, se ha identificado la presencia de HEV en numerosas especies de animales salvajes y domésticos. La hepatitis E es una enfermedad zoonótica que puede ser transmitida al hombre desde el cerdo (carne y derivados) (Bouwknegt, Lodder-Verschoor, van der Poel, Rutjes, y de Roda Husman, 2007; Van der Poel, 2014).

La FAO-OMS convocó a un comité de expertos en virología alimentaria y ha emitido un documento cuyo objetivo es trazar los lineamientos sobre cómo prevenir o minimizar la presencia de virus entéricos humanos en alimentos (FAO/WHO, 2012). Entre los puntos más importantes, recomienda:

- Identificar en qué pasos de la producción primaria de alimentos ocurre la contaminación para poder controlarla y reducirla.
- Diseñar o utilizar equipamiento y facilidades cuyas superficies puedan limpiarse y desinfectarse.
- Controlar el procesamiento de los alimentos para prevenir la contaminación viral.
- Brindar guías específicas para la notificación de eventos de ETA y control sanitario posterior al brote en los establecimientos afectados.
- Prevenir la contaminación por manipulación de alimentos por parte de trabajadores infectados o por una mala higiene personal.
- Asesorar a productores de alimentos para la prevención de la contaminación viral.

Comprendido dentro de varios de estos puntos se encuadra la necesidad de implementar técnicas de laboratorio para la detección de la contaminación viral.

Países miembros de la Unión Europea, organizaciones internacionales, en especial la OMS y el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y laboratorios de investigación internacionales han creado redes de vigilancia integrada para el monitoreo y detección de agentes virales en brotes de ETA y se ocupan del desarrollo y validación de la metodología (Verhoef *et al.*, 2011).

En general, la detección de contaminación viral en alimentos depende del éxito de tres etapas sucesivas: la extracción y concentración del virus de la matriz del alimento, la extracción de ácidos nucleicos del concentrado viral y la detección de secuencias virales específicas en los ácidos nucleicos extraídos. Sin embargo, no hay un consenso generalizado sobre el procedimiento para emplear durante la primera etapa. El procesamiento de muestras sólidas generalmente comienza con una etapa de lavado o elución, u homogeneización, seguido

de un paso de concentración. Entre los métodos de concentración utilizados pueden contarse la adsorción-elución, precipitación diferencial, ultracentrifugación y ultrafiltración. La estandarización de los métodos de extracción y concentración de virus desde las matrices alimentarias necesitan la inclusión de controles virales que permitan estimar la eficiencia de recuperación viral de los procesos. Con ese objetivo, se ha propuesto el uso de virus no patógenos con características estructurales similares a los virus entéricos humanos pero que no estén naturalmente presentes en las muestras a evaluar.

La detección de los ácidos nucleicos virales mediante el empleo de las técnicas de (q)PCR o RT-(q)PCR es el *gold standard* para la detección de contaminación viral en alimentos. Esto se debe a la alta sensibilidad de la técnica y a la imposibilidad de cultivar muchos de los virus responsables de ETA. Sin embargo, sus limitaciones deben ser tenidas en cuenta: la imposibilidad de distinguir infectividad de las partículas virales y la posibilidad de contaminación cruzada durante las detecciones (Stals, Van Coillie, y Uyttendaele, 2013). La validación de estos ensayos hace necesaria la inclusión de diversos controles, entre los que deben incluirse un control del proceso (virus que se siembra artificialmente en la muestra) y un control de amplificación interno o externo de la reacción (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012). Además, para la confirmación de una muestra positiva se ha sugerido el uso de otra (q)PCR dirigida a otra secuencia específica del mismo virus (Baert *et al.*, 2011).

El presente trabajo se enmarca en los objetivos de los Premios Senasa, particularmente dentro del área de la calidad e inocuidad agroalimentaria, aspectos contenidos dentro de los lineamientos estratégicos de los núcleos socio productivos estratégicos en el área agroindustria que fueron definidos en el Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación 2012-2015.

El objetivo es desarrollar un sistema de detección viral en alimentos, dirigido principalmente hacia NoV, HAV y HEV. Todos los protocolos emplearán una estrategia que incluirá la liberación y concentración de las partículas virales de las matrices de alimentos (frutas, hortalizas, carne) seguidas de la detección molecular de los virus. Como virus controles se utilizarán PP7, un bacteriófago con genoma ARN de *Pseudomonas aeruginosa* y el virus humano adenovirus serotipo

3 (huAdV3), con genoma ADN. Particularmente, en el corto plazo se busca contar con protocolos estandarizados para la liberación, concentración y detección de virus entéricos desde las distintas matrices alimentarias, mientras que, como objetivo final, se espera poder realizar la transferencia de la metodología a organismos de control a cargo de la vigilancia alimentaria o ambiental.

Metodología

Virus control y células

Como control interno de los procesos evaluados se utilizarán PP7 (ATCC 15692-B2), un bacteriófago con genoma ARN de *Pseudomonas aeruginosa*. Para la propagación del bacteriófago se utilizará *P. aeruginosa* (ATCC15692). También se usará el virus humano adenovirus serotipo 3 (huAdV3). Los adenovirus son virus con genoma ADN que han sido sugeridos como posibles indicadores de contaminación fecal viral (Wyn-jones *et al.*, 2011). Para el cultivo de huAdV3 se utilizarán las células A549.

Todos los alimentos evaluados se sembrarán artificialmente con una cantidad conocida de PP7 y AdV para el posterior cálculo del porcentaje de recuperación viral. Cada uno de los protocolos que se detallan a continuación se evaluará por triplicado.

Extracción y concentración de virus entéricos de frutas blandas y verduras de hoja

Para el análisis de frutas y vegetales, se utilizarán protocolos descriptos anteriormente y sus modificaciones (Butot *et al.*, 2007; Summa, von Bonsdorff, y Maunula, 2012). Estos protocolos incluyen la disgregación mecánica y enzimática de las frutas y hortalizas, seguida de una elusión en buffer alcalino de los virus que puedan estar presentes en los alimentos. Los virus luego son concentrados por precipitación con polietilenglicol y una posterior extracción con cloroformo-butanol. Los concentrados virales se guardarán a -70 °C.

Extracción y concentración de virus entéricos de moluscos bivalvos

Para el análisis de moluscos se utilizarán técnicas previamente descriptas y sus modificaciones (Sincero

et al., 2006). Brevemente, una alícuota de tejido de moluscos (tracto digestivo para moluscos grandes como almejas u ostras) se pone en contacto con un buffer de elusión alcalino y se agita hasta completar la homogeneización. Los virus luego son concentrados por precipitación con polietilenglicol y una posterior extracción con cloroformo-butanol. Los concentrados virales se guardarán a -70 °C.

Extracción y concentración de HEV de carne de cerdo y derivados

Para el análisis de carnes y chacinados se usarán protocolos descriptos anteriormente (Bouwknegt *et al.*, 2007). Brevemente, se realizará un macerado de porciones estandarizadas del alimento, ya sea de manera manual o con homogeneización mecánica. Se evaluará el uso de disrupción enzimática. Los concentrados virales se almacenarán a -70 °C.

Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizará un kit comercial de extracción de ARN: Qiagen Viral RNA Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La eficiencia de extracción de este kit ha sido evaluada y comparada con otros métodos de extracción de ARN en trabajos previos. Se ha demostrado una alta eficiencia de extracción y eliminación de contaminantes (Poma *et al.*, 2013).

Detección y cuantificación de los virus controles (fago PP7 y adenovirus)

El bacteriófago PP7 se cuantificará por RT-(q)-PCR como copias genómicas por microlitro como medida de partículas virales totales de acuerdo con lo descripto previamente (Poma *et al.*, 2013). También se evaluarán partículas infectivas mediante la titulación de unidades formadoras de placas por mililitro de acuerdo con la técnica de doble capa de agar (Cormier y Janes, 2014).

El HuAdV se cuantificará por (q)-PCR como copias genómicas por microlitro como medida de partículas virales totales según lo descripto previamente (Jothikumaret *et al.*, 2005). También se evalúan partículas infectivas por dosis infectiva 50 % en cultivo de tejidos (DICT50).

Detección de NoV, HAV y HEV por RT-(q)PCR

La detección de NoV, HAV y HEV se realizará mediante RT-(q)PCR. No se ha desarrollado hasta el momento un sistema de cultivo para NoV y HEV, mientras que el cultivo de HAV no es aconsejable como técnica de detección de rutina ya que se necesita de la adaptación del virus al cultivo. Los ensayos de (q)PCR ya han sido descritos previamente y están dirigidos a la polimerasa viral dependiente de ARN de NoV (Jothikumar, Lowther *et al.*, 2005), la región 5' no traducible de HAV (Jothikumar *et al.*, 2006) y el marco abierto de lectura 2 de HEV (Jothikumar *et al.*, 2006).

Conclusión

Los agentes virales causales de ETA adquieren cada vez más reconocimiento a nivel mundial en todos los grupos etarios. El contacto con heces humanas o animales, agua superficial o efluentes cloacales contaminados con virus son las principales vías de exposición, en especial aquellos que se usan para irrigación, abono o para el cultivo de moluscos. La toma de conciencia por parte de la población acerca de las fuentes de contaminación viral, especialmente aquellos individuos involucrados en la producción o manipulación de alimentos, es fundamental para la prevención de brotes de ETA causadas por virus.

Los métodos para la detección de estos patógenos en el ambiente y alimentos deben todavía mejorarse y estandarizarse para poder vigilar la presencia y supervivencia en el ambiente, así como para controlar la inactivación de virus durante el tratamiento de efluentes o para dilucidar el origen de brotes de ETA no bacterianas. Además, resulta necesario disponer de métodos cuantitativos confiables para poder realizar análisis de riesgo y evaluar el potencial real de los virus ambientales de generar enfermedad en la población.

Se espera poder contar, al final del proyecto, con métodos de detección viral en alimentos que incluyan la elusión y concentración de virus a partir de matrices sólidas (verduras de hoja, frutas blandas, moluscos bivalvos y carne) y su posterior detección molecular por (q)PCR o RT-(q)PCR. Todos los métodos propuestos incluirán controles virales para evaluar el desarrollo

de los procesos y la amplificación de ácidos nucleicos. También se incluirán controles virales cuya infectividad podrá evaluarse mediante el cultivo in vitro. Se busca obtener métodos con una eficiencia de recuperación viral adecuada, de fácil procedimiento y baja variabilidad. Se espera también poder transferir estas metodologías a organismos gubernamentales para el control de alimentos o para ayudar a dilucidar el origen de brotes de ETA que no sean causadas por agentes bacterianos.

Bibliografía

- Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L. y M. Uyttendaele (2011), "Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health?", *International Journal of Food Microbiology*, 151 (3), pp. 261-9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro. 2011.09.013.
- Blanco Fernández, M. D., Torres, C., Martínez, L. C., Giordano, M. O., Masachessi, G., Barril, P. A., Isa, M. B., Campos, R. H., Nates, S. V., y V. A. Mbayed (2011), "Genetic and evolutionary characterization of norovirus from sewage and surface waters in Córdoba City, Argentina", *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 11 (7), pp. 1631-7. doi:10.1016/j.meegid. 2011.06.005.
- Blanco Fernández, M. D., Torres, C., Poma, H. R., Riviello-López, G., Martínez, L., Cisterna, D., Rajal, V., Nates, S. V. y V. A. Mbayed (2012), "Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio-temporal diffusion processes", *The Science of the Total Environment*, 437 (437), pp. 262-9. doi:10.1016/j.scitotenv. 2012.08.033.
- Blanco Fernández, M. D., Torres, C., Riviello-López, G., Poma, H. R., Rajal, V. B., Nates, S., Cisterna, D. M., Campos, R. H. y V. A. Mbayed (2012), "Analysis of the circulation of hepatitis A virus in Argentina since vaccine introduction", *Clinical*

- Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18 (12), E548–51. doi:10.1111/1469-0691.12034
- Bouwknegt, M., Lodder-Verschoor, F., van der Poel, W. H. M., Rutjes, S. A., y A. M. de Roda Husman (2007), “Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands”, *Journal of Food Protection*, 70 (12), pp. 2889-2895.
- Butot, S., Putallaz, T. y G. Sánchez (2007), “Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables”, *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (1), pp. 186-92. doi:10.1128/AEM.01248-06.
- Centers for Control Disease and Prevention (2010), “Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 2007”, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59 (31).
- Centers for Control Disease and Prevention (2013), “Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2009-2010”, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62 (1), 91–3. doi:10.1016/j.annemergmed.2013.04.001.
- Cormier, J. y M. Janes (2014), “A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS2”, *Journal of Virological Methods*, 196, 86–92. doi:10.1016/j.jviromet.2013.10.034.
- Eurosurveillance Editorial Team (2012), “The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010”, *EFSA Journal*, 10(3) (1003), 2597. doi:10.2903/j.efsa.2012.2597.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization (2008), “Viruses in food: scientific advice to support risk management activities. Meeting Report”, *Microbiological Risk Assessment Series*, 13.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization (2012), “JOINT FAO / WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION Thirty-fifth Session REPORT OF THE FORTY-THIRD SESSION OF THE CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE”. *Codex Alimentarius Commission* (July), pp. 2-7.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Hill, V. R., Lu, X., Sobsey, M. D. y D. D. Erdman (2005), Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41, 71 (6), pp. 3131-3136. doi:10.1128/AEM.71.6.3131.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Robertson, B. H., Meng, X. J. y Hill, V. R. (2006), “A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus”, *Journal of Virological Methods*, 131 (1), pp. 65-71. doi:10.1016/j.jviromet.2005.07.004.
- Jothikumar, N., Lowther, J. A., Henshilwood, K., Lees, D. N., Hill, V. R. y Vinje, J. (2005), Rapid and Sensitive Detection of Noroviruses by Using TaqMan-Based One-Step Reverse Transcription-PCR Assays and Application to Naturally Contaminated Shellfish Samples, 71 (4), pp. 1870-1875. doi:10.1128/AEM.71.4.1870.
- Poma, H. R., Gutiérrez Cacciabue, D., Garcé, B., Gonzo, E. E. y V. B. Rajal (2012), “Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters”, *The Science of the Total Environment*, 433, pp. 98-109. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.019.
- Poma, H. R., Rajal, V. B., Blanco Fernández, M. D., Barril, P. A., Giordano, M. O., Masachessi, G., Martinez, L. C., Isa, M. B., Freire, M. C., Lopez-Riviello, G., Cisterna, D. M., Nates S. V., y V. A. Mbayed (2013), “Evaluation of concentration efficiency of the Pseudomonas aeruginosa phage PP7 in various water matrixes by different methods”, *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (3), pp. 2565-76. doi:10.1007/s10661-012-2731-9.

- República Argentina, Ministerio de Salud de la Nación, Secretaria de Promoción y Programas Sanitarios (2011), *Boletín Integrado de Vigilancia*, N.º 95 SE43, pp. 7-16.
- Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., Ruggeri, F. M., Sellwood, J., Nasser, A., Nascimento, M. S. J., D'Agostino, M., Santos, R., Saiz, J. C., Rzezutka, A., Bosch, A., Girones, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovac, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., von Bonsdorff, C., de Roda Husman, A. M., Hernandez, M. y W. H. M. van der Poel (2012), "Virus hazards from food, water and other contaminated environments", *FEMS Microbiology Reviews*, 36, pp. 786-814. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00306.x
- Siebenga, J. J., Vennema, H., Zheng, D.-P., Vinjé, J., Lee, B. E., Pang, X.-L., Ho, E. C. M., Lim, W., Choudekar, A., Broor, S., Halperin, T., Rasool, N. B. G., Hewitt, J., Greening, G. E., Jin, M., Duan, Z., Lucero, Y., O'Ryan, M., Hoehne, M., Schreier, E., Ratcliff, R. M., White, P. A., Iritani, N., Reuter, G. y M. Koopmans (2009), "Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007", *The Journal of Infectious Diseases*, 200 (5), pp. 802-2. doi:10.1086/605127
- Sincero, T. C. M., Levin, D. B., Simões, C. M. O. y C. R. M. Barardi (2006), "Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*)", *Water Research*, 40 (5), pp. 895-902. doi:10.1016/j.watres.2005.12.005
- Stals, A., Van Coillie, E. y M. Uyttendaele (2013), "Viral genes everywhere: public health implications of PCR-based testing of foods", *Current Opinion in Virology*, 3 (1), pp. 69-73. doi:10.1016/j.coviro.2012.11.003
- Summa, M., von Bonsdorff, C.-H. y L. Maunula (2012), "Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries", *Journal of Virological Methods*, 183 (2), pp. 154-60. doi:10.1016/j.jviromet.2012.04.006.
- Teunis, P. F. M., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J. y R. L. Calderon (2008), *Norwalk Virus: How Infectious is It?*, 1476 (April), pp. 1468-1476. doi:10.1002/jmv.
- Van der Poel, W. H. M. (2014), "Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission", *Current Opinion in Virology*, 4, pp. 91-6. doi:10.1016/j.coviro.2014.01.006.
- Verhoef, L., Kouyos, R. D., Vennema, H., Kroneman, A., Siebenga, J., van Pelt, W. y M. Koopmans (2011), "An Integrated Approach to Identifying International Foodborne Norovirus Outbreaks", *Emerging Infectious Diseases*, 17 (3), pp. 412-418. doi:10.3201/eid1703.100979.
- Wassaf, M. G. M., Pisano, M. B., Barril, P. A., Elbarcha, O. C., Pinto, M. A., Mendes de Oliveira, J., Di Giusto, P., Nates, S. V. y V. E. Ré (2014), "First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey", *Journal of Clinical Virology*, 61 (3), pp. 334-339. doi:10.1016/j.jcv.2014.08.016.
- Wyn-jones, A. P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, S., Höller, C., de Roda Husman, A. M., Kay, D., Kozyra, I., Lopez-Pila, J., Muscillo, M., Nascimento, M. S. J., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szewzyk, R. y M. Wyer (2011), "Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters", *Water Research*, 45 (3), pp. 1025-38. doi:10.1016/j.watres.2010.10.015.
- Yugo, D. M. y X.-J. Meng, (2013), "Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10 (10), pp. 4507-33. doi:10.3390/ijerph10104507.