

## Artículo original

### Detección de norovirus y rotavirus en ostras comercializadas en Cumaná, Venezuela

Zhorymar Zambrano<sup>a</sup>, Antonio Maldonado<sup>b,\*</sup>, Jesús Bastardo<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre, Venezuela. <sup>b</sup>Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

Recibido 8 de abril de 2011; aceptado 3 de septiembre de 2011

**Resumen:** Los brotes de gastroenteritis en humanos han sido frecuentemente asociados con el consumo de moluscos bivalvos. En este estudio se analizaron 15 mezclas de muestras de tejido digestivo de ostras (*Pinctada imbricata*) comercializadas en la avenida Perimetral de Cumaná, estado Sucre, Venezuela, mediante dos métodos de procesamiento y dos métodos de extracción de ácidos nucleicos, con el fin de detectar por Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, el ARN de norovirus y rotavirus. Además se utilizaron cinco pares de oligonucleótidos para seleccionar el mejor en la detección de los virus. Norovirus fue detectado en 13 de las 15 mezclas de muestras con la combinación de los métodos de procesamiento A y de extracción de ácidos nucleicos B utilizando el par de oligonucleótidos JV12 y JV13. Esta combinación de métodos resultó ser la más eficaz para la detección de norovirus mediante RT-PCR. No obstante, rotavirus no se detectó en el tejido digestivo de las ostras analizadas con ninguna de las combinaciones de métodos, ni con ninguno de los pares de oligonucleótidos utilizados. La elevada presencia de norovirus en las ostras mostró su potencial de servir como vehículo de infecciones por virus entéricos.

**Palabras clave:** norovirus, rotavirus, detección, ostras.

### Norovirus and rotavirus detection in oysters commercialized in Cumana, Venezuela

**Abstract:** Gastroenteritis outbreaks in humans have been often associated with the ingestion of bivalve mollusks. In this study, 15 mixtures of samples of the digestive tissue of oysters (*Pinctada imbricata*), commercialized at the Avenida Perimetral in Cumana, Sucre State, Venezuela, were analyzed through two processing methods and two nucleic acid extraction methods, with the purpose of detecting norovirus and rotavirus RNA by the Polymerase Chain Reverse Transcription Method. Five pairs of oligonucleotids were also used, to select the best one for virus detection. Norovirus was detected in 13 of the 15 mixtures of samples using a combination of processing method A and nucleic extraction method B, and the JV12 and JV13 oligonucleotid pair. This combination of methods resulted as the most efficient for norovirus detection through PCR-RT. Nevertheless, rotavirus was not detected in the digestive tissue of any of the oysters analyzed with any of the combination of methods, or any of the oligonucleotid pairs used. The high presence of norovirus in the oysters showed their potential for serving as carriers of enteric virus infections.

**Keywords:** norovirus, rotavirus, detection, oysters.

\* Correspondencia:  
E-mail: mcheo@yahoo.com

#### Introducción

Los productos extraídos del mar, como peces y moluscos, constituyen una proporción muy importante de los recursos alimenticios a escala mundial [1]. Sin embargo, las constantes descargas de aguas residuales en las zonas costeras han traído como consecuencia la disminución de la calidad sanitaria del agua donde se desarrollan estos organismos, contaminándolos con patógenos humanos como bacterias o virus [2-4]. Esta situación constituye un riesgo potencial para la salud pública derivado del consumo directo de los

organismos marinos como moluscos bivalvos, que por ser organismos filtradores y poseer un elevado ritmo de bombeo, pueden convertirse en verdaderos concentradores biológicos capaces de acumular virus muy rápidamente [2,5].

Entre los virus patógenos para el humano, que pueden ser transmitidos por los moluscos bivalvos, se encuentran los virus entéricos (hepatitis A, poliovirus, rotavirus, norovirus, astrovirus), los cuales son muy resistentes al ambiente ácido del estómago, a las condiciones básicas del intestino delgado y a las enzimas proteolíticas [6]. De igual modo son

resistentes a las condiciones adversas del medio ambiente (p.e. temperatura, luz, humedad) [7]. La gastroenteritis viral aguda es una enfermedad muy común que puede ser ocasionada por el consumo de ostras contaminadas con virus entéricos, fundamentalmente norovirus y/o rotavirus.

Los norovirus han sido identificados, tanto en aguas recreacionales como en tejidos de crustáceos marinos y los brotes de gastroenteritis en humanos han sido frecuentemente asociados con el consumo de ostras crecidas en aguas contaminadas por estos virus [7-10]. Por su parte, los rotavirus se han detectado en la superficie de las aguas en todo el mundo y también en moluscos bivalvos [11]. A nivel mundial se han realizado estudios para detectar la presencia de ambos virus en moluscos bivalvos [11-14] y en Venezuela se han realizado estudios sobre detección de los mismos, pero en muestras de heces de humanos y animales [15-24]. Sin embargo, en el estado Sucre no existe reporte alguno referente a la presencia de estos agentes virales en muestras de organismos marinos.

Actualmente, la técnica estándar más utilizada en la detección de virus en muestras de moluscos bivalvos ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), que sin embargo, a pesar de su sensibilidad y especificidad, puede ser afectada por inhibidores presentes en esas muestras [25]. Algunos investigadores han dedicado estudios a la búsqueda de metodologías que permitan eliminar estos agentes inhibidores, sin embargo, aún no se ha podido desarrollar un único método que sea fácil y eficiente para múltiples virus [25-28]. Las metodologías desarrolladas hasta el momento están basadas en procesos fisicoquímicos que permiten concentrar y purificar los virus a partir de la muestra de tejido y básicamente constan de tres etapas: 1) liberación de los virus de los tejidos, 2) concentración de las partículas virales y 3) extracción del ácido nucleico (ARN) [29].

Debido a la falta de información en esta región del país sobre la presencia de norovirus y rotavirus en organismos marinos, se realizó una investigación en ostras, por ser moluscos que normalmente se consumen crudos. Para ello se investigó molecularmente la presencia del ARN de norovirus y rotavirus en tejido digestivo de ostras expandidas para el consumo humano en la avenida Perimetral de Cumaná, estado Sucre, Venezuela y se comparó la efectividad de diferentes métodos para el procesamiento de las muestras y la extracción de los ácidos nucleicos de los virus estudiados.

## Materiales y métodos

**Obtención de muestras:** Las ostras (*Pinctada imbricata*) se obtuvieron crudas, por docenas, en los puestos de consumo ubicados en la avenida Perimetral, sector El Monumento de Cumaná, donde fueron desbulladas y servidas por los mismos expendedores. Las muestras fueron trasladadas en envases de vidrio estériles bajo refrigeración, en cava, al laboratorio, donde se procedió a obtener por disección los estómagos y divertículos digestivos. Cada 2 g de estos tejidos representó una muestra, utilizando para este estudio

un total de 120 muestras, de las cuales se utilizaron 60 en cada uno de los métodos de procesamiento empleados. Todas las muestras se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Nuair Ultralow Freezer, Kyongkido, Korea del Sur) hasta el momento de la detección del ARN viral.

**Detección de ARN de rotavirus y norovirus:** Para el análisis de las muestras de ostras se utilizaron diferentes métodos de procesamiento y de extracción del ácido nucleico, seguidos de la amplificación por RT-PCR y visualización con electroforesis en geles de agarosa.

**Procesamiento de muestras para ambos virus:**

**Método A:** Cada muestra se colocó en el envase de un homogeneizador manual tipo Dounce (Potter Elvehjem Dounce, Sigma, EUA) que contenía 10 mL de buffer fosfato salino (PBS; pH 7,4) y se homogeneizó a la máxima velocidad ( $2.400\text{ min}^{-1}$ ) en un equipo IKA, modelo RW 20 DZM.n, EUA. El tejido se colocó en tubos de centrifuga de 50 mL y luego se agregaron 6 mL de una solución de cloroformo-butanol (1:1, vol/vol) y 175  $\mu\text{L}$  de Cat-Floc T (Sigma). Se agitó por inversión durante 5 minutos y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a  $13.500\text{ xg}$  (centrifuga refrigerada IEC, modelo B-22M, EUA) durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , para luego recuperar la fase acuosa y agregarle 6,5 mL de una solución de polietilenglicol PEG 6.000 (24%) con cloruro de sodio ( $1,2\text{ mol L}^{-1}$ ). Seguidamente se agitó por 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó durante 20 minutos a  $11.000\text{ xg}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 3 mL de agua destilada [25].

**Método P:** Cada muestra se homogeneizó en 10 mL de buffer glicina estéril  $0,25\text{ mol L}^{-1}$ , pH 10, en un homogeneizador manual. La mezcla resultante se colocó en frascos de vidrio estériles y se agitó con magneto durante 10 minutos. Las mismas se transfirieron a tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugaron a  $2.500\text{ xg}$  por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se ajustó a pH 7,4 [2].

**Extracción de ácidos nucleicos (ARN):**

**Método A:** Se tomaron 1,5 mL de la muestra procesada y se añadió proteinasa K ( $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , Sigma) en buffer PK, dejándola actuar durante 30 minutos a  $56^{\circ}\text{C}$ . Los ácidos nucleicos fueron extraídos con una solución de fenol-agua-cloroformo (68:18:14) y luego precipitados con etanol 100% frío y acetato de sodio ( $3\text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,2). Se dejó por 12 horas a  $-40^{\circ}\text{C}$  y una vez finalizado este proceso se centrifugó durante 30 minutos a  $15.000\text{ xg}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado obtenido se resuspendió en agua a  $56^{\circ}\text{C}$  y se agregó bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB, por sus siglas en inglés) (Sigma) y cloruro de sodio (NaCl) a concentraciones finales de 1,4% y  $0,11\text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y luego se centrifugó a  $15.000\text{ xg}$  durante 30 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . El nuevo precipitado se resuspendió en NaCl ( $1\text{ mol L}^{-1}$ ) y fue sometido a una última precipitación, para lo cual se le agregó etanol 100% frío y acetato de sodio ( $3\text{ mol}$

L<sup>-1</sup>, pH 5,2). Se dejó reposar durante 12 horas a -40 °C y se centrifugó a 14.000 xg durante 30 minutos a 4 °C. El precipitado fue lavado con etanol 70% frío y se recuperó por centrifugación. Se dejó secar durante 15 minutos con los tubos abiertos y se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas [25].

**Método B:** Se prepararon tubos de reacción colocando 900 µL de buffer L6 (tiocianato de guanidina, Tris-HCl, EDTA y Tritón x-100) y 50 µL de sílica estéril, a los que se agregaron 50 µL de la muestra, se agitaron vigorosamente por 5 segundos y se dejaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agitaron de nuevo y se centrifugaron por 15 segundos a 13.500 xg. Luego se realizaron 5 lavados: dos veces con buffer L2 (tiocianato de guanidina y Tris HCl), dos con etanol al 70% frío y una vez con acetona 100% fría. Luego se descartó la solución de lavado y los tubos abiertos se dejaron secar a 56 °C en un baño de agua circulante (SWB 5050 Shaking Water Bath, Labnet, National Company, EUA) por 10 minutos. Se agregaron 40 µL de agua libre de nucleasas para resuspender el precipitado, los tubos cerrados se agitaron y se incubaron a 56 °C en un baño de agua. Se centrifugaron a 13.500 xg durante 2 minutos a 4 °C y se conservó el sobrenadante [30].

**RT-PCR:** Para la amplificación de los ácidos nucleicos extraídos se utilizaron varios pares de oligonucleótidos [12,25,31-33] dependiendo del virus a identificar, los cuales reconocen y amplifican diferentes regiones del genoma de cada uno de ellos (Tabla 1). Debido a que se utilizaron varios métodos de procesamiento y de extracción, se prepararon dos lotes de 15 mezclas de 20 µL que contenían 5 µL de cada muestra (4 muestras/mezclas) con el fin de reducir el número

de reacciones de RT-PCR. Se utilizó el kit SuperScript™ One Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, EUA), para preparar tubos de reacción con 25 µL del buffer 2X Reaction Mix, 2 µL (0,2 µmol L<sup>-1</sup>) de los oligonucleótidos sentido y antisentido, 1 µL de la RT/Platinum® Taq mix, 15 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL de la muestra de ARN. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAMP® PCR System 9.700 (Applied Biosystems, EUA) siguiendo el programa establecido para cada virus, que consta de tres etapas: 1) retrotranscripción (RT) a 48 °C durante 45 minutos (rotavirus) o 1 hora (norovirus) y 94 °C por 2 minutos para inactivación enzimática 2) amplificación (PCR) la cual se llevó a cabo realizando 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 42 °C (norovirus) o 55 °C (rotavirus) por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto; 3) extensión final a 72 °C durante 10 minutos [25].

El control positivo para norovirus se preparó amplificando mediante RT-PCR la región que codifica la polimerasa de calicivirus de una muestra aislada en cerdos en el Laboratorio de Biología de Virus del Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), utilizando los cebadores JV12 y NV35 [32,34]. Luego, este amplificado fue clonado en el plásmido pCR®2.1-TOPO® y expandido en células de *E. coli* transformadas utilizando el sistema TOPO TA cloning® kit (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA). Dicho control recibió el mismo tratamiento que las muestras. Como control negativo se utilizaron células de *E. coli* no transformadas.

**Electroforesis en gel de agarosa:** Los productos amplificados para rotavirus y norovirus fueron analizados a través de electroforesis en gel de agarosa (Sigma) al 2% teñido con

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de norovirus y rotavirus humanos en muestras de ostras mediante RT-PCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Localización	Amplicón obtenido (pb)	Virus amplificado	Ref.
JV12 <sup>a</sup>	ATACCACTATGATGCAGATTA	4552-4572			
JV13 <sup>b</sup>	TCATCATCACCATAGAAAGAG	4858-4878	326	NV	32
NVp36 <sup>a</sup>	ATAAAAGTTGGCATGAACA	4487-4505			
NVp35 <sup>b</sup>	CTTGTTGGTTTGAGGCCATAT	4936-4956	470	NV	25
GLPSG1 <sup>a</sup>	GAIGGICTCCATCWGGITT	4715- 4737			
GLPSG2 <sup>a</sup>	GARGGICTICITCKGGIGTI	4715- 4737	154	NV (GI) NV (GII) NV (GI y GII)	33
YGDD1 <sup>b</sup>	ACIATYTCRTCATCICCRTA	4869- 4847			
p289 <sup>b</sup>	TGACAATGTAATCATCACCATA	4865-4886			
p290 <sup>a</sup>	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	4568-4590	319 (NV) 300 (RV)	NV y RV	12
CON1 <sup>a</sup>	TTGCCACCAATTCAGAAT	666-685			
CON2 <sup>b</sup>	ATTTCGGACCATTTATAA	862-881	211	RV	31

<sup>a</sup> sentido, <sup>b</sup> antisentido, NV: norovirus, GI: genogrupo I, GII: genogrupo II, RV: rotavirus. Ref: referencia bibliográfica.

bromuro de etidio ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Sigma). El marcador de peso molecular utilizado fue 100 pb (Promega, EUA). La corrida electroforética se realizó a 85 V por 45 minutos. Finalmente, los geles se colocaron en una cámara de luz ultravioleta (Gel Doc™ XR System, BioRad, EUA) para observar y fotografiar los amplicones, y luego fueron analizados para determinar el peso molar de cada uno por comparación con el control positivo y el marcador.

## Resultados y discusión

Norovirus se detectó en 13 de las 15 mezclas de muestras analizadas por RT-PCR con la combinación de los métodos de procesamiento A [25] y de extracción B [30], utilizando los oligonucleótidos JV12 y JV13 (Figura 1), lo cual sugiere que esta combinación de métodos pudo haber permitido una mejor liberación, concentración y extracción del ARN de los virus presentes en las muestras de ostras (Tabla 2).

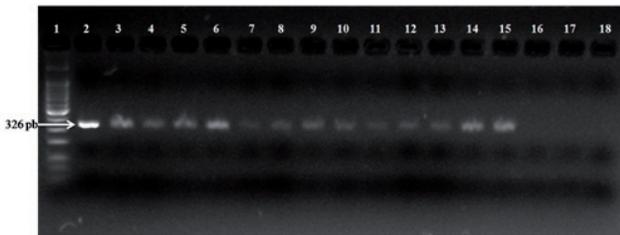


Figura 1. Productos de la RT-PCR para norovirus extraídos con el método de procesamiento “A” y extracción “B”, utilizando los oligonucleótidos JV12 y JV13. [carril 1, marcador de peso molecular; 3 al 17, mezclas de muestras; 2 y 18, control positivo y negativo, respectivamente].

Tabla 2. Detección de norovirus en muestras de ostras mediante la aplicación de la RT-PCR, utilizando diferentes oligonucleótidos y distintos métodos de procesamiento y extracción.

Procesamiento	Extracción	JV12- JV13	NVp35- NVp36	p289- p290	GLPS- YGDD1
A	A	-	-	-	-
	B	+	-	-	-
P	A	-	-	-	-
	B	-	-	-	-

A: Atmar *et al.* (1995), P: Pina *et al.* (1998), B: Boom *et al.* (1990).

El método de procesamiento A tiene como característica principal la utilización de reactivos como el Cat-Floc y PEG 6000: el primero se utiliza para facilitar la eliminación de los restos de tejidos de la ostra mediante su aglutinación, mientras que el segundo es usado para precipitar proteínas, entre las cuales están presentes las partículas virales. Con el método de procesamiento P [2], no se obtuvieron resultados positivos, posiblemente debido a que muchas partículas virales quedaron todavía adheridas al tejido, reduciendo así la concentración necesaria de éstas para la posterior extracción de su ácido nucleico.

En cuanto a los métodos de extracción de ácidos nucleicos, el método B [30] se basó en las propiedades de lisis e

inactivación de nucleasas que tiene el agente tiocianato de guanidina, junto a las propiedades de unión al ácido nucleico que tienen las partículas de sílica en presencia de dicho agente. Por otra parte, el método de extracción A [25] estuvo basado en la digestión de las proteínas con proteinasa K y SDS, la extracción del ácido nucleico con fenol-cloroformo, eliminación de posibles inhibidores con CTAB y precipitación con posterior purificación del ácido nucleico con etanol. Los resultados obtenidos en esta investigación permiten presumir que, el método B de extracción de ácidos nucleicos fue más eficaz por consumir poco tiempo de trabajo, mientras que el método A, al constar de más etapas, es un proceso más largo y laborioso, lo que podría favorecer la degradación o contaminación del ácido nucleico.

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio, que resultaron más eficientes para la detección de norovirus en muestras de ostras, fueron JV12-JV13 en combinación con los métodos de procesamiento A y el de extracción B. Cabe destacar, que en esta investigación se utilizaron otros pares de oligonucleótidos para la detección de norovirus, diseñados para amplificar secuencias de la región más conservada del genoma: la ARN polimerasa viral [17]; sin embargo, la selección de un solo par de oligonucleótidos capaz de detectar todas las cepas se ha hecho muy difícil, debido probablemente a la diversidad genética de estos virus.

No se detectaron rotavirus con ninguna de las combinaciones de métodos, ni con ninguno de los pares de oligonucleótidos usados. Se conoce que el par CON1-CON2 fue diseñado para la detección específica del gen 4 de rotavirus, que amplifica una región del genoma de apenas 211 pb, mientras el par de oligonucleótidos p289-p290, que fue originalmente diseñado para detectar norovirus y sapovirus, también detecta rotavirus por reacción cruzada, al amplificar la región correspondiente al gen 1 con un tamaño aproximado de 300 pb [12,19,31]. Con base en estas informaciones es importante destacar que, para trabajos posteriores, deben utilizarse otros juegos de oligonucleótidos que amplifiquen regiones con mayor número de pares de bases que los utilizados en este estudio, ya que podrían aportar resultados más favorables [35,36]. No existen muchos reportes sobre detección de este agente viral en moluscos bivalvos, por lo que algunos estudios se han basado en la detección de rotavirus en muestras de moluscos contaminadas artificialmente [37-39]. También se ha reportado que, para la detección por RT-PCR del ARN de doble cadena de rotavirus en moluscos, es necesario un paso posterior de purificación del ácido nucleico en celulosa granular CC41 después de la extracción con la proteinasa K y SDS [11], que no se realizó en este estudio.

Es importante que en estudios posteriores se incluyan otros moluscos y se determine la calidad sanitaria de las aguas de captura y de los sitios de venta a orillas del Golfo de Cariaco en la avenida Perimetral de Cumaná. En estos sitios las ostras traídas en sacos desde las zonas de captura se venden crudas, desbulladas por los mismos expendedores, quienes las mantienen vivas remojándolas frecuentemente

en la costa. Esta es un área marina costera, urbana, que recibe descargas de aguas de lluvia y servidas no tratadas por canales que atraviesan diversos sectores de la ciudad de Cumaná, lo que la convierte en una fuente potencial de contaminación para estos moluscos.

### Conclusiones

El consumo de las ostras crudas comercializadas en la avenida Perimetral de Cumaná involucra una potencial exposición a los norovirus, que son agentes etiológicos importantes de gastroenteritis en humanos de todas las edades.

La no detección de rotavirus pudo deberse a que no estuvieron presentes en las muestras, a que no se utilizaron los pares de oligonucleótidos que amplificaran una región mayor del genoma, o a que las técnicas usadas para el procesamiento y extracción de ácidos nucleicos no fueron efectivas para la liberación, concentración y extracción del ARN bicatenario.

Los resultados plantean la necesidad de realizar una investigación más amplia, para dar respuesta a las múltiples interrogantes de interés epidemiológico y sanitario que surgieron con este primer estudio.

### Agradecimientos

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento de esta investigación a través del proyecto N° CI-2-010101-1273/06. Al Laboratorio de Biología de Virus del Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por el asesoramiento en la preparación de los controles positivo y negativo para norovirus.

### Referencias

1. Pina S. Detección y caracterización de virus patógenos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, España. Tesis de Grado; 2001.
2. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64: 3376-82.
3. Martínez R, Villalobos L. *Escherichia coli* enteropatógenas en moluscos crudos y cocidos. *Rev Cient FCV-LUZ.* 2005; XV:163-7.
4. Le Baron C, Furutan N, Lew J, Allen J, Gouvea V, Moe C, *et al.* Viral agents of gastroenteritis. Public health importance and outbreak management. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 1990; 39:1-24.
5. Traore O, Armal C, Mignotte B, Maul A, Laveran H, Billaudel S, *et al.* Reverse transcriptase PCR detection of astrovirus, hepatitis A virus and poliovirus in experimentally contaminated mussels: comparison of several extraction and concentration methods. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:3118-22.
6. Griffin D, Donaldson K, Paul J, Rose J. Pathogenic human

- viruses in coastal waters. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16:129-43.
7. Ferrari C, Torres E. Contaminación de los alimentos por virus: un problema de salud pública poco comprendido. *Rev Panam Salud Publica.* 1998; 36:359-66.
8. Kou X, Wu Q, Zhang J, Hongying F. Rapid detection of noroviruses in fecal samples and shellfish by nucleic acid sequence-based amplification. *J Microbiol.* 2006; 44:403-8.
9. Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, Dubois E, Pommepuy M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66:3241-8.
10. Le Guyader F, Neill F, Estes M, Monroe S, Ando T, Atmar R. Detection and analysis of a small-round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62:4268-72.
11. Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60:3665-71.
12. Jiang X, Huang P, Zhong W, Farkas T, Cubitt D, Matson D. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk-and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Meth.* 1999; 83:145-54.
13. Myrmet M, Berg E, Rimstad E, Grinde B. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70:2678-84.
14. Prato R, Lopalco P, Chironna M, Barbuti G, Germinario C, Quarto M. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. *BMC Infect Dis.* 2004; 4: 37.
15. Alcalá A, Hidalgo M, Obando C, Vizzi E, Liprandi F, Ludert, J. Detección molecular de calicivirus entéricos de bovino en Venezuela. *Acta Cient Venez.* 2003; 54:148-52.
16. Castellanos M, Costa L, Porto L, Monsalve F, Callejas D, Carrero Y y col. Factores de riesgo en la aparición de adenovirus y calicivirus en niños menores de 5 años de la comunidad de Nazareth del municipio Mara. *Universidad del Zulia. Zulia-Venezuela. Bol Venez Infectol.* 2008; 19:191-2.
17. Buesa Gómez J, López-Andújar P, Rodríguez-Díaz J.. Diagnóstico de las infecciones víricas gastrointestinales. Control de calidad SEIMC. Disponible en: <http://www.seimc.org/control/revisiones/viromicromol/rotavir.pdf>. Acceso: 20 de marzo de 2011
18. González G, Pujol F, Liprandi F, Ludert J. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J Med Virol.* 1998; 55:288-92.
19. Ludert J, Alcalá A, Liprandi F. Primer pair p289-p290, designed to detect both noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR, also detects rotaviruses by cross-reactivity. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:835-6.
20. Maldonado A, Bastardo J. Epidemiología molecular de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela. *Acta Cient Venez.* 1992; 43:368-72.
21. Maldonado A, Bastardo J. Prevalencia de subgrupos, serotipos y electroferotipos de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela. *Invest Clin.* 1998; 39:39-51.
22. Martínez A, Alcalá A, Carruyo G, Botero L, Liprandi F, Ludert J. Molecular detection of porcine enteric calicivirus in Venezuelan farms. *Vet Microbiol.* 2006; 116:77-84.
23. Morales M, Marrugo M, Angulo G, González R, Alcalá

- A, González G y col. Estudio de la infección por rotavirus y calicivirus en neonatos de la Maternidad "Concepción Palacios" de Caracas. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2007; 27:349-63.
24. Rodríguez L, Vizzi E, Alcalá A, Pujol F, Liprandi F, Ludert J. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J Clin Microbiol.* 2005; 33:104-9.
  25. Atmar R, Frederick N, Romalde J, Le Guyader F, Woodley C, Metcalf T, *et al.* Detection of norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61:3014-8.
  26. Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26:3309-10.
  27. Chung H, Jaykus L, Sobsey M. Detection of human enteric virus in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62:3772-8.
  28. Lees D, Henshilwood K, Doré W. Development of a method for detection of enteric viruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60:2999-3005.
  29. Wilson I. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63:3741-51.
  30. Boom R, Sol C, Salimans M, Jansen C, Ertheim Van Dillen P, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:495-503.
  31. Abbaszadegan M, Stewart P, Lechevallier M. A Strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:444-9.
  32. Vinjé J, Koopmans M. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis.* 1996; 174:610-5.
  33. Green S, Lambden P, Deng Y, Lowes J, Lineham S, Bushell J *et al.* Polymerase chain reaction detection of small round-structured viruses from two related hospital outbreaks of gastroenteritis using inosine-containing primers. *J Med Virol.* 1995; 45:197-202.
  34. Atmar R, Metcalf T, Neill F, Estes M. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59:631-5.
  35. Gentsch J, Glass R, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das B, Bhan M. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:1365-73.
  36. Wu H, Taniguchi K, Wakasugi F, Ukae S, Chiba S, Ohseto M, Hasegawa A, Urasawa T, Urasawa S. Survey on the distribution of the gene 4 alleles of human rotaviruses by polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect.* 1994; 112:615-22.
  37. Lewis G, Metcalf T. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl Environ Microbiol.* 1988; 54:1983-8.
  38. Speirs J, Pontefract R, Harwig J. Methods for recovering poliovirus and rotavirus from oysters. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53:2666-70.
  39. Zhou Y, Estes M, Jiang V, Metcalf T. Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus from shellfish by hybridization tests. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57:2963-8.