

VEGETALES DE HOJAS COMO POTENCIALES TRANSMISORES DE NOROVIRUS EN LA CIUDAD DE CÓRDOBA, ARGENTINA

LEAFY VEGETABLES AS POTENTIAL TRANSMITTERS OF NOROVIRUS IN CORDOBA CITY, ARGENTINA

VEGETAIS DE FOLHA COMO POTENCIAIS TRANSMISSORES DE NOROVIRUS DA CIDADE DE CÓRDOBA, ARGENTINA

María Laura Coluccini¹.

1- Mgter en Microbiología con Orientación en Investigación en Salud Humana. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Escuela de Nutrición. Cátedra de Microbiología y Parasitología; Argentina. E-mail de contacto: laucolu@hotmail.com

Conceptos clave:

Los NoV constituyen un importante patógeno causante de gastroenteritis por transmisión alimentaria en el mundo y en todos los grupos etarios. En Argentina los estudios de brotes son escasos y no existía hasta el presente ningún estudio de contaminación viral en vegetales consumidos por humanos.

El presente trabajo, constituye el primer reporte en nuestro país de detección de NoV en vegetales de hoja, alertando la necesidad de tomar medidas de control, ya que la población que los consume estaría expuesta a un riesgo potencial.

Resumen:

Introducción: Los Norovirus (NoV) constituyen un género dentro de la familia viral Caliciviridae, siendo el principal causante de brotes de origen alimentario entre humanos. Los vegetales frescos son susceptibles de ser contaminados con estos patógenos durante su cultivo, cosecha, transporte, procesamiento y manipulación. Por lo que se pretendió determinar la frecuencia de detección de NoV en muestras vegetales de hojas de la Ciudad de Córdoba, y adaptar un método de concentración viral con polietilenglicol para la recuperación de partículas virales de la superficie de vegetales y caracterizar los genogrupos de NoV detectados.

Métodos: Se tomaron 19 muestras de vegetales de hoja entre junio y diciembre de 2012. Se aplicó una técnica de concentración viral validada previamente en el laboratorio (elución y precipitación con polietilenglicol). A los concentrados de las muestras se les extrajo el ARN viral utilizando Trizol y precipitación con alcohol isopropílico. Se amplificó el ácido nucleico por Rt-PCR con primers específicos para identificar genogrupos I (GI) y II (GII). Los productos de la amplificación fueron revelados por electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción argéntica.

Resultados: Se encontraron 57,89% muestras positivas. Diez de las de cepas detectadas pertenecieron al genogrupo I (GI) y una al genogrupo II (GII). Se identificaron a lo largo de todo el periodo estudio, particularmente durante los meses de agosto, septiembre y noviembre.

Conclusión: Se detectó a estos patógenos con una prevalencia de 57,89 %. Las cepas pertenecieron mayoritariamente al GI, representando un riesgo potencial para la población.

Palabras clave: norovirus; vegetales; alimentos; brote.

Abstract:

Introduction: The Norovirus (NoV) constitute a genus within the viral family Caliciviridae, being the main cause of outbreaks of food origin among humans. Fresh vegetables are susceptible to being contaminated with these pathogens during their cultivation, harvest, transport, processing and handling. So it was intended to determine the frequency of detection of NoV in plant samples of leaves of the City of Córdoba, and adapt a method of viral concentration with polyethylene glycol for the recovery of viral particles from the surface of vegetables and characterize the genogroups of NoV detected.

Methods: 19 samples of leafy vegetables were taken between June and December 2012. A viral concentration technique previously validated in the laboratory was applied (elution and precipitation with polyethylene glycol). The viral RNA was extracted to the concentrates of the samples using Trizol and precipitation with isopropyl alcohol. The nucleic acid was amplified by Rt-PCR with specific primers to identify genogroups I (GI) and II (GII). The products of the amplification were revealed by polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining.

Results: We found 57.89% positive samples. Ten of the detected strains belonged to genogroup I (GI) and one to genogroup II (GII). They were identified throughout the study period, particularly during the months of August, September and November.

Conclusion: These pathogens were detected with a prevalence of 57.89%. The strains belonged mainly to the GI, representing a potential risk for the population.

Keywords: norovirus; vegetables; food; sprout.

Resumo

Introdução: Os Norovírus (NoV) constituem um gênero dentro da família viral Caliciviridae, sendo a principal causa de surtos de origem alimentar nos humanos. Os vegetais frescos são susceptíveis a serem contaminados com estes patógenos durante seu cultivo, colheita, transporte, processamento e manipulação. O objetivo foi determinar a frequência de detecção de NoV em amostras de vegetais de folha da cidade de Córdoba, adaptando um método de concentração viral com polietilenglicol para a recuperação de partículas virais da superfície de vegetais e caracterizar os genogrupos de NoV detectados.

Métodos: Colheram-se dezoito amostras de vegetais de folha entre junho e dezembro de 2012. Aplicou-se uma técnica de concentração viral validada com antecedência no laboratório (eluição e precipitação com polietilenglicol). Extraiu-se o RNA viral com Trizol e precipitação com álcool isopropílico dos concentrados das amostras. Amplificou-se o ácido nucleico por RT-PCR com primers específicos para identificar genogrupos I (GI) e II (GII). Os produtos da amplificação revelaram-se por electroforese em géis de poliacrilamida e tincão argírica.

Resultados: Encontraram-se 57.89% de amostras positivas. Dez cepas pertenceram ao genogrupo I (GI) e uma ao genogrupo II (GII). Identificaram-se ao longo de todo o período de estudo; especialmente durante os meses de agosto, setembro e novembro.

Conclusão: A prevalência deste patógeno foi de 57.89%. A maioria das cepas pertenceu ao GI, representando um risco potencial para a população.

Palavras chave: Norovírus; vegetais; alimentos, surto.

Recibido: 2019-04-19 Aceptado: 2020-03-10

DOI: <http://dx.doi.org/10.31053/1853.0605.v77.n1.24070>



© Universidad Nacional de Córdoba

Introducción

Los Norovirus (NoV) son agentes causales de brotes epidémicos por gastroenteritis en individuos de todas las edades, siendo responsables de más del 90% de las mismas por causa no bacteriana en todo el mundo⁽¹⁾.

Éstos agentes constituyen un género dentro de la familia viral Caliciviridae. Son virus de genoma ARN de sentido positivo, de cadena simple y no envueltos, de 27 a 32 nm de tamaño y poseen una cápside icosaédrica⁽²⁾.

Los NoV pueden causar la contaminación de frutas y verduras y transmitirse a un gran número de consumidores, causando de este modo un brote por transmisión alimentaria.

En el año 2008, el Centers of Diseases Control and Prevention (CDC) reportó a los NoV como los agentes más frecuentes y confirmado por laboratorio como único patógeno causal en el 49 % de 479 brotes registrados en ese año. Los brotes ocurren particularmente en establecimientos de salud, educación, geriátricos, militares y en otras instituciones donde la transmisión se ve facilitada por la presencia de un gran número de individuos en estrecho contacto⁽³⁾.

Los vegetales frescos son susceptibles de ser contaminados con estos patógenos durante su cultivo al tomar contacto con el agua de riego contaminada o fertilizante orgánico, posterior cosecha, transporte, procesamiento y manipulación. Como la mayoría de estos vegetales se consumen crudos, se observó en estudios en países en desarrollo un incremento en el número de brotes alimentarios asociados al consumo de los mismos⁽⁴⁻⁵⁾.

El consumo de vegetales frescos es promovido como parte de una dieta saludable para la población, sin embargo esto podría suponer un riesgo potencial para la salud pública, ya que una amplia variedad de vegetales de hoja se consumen crudos.

Si bien en países altamente desarrollados se cuenta con datos importantes acerca de las transmisiones de enfermedades víricas a través de alimentos⁽⁶⁻⁸⁾, en nuestro país no se cuanta con información al respecto. Está claro que hasta el momento no se está en condiciones de valorar el posible impacto en salud de la transmisión alimentaria de virus en nuestra región y es imperiosamente necesario el comienzo de estudios en este ámbito. El presente constituye el primer reporte en nuestro país sobre la presencia de estos agentes virales en alimentos.

Objetivos

- Determinar la frecuencia de detección de NoV en muestras de alimentos (vegetales de hojas) comercializados en un puesto mayorista del mercado de abasto de la Ciudad de Córdoba.
- Implementar un método de concentración viral con polietilenglicol para la recuperación de partículas virales. Caracterizar los

genogrupos de NoV involucrados en la contaminación de las verduras estudiadas.

Métodos

Se recolectaron 19 muestras de vegetales de hoja (lechuga, lechuga colorada, acelga, achicoria, rúcula y espinaca), de aproximadamente 800 a 1000 gr cada una, de un mismo proveedor del Mercado de Abasto de la ciudad de Córdoba seleccionado al azar. El muestreo se realizó entre junio y diciembre de 2012 con frecuencia quincenal. Se aplicó una técnica de concentración viral validada previamente en el laboratorio, con ligeras modificaciones⁽⁹⁾.

Brevemente, las partículas contenidas en 1,5 litros de buffer de lavado de muestra fueron concentradas cien veces en un volumen final de 15 ml mediante centrifugación-elusión con polietilenglicol.

La extracción del ácido nucleico se realizó con Trizol-cloroformo y posterior precipitación en alcohol isopropílico, partiendo de 400 µL de concentrado de la muestra⁽⁵⁾.

El ARN extraído se desnaturalizó a 97°C durante 7 minutos y se sometió a retrotranscripción con *random primers*. La detección específica de NoV se realizó por *semi-nested* PCR utilizando *primers* dirigidos a la región A del gen de la polimerasa viral. La primera reacción detecta los genogrupos I y II de NoV obteniéndose un producto de 327 pb, mientras que las dos segundas reacciones por separado diferencian los genogrupos I (187 pb) y II (236 pb)⁽¹⁰⁾.

Los amplicones fueron revelados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con plata⁽¹¹⁾.

Los datos se analizaron mediante determinación de frecuencias de detección según las variables estacionales y especie del vegetal.

Comités de ética

La investigación se ha realizado con muestras ambientales, no incluye muestras humanas, por lo tanto no fue necesaria la obtención de consentimientos y revisión por un Comité de Ética, según los principios de la Declaración de Helsinki.

Resultados

Del total de 19 muestras analizadas, 11 de ellas resultaron positivas para NoV (57,89 %). Se observó que, de las seis especies de vegetales de hoja estudiados, se detectaron muestras positivas en cinco de ellas (lechuga, acelga, achicoria, espinaca y rúcula). Sorprendentemente, cuatro de ellas se consumen crudas. Diez de las cepas detectadas pertenecieron al GI y una al GII. (Tabla 1).

Se observó presencia de NoV intermitentemente durante todo el periodo estudiado, principalmente en los meses de agosto, septiembre y noviembre. (Figura 1).

Tabla N° 1: Resultados por distintos protocolos de RT-PCR de las muestras analizadas

N° de Muestras	Tipo de vegetal	Mes que se adquirió y cosechó	Resultados por Rt-PCR
			(Vennema et al 2002) RdRP
1	Lechuga	12/6/2012	-
2	Lechuga	27/6/2012	-
3	Espinaca	8/8/2012	-
4	Lechuga	15/8/2012	-
5	Achicoria	15/8/2012	GI
6	Rúcula	22/8/2012	GI
7	Espinaca	22/8/2012	GI
8	Acelga	5/9/2012	GI
9	Lechuga	5/9/2012	GI
10	Rúcula	12/9/2012	GI
11	Espinaca	12/9/2012	-
12	Acelga	3/10/2012	GI
13	Lechuga	3/10/2012	-
14	Acelga	24/10/2012	-
15	Lechuga colorada	24/10/2012	-
16	Lechuga	15/11/2012	GI/ GII
17	Acelga	15/11/2012	GI
18	Achicoria	28/11/2012	GI
19	Acelga	28/11/2012	GI

Resultados de RT-PCR de las muestras analizadas.

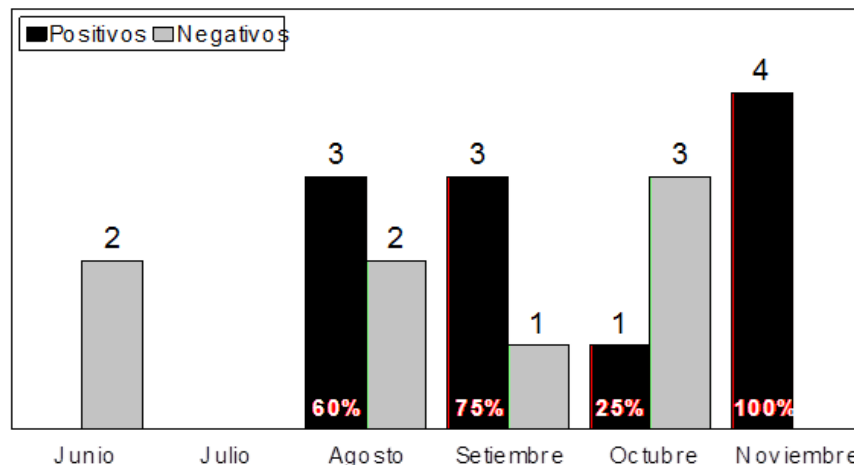


Figura N° 1. Distribución de muestras positivas y negativas según mes del año en el periodo estudiado (junio-noviembre 2012)

Discusión

En la actualidad, y en países con un alto grado de desarrollo, las infecciones alimentarias de origen viral constituyen una preocupación mayor tanto para el sector de alimentos como para el ámbito de la salud. Los patógenos virales implicados son esencialmente los virus entéricos que constituyen un conjunto de virus transmisibles al humano vía los alimentos contaminados, agua y contactos interpersonales⁽¹²⁾.

En el plano epidemiológico, los norovirus son corrientemente reportados entre los casos de gastroenteritis no bacteriana. En el mundo entero, tanto en países en vías de desarrollo como desarrollados, causan enfermedad moderada a severa afectando todas las edades, con una gran carga entre los niños: 9 millones de hospitalizaciones y 2 millones de muertes por año entre los menores de cinco años en países en vías de desarrollo y alrededor de 500 mil hospitalizaciones por año en países desarrollados para el mismo grupo etario⁽¹³⁻¹⁴⁾.

En Estados Unidos, serían responsables del 58% de los casos anuales de enfermedades transmitidas por alimentos con pérdidas económicas estimadas en 3,7 mil millones de dólares por año⁽¹⁵⁾. Desde hace más de una década, han sido reportados brotes epidémicos de diversa severidad en Canadá⁽¹⁶⁾, y en numerosos países europeos⁽¹⁷⁾. Los datos más recientes dan cuenta de un aumento de las incidencias en Gran Bretaña⁽¹⁸⁾, Países Bajos⁽¹⁹⁾, Japón⁽²⁰⁾, en Francia, Australia y Nueva Zelanda⁽²¹⁾. En los países de América del Sur, no existen programas de eliminación y control de las gastroenteritis producidas por norovirus, por lo tanto los datos son escasos y dispersos. Los rangos de prevalencia reportados en estos países son: Brasil: 14,5%, Venezuela: 16,76%, Chile: 17,4%, Argentina: 24% y Colombia: 32%⁽²²⁾.

Los datos en Argentina, si bien son escasos, adquieren relevancia, ya que dan cuenta de la existencia de brotes de gastroenteritis por causa de norovirus en nuestro país⁽²³⁻²⁵⁾, y la posible subestimación que exista de la prevalencia de esta patología. Asimismo, no se cuenta al presente en Argentina con reportes acerca de monitoreo viral en diferentes matrices alimentarias, lo cual resulta fundamental a fin de perfeccionar técnicas sensibles y específicas para establecer potenciales fuentes de contaminación y estimar el riesgo al que la población que consume dichos alimentos está expuesta.

Se planteó realizar un estudio de detección de NoV en verduras de hoja comercializadas en el mercado de abasto de nuestra ciudad. Sorprendentemente, los resultados arrojaron una prevalencia de 57,89% (11/19), la más alta frente a otros reportes recientes que dan cuenta de una prevalencia del 11,9% en Francia⁽²⁶⁾, 10% en España⁽⁸⁾, 28,2% en Canadá y 33,3% en Bélgica⁽⁷⁾. Si bien estos estudios difieren en la metodología empleada para el muestreo y detección entre sí, constituyen los escasos reportes con los que se cuenta para establecer una comparación preliminar. Cuatro de las seis variedades de vegetales estudiados, se consumen crudos como lechuga, achicoria, espinaca y rúcula, mientras que la restante fue

acelga, que generalmente se consume cocida, si bien como todo alimento es manipulado en la cocina y puede entrar en contacto con utensilios y demás superficies contaminadas. En cuanto a la estacionalidad de las muestras analizadas (Figura 1), se han encontrado especímenes positivos durante los meses fríos como cálidos (junio, agosto, septiembre y noviembre), y no se ha podido advertir un único patrón estacional con picos elevados en invierno como sucede en los muestreos clínicos, sino que similarmente a otros reportes en muestras ambientales, los hallazgos positivos parecerían suceder a lo largo del año y con algún pico primaveral. En el presente trabajo, la mayoría (10/19) de muestras positivas resultaron pertenecer al GI, mientras que tan sólo una, resultó positiva para GII. Este hallazgo a priori llama la atención debido a que se conoce que la mayoría de las cepas que circulan en humanos pertenecen al GII y que GI se encuentra en menor proporción en muestras clínicas. Dependiendo del año, cerca del 75 al 95 % de los brotes de NoV del mundo son debidos a virus GII y del 5 al 25 % se deben a virus GI, mientras que muy rara vez se han identificado virus GIV. Sin embargo, se ha evidenciado que cepas pertenecientes al genotipo GII.4 estarían implicadas en los casos de contaminación de persona a persona, mientras que cepas del genogrupo GI estarían más bien ligadas a productos de mar y vegetales frescos⁽⁸⁾.

Conclusiones

En este primer estudio realizado en Argentina, se detectó NoV en vegetales de hojas que se comercializan en la ciudad de Córdoba con una frecuencia de detección del 57,91%.

Las cepas detectadas pertenecen mayoritariamente al GI, coincidiendo con otros reportes de NoV en alimentos, mientras que tan solo una cepa resultó pertenecer al genogrupo II (GII).

La alta frecuencia de detección de NoV en vegetales de hojas pone de manifiesto el riesgo potencial al que la población que los consume está expuesta.

Se sugiere continuar con estos estudios, particularmente aplicando técnicas de cuantificación a fin de realizar cálculos de riesgo de infección; como así también secuenciar las cepas detectadas y compararlas con aquellas cepas de muestras clínicas de individuos afectados.

Conflictos de interés

No existen.

Limitaciones de responsabilidad

La responsabilidad del trabajo es sólo del autor

Bibliografía

1. Verhoef L, Depoortere E, Boxman I, Duizer E, van Duynhoven Y, Harris J, Johnsen C, Kroneman A, Le Guyader S, Lim W, Maunula L, Meldal H, Ratcliff R, Reuter G, Schreier E, Siebenga J, Vainio K, Varela C, Vennema H, Koopmans M; Food Borne Viruses in Europe Network. Emergence of new norovirus variants on spring cruise ships and prediction of winter epidemics. *Emerg Infect Dis*. 2008 Feb;14(2):238-43. doi: 10.3201/eid1402.061567.
2. Lin CY, Chiu NC, Lee HC, Chuang CK, Lin SP, Yeung CY. The emerging importance of norovirus as the etiology of pediatric gastroenteritis in Taipei. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010 Apr;43(2):105-10. doi: 10.1016/S1684-1182(10)60017-5.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for foodborne disease outbreaks--United States, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011 Sep 9;60(35):1197-202.
4. Mueller JE, Bessaud M, Huang QS, Martinez LC, Barril PA, Morel V, Balanant J, Bocacao J, Hewitt J, Gessner BD, Delpeyroux F, Nates SV. Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Córdoba Province, Argentina. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Mar;75(5):1395-401. doi: 10.1128/AEM.02201-08.
5. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9. doi: 10.1006/abio.1987.9999.
6. Pérez-Rodríguez F, González-García P, Valero A, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D. Impact of the prevalence of different pathogens on the performance of sampling plans in lettuce products. *Int J Food Microbiol*. 2014 Aug 1;184:69-73. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.019.
7. Baert L, Mattison K, Loisy-Hamon F, Harlow J, Martyres A, Lebeau B, Stals A, Van Coillie E, Herman L, Uyttendaele M. Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? *Int J Food Microbiol*. 2011 Dec 15;151(3):261-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.013.
8. Le Guyader F, Loisy F, Atmar RL, Hutson AM, Estes MK, Ruvoën-Clouet N, Pommepuy M, Le Pendu J. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jun;12(6):931-6. doi: 10.3201/eid1206.051519.
9. Guévremont E, Brassard J, Houde A, Simard C, Trottier YL. Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. *J Virol Methods*. 2006 Jun;134(1-2):130-5. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.12.009.
10. Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol*. 2002 Aug;25(2):233-5. doi: 10.1016/s1386-6532(02)00126-9.
11. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*. 1982 Sep;16(3):473-7.
12. Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol*. 2004 Jan 1;90(1):23-41. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00169-7.
13. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol*. 2009 Jan;44(1):1-8. doi: 10.1016/j.jcv.2008.10.009.
14. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014 Aug;14(8):725-730. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70767-4.
15. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):7-15. doi: 10.3201/eid1701.p11101.
16. Institut National de Santé Publique du Québec. Cas d'infection à Caliciviridae incluant le norovirus. STATLABO-Statistique d'Analyse du Laboratoire Santé Publique du Québec. INSPQ, 2011 Jan;10(1):1-12.
17. Kroneman A, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, Gray J, Iturriza M, Böttiger B, Falkenhorst G, Johnsen C, von Bonsdorff CH, Maunula L, Kuusi M, Pothier P, Galloway A, Schreier E, Foley B, Szűcs G, Reuter G, Krisztalovics K, Lynch M, McKeown P, Kocj B, Coughlan S, Ruggeri FM, Di Bartolo I, Vainio K, Isakbaeva E, Poljsak-Prijatelj M, Grom AH, Bosch A, Buesa J, Fauquier AS, Hernandéz-Pezzi G, Hedlund KO, Koopmans M. Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *J Public Health (Oxf)*. 2008 Mar;30(1):82-90. doi: 10.1093/pubmed/fdm080.
18. PHE. Weekly national norovirus and rotavirus report. 2014. *Public Health England* 2014, 1-8.
19. Havelaar AH, Haagsma JA, Manges MJ, Kemmeren JM, Verhoef LP, Vijgen SM, Wilson M, Friesema IH, Kortbeek LM, van Duynhoven YT, van Pelt W. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *Int J Food Microbiol*. 2012 Jun 1;156(3):231-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.029.
20. National Institute of Infectious Diseases (NIID) 2014. <http://www.nih.go.jp/niid/en/iasr-noro-e.html>. NIID. 2014.
21. van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden J S, Fonager J, Hewitt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinjé J, White P A, Koopmans M, on behalf of NoroNet Collective. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill*. 2013;18(1):pii=20345. <https://doi.org/10.2807/ese.18.01.20345-en>
22. Peláez, D. Enfermedad diarreica aguda (EDA) nuevos agentes virales. *Rev MVZ Córdoba* 2004, 9(2):470. doi:10.21897/rmvz.497.
23. Gomez K, Stupka J, Parra G, Gomez J. Caracterización molecular de cepas de norovirus aislados de brotes de gastroenteritis ocurridos en Argentina durante 2004. *Rev Argent Microbiol* 2005, 37(1):43.
24. Gomez KA, Stupka JA, Gómez J, Parra GI. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol*. 2007 Nov;79(11):1703-9. doi: 10.1002/jmv.20989.
25. Gomes KA, Stupka JA, Diana A, Parra GI. Caracterización molecular de calicivirus aislados de brotes de gastroenteritis ocurridos en la Argentina durante los años 2005 y 2006 [Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis occurring in Argentina during 2005 and 2006]. *Rev Argent Microbiol*. 2008 Oct-Dec;40(4):222-8.
26. Loutreul J, Cazéaux C, Levert D, Nicolas A, Vautier S, Le Sauvage AL, Perelle S, Morin T. Prevalence of human noroviruses in frozen marketed shellfish, red fruits and fresh vegetables. *Food Environ Virol*. 2014 Sep;6(3):157-68. doi: 10.1007/s12560-014-9150-8.