



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias - Programa de Magíster en Ciencias Veterinarias
con mención en Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen animal

**ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DE VIRUS
HEPATITIS A Y NOROVIRUS; Y PESQUISA EN LA REGIÓN
DEL BIOBIO, CHILE.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Veterinarias con
mención en Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal

CLAUDIA ORIETTA VILLANUEVA OLIVOS
CHILLAN-CHILE
2022

Profesor Guía: René Ortega Vásquez
Dpto. de Patología y Medicina Preventiva
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Patología y Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.


Profesor Guía

Dr. René Ortega Vásquez
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Daniel Sandoval Silva
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dr. Carlos Landaeta Aqueveque
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dr. Carlos Farías Rojas
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Director de Programa

Prof. Reinaldo Letelier Contreras
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

TABLA DE CONTENIDOS

CAPITULO	PAGINA
Índice de Tablas.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Resumen.....	viii
Summary.....	ix
INTRODUCCION.....	1
1. Etiología y epidemiología de Virus Hepatitis A.....	6
2. Etiología y epidemiología de Norovirus.....	10
3. Métodos de Transmisión.....	14
4. Evaluación filogenética de HAV y HUNOV.....	15
5. Pesquisa de HAV y HuNoV en moluscos bivalvos como matriz alimentaria y su vigilancia epidemiológica.....	18
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	22
Hipótesis.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
MATERIAL Y METODO.....	23
1. Colección de secuencias homólogas.....	23
2. Alineamiento múltiple de secuencias, Selección del modelo de sustitución más ajustado y Pruebas de confiabilidad.....	23
3. Interpretación evolutiva y análisis de filogenia.....	24

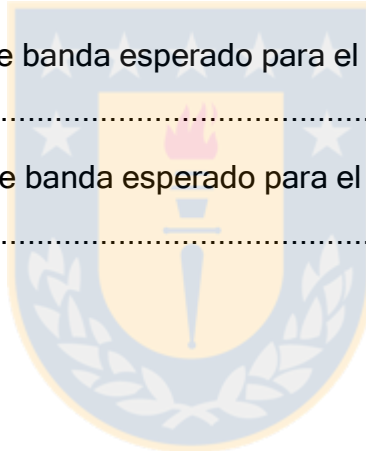
4. Obtención de muestras	26
5. Extracción de ARN viral	26
6. Reacción de transcripción reversa.....	27
7. PCR en tiempo final (RT- PCR) para genotipificación de las cepas detectadas.	27
8. RT-PCR anidado (nRT-PCR).....	28
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	31
1. Colección de secuencias homólogas.	31
2. Alineamiento múltiple de secuencias y selección del modelo de sustitución más ajustado	33
2.1 Genoma completo	33
2.2 Segmento VP1.....	33
2.3 Segmento RdRp.	33
3. Alineamiento múltiple de secuencias y selección del modelo de sustitución más ajustado de HAV	34
3.1 Genoma completo	34
3.2 Segmento VP1/2A	34
3.3 Segmento VP3/VP1	34
4. Interpretación evolutiva y análisis de filogenia de HUNOV	35
4.1 Según secuencias genómicas completas	35
4.2 Según secuencias de segmento VP1.....	39
4.3 Según secuencias de segmento RdRp	42
5. Interpretación evolutiva y análisis de filogenia de HAV	44
5.1 Según secuencias genómicas completas	44
5.2 Según secuencias de segmento VP1/2A	46

5.3 Según secuencias de segmento VP3/VP1	49
6. Pesquisa de HAV y HuNoV en Región del Biobio	52
7. RT-PCR y nPCR para HuNoV segmento RdRp	52
8. RT-PCR y nPCR para HAV segmento VP1/2A	55
9. RT-PCR y nPCR para HAV segmento VP3/VP1	56
CONCLUSIONES	60
PROYECCION	60
BIBLIOGRAFIA.....	61
ANEXOS	90



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores para HAV (VP1/2A, y VP3/VP1) utilizados en los ensayos de RT-PCR.....	28
Tabla 2. Partidores para HAV y partidores para HUNOV utilizados en los ensayos de nRT-PCR.....	29
Tabla 3. Valores AIC de Jmodel para escoger Modelo de sustitución más ajustado.....	35
Tabla 4. Tamaño de banda esperado para el segmento RdRP en resultado nPCR 53	
Tabla 5. Tamaño de banda esperado para el segmento VP1/2A en resultado nPCR	55
Tabla 6. Tamaño de banda esperado para el segmento VP3/VP1 en resultado nPCR	57



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Genoma del virus Hepatitis A.....	8
Figura 2.	Genoma del virus Norovirus Humano.....	11
Figura 3.	Dendograma de secuencias genómicas completas de HUNOV	36
Figura 4.	Dendograma de HUNOV según secuencias de segmento VP1.....	40
Figura 5.	Dendograma de HUNOV según secuencias de segmento RdRp .	42
Figura 6.	Dendograma de HAV según secuencias genómicas completas	44
Figura 7.	Dendograma de HAV según segmento VP1/2A	47
Figura 8.	Dendograma de HAV según secuencias de segmento VP3/VP1 .	50
Figura 9.	Resultados en gel de agarosa al 2% de PCR y nPCR para el segmento RdRP de HUNOV.....	53
Figura 10.	Resultados en gel de agarosa al 2% de PCR y nPCR para el segmento RdRP de HUNOV.....	54
Figura 11.	Resultados en gel de agarosa al 2% de PCR y nPCR para el segmento VP1/2A de HAV.....	56
Figura 12.	Resultados PCR y nPCR para la región VP3/VP1 de HAV	57

RESUMEN

“ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DE VIRUS HEPATITIS A Y NOROVIRUS; Y PESQUISA EN LA REGIÓN DEL BIOBIO, CHILE.”

Los Picornavirales Hepatitis A (HAV) y Norovirus humano (HUNOV), son virus patógenos de transmisión feco-oral presentes a nivel mundial. Son la causa de alertas epidémicas por brotes de intoxicación alimentaria en países con riesgo de infección, provocando anualmente millones de casos clínicos en el mundo. En Chile, los cuadros epidémicos por HAV ocurren en ciclos de 3 a 5 años, afectando de niños a adultos jóvenes, y se cataloga como territorio de endemicidad intermedia, al igual que todo Sudamérica. En tanto, HUNOV es una patología de alta frecuencia en niños menores a 5 años, con alta demanda de atenciones ambulatorias, siendo hoy en el país, un agente de notificación obligatoria. Si bien son virus con presencia confirmada a lo largo del mundo, de alta incidencia y prevalencia endémica, no existen datos de relación filogenética entre las cepas publicadas, y por ello se desconoce la filogeografía y sus asociaciones. Por otro lado, a nivel nacional, la Octava Región del Biobío es considerado el sector con mayor tasa de incidencia de estos virus, dado por el alto número de ETA's asociados al consumo de agua contaminada y a moluscos bivalvos semicocidos que se desarrollan en aguas que reciben contaminantes urbanos. No obstante, existe escaso o nulo antecedente en Chile sobre la detección y genotipificación del virus en alimentos de consumo humano, lo cual es común a lo largo del mundo mediante reacción en cadena de polimerasas (PCR). Con el fin de conocer el estado actual de estos agentes virales tanto en el país como en zonas mundiales representativas, el primer objetivo de esta investigación es analizar árboles filogenéticos con cepas descritas de HAV y HUNOV a nivel mundial, y el segundo objetivo es detectar el virus de la Hepatitis A, y el Virus Norovirus Humano en Almejas (*Venus antiqua*) y Mejillones (*Mytilus chilensis*) de la región del Biobío de Chile.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, campus Chillán, donde se realizó un análisis filogenético de 116 cepas de HUNOV publicadas en todo el mundo, y 98 cepas de HAV con número de libre acceso, mediante estadística bayesiana, obteniendo clados de baja variabilidad nucleotídica con cepas continentalmente distantes, presumiendo una diseminación cosmopolita de ambos agentes virales. Además, se realizó una pesquisa de HAV y HUNOV mediante PCR en tiempo final con transcripción reversa anidado (nRT-PCR), sin resultados considerables para evaluación mundial. Este estudio permite contribuir al conocimiento de la circulación geográfica de estos virus gastroentéricos, información necesaria para posibles medidas de prevención sanitaria a nivel mundial, y a su vez, muestra los primeros pasos para la detección de estos agentes virales a partir de moluscos bivalvos en Chile, como punto de partida para futuras investigaciones nacionales enfocadas en la seguridad alimentaria.

SUMMARY

“MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF VIRUSES HEPATITIS A AND NOROVIRUS AND DETECTION IN THE BIOBIO REGION, CHILE.”

The Picornavirales Hepatitis A (HAV) and human Norovirus (HUNOV), are an oral-feces transmission pathogen, with worldwide distribution. Are one of the principals agent of epidemic alerts for food poisoning outbreaks, and are responsible of million clinical cases throughout the world. The outbreaks by HAV in Chile occur in cycles of 3 to 5 years, affecting from childrens, until young adults, and our country is classified as intermediate endemic territory, as well all South America. Regarding HUNOV is a pathology of high frequency in children under five years old, and present a high demand of ambulatory procedures, being able an agent of obligatory notification. Although they are viruses with a confirmed

presence throughout the world, with a high incidence and endemic prevalence, there are no data on a phylogenetic relationship between the published strains, and therefore the phylogeography and their associations are unknown. On the other hand, at the national level, the Eighth Region of Biobio is considered the sector with the highest incidence rate of these viruses, given by the high number of foodborne illness associated with the consumption of contaminated water and semi-cooked bivalve molluscs that develop in waters that receive urban pollutants. However, there is little or no precedent in Chile on the detection and genotyping of the virus in food for human consumption, which is common throughout the world by means of polymerase chain reaction (PCR). In order to know the current status of these viral agents both in the country and in representative world areas, the first aim of this study is to analyze phylogenetic trees with described strains of HAV and HUNOV worldwide, and the second objective is to detect the Hepatitis A virus and the Human Norovirus in Clams (*Venus antiqua*) and Mussels (*Mytilus chilensis*) from the Biobio region of Chile.

This research was realized at Virology Laboratory of Veterinary Sciences faculty of Universidad de Concepción, Campus Chillán, where a phylogenetic analysis of 116 HUNOV strains published around the world, and 98 HAV strains with free access numerical access, was performed using Bayesian statistics, obtaining clades of low nucleotide variability with continentally distant strains, inferring a cosmopolitan dissemination of both viral agents. In addition, a screening for HAV and HUNOV was performed by nested reverse transcription endpoint PCR (nRT-PCR), without significant results for worldwide evaluation.

This study makes it possible to contribute to the knowledge of the geographical circulation of these gastroenteric viruses, information necessary for possible health prevention measures worldwide, and also, shows the first steps for the detection of these viral agents from bivalve molluscs in Chile as a starting point for future national research focused on food safety.

INTRODUCCION

Norovirus Humano (HUNOV) y Hepatitis A (HAV) son virus ARN positivo de hebra simple, pertenecientes a las familias Caliciviridae y Picornaviridae respectivamente, ambos del Orden de los Picornavirales (Lefkowitz *et al.*, 2018). Ambos patógenos virales son reconocidos como causal de enfermedades gastroentéricas desde la década de los '70 (Lemon *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2008), siendo HUNOV el causal etiológico más común de las diarreas virales agudas a nivel mundial (Van Beek *et al.*, 2018), y HAV el patógeno viral más incidente en cuadros de hepatitis virales agudas (Cuthbert, 2001). Se caracterizan por presentar más de un genotipo infectivo en humanos (Nainan *et al.*, 2006; Vinjé *et al.*, 2015), son capaces de provocar brotes epidémicos por intoxicación alimentaria en todo el mundo, altamente cosmopolitas y transmisibles (Koopmansy Duizer, 2004; Yeargin y Gibson, 2019).

Actualmente, estos virus son diagnosticados mediante serología sólo en pacientes con síntomas gastroentéricos, y en las ocasiones donde producen brotes de intoxicación alimentaria, se realiza la identificación genómica de estos agentes mediante “reacción en cadena de polimerasas” (PCR). Existen datos publicados alrededor del mundo donde analizan un compilado de exámenes positivos de PCR, generalmente obtenidos de una misma zona geográfica o un mismo episodio de brote, mediante la secuenciación de los resultados genómicos obtenidos, con los cuales analizan la dinámica de procesos epidemiológicos y de evolución entre las cepas descubiertas, mediante modelos filogenéticos (Gharbi-Khelifi *et al.*, 2011; Hamza *et al.*, 2017).

La filogenia es un método que tiene como objetivo, reunir organismos de una misma familia o género, según características afines entre sí. En este caso, utilizando secuencias nucleotídicas, la filogenia analiza, en su contexto más simple, cepas por pares, esto quiere decir que cuando dos organismos son

analizados paralelamente, las diferencias o similitudes previstas entre ellos dos es comparada con las similitudes que tienen las siguientes dos, y así sucesivamente. Si a ésta definición adjuntamos más parámetros de estudio tales como año de detección de la cepa, tipo de muestra utilizada, y ubicación geográfica de la detección, es posible percibir la similitud entre las cepas virales distribuidas a nivel mundial, abriendo un campo de conocimiento que permite la visualización real de diseminación de estos agentes, y determinar la relación de las cepas circulantes con cualquier cepa disponible de brotes anteriores (Mutreja y Dougan, 2020). Actualmente el análisis filogenético se ha vuelto de gran importancia en la vigilancia epidemiológica, especialmente en brotes epidémicos virales y/o de intoxicación alimentaria (Wang *et al*, 2016). Se han realizado estudios filogenéticos en el mundo, no obstante, sólo en zonas geográficas delimitadas. Por ejemplo, para HUNOV en China (Qiao *et al*; 2016), y Estados Unidos (Vega *et al*, 2014), y en el caso de Hepatitis A, no hay datos de libre acceso, a excepción de un estudio realizado por Kroneman (2018), utilizando secuencias genómicas obtenidas del instituto privado HAVnet (Kroneman *et al.*, 2018). A diferencia de una amplia gama de estudios en otros agentes virales como es el caso del virus Influenza (Zhang *et al*, 2020; Reimering *et al*, 2020) y SARS-COV2 (Zhu *et al*, 2021; Vale *et al*, 2021).

En lo que a nuestro continente respecta, América del Sur se registra como región de endemidad intermedia, es decir, donde hasta el 50% de la población es inmune a la edad de 15 años, factor que evidencia una alta prevalencia de la enfermedad en la zona. A pesar de ello, su registro epidemiológico es deficiente (Kroneman *et al.*, 2018). Argentina, por ejemplo, describe la presencia de HAV y el Subgenotipo (SG) IA en su país, mediante un diseño experimental prospectivo en muestras de suero y muestras fecales humanas (Munné *et al.*, 2007). Este subgenotipo también fue descrito en Uruguay (García-Aguirre y Cristina, 2008) y Colombia (Báez *et al.*, 2016; Robertson *et al.*, 2008). Brasil ha determinado la circulación de HAV SG IB en muestras de sangre (De Paula *et al.*, 2002) y tanto

el genogrupo I como el genogrupo II de HUNOV (Bitencurt *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2019; Fioretti *et al.*, 2018), al igual que Guatemala (Estévez *et al.*, 2013) y Chile (Montenegro *et al.*, 2014). A su vez, se ha descrito el genogrupo II en Paraguay (Galeano *et al.*, 2013).

De los 14 países que componen Sudamérica, sólo el 30% ha publicado estudios respecto a los genotipos de HAV circulante en la región, poniendo en evidencia la carencia de información de este agente en el continente (Aguirre *et al.*, 2011; García-Aguirre y Cristina, 2008; Navas y Báez, 2015; Sincero *et al.*, 2006). En cuanto a HUNOV en el continente, cabe destacar que todas las detecciones de este agente son de muestras fecales humanas, no existiendo publicaciones de epidemiología molecular desde matrices alimentarias.

La importancia de relacionar estos agentes virales con productos alimenticios de consumo humano nace desde el entendimiento de su transmisión oral-fecal. Debido a la escasa depuración viral de las aguas de desecho, el agua contaminada es la principal fuente de transmisión de estos virus, y con ello, cualquier alimento que haya tenido contacto o requiera de afluentes de agua puede ser un potencial agente transmisor (Da Silva Poló *et al.*, 2016). Se ha detectado HUNOV y HAV mediante RT - PCR en aguas de desecho (Adefisoye *et al.*, 2016; Flannery *et al.*, 2012) demostrando ser una fuente potencial de contaminación para el agua de mar (Cuthbert, 2001). A su vez, una escasa higiene del manipulador de alimentos puede ser causal de contaminación en cualquier momento de la producción (Koopmans *et al.*, 2019). Se ha descrito que, tanto HAV como HUNOV está presente en sándwiches listos para el consumo, lácteos y carnes (Marsh *et al.*, 2018; Purpari *et al.*, 2019). Sin embargo, los moluscos bivalvos son los alimentos de mayor riesgo, los cuales, al ser consumidos crudos, provocan brotes de intoxicación alimentaria a lo largo del mundo; (Yates, 2011; Meghnath *et al.*, 2019).

The Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference group (FERG) estimó que, en el año 2010, HAV fue responsable de 14 millones de casos de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA's) de las cuales 27.731 resultaron en la muerte de los infectados. Mientras que HUNOV provocó 35.000 fallecimientos por la misma causa en el mismo año a nivel mundial (Havelaar *et al.*, 2015).

En tanto en Chile, se describe que, al año 2018, la mayor tasa de notificaciones de HAV ocurrió en la Región del Biobío, con 28.4 casos por cien mil habitantes (habs.), manteniéndose en brote desde el año 2014, y contribuyendo con el 39% del total de casos notificados en Chile (MINSAL, 2017). En tanto para HUNOV, el boletín epidemiológico de diarreas agudas de MINSAL, menciona que anualmente se registran 5.000 diarreas agudas en niños menores de 5 años, y de ellas el 58% tienen como agente causal a Norovirus (MINSAL, 2016). Si bien existen datos de brote de intoxicación alimentaria en el país, con agente causal Norovirus y/o Hepatitis A, no se ha evaluado la genotipificación del virus en matrices alimentarias (Díaz T *et al.*, 2012; Rivas *et al.*, 2018). De hecho, deja al descubierto la baja a nula investigación de estos agentes en el país, en el boletín de ACHIPIA año 2017, el cual utiliza datos estadounidenses para mostrar los brotes de intoxicación alimentaria causados por Norovirus (ACHIPIA, 2017).

Es por todo lo descrito anteriormente, que los virus Hepatitis A y Norovirus son de importancia en salud pública, y requieren un análisis con herramientas in silico que permitan evaluar grandes cantidades de cepas, distribuidas a lo largo del mundo, y entregar con ello la realidad actual de ambos agentes virales tanto de su distribución geográfica como de su similitud genética, en una sola imagen que lo permita. Las filogenias virales proporcionan información crucial sobre la propagación de enfermedades infecciosas, que a menudo complementan o incluso sustituyen los métodos de vigilancia convencionales, particularmente cuando el muestreo es deficiente (Louca *et al.*, 2021). Por otro lado, frente a la

escasa información respecto a la presencia de HAV y HUNOV en matrices alimentarias de nuestro país, es menéster realizar una pesquisa de estos agentes virales en nuestra región para dilucidar el estado real de ellos en nuestra zona geográfica, entregando el primer estudio nacional de detección de HAV y HUNOV en moluscos bivalvos de la región del Biobio, para con ello, compartir las directrices necesarias para futuras investigaciones en nuestro país y continente.



1. Etiología y epidemiología de Virus Hepatitis A

HAV, por sus siglas en inglés “Hepatitis A virus”, es un virus perteneciente a la Familia Picornaviridae, y se clasifica como la única especie del Género Hepatovirus (Lefkowitz *et al.*, 2018). Se caracteriza por ser un virus desnudo, que conserva características estructurales y funcionales propias de los picornavirus ancestrales (Wang *et al.*, 2015), no obstante, se ha descrito la existencia de HAV en forma envuelta cuando el virión está dentro del hospedador (Feng *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2019). El Virus de la Hepatitis A consta de 7 genotipos, de los cuales 4 genotipos son de origen humano (I, II, III, y VII), y 3 genotipos son de origen simio (IV, V, VI) (Nainan *et al.*, 2006). Se reconocen seis subgenotipos (SG) IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, y son de dispersión geográfica universal (Smith y Simmonds, 2018).

Posee un ARN genómico lineal y de polaridad positiva, de 7.500 nucleótidos de longitud, compuesta por una región 5' no traducida (UTR) de 734 a 740 nucleótidos (García-Aguirre y Cristina, 2008) que constituye el segmento viral de elección para la amplificación genómica del virus cuando se realiza diagnóstico por PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) (Echevarría y Avellón, 2008), debido a su alto nivel de conservación y polimorfismo de fácil detección (Wang *et al.*, 2015). Le sigue un marco de lectura abierto (ORF), y un 3'UTR de 40 a 80 nucleótidos, con una cola de poliadenosina (Mackiewicz *et al.*, 2010) (Figura 1).

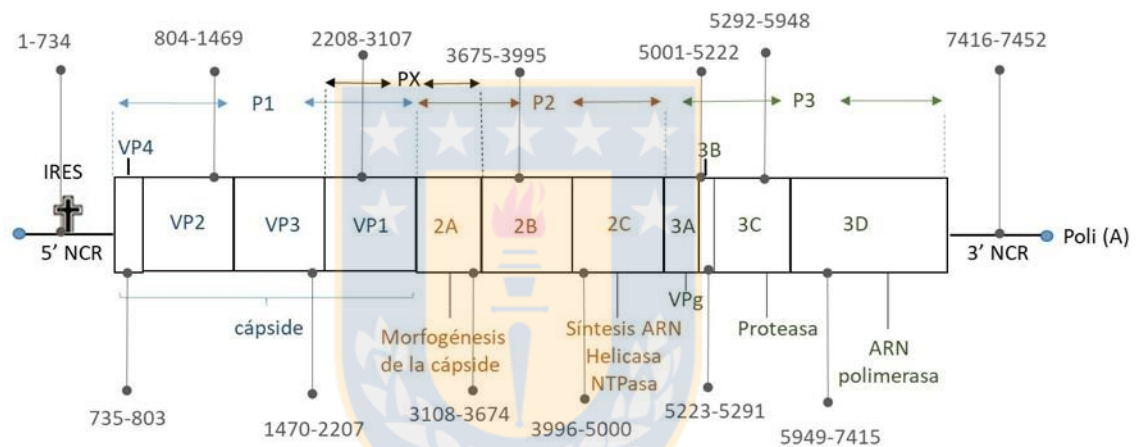
El ORF codifica una sola proteína de aproximadamente 2230 aminoácidos, de la cual se reconocen 3 regiones denominadas P1, P2 y P3 (Wang *et al.*, 2015). La región P1 alberga las proteínas de la cápside, VP1, VP2 y VP3, y si bien existe una cuarta proteína denominada VP4, ésta no es detectada en partículas virales maduras (Cao *et al.*, 2018). Por otro lado, las partículas que contienen la extensión VP1 se envuelven en la membrana plasmática hospedadora para crear virus envueltos (McKnight y Lemon, 2018; Rivera-Serrano *et al.*, 2019).

Se definen residuos de VP1 y VP3 implicados en la neutralización de epítomos a través de anticuerpos del hospedador, por lo que esta zona es de especial interés para el desarrollo de vacunas (Ping y Lemon, 1992; Shukla *et al.*, 2014). Sin embargo, la interacción de la antigenicidad de HAV y el sistema inmune no está completamente caracterizada (Cao *et al.*, 2018).

La región P2 alberga proteínas estructurales que contribuyen en el ensamblaje de las mismas. Se destaca el segmento PX, que es una forma más larga de VP1 unida a la proteína 2A (Dotzauer *et al.*, 2005). Esta región PX es única de HAV entre los picornavirus y por ende la más estudiada para su tipificación molecular (Wang *et al.*, 2015). Por último, la región P3, es el lugar donde codifica una proteína del virión ligada al genoma (VPg) que se vincula a la iniciación de síntesis de ARN (Cuthbert, 2001). Se describe que el género Hepatovirus tiene un tropismo por los hepatocitos (Song *et al.*, 2014), a los cuales ingresa por transcitosis y es el lugar donde se libera el genoma viral (Qi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Cabe mencionar que, si bien el virus de la Hepatitis A está dentro de una familia de virus ARN positivo desnudo, se ha descubierto que éste puede obtener habilidades de cuasi envoltura dentro del hospedador (eHAV) (Qi *et al.*, 2015).

La patogenia de HAV, aún es motivo de investigación ardua, manteniéndose bajo supuestos teóricos (Dotzauer *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015). Se presume que HAV tiene afinidad con un receptor de inmunoglobulina polimérica (plgR), el cual utiliza para ingresar desde el intestino a la circulación, y ser liberado a través del hepatocito apical hacia el canalículo biliar (Cuthbert, 2001; Jeong y Lee, 2010), utilizando receptores para ingresar al hígado y generar viremia (Dotzauer *et al.*, 2005) En el hospedador, las células T, Ig y mucina 1 (TIM-1) actúan como receptores para HAV (Manangeeswaran *et al.*, 2012). No obstante, no se ha logrado determinar los sitios de adherencia de estos receptores sobre el virus (Wang *et al.*, 2015).

Figura 1. Genoma del virus Hepatitis A. ARN hebra simple en sentido positivo (5'NCR - 3'NCR), de 7.5 kb aprox. Cada cuadro representa el segmento de codificación de poliproteínas, que son procesadas en regiones P1, P2 y P3, dentro de 1 sólo marco de lectura abierto (ORF1). La región PX descrita como extensión de la cápside viral. Se indican las funciones individuales de las proteínas reconocidas, y la ubicación nucleotídica de cada segmento.



Fuente: Imagen modificada de Mcknight and lemon, 2018; Nainan *et al*, 2018, y García Aguirre, 2008.

HAV es reconocido como uno de los patógenos de intoxicación alimentaria más importantes en el mundo, por el número de brotes y el número de personas afectadas, y su prevalencia depende de las condiciones sanitarias del ambiente, la calidad del agua, y la edad del individuo al momento de ser infectado (Koopmans y Duizer, 2004).

Si bien HAV produce una hepatitis aguda generalmente autolimitante, se describen casos fulminantes de la enfermedad debido a que su gravedad está directamente relacionada con el estatus inmunológico y edad del hospedador (Mackiewicz *et al.*, 2010). Cursa como un cuadro de aparición brusca e

inespecífica, pseudo gripal, con astenia, mialgias o artralgias, náuseas o vómitos, fiebre, estreñimiento o diarrea (Jeong y Lee, 2010). En algunos casos se presenta prurito e ictericia (Aguilera *et al.*, 2014). Se describe que menos del 30% de los niños y jóvenes infectados manifiestan sintomatología hepática, a diferencia de los adultos infectados, los cuales manifiestan signos clínicos de una hepatitis aguda en un 80 % de los casos (Jeong y Lee, 2010).

En relación al tratamiento de la sintomatología clínica de Hepatitis A, se ha determinado que no existe un tratamiento específico, por lo que solo se aplican terapias paliativas, tales como uso de rehidratantes y manejo del dolor (Jeong y Lee, 2010). Existen datos sobre la vacunación contra Hepatitis A, que demuestran su eficacia en la disminución de brotes por este agente (Beran *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018). En nuestro país, se ha empleado una vacuna anti HAV la cual detecta la región VP1 del virus, que se aplica a niños de 18 meses como parte del programa nacional de vacunación obligatoria (MINSAL, 2017; Villena *etal.*, 2017)

Chile se considera una región de endemicidad intermedia, donde el 50% de la población es inmune a la edad de 15 años (Kroneman *et al.*, 2018). El último boletín epidemiológico de HAV en el país describe que, a junio del año 2018, existe un aumento de notificaciones 2 a 3 veces superiores a lo esperado según la mediana 2013-2017. El 54% de los casos se concentra en el grupo etario entre 15 a 29 años, siendo el grupo de 20 a 24 años y especialmente hombres, quienes presentan un riesgo 2,3 veces mayor respecto a las mujeres, principalmente dado por sexo entre hombres (MSM) (MINSAL, 2017). Los brotes de intoxicación alimentaria por HAV han presentado ciclos de 3 a 5 años en el país (Medina *et al.*, 2003). A modo de ejemplo, en el año 2002 se notificaron 180 brotes de Hepatitis A, en gran parte dentro de recintos privados como colegios y casinos (Medina *et al.*, 2003). En 2015 hubo un brote de Hepatitis A en la región del BioBio, y en el año 2017 en Antofagasta y Valparaíso por consumo de agua

contaminada (MINSAL, 2017). Queda al descubierto que, en los reportes epidemiológicos nacionales, denotan el concepto “brote”, específicamente a un alza de infección por HAV en individuos de una zona en común, sin realizar estudios retrospectivos para ratificar con evidencia la posible causal de tales brotes. Hoy en día existen circulares del Ministerio de Salud (MINSAL), que abordan la investigación de HAV en base a notificación de casos en hospitales, por serología o diagnóstico clínico, dando consejos de prevención enfocados en la higiene personal y sanitización de cocina y baños (MINSAL, 2006).

Debido al largo período de incubación de HAV (15 a 50 días), la vinculación del virus con el rastreo del alimento contaminado no siempre es efectivo (Alonso *et al.*, 2015; Jeong y Lee, 2010). Dado que HAV se considera estable, la comparación de las cepas por tipificación molecular puede ayudar a identificar brotes y alimentos asociados, sobre todo cuando éstos tienen una alta distribución geográfica (Kroneman *et al.*, 2018).

2. Etiología y epidemiología de Norovirus

HUNOV, por sus siglas en inglés “Human norovirus”, es un virus desnudo de 27nm, clasificado en la familia Caliciviridae. Es ARN cadena simple positiva, de 7.5 kb de longitud, y codifica para 8 proteínas, de las cuales dos son estructurales: VP1 y VP2. Según la variabilidad nucleotídica de la proteína estructural VP1, se han clasificado 7 genogrupos (GI – GVII) y 40 genotipos (Vinjé, 2015).

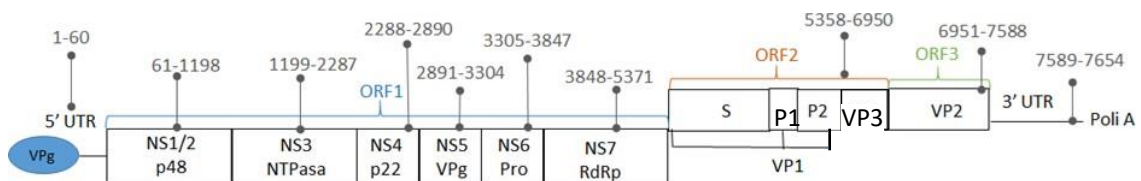
De ellos, se conoce que los genotipos provenientes de los genogrupos GI, GII, GIV, GVIII y GIX infectan a humanos, siendo los más prevalentes, los genogrupos GI y GII que poseen 9 y 27 genotipos respectivamente (Chhabra *et al.*, 2019). En la década de los noventa, el Genotipo GII.4 fue la mayor causal clínica de la infección (Siebenga *et al.*, 2009). En tanto, actualmente, la cepa emergente

GII.17 se ha vuelto el genotipo predominante de infección en algunas partes de Asia (De Graaf *et al.*, 2015).

La familia de Calicivirus es similar a los Picornaviridae en la presencia de una proteína unida al genoma (Vpg), y en la dirección de su secuencia ARN, más la presencia de polimerasas y proteasas (Atmar y Estes, 2001). El Norovirus humano posee un genoma ARN positivo y no segmentado, de 7.5 kb de longitud, compuesto de 3 marcos de lectura abiertos (ORFs).

Éstos ORFs codifican a una larga poliproteína no estructural (ORF 1), la cual es traducida en seis proteínas maduras (NS1/2, NS3, NS4, NS5, NS6 and NS7); ORF 2 codifica la proteína estructural más larga (VP1), y la proteína estructural menor (VP3). En tanto, ORF3 codifica la proteína estructural más pequeña de HUNOV (VP2) (Chhabra *et al.*, 2019; Thorne *et al.*, 2012) (Figura 2).

Figura 2. Genoma del virus Norovirus Humano (HUNOV). ARN hebra simple en sentido positivo (5'NCR - 3'NCR), de 7.5 kb aprox. Cada cuadro representa el segmento de codificación de poliproteínas, que son procesadas en 3 marcos de lectura abiertos (ORF1, ORF2, ORF3). La cápside viral se codifica en el último segmento del genoma (VP1, VP2), diferenciándose en VP1 los dominios S y P. Mientras ORF1 se compone de las proteínas no estructurales. Se indica la ubicación nucleotídica de cada segmento.



Fuente: Imagen modificada de Robilotti *et al.*, 2015 y Guadagnucci *et al.*, 2011.

La cápside viral es icosaédrica y se compone de 90 dímeros de VP1, el cual se divide en una porción interna de la cápside (Shell domain o S), y una porción

protuberante (Protruding domain o P). el dominio P es responsable de unirse a los antígenos del grupo histosanguíneo (HBGA), los cuales actúan como receptores para el virus en el intestino de los hospedadores susceptibles (Lindesmith *et al.*, 2003).

La partícula viral fue descubierta en el año 1972 mediante microscopía electrónica, en Ohio, Estados Unidos (Kapikian *et al.*, 1972) y era una enfermedad conocida como la enfermedad del vómito de Invierno (Adler y Zickl, 1969).

Norovirus Humano es la causa viral más común de intoxicaciones alimentarias en el mundo (cerca del 90% de los brotes) (Marsh *et al.*, 2018; Moore *et al.*, 2015). Anualmente, es responsable de 70.000 a 200.000 muertes a nivel mundial (Weinberg, 2018), con el mayor índice de mortalidad en países en desarrollo (Costa *et al.*, 2019)

En pacientes adultos inmunocompetentes, HUNOV es de presentación rápida, con un periodo de incubación de 24-48 hrs, y resolución de síntomas en 12 a 72 hrs (Karst, 2010).

La sintomatología se caracteriza por cuadros de diarrea y vómitos, incluyendo dolor abdominal y náuseas. En algunos casos también incluye fiebre y dolor muscular. No obstante, en grupos de riesgo como ancianos y menores de 5 años, la presentación clínica puede agravarse y mantenerse hasta por 6 semanas (Subahir *et al.*, 2019; Trivedi *et al.*, 2013). Además se ha descrito la persistencia de infección en pacientes oncológicos (Simon *et al.*, 2006).

En tanto en Sudamérica, Norovirus se asocia con al menos 1 de cada 6 hospitalizaciones a causa de diarrea aguda en menores de 5 años (O'Ryan *et al.*, 2017). Recientemente, existen reportes que correlacionan la malnutrición con la gravedad de infecciones enteropatógenas, provocando doble mortalidad por número de infectados (Tickell *et al.*, 2020).

Respecto al tratamiento de este cuadro viral se han detectado resultados positivos en el tratamiento con polímeros, específicamente Sulfonato de Naftaleno, que supone inactivar la región RdRp de HUNOV (Tarantino *et al.*, 2014). No obstante, se estima que la efectividad de éstos depende de la variabilidad de esta región, específicamente en el genogrupo GII, por lo cual el tratamiento para este virus aún se mantiene en estudios experimentales (Ozaki *et al.*, 2020).

La vacunación contra este virus aún no es factible, por la ausencia de una vacuna comercial disponible. Actualmente están en desarrollo dos vacunas contra los genotipos I y II, en fase de ensayos clínicos (Mattison *et al.*, 2018)

A modo de ejemplificar el aspecto ambiental, se ha descrito la presencia de HUNOV en lagos recreacionales en Holanda, motivo por el cual hoy en día este virus está dentro del marco de estudio de One Health (Sips *et al.*, 2020). También se ha presenciado un aumento en la carga viral en aguas costeras, por descargas residuales de botes y barcos. Se destaca además que, en épocas lluviosas, se asocia un aumento en la prevalencia de HUNOV en aguas costeras producto de la escorrentía urbana (Razafimahefa *et al.*, 2019). Es por esto que, en la última década, se ha prestado énfasis a los rasgos climáticos como posible factor predominante en la incidencia de la enfermedad (Maalouf *et al.*, 2010; Rohayem *et al.*, 2009).

A nivel nacional, según lo establece el Reglamento sobre notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria (Decreto Supremo N°158/2004), HUNOV es de notificación exclusiva a través de establecimientos centinelas. El boletín epidemiológico de diarreas agudas de MINSAL, menciona que anualmente se registran 5.000 diarreas agudas en niños menores de 5 años, y de ellas el 58% tienen como agente causal a Norovirus (MINSAL, 2016). A nivel molecular, se describe la presencia de HUNOV genotipo II implicado en brotes gastroentéricos de Santiago entre 2001 y 2003 (Vidal *et al.*, 2006), y en un brote

del año 2010 en Antofagasta, donde se detectó la presencia del virus en muestras ambientales de agua servida, con la cual feriantes regaban las hortalizas que vendían en el mercado (Díaz *et al.*, 2012).

3. Métodos de Transmisión

Como agentes virales gastroentéricos, tanto HAV como HUNOV se transmiten principalmente por vía fecal – oral, ya sea por traspaso de persona a persona, o por ingestión de agua o alimentos contaminados (Dotzauer *et al.*, 2005; Trivedi *et al.*, 2013). Una de las diferencias de transmisión entre ambos virus, es que HAV puede transmitirse a su vez por uso de drogas intravenosas y sexo entre hombres (MSM) (Jeong y Lee, 2010; Rivas *et al.*, 2018). En tanto HUNOV, puede transmitirse por aerosoles producidas durante el vómito (Fernández y Gómez, 2010). Además del consumo de agua y alimentos contaminados, ambos se transmiten por la ingestión de agua contaminada, alimentos que crecen a ras de suelo, y moluscos crudos o mal cocidos, siendo estos últimos los principales reservorios alimentarios de origen animal (Bon *et al.*, 2005; Glass *et al.*, 2009; Maalouf *et al.*, 2010; Purpari *et al.*, 2019). En el año 2015, los moluscos crudos o semicocidos eran causal del 15% de brotes por HUNOV a nivel mundial, y si bien los vegetales crudos son el principal alimento transmisor de este virus en particular (Moore *et al.*, 2015), las ostras se conocen como los principales vectores para la transmisión humana de HUNOV en el medio ambiente (Mathijs *et al.*, 2012).

En la actualidad existe evidencia sobre la viabilidad de HUNOV en superficies y su capacidad de infectar. En este sentido, se ha demostrado que el virus permanece infectivo después de 28 días en diferentes superficies de contacto, tales como acero inoxidable, plástico, caucho, vidrio, cerámica y madera (Kim *et al.*, 2014), Requiere una baja carga viral para ser infectivo (Atmar y Estes, 2001; Glass *et al.*, 2009) y es de alta persistencia en el medio ambiente, razón por la cual son comunes los brotes de HUNOV en numerosos ambientes, como jardines

infantiles, hoteles, hospitales, enfermerías, y cruceros (Bull *et al.*, 2007; Yates, 2011).

Por otro lado, HAV es estable en el ambiente, permaneciendo de días a meses en suelos, fuentes de agua, sedimentos marinos y ostras. Es resistente al calor y al bajo pH (Biziagos *et al.*, 1988; Navas y Báez, 2015) Además, estas características facilitan la probabilidad de transmisión por alimentos y agua contaminados, y a su vez facilita la probabilidad de detección en muestras ambientales, como el agua (Bloch *et al.*, 1990; Halliday *et al.*, 1991; Ahmad *et al.*, 2018).

En alimentos, cabe mencionar que la acumulación de HUNOV en moluscos bivalvos está influenciada por las condiciones ambientales que determina la persistencia viral en el agua. El virus es eliminado por semanas o meses por las fecas y vómito tanto de infectados sintomáticos como asintomáticos, alcanzando una eliminación viral sobre las 10⁹ copias genómicas por gramo de fecas infectadas, (Atmar *et al.*, 2008). Es por ésto que la protección y gestión de la salud pública requiere estudiar la diversidad de HUNOV en alimentos contaminados con el medio ambiente, como los mariscos (Desdouits *et al.*, 2020).

4. Evaluación filogenética de HAV y HUNOV

Las reconstrucciones filogenéticas que se basan en datos moleculares ha permitido la evaluación tanto taxonómica como epidemiológica de cualquier organismo. En el caso de HAV, éste se ha clasificado en 7 genotipos (I-VII), y 6 subgenotipos (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB), con un porcentaje de variabilidad nucleotídica entre genotipos del 15% y entre los subgenotipos del 7.8% (Robertson *et al.*, 1992). Los subgenotipos I, II y III se han aislado de muestras de origen humano, y las cepas IV, V y VI se han aislado de muestras de origen simio. Cabe destacar que el genotipo III es el único de los seis que se ha aislado tanto de simios como humanos (Navas y Báez, 2014). No obstante, gracias a

estudios filogenéticos ha comprobado por ejemplo, que el virus Hepatitis A resultó ser un agente zoonótico de pequeños mamíferos (Drexler *et al.*; 2015).

Para la caracterización genotípica de HAV, se ha denominado a la región genómica VP1 como la zona ideal para la amplificación, por su identidad nucleotídica del 75 a 85%, mayor a los porcentajes de otras regiones del virus. Sin embargo, la mejor evaluación filogenética de cualquier organismo es mediante secuenciación de genoma completo (Wang *et al.*, 2016). Entre genotipos, la mayor variabilidad nucleotídica en la región VP1 es entre los genotipos IIIA y V con un promedio de diferencia del 23%. En tanto, los subgenotipos con menos diferencia observada es entre IA y IB de las cepas humanas, con un 9.7% de diferencia nucleotídica, y la menor diferencia interespecie es entre los subgenotipos IB y VII (1.05% en promedio) (Costa-Mattioli *et al.*, 2002).

De modo similar, se han clasificado 10 genogrupos de HUNOV (GI a GX), basado en la diversidad aminoacídica de la proteína VP1. Analizando su cápside, de este mismo modo se han subdividido 49 genotipos distintos, y según la variación de secuencias nucleotídicas parciales de la región ARN dependiente de ARN polimerasa, se han confirmado otros 60 genotipos (Chhabra *et al.*, 2019). Actualmente la cepa GII.4 se mantiene como la más infectante desde la década del 1990. No obstante, desde el año 2014 se ha reportado un aumento de casos por la cepa GII.17 (Matsushima *et al.*, 2019), la cual en Sudamérica se describen casos en Brasil y Argentina (Andrade *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2019).

El estudio filogenético de HUNOV no dista de ser menos complicado que el virus por sí mismo. Si bien se han clasificado genogrupos y genotipos de este agente, la rápida mutación genética que presenta en segmentos tanto conservados como variables de su genoma, la clasificación conocida de HUNOV no es completamente informativa a la hora de diferenciar las variantes de cada

genotipo, o, dicho de otro modo, a la fecha, no hay un sistema de clasificación de Norovirus recombinantes (Kroneman *et al.*, 2013; Chaabra *et al.*, 2019).

Nuevos estudios plantean la denominación de “inmunotipos” entre las variantes de HUNOV GI y GII. Esto porque se determinó que GII.4 específicamente adquiere cambios en su cápside con el tiempo (genotipo en evolución), mientras que todos los otros genotipos (no GII.4), retienen una proteína de la cápside altamente conservada durante décadas (genotipo estático). Correlacionando estos cambios evolutivos con brotes epidémicos, Parra *et al.* (2017), describe que “Los inmunotipos representados por genotipos estáticos sólo pueden volver a infectar a los individuos que no hayan recibido ese inmunotipo en particular, mientras que el genotipo en evolución GII.4 puede volver a infectar a los individuos reemplazando periódicamente sus variantes”. De este modo se predice que mientras los adultos mayores tienen mayor riesgo de enfermarse por la evolución de los genotipos, los niños hasta no desarrollar una inmunidad amplia, se infectarán con cepas de cada uno de los inmunotipos (Parra *et al.*, 2017)

Es de importancia desarrollar métodos sensibles, rápidos y confiables para verificar la ausencia de agentes virales y mejorar la eficacia de los tratamientos tecnológicos implementados en la industria de alimentos para asegurar la sanidad del alimento con la remoción del virus (Lebourgeois *et al.*, 2018). La caracterización molecular de las secuencias amplificadas por “PCR en tiempo real con transcriptasa reversa” (qRT-PCR) del ARN genómico y posterior análisis filogenético, permite determinar los diferentes genotipos virales, lo cual si bien, carece de utilidad clínica, resulta útil tanto para la identificación de fuentes de infección como la dinámica evolutiva del virus (Nainan *et al.*, 2006; Coudray-Meunier *et al.*, 2014). En este caso, las redes bayesianas representan una herramienta flexible y contundente para el análisis de investigaciones basadas en resultados, más en el área médica que tiene como objetivo la precisión (Arora *et al.*, 2019).

5. Pesquisa de HAV y HUNOV en moluscos bivalvos como matriz alimentaria y su vigilancia epidemiológica

Los estudios descritos respecto a la caracterización molecular en moluscos, concuerdan en que la extracción del virus es el primer paso y el más crítico dentro del proceso, básicamente por la composición del molusco, rica en polisacáridos, ácidos grasos y proteínas (Stals *et al.*, 2012). Respecto a la detección de HUNOV en muestras de marisco, se destaca principalmente la baja eficiencia en la extracción del virus y la presencia de sustancias que inhiben o interfieren en la detección molecular como la mayor dificultad del proceso (Le Guyader *et al.*, 2009). Sin embargo, HAV ha sido aislado con éxito de ostras, almejas y mejillones, mediante la técnica de PCR (Nainan *et al.*, 2006).

El test de referencia para la extracción viral en este tipo de matriz es la ultracentrifugación, mostrando una eficiencia de recuperación del 10% del virus en 25 gramos de ostras (Casas *et al.*, 2007). No obstante, se reporta con más frecuencia el método de extracción directa de ARN viral en moluscos bivalvos (Barardi *et al.*, 1999; Sincero *et al.*, 2006), el cual busca extraer el virus mediante reactivos comerciales. Posterior a la extracción del virus, la detección de éste desde el marisco se ha logrado mediante PCR convencional con transcriptasa reversa (RT-PCR) (Atmar *et al.*, 1995; Cromeans *et al.*, 1997; Casas *et al.*, 2007; Londoño y Sánchez, 2018), y PCR en tiempo real con transcriptasa reversa (qRT-PCR) para la cuantificación de éste (Costafreda *et al.*, 2006).

Se destaca que la técnica de PCR anidado (nPCR) permite detectar bajas concentraciones de unidades formadoras de partículas (PFU), lo cual es significativamente más sensible que cualquier otra técnica de PCR probada en este virus, siendo 1000 veces más sensible que RT-PCR, y 100 veces más sensible que qRT-PCR, detectando como mínimo de 0 a 2 PFU de HAV (Hu y Arsov, 2009).

Se ha descrito el establecimiento de ambos agentes virales en todos los continentes, con la presencia de más de dos genotipos en una misma zona geográfica (D'Andrea *et al.*, 2015; Davidkin *et al.*, 2007). En Asia por ejemplo, India presenta HAV del subgenotipo (SG) IIIA (Kulkarni *et al.*, 2009). En tanto Japón, presenta los subgenotipos IIIA y IIIB (Endo *et al.*, 2007), además de ambos genogrupos más prevalentes de HuNoV (GI y GII) (Kageyama *et al.*, 2004), a diferencia de Tailandia, que sólo presenta GII (Phumpholsup *et al.*, 2015). En Europa se describen los subgenotipos IIA de HAV en Francia (Desboiset *et al.*, 2010) y SG IA y IB en los Países Bajos (Tjon *et al.*, 2005). En tanto de HUNOV, se presenta el Genogrupo II en Bélgica (Wollants *et al.*, 2015), y España (Carmona *et al.*, 2016).

A diferencia de América del Sur, el resto de continentes realiza estudios periódicos en la caracterización molecular de HUNOV y HAV, sobre todo a nivel alimentario, donde se encuentra la mayor causa de brotes. A modo de ejemplo, Túnez (Ouardani *et al.*, 2016) o Australia (Conaty *et al.*, 2000), América del Norte (Beller, 1992; Collier *et al.*, 2014; Rosenblum *et al.*, 1990; Shie *et al.*, 2000), Francia (Bosch *et al.*, 2001), China (Halliday *et al.*, 1991), Suecia (Nenonen *et al.*, 2008), y España, que lleva 20 años de estudio sobre prevalencia de virus entéricos transmitidos por mariscos (Romalde *et al.*, 2002), entre otros.

Respecto a HUNOV y su estudio en mariscos de consumo humano, se realiza comúnmente a lo largo del mundo, mediante RT-PCR. Se ha descrito en China, con prevalencia de GI (Zhou *et al.*, 2017). A diferencia de Marruecos, que su último estudio mostró sólo la presencia de GII en sus costas (El Moqri *et al.*, 2019) En tanto, se ha descrito la presencia de los dos genotipos más prevalentes (GI, y GII), en una misma muestra de molusco, como es el caso de Francia (Polo *et al.*, 2016), o la presencia de ambos genotipos en distintas muestras de una misma zona costera, como ocurre en Canadá (Meghnath *et al.*, 2019). Cabe destacar que, en algunas zonas costeras, la presencia de HUNOV GII es incluso mayor

que la presencia de Rotavirus y Hepatitis A, como es el caso de Italia (Fusco *et al.*, 2019).

Un estudio realizado en conjunto entre Alemania y Chile, sobre la bioconcentración de HAV en moluscos, determinó que estos animales pueden coleccionar y concentrar hasta 100 veces más HAV que la dispuesta en su ambiente, y este persiste a medida que la filtración disminuye (Enriquez *et al.*, 1992). Por otro lado, Stals *et al.*, (2012), comentan que las muestras de mariscos naturalmente contaminadas contienen niveles de virus transmitidos por los alimentos que varían entre 10² y 10⁴ copias genómicas virales por gramo de tejido digestivo. Estos estudios comprueban, que los moluscos son el mejor reservorio de HAV, promoviendo la sobrevivencia y crecimiento de este agente viral (FSANZ, 2017).

La prevalencia de HAV en los moluscos se presenta en un rango de 6 – 27%, según la técnica de detección y zona de muestreo (Yates, 2011). Distintos estudios mundiales, utilizando técnicas moleculares como PCR han determinado una prevalencia para HAV en mariscos de un 15% en Italia (Crocì *et al.*, 2003), 27% en España (Romalde *et al.*, 2002) y hasta 21% en Brasil (Sincero *et al.*, 2006). A nivel nacional, durante el año 2005, un estudio realizado en Santiago, reportó que entre un 45 y 55% de los brotes de gastroenteritis por consumo de mariscos, eran causados por HUNOV (Vidal *et al.*, 2006). Estudios posteriores de HUNOV determinan que el 18% de las infecciones gastrointestinales agudas en niños chilenos es causada por este virus (O’Ryan *et al.*, 2017), siendo para el año 2012, el causal viral más frecuente en niños menores de 5 años, hospitalizados por diarrea aguda en Concepción, siendo más incidente que Rotavirus (Montenegro *et al.*, 2014).

Si bien se conoce un brote de Intoxicación alimentaria por HUNOV en el país (Díaz *et al.*, 2012), no existen datos de prevalencia de HAV o HUNOV por detección molecular, en ningún tipo de alimento o matriz alimentaria, por lo tanto,

se requiere ampliar esta investigación para conocer mejor el estado del virus en la región, desarrollar estrategias para prevenir la contaminación por HAV y HUNOV en los moluscos, y su real efecto en las infecciones gastrointestinales del país.

No obstante, se conocen los datos de cosecha de los mariscos a muestrear en este estudio (mejillones y almejas), aportados por SERNAPESCA en el año 2017. En la Región del Biobío, este grupo de especies representó el 21,1% del total cosechado en centros de cultivo, con 56 toneladas. Las principales especies fueron *Mytilus chilensis* (mejillones), que alcanzó un nivel de 38 toneladas, aportando el 67,9% del total de este grupo, y *Venus antiqua* (almejas), con el 26,8%, correspondiente a 15 toneladas (INE, 2017).

En cuanto a las zonas regionales de cultivo de moluscos, se destaca la Caleta Tumbes, ubicada en la península de Tumbes, a 12 km de Talcahuano, por ser una de las caletas de pesca artesanal de mayor tradición en la región del Biobío (Flores y Sanhueza, 2018). Desde este centro portuario se comercializan productos del mar tanto a la región del Biobío como a la región de Ñuble, siendo uno de los centros de mayor representación para la evaluación de los moluscos que son consumidos en esta zona de Chile. Por otro lado, cabe destacar, que esta península utiliza emisarios submarinos como método de tratamiento de aguas residuales (González-Saldía *et al.*, 2019) Es necesario destacar, que conocer la dinámica del agente dentro de la zona, analizar posibles factores de riesgo, o reconocer la presencia de los alimentos como agente causal de los brotes epidémicos de HAV y HUNOV resulta distante en la investigación del país. Es por todo lo anterior, que la realización de este estudio permitirá establecer relaciones filogenéticas entre patógenos descritos a nivel mundial, y con ello evidenciar una posible co-circulación interzonal. Además, entregará la primera pesquisa de HAV y HUNOV en matrices alimentarias en Chile.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El análisis filogenético de HAV y HUNOV a nivel mundial presenta una co-circulación geográfica, y ambos agentes están presentes en moluscos bivalvos de la Región de Biobío.

Objetivo general

Realizar un diagnóstico epidemiológico molecular in silico de cepas HAV y HUNOV distribuidos en el mundo, y una pesquisa de ambos agentes en moluscos bivalvos de la región del Biobío.

Objetivos específicos

Confecionar y analizar árboles filogenéticos con cepas descritas de HAV y HUNOV a nivel mundial.

Pesquisar HAV y HUNOV en Almejas (*Venus Antiqua*) y Mejillones (*Mytilus chilensis*) de la región del Biobío mediante RT- PCR.

MATERIAL Y METODO

Objetivo específico 1: Confeccionar y analizar árboles filogenéticos con cepas descritas de HAV y HUNOV a nivel mundial.

1. Colección de secuencias homólogas

Se realizó una búsqueda en línea de secuencias genómicas pertenecientes a HAV y HUNOV en la plataforma GenBank, en sus categorías “nucleotide”, “genome”, “BioProject”, y “Taxonomy”.

Se utilizaron palabras clave o “booleanos” como método de selección de secuencias, tales como como “Hepatitis A complete genome”, “HAV complete genome”, “VHA complete genome”, “HAV OR Hepatitis A AND complete genome”, “HAV OR Hepatitis A AND mussel”, “HAV OR Hepatitis A AND Clams OR Oysters”, para el caso del virus Hepatitis A, y palabras clave como “Norovirus complete genome”, “HuNoV complete genome”, “Norovirus OR HuNoV AND complete genome”, “HuNoV OR Norovirus AND mussel”, “HuNoV OR Norovirus AND Clams OR Oysters”, para el caso de Norovirus, ambos con un rango de longitud de secuencias personalizado de 7.300 a 8.000 pares de bases.

Además, se realizó una búsqueda de secuencias para segmentos genómicos específicos de cada virus, siendo el segmento “RdRp” y la región “VP1/2A” para el caso de HAV.

2. Alineamiento múltiple de secuencias, Selección del modelo de sustitución más ajustado y Pruebas de confiabilidad

Las secuencias obtenidas en formato .fasta fueron evaluadas para su alineamiento en agrupaciones de longitud de secuencia, mediante el programa MEGA-X utilizando el algoritmo ClustalW. De este modo se obtuvo un total de 6

agrupaciones de secuencias según su segmento de estudio, alineadas correctamente. A su vez se obtuvo entre secuencias, la proporción de sitios de nucleótidos que son diferentes entre ellas, conocido estadísticamente como p-distance (Kumar y Nei, 2000). Para pulir los pools de alineamiento múltiple se utilizó el programa BioEdit.

Para analizar el pool de secuencias ya alineadas se utilizó el programa JmodelTest (Posada, 2018), y se determinó el modelo de sustitución más ajustado según el criterio de información de Akaike (AIC). Jmodeltest obtiene el modelo más ajustado a las secuencias en estudio, y se escoge según los valores que arroja cada modelo, donde a menor número significa menor número de pasos. En otras palabras, construye un consenso de árboles de máxima verosimilitud (MV) para cada modelo en el conjunto de candidatos (Posada, 2008), Los resultados obtenidos por Jmodel sólo tienen fines estadísticos para que el árbol obtenido sea el más adecuado a las secuencias genómicas analizadas.

Existe una prueba estadística que mide el soporte de los nodos en los árboles filogenéticos. También llamada prueba de confiabilidad o “Bootstrap”, es una técnica que utiliza reordenamientos de alineamiento aleatorio para determinar errores o confianza en los parámetros estimados. Se recomienda como mínimo 1.000 réplicas para interpretar que, si el valor bootstrap es >85%, es considerado un modelo con buen soporte. En caso contrario, el modelo filogenético no tiene sustento evolutivo.

Se realizó 2.000.000 de bootstrap en cada pool de secuencias según el segmento en estudio, mediante estimación de máxima verosimilitud.

3. Interpretación evolutiva y análisis de filogenia

La interpretación evolutiva se realizó mediante inferencia Bayesiana, el cual lleva el nombre por su creador, Thomas Bayes, quien incorporó a la inferencia

estadística conocimiento a priori a la hipótesis (Rendón-Macias *et al.*, 2018). De este modo, el grado de confianza de una hipótesis se modifica según la evidencia (Rodin *et al.*, 2012).

se expresa en la siguiente fórmula:

$$Pr(A/B) = \frac{Pr(B/A) Pr(A)}{Pr(B)}$$

Lo cual indica que, en el caso filogenético, la probabilidad posteriori de un árbol dada la evidencia de los datos, es igual a la verosimilitud de los datos dada la evidencia del árbol, por la probabilidad a priori del árbol sobre la probabilidad incondicional de los datos. En palabras más simples, este teorema expresa que de una idea preconcebida de una probabilidad (anterior o pretest), se puede actualizar tal concepto mediante el cálculo de una nueva probabilidad sobre la anterior (posterior, a posteriori, o postest). Las herramientas bayesianas adquieren la forma de una red formada por nodos y aristas que representan las variables aleatorias del modelo, y las influencias entre ellas, respectivamente (Arora *et al.*, 2019).

El resultado obtenido se graficó mediante FigTree v 1.4.4

Objetivo específico 2: Detectar HAV y HUNOV en Almejas (*Venus Antiqua*) y mejillones (*Mytilus chilensis*) de la región del Biobio mediante RT- PCR.

4. Obtención de muestras

Para la detección de estos agentes se han descrito estudios con muestreo dirigido (Uribe. 2014). De este modo se han obtenido resultados utilizando como tamaño muestral desde 2 a 19 individuos (Sánchez *et al.*, 2002; Cromeans *et al.*, 1997; Sincero *et al.*, 2006), o pool de muestreo de 150 gr, sin indicar el número de individuos utilizados (Atmar *et al.*, 1995; Croci *et al.*, 2003). En el presente estudio se realizó un muestreo dirigido de 50 unidades de Mejillones (*Mytilus chilensis*) y 50 unidades de Almejas (*Venus antiqua*) en el mes de febrero año 2019, obtenidos directamente desde el Centro Portuario de Tumbes, reconocido por su pesca artesanal. Estos moluscos recién recolectados y frescos, fueron transportados bajo condiciones de refrigeración, y mantenidos entre 4°C a 8°C hasta su manipulación. Para fines prácticos se denominó como muestra al compuesto de 15 mg de hepatopáncreas más 15 mg de branquias por individuo, mantenidos a -20°C hasta su uso.

5. Extracción de ARN viral

Para la obtención de material genético viral, se disectó bajo condiciones de esterilidad las muestras de hepatopáncreas y branquias desde cada unidad de molusco recolectada. Se adoptaron medidas de bioseguridad tales como, uso de mascarilla y lentes, aplicación de alcohol 70% antes y después de cada manipulación, y uso estricto de cámara de bioseguridad (NUAIRE NU425-400E Clase II) durante todo el procedimiento. Tanto el individuo como las muestras obtenidas se mantuvieron sobre hielo constantemente.

Posterior a la disección, cada muestra fue homogenizada por ultrasonido utilizando un sonicador de vástago de titanio (BioLogics, 150V/T) mediante 4

pulsos de 3 segundos a 70% de potencia, y se extrajo el ARN total con el kit E.Z.N.A RNA extraction (Omega) en el caso de *Venus Antiqua*, y con el protocolo de TRIzol Reagent en el caso de *Mytilus chilensis*, siguiendo las instrucciones del fabricante en ambos métodos de extracción de ARN.

Finalmente se cuantificó el material genético obtenido por medio de un lector de ELISA (Epoch, Biotec). La pureza del ARN se determinó por la relación 260/280, y una visualización en gel de agarosa no denaturante para evaluar ARN de 18S y 28S.

6. Reacción de transcripción reversa.

Posterior a la obtención del material genético de las muestras de moluscos, se preparó ADNc mediante las especificaciones del kit RT de New England de Biolabs. En este proceso, se realizó una seguidilla de incubaciones en las muestras agregando en el siguiente orden, 1 µg de ARN total 37°C por 10 minutos con DNase 10X buffer y 2 U DNase I (New England Biolabs. USA) en un volumen de 10 µl; 25 mM EDTA (New England Biolabs. USA) a 75°C por 10 minutos; 60 mM Random primers (New England Biolabs. USA) a 25°C por 5 minutos; M-MuLV 10X buffer a 42°C por 1 hora con 200 U M-MuLV RT (New England Biolabs. USA); 10 mM dNTPs mix y 0,2 U Inhibidor RNAsas (New England Biolabs. USA) en un volumen final de 20 µl; y el proceso concluyó incubando a 65°C por 20 minutos. El ADNc fue almacenado a -20°C hasta su utilización. Muestra control negativo, fue procesada en ausencia de M-MuLV RT

7. PCR en tiempo final (RT- PCR) para genotipificación de las cepas detectadas.

Se amplificó el segmento VP1/2A mediante RT- PCR. Se utilizaron los partidores descritos por Sánchez (2002). (Tabla 1).

Los ensayos de RT-PCR fueron desarrollados utilizando 1 uL de ADNc obtenido de transcripción reversa, 10 mM de cada partidor, 10X buffer Taq polimerasa (ThermoFischer), 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs y agua para completar un volumen final de 25 uL. La mezcla reacción final fue sometida a una desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, 40 ciclos de amplificación (94°C por 1 min, alineamiento a 53°C por 1 min, y 72°C por 1.5 min), y una extensión final a 72°C por 10 min, como describió Sánchez *et al.* (2002). Los productos de RT-PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2 % en solución tampón TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (0,1mg/ml).

Tabla 1. Partidores para HAV (VP1/2A, y VP3/VP1) utilizados en los ensayos de RT-PCR.

Primer	Secuencia (5' a 3')	Polaridad	Ubicación Genómica
VP1/ 2A	AATGTTTATCTTTCAGCAAT	+	2136
	ACAGCTCCAAGAGCAGTTTT	-	2751

Fuente: Elaboración Propia.

8. PCR con transcripción reversa anidado (nRT-PCR)

Las muestras correctamente amplificadas en la región VP1/2A, fueron utilizadas para realizar un nRT-PCR, con el objetivo de la secuenciación posterior del genoma viral. Se utilizaron los partidores descritos por Theamboonlers *et al.*, (2012) y Nainan *et al.* (2006). En tanto, para HUNOV, se utilizaron los partidores descritos por Kojima *et al.* (2002) (Tabla 2).

Tabla 2. Partidores para HAV (segmento VP1/2A y Segmento VP3/VP1) y partidores para HUNOV (región RdRp) utilizados en los ensayos de nRT-PCR.

		Primer	Secuencia (5' a 3')	Polaridad	Ubicación genómica
nPCR HAV	1°	BR-5b	TTGTCTGTCACAGAACAATCAG	+	2950
		BR-9b	AGTCACACCTCTCCAGGAAAATT	-	3285
	2°	Rj-3c	TCCCAGAGCTCCATTGAA	+	2984
		Br-6b	AGGAGGTGGAAGCAGTTCATTTGA	-	3193
nPCR VP3/ VP1	1°	F2-EXT	GTGAATGTTTATCTTTTCAGCAAT	+	2132
		R2-EXT	GATCTGATGTATGTCTGGAATTCT	-	2451
	2°	F2-INT	GCTCCTCTTTATCATGCTATGGAT	+	2172
		R2-INT	CAGGAAATGTCTCAGGTACTTTCT	-	2415
nPCR HU NOV	1°	MR3	CCGTCAGAGTGGGTATGAA	+	4485
		MR4	AGTGGGTTTGAGGCCGTA	-	4954
	2°	Yuri22F	ATGAATGAGGATGGACCCAT	+	4505
		Yuri22R	CATCATCCCCGTAGAAAGAT	-	4877

Fuente: Elaboración Propia.

Los ensayos de RT-PCR fueron desarrollados utilizando 1 uL de ADNc obtenido de transcripción reversa, 10 mM de cada partidor, 10X buffer Taq polimerasa (ThermoFischer), 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs y agua para completar un volumen final de 25 uL. La mezcla reacción final fue sometida a una desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, 40 ciclos de amplificación (94°C

por 1 min, alineamiento a 53°C por 1 min, y 72°C por 1.5 min), y una extensión final a 72°C por 10 min, como describe Park *et al.* (2015).

Los productos de nRT-PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2 % en solución tampón TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (0,1mg/ml), con un tamaño de banda esperado según el tamaño de cada partidor.



RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Colección de secuencias homólogas.

Para el caso de HUNOV, Según las palabras claves a utilizar descritas anteriormente, utilizando en primer lugar la referencia “Norovirus AND mussel”, se obtuvieron 27 resultados, de los cuales 2 eran de genoma completo (EU085523.1, EU085522.1). Al utilizar la referencia “Norovirus AND oyster”, de 250 resultados, el 95% de las secuencias disponibles tenían un ancho de banda inferior a 250 pares de bases (pb), no pudiendo ser utilizadas para el estudio filogenético. En tanto, se encontró 3 secuencias de genoma completo asociado a ostras (DQ379715, DQ379714, DQ379713).

Para completar el estudio y evaluar los genotipos disponibles con su dispersión geográfica, se recopilaron 62 secuencias de genoma completo, adquiridas desde Bioproject para HUNOV número de acceso 7047, y además se realizó la búsqueda “Norovirus complete genome” con filtro de fecha de publicación entre los años 2019 y 2020, diversas en clasificación genotípica y ubicación geográfica de muestreo, sin considerar datos de extracción o situación epidemiológica del estudio. Las secuencias disponibles son de América del Norte (EE.UU) y Asia (Vietnam, China, Japón, Korea y Rusia asiático).

Para la categorización de las secuencias en base al segmento de estudio, se realizó una búsqueda dirigida a través de “Taxonomy Browser” de NCBI. En primer lugar se identificó el segmento RdRp en Virus ARN. Luego se identificó Norovirus Humano, y con él se desplegó la lista de cepas publicadas con número de acceso en GenBank, que contienen esa región. La selección se realizó omitiendo cualquier cepa que no incluyera “clam”, “oyster”, “mussel”, “outbreak”. Recuperando de este modo secuencias de genotipo I y II.

En la recopilación de cepas de HUNOV para el segmento VP1 asociadas a brotes de intoxicación alimentaria se utilizó las palabras clave “HuNoV, ORF2, VP1,

oyster, mussel, outbreak” en Genbank. La ubicación genómica de segmento VP1 (ORF2): 6950 pb a 5371 pb (290 nucleótidos). En tanto, de las cepas recabadas en Genbank, la secuencia más corta fue de 206 pb, en tanto, la secuencia más larga se compone de 776 pb.

En la recopilación de cepas de HUNOV para el segmento RdRp asociadas a brotes de intoxicación alimentaria se utilizó las palabras clave “HuNoV, RdRp, oyster, mussel, outbreak”, en Genbank. ubicación genómica de segmento RdRp: 3848 pb a 5371 pb (1523 nucleótidos). de las cepas recabadas en Genbank, la secuencia más corta fue de 67 pb, en tanto, la secuencia más larga fue de 596 pb.

En tanto, en el caso de HAV, según las palabras claves a utilizar descritas anteriormente, utilizando en primer lugar la referencia “Hepatitis A AND mussel”, se obtuvieron 9 resultados, de los cuales ninguno era de genoma completo. Al utilizar la referencia “Hepatitis A AND oyster”, de 23 resultados, el 90% de las secuencias disponibles tenían un ancho de banda inferior a 250pb, y las calificadas para el estudio, eran amplificaciones de estudios in vitro, no pudiendo ser utilizadas para el estudio filogenético. Las secuencias utilizadas fueron las recopiladas desde GenBank con los términos “HAV AND complete genome”, “Hepatitis A virus AND complete genome”, y “HAV OR Hepatitis A” con un rango de secuencia personalizado, de 7.300 a 8.000 pares de bases. obteniendo un total de 33 secuencias disponibles para estudio, indiferente del tipo de muestra utilizada.

En la recopilación de cepas de HAV para el segmento VP1 asociadas a brotes de intoxicación alimentaria se utilizó las palabras clave “HAV, VP1/2A, PX, oyster, mussel, outbreak”, en Genbank. La ubicación genómica del segmento VP1/2A se ubica entre 2208 pb y 3674 pb (1466 nucleótidos). En la recopilación de cepas de HAV para el segmento VP3 asociadas a brotes de intoxicación alimentaria se utilizó las palabras clave “HAV, VP3, oyster, mussel, outbreak”, en Genbank,

proceso por el cual se obtuvieron 2 resultados (MT222962.1 y EF190998.2) que fueron posteriormente eliminados del estudio. La ubicación genómica del segmento VP3 es entre 1470 pb y 2207 pb (737 nucleótidos). De las cepas recabadas en Genbank sólo utilizando una búsqueda dirigida a “HAV AND VP3”, se obtuvieron 36 resultados.

2. Alineamiento múltiple de secuencias y selección del modelo de sustitución más ajustado

2.1 Genoma completo.

De un total de 62 secuencias, se descartó un total de 29 secuencias genómicas completas por presentar gaps muy variables respecto al pool, y/o poseer mayor a 15 gaps consecutivos. De este modo, 33 secuencias resultaron viables para la evaluación filogenética con secuencias genómicas completas. El modelo de sustitución escogido por JModel Test fue Tim2+I+G.

2.2 Segmento VP1.

Se realizó el alineamiento de 50 secuencias seleccionadas por lugar de muestreo, y se afinó el pool de secuencias permitiendo un alineamiento de 290 pb. Se seleccionaron un total de 40 secuencias genómicas. El modelo de sustitución escogido por JModel Test fue TPM2U+I+G.

2.3 Segmento RdRp.

De la selección inicial de 59 secuencias según lugar geográfico de muestreo, y tipo de muestra utilizada, se realizó alineamiento de éstas con una depuración según el largo de la secuencia, en un rango personalizado de 500 a 800 pb, quedando disponibles para estudio 36 secuencias genómicas. El modelo de sustitución escogido por JModel Test fue K80+G.

3. Alineamiento múltiple de secuencias y selección del modelo de sustitución más ajustado de HAV

3.1 Genoma completo

De 35 secuencias seleccionadas para el estudio, 2 fueron descartadas por provenir de estudios in vitro. En tanto de las 33 restantes, todas fueron alineadas y utilizadas para el análisis. El modelo de sustitución escogido por JModel Test fue GTR+G.

3.2 Segmento VP1/2A

De un total de 84 cepas disponibles, luego de una depuración basada en el alineamiento, se seleccionaron un total de 33 secuencias genómicas, con un tamaño de 301 pb. El modelo de sustitución escogido por JModel Test fue TIM1+G.

3.3 Segmento VP3/VP1

Se realizó el alineamiento de 40 secuencias seleccionadas por zona geográfica de muestreo, y se afinó el pool de secuencias permitiendo un alineamiento de 500 pb. Luego de una depuración mediante el alineamiento, se obtuvo un total de 22 secuencias genómicas disponibles para estudio, con una longitud de banda de 218 pb. El modelo de sustitución escogido por JModel Test fue TPM2uf+G.

Todo el pool de secuencias, tanto de HUNOV como HAV, presentaron una p-distance <0.5 entre cepas homólogas, y en cada uno de los casos se obtuvo >0.5 en el valor p-distance cuando las cepas homólogas fueron comparadas con la secuencia outgroup (secuencia raíz) (Anexo Tabla 1-7).

En tanto, según el criterio de información de Akaike (AIC) y su peso estadístico, los modelos de sustitución escogidos por el programa de Jmodel se describen en la tabla.

Tabla 3. Valores AIC de Jmodel para escoger Modelo de sustitución más ajustado.

Segmento genómico	Modelo escogido	AICc	Peso
Gen. completo NoV	TIM2+I+G	2.12442×10^5	0.999993
VP1 NoV	TPM2uf+I+G	8.184×10^3	0.374837
RdRp NoV	K80+G	7.273×10^3	0.640545
Gen. Completo HAV	GTR+G	8.5855×10^4	0.742117
VP1/2A HAV	TIM1+G	3.481×10^3	0.193825
VP3/VP1 HAV	TPM2uf+G	1.767×10^3	0.396341

Fuente: Elaboración Propia.

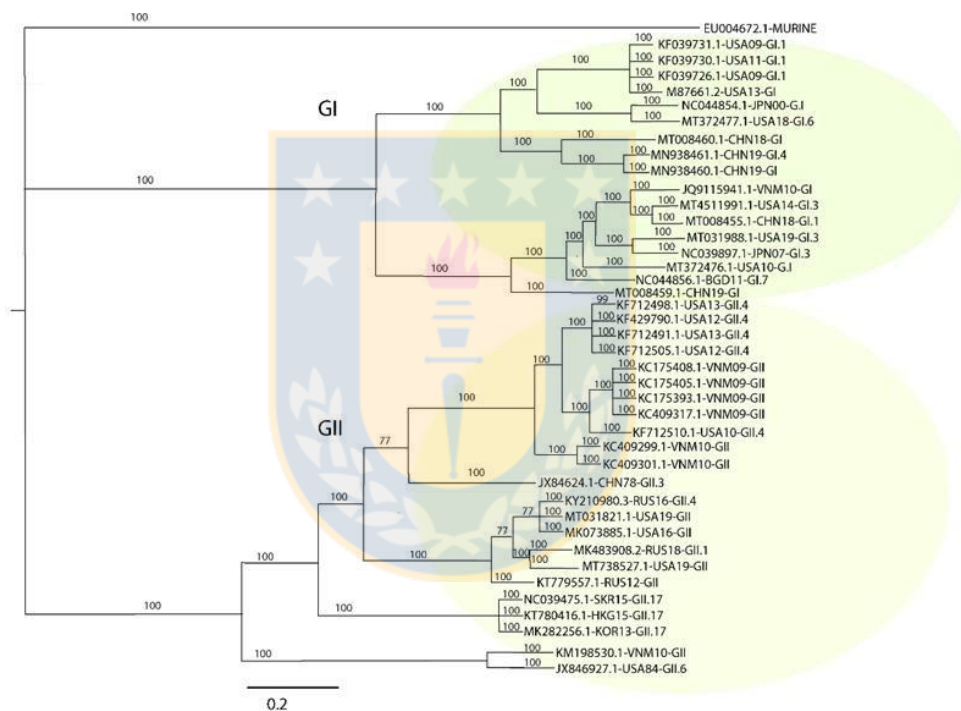
4. Interpretación evolutiva y análisis de filogenia de HUNOV

4.1 Según secuencias genómicas completas

El árbol filogenético de Norovirus humano utilizando secuencias genómicas completas tiene un total de 40 secuencias monofiléticas, los cuales se diferencian en 2 clados principales, denominados GI (Genogrupo I) y GII (Genogrupo II) con un valor a posteriori del 100%. Según el número de escala, el 2% de las secuencias son diferentes, y el porcentaje de confianza de cada rama es mayor

al 70% en todos los casos. El dendograma obtenido fue realizado con 2.000.000 de bootstrap (Figura 3).

Figura 3. Dendograma de secuencias genómicas completas de HUNOV



. Fuente: Elaboración Propia.

Se evidencia una identidad nucleotídica entre cepas de distinto año y/o regiones geográficas, lo que sugiere que podría existir una distribución cosmopolita de ambos genogrupos, en constante migración por distintas zonas geográficas. Tal es el ejemplo de EE. UU y China, en el genogrupo I, que fueron detectados en Orange County, EE. UU en 2014 (Silva *et al.*, 2021) y Shangai, China, en 2018, respectivamente. Estas cepas tienen 100% de identidad nucleotídica, por lo cual se puede aseverar que la migración de norovirus se extiende continentalmente.

Este árbol confirma antecedentes de distribución desde EE. UU, lugar que identificó por primera vez el virus (Dolin *et al.*, 1971; Neil, 2004). El contraste geográfico de estas cepas no había sido evaluado anteriormente.

Sin embargo, es importante respaldar la similitud de cepas con datos publicados en su número de acceso. Por ejemplo, en el último clado, del genotipo II.4 (EE. UU y Vietnam), se destaca un 100% de identidad nucleotídica en una secuencia de Vietnam del año 2010, con una secuencia de EE. UU, del año 1984. A pesar de que estas cepas son publicadas en continentes distintos, la cepa de EE. UU proviene de un BioProject (acceso PRJNA70471), donde la colección de muestras se realizó en la ciudad de Ho Chi Minh, en Vietnam, misma ciudad donde se obtuvo la cepa vietnamita (Cotten *et al.*, 2014). Pese a que en este caso no es posible demostrar una cocirculación del virus, es relevante resaltar la prevalencia de la cepa en el país asiático, el cual se mantiene vigente por 26 años.

Por otro lado, se observa el tránsito geográfico de variantes que resultan verosímiles entre sí, como se observa en el genotipo II.4, lo cual sugiere que una misma variante GII.4 estuvo circulando tanto en Rusia como EE. UU. Estos dos países no habían sido evaluados en su conjunto en ningún otro estudio. No obstante, y por separado, se clasificaron como secuencias emergentes del genogrupo GII.4/ Sidney, cepa que se detectó por primera vez en Australia, en el año 2012, y causó brotes epidémicos de gastroenteritis aguda en Nueva Zelanda, Japón, Canadá y Este de Europa (Leshem, *et al.*, 2013). A pesar de que este estudio no incluye esas secuencias, el estudio realizado por Cannon *et al.*, en 2017, demostró que la cepa de EE. UU incluida en este árbol (AN: MK073885) tiene de ancestro común a la cepa GII.4 Sidney, al igual que la cepa rusa (Zhirakovskaia *et al.*, 2020), dejando a la luz la emergencia y diseminación cosmopolita del virus.

Este árbol también nos dice que el genotipo II.17 es en realidad, con un 100% de confianza, una sola cepa que estuvo transmitiéndose en distintas zonas asiáticas. Estudios de Corea del Sur y China obtuvieron el mismo resultado, nombrando a ésta como cepa Kawasaki (Dhang Thangh *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2015). Desde el año 2014 se ha reportado un aumento de casos por la cepa GII.17, considerada la más infectante en el ser humano (Matsushima *et al.*, 2019).

Se observa que la única secuencia genómica de China de genotipo II, no tiene relación filogenética directa con ninguna de las otras cepas descritas en este análisis. No existen datos filogenéticos de esta cepa, perteneciente a Bioproject NA PRJNA70471.

Las secuencias disponibles en este estudio datan en su mayoría del año 2007 en adelante, las cuales tienen una estrecha relación filogenética con cepas identificadas 12 años después, en otro continente. Tal es el caso de una cepa GII.3 secuenciada en Japón en el año 2007, detectada por metagenómica utilizando como muestra a una tuna (Katayama *et al.*, 2007), la cual compone un clado con un valor a posteriori de 1 junto a una secuencia identificada en Estados Unidos en el año 2019, extraída de desecho digestivo humano (sin publicación). Estas cepas no habían sido evaluadas en su conjunto anteriormente.

Es preciso señalar una diferencia evolutiva importante entre los dos genogrupos (GI y GII). En tanto GI parece divergir de dos ancestros, y por ende tener dos líneas evolutivas, GII muestra la diversidad de sus cepas en base a la variabilidad de una misma cepa que ha ido variando nucleotídicamente en el tiempo. En este árbol filogenético se observa que el genotipo GII.6 no tuvo injerencia en los posteriores estados evolutivos del genogrupo GII, estando en un clado diferente de las otras variantes, tal como identifica también Chan *et al.*, (2015). En tal caso en particular fue un brote en un hospital de Amsterdam, el cual reemergió 6 meses después (Koek *et al.*, 2006).

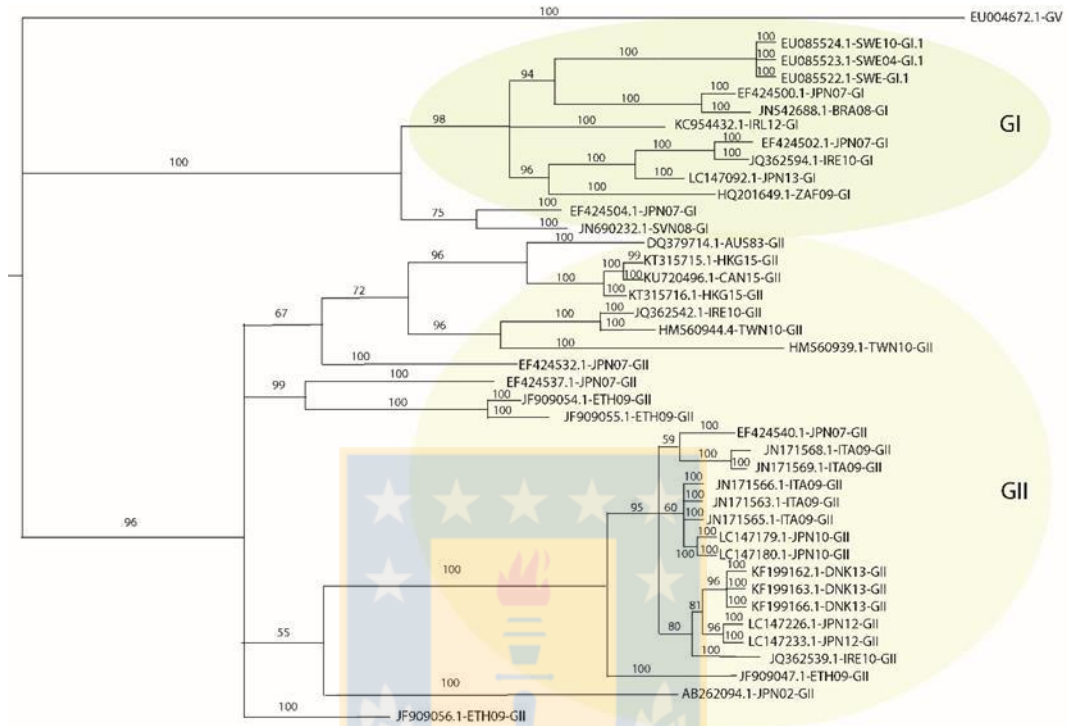
Sería interesante evaluar el origen de los alimentos que provocan los brotes de intoxicación alimentaria además de secuenciar la muestra del paciente, puesto que puede ser un claro ejemplo de diseminación intercontinental del virus. Esto se infiere del clado que agrupa una secuencia de Japón (año 2007) donde la detección de la secuencia es en almejas, junto a secuencias provenientes de Etiopía, detectadas en muestras fecales de niños con sintomatología gastroentrérica, en un período de 6 meses en el año 2009 (Yassin *et al.*, 2012). ¿Será otra evidencia de la diseminación cosmopolita a través del agua? Podría inferirse incluso un tránsito hasta Europa, como se expresa en el clado con secuencias estrechamente relacionadas de Japón (2007) e Italia (2009).

Actualmente, la mejor forma de evaluar filogenéticamente variantes del virus Norovirus Humano es mediante la secuenciación de genoma completo (Desdouits *et al.*, 2020; Fernández-Cassi *et al.*, 2020). Esto debido a que estos agentes virales presentan variaciones genómicas rápidas en más de un segmento de su genoma, y las variantes obtenidas por la clasificación de ambos segmentos por separado no logran una correcta clasificación del agente (Parra *et al.*, 2017). Se requiere estandarizar el protocolo de identificación de HUNOV, para lograr una correcta evaluación de la circulación del virus en el medio.

4.2 Según secuencias de segmento VP1.

Se diferencian dos clados claramente divididos en genogrupo I y genogrupo II con un índice de confianza >95%, enraizados con GIV murino. Se observa un índice de verosimilitud mayor al 90% en todas las ramas que bifurcan desde el tercer ancestro común. Las cepas entre sí tienen una variabilidad nucleotídica de un 2%, y se evidencia la diferencia de la distancia genética entre el genotipo GIV con GI y GII. El dendograma obtenido fue realizado con 2.000.000 de bootstrap (Figura 4). En el primer clado, las cepas GI han sido detectadas en muestras ambientales y en diversas especies de molusco, así como también se ha asociado a brotes de intoxicación alimentaria (Anexo Tabla 8).

Figura 4. Dendograma de HUNOV según secuencias de segmento VP1.



Fuente: Elaboración Propia.

Se extrapola que, en Suecia, por ejemplo, la cepa GI que ha estado circulando en sus moluscos entre los años 2004 y 2010 tiene una muy baja variabilidad nucleotídica, representada por la misma longitud de sus ramas. Este resultado se ve confirmado por la alta similitud obtenida entre estas mismas cepas por Nenonen *et al.*, en el año 2008. En tanto, se aprecia una diseminación de cepas GI entre Japón e Irlanda, obtenidas desde molusco bivalvo y aguas residuales respectivamente (Rajko-Nenow *et al.*, 2013). Estas cepas no habían sido evaluadas en conjunto anteriormente. Cabe señalar, que no todas las cepas registradas tienen el subgenotipo designado, por lo cual este árbol podría estimar que las cepas de GI que producen brotes de intoxicación alimentaria en distintas

zonas geográficas no son las mismas dispuestas en los moluscos bivalvos del sector en estudio, lo cual es un indicador potencial de una infección mixta por norovirus, siendo el agua como vector, una oportunidad para incrementar la variabilidad genética del virus (Symes *et al.*, 2007).

En tanto, el genotipo GII.17 descrito en estudios epidemiológicos de Asia, evidencia el mismo ancestro común que la cepa australiana del año 1983 (Chan *et al.*, 2017), tal como se observa en el árbol de HUNOV con secuencias genómicas completas. Esto deja al descubierto que aún estudiando un segmento genómico del virus y no su secuencia completa, se puede establecer una relación filogenética entre ellas (Symes *et al.*, 2007).

El segmento VP1 es el más utilizado para la detección de HUNOV en moluscos y brotes de intoxicación alimentaria (Romalde *et al.*, 2002; Nenonen *et al.*, 2018). Se publicó una cepa GII detectada en aguas de 3 ríos en Sudáfrica, mediante la secuenciación de este segmento, la cual, si bien no tiene similitud nucleotídica con otras cepas en este árbol filogenético, Mans *et al.*, en el año 2012, infiere al igual que en este estudio, que el agua podría ser una potencial fuente de infección para la comunidad (Mans *et al.*, 2012). Otro punto que valida esta discusión, es el clado de GI que vincula a una cepa detectada en almejas en el año 2007 provenientes de Japón (AN:EF424540), con una cepa italiana del año 2009, detectada al ser causal de un brote de intoxicación alimentaria en niños (Colomba *et al.*, 2007). Es importante señalar que estas cepas no habían sido evaluadas en conjunto anteriormente.

Para finalizar, este árbol filogenético clarifica la agrupación de cepas por clados cuando son nucleotídicamente parecidas, y demuestra la circulación cosmopolita del virus. Tales son los brotes de intoxicación alimentaria descritos en Dinamarca (Fonager *et al.*, 2012); y Japón (AN: LC147226), que ejemplifican esta condición, ambos descritos como variantes de GII.4/Sidney, y que en este estudio presentan un 100% de identidad nucleotídica.

de confianza. Las cepas de HUNOV evaluadas en este árbol tienen una variabilidad nucleotídica entre ellas no mayor al 4%.

Respecto a las cepas del Genotipo I, sólo se identificaron 2 secuencias publicadas bajo este segmento genómico de evaluación, asociadas a Moluscos o brotes de intoxicación alimentaria (Rhoda Husman *et al.*, 2007; Henignam *et al.*, 2015). En este caso, ambas secuencias pertenecen a la Unión Europea, con una estrecha relación filogenética representada por el valor a posteriori de 1.

El Genotipo II ha sido detectado e identificado en Europa, Asia, y América Latina (Han *et al.*, 2014; León-Félix *et al.*, 2010; Lindell *et al.*, 2005). Está claramente subdividido en 3 clados, mostrando relaciones filogenéticas entre cepas de distintos continentes, matriz alimentaria, y/o año de detección. No obstante, se observa que, en el caso de cepas publicadas por Rusia, a causa de un brote de intoxicación alimentaria, éstas son las únicas del Genotipo II que no poseen relación filogenética con alguna de las cepas incluidas en esta evaluación (No publicado).

Los siguientes dos clados identificados para el segmento GII no poseen una diferenciación continental categórica. En el caso de las cepas latinoamericanas disponibles, sólo se observan secuencias publicadas desde México, las cuales se obtuvieron desde una fábrica de producción de pimiento morrón (León-Félix *et al.*, 2010). Estas secuencias tienen una similitud nucleotídica con secuencias de Suecia, esto con un 100% de identidad, las cuales fueron detectadas desde moluscos (Nenonen *et al.*, 2008). Si bien estas secuencias fueron descritas por Suecia como cepas de variante GII.2 y GII.4, México no realizó este tipo de identificación. Se considera importante destacar que la diferencia de tiempo entre la detección de Suecia y México es de 3 años.

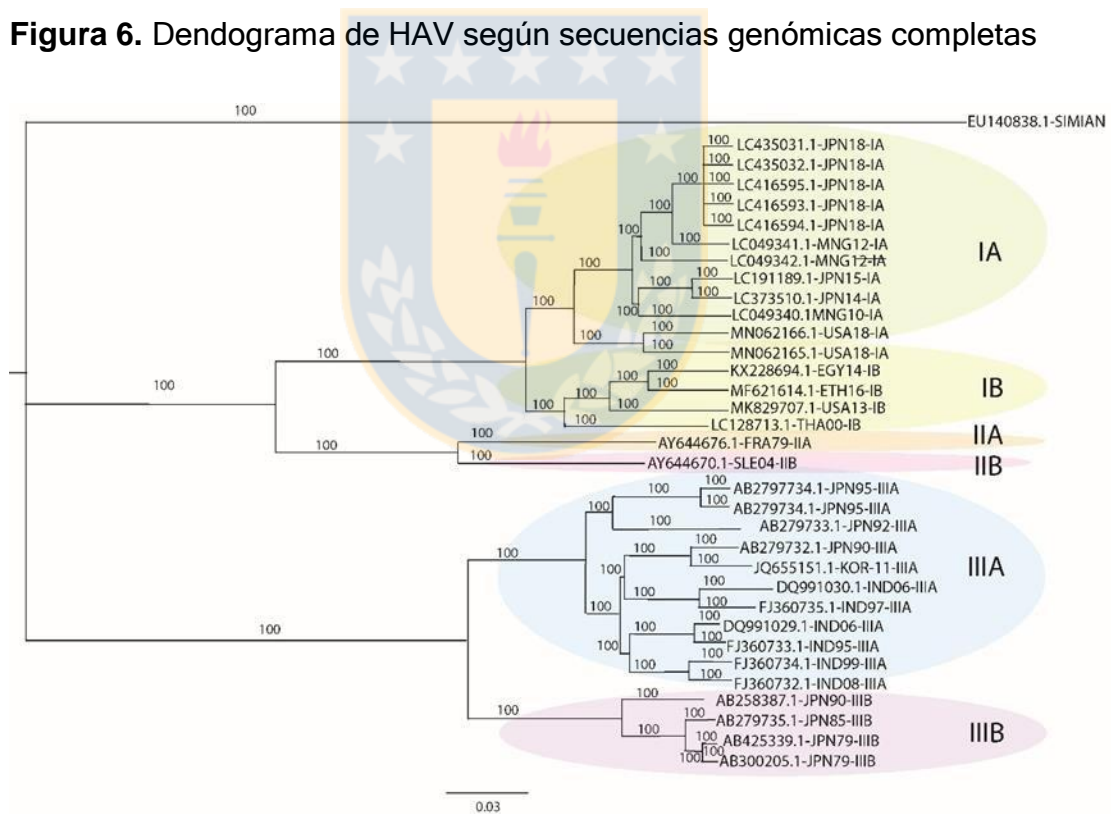
Algo similar ocurre con las cepas GII de Japón con las cepas GII de Dinamarca, los cuales, a pesar de ser de continentes distintos, y con una diferencia de tiempo en su detección de 3 años, ambos pools de secuencias están agrupadas en un

mismo clado, con un valor a posteriori de 1. La diferencia es que en este caso las cepas que filogenéticamente están relacionadas fueron detectadas, en ambos casos, por brotes de intoxicación alimentaria (Fonager *et al.*, 2013). Se observa la misma relación filogenética de estas cepas en particular, que en el árbol filogenético anterior. Es importante señalar que estas cepas no han sido evaluadas anteriormente en conjunto.

5. Interpretación evolutiva y análisis de filogenia de HAV

5.1 Según secuencias genómicas completas

Figura 6. Dendograma de HAV según secuencias genómicas completas



Fuente: Elaboración Propia.

Lo primero que destaca del árbol filogenético obtenido de 33 secuencias completas de HAV, es que todas sus ramas tienen un valor a posteriori de 100, por lo que éste árbol tiene 100% de probabilidad de que todas sus ramas estén correctamente agrupadas. Se observa que desde el ancestro común de HAV, existen 2 puntos de divergencia los cuales se separan evolutivamente a los genotipos I y II del genotipo III. En total se observan 6 clados, diferenciando cada subgenotipo de HAV, con una variabilidad nucleotídica del 3% entre cada cepa. El continente que lidera la secuenciación de este virus es Asia, que evidencia la presencia de todos los genotipos, a excepción de los genotipos IIA y IIB, los cuales son autóctonos de Francia (detectado en 1979) y Sierra Leona (detectado en 1988) respectivamente, y se reporta sólo una secuencia completa de cada Genotipo en el mundo (CF53 y SLF88) (Lu *et al.*, 2004; Ching *et al.*, 2002). La cepa SFL88 era el pasado genotipo VII, el cual se reclasificó como genotipo IIB (Ching *et al.*, 2002). Este se reclasificó por su serotipo, el cual tiene epítopes conformacionales que corresponden a residuos de VP3, muy cercanos a la partícula viral (Ching *et al.*, 2002). Esta cepa se caracteriza por ser la de más baja mutación. Los reportes del genotipo IIB circulantes fuera del continente africano, son casos esporádicos vinculados a viajes a la región autóctona de este genotipo, generando recombinaciones en VP1, como la cepa 9F94 (Costa – Matioli *et al.*, 2002).

Del primer genotipo se observa un mayor número de secuencias japonesas, detectadas en 3 épocas distintas. No obstante, mantienen agrupaciones cladísticas cerradas sin interacción con secuencias de otras zonas geográficas. Esta peculiaridad ocurre porque todas estas secuencias fueron obtenidas desde muestras fecales de MSM, cepas las cuales difieren nucleotídicamente de las transmitidas por vía digestiva (Watanabe *et al.*, 2019). En contraparte, se observa que secuencias provenientes de Mongolia son el ancestro común más cercano de secuencias descritas en Japón. Al observar el árbol filogenético de HAV, las secuencias que divergen de Mongolia siguen un orden cronológico de detección.

Es decir, la secuencia mongola del año 2012 (LC049340), está estrechamente relacionada con secuencias de Japón del año 2014 y 2015 respectivamente (LC373510 y LC191189). Este análisis se ve confirmado por Tsatsralt-Od *et al.* (2016), quien al analizar filogenéticamente las cepas mongolas obtenidas de pacientes con hepatitis aguda, llegó al mismo resultado que en este estudio.

Llama la atención en el clado del genotipo IB, en que todas las cepas tienen como ancestro común más cercano a una cepa descrita en Tailandia el año 2000, cepa que se asocia a cepas de Australia, china y Brasil (Ruchusatsawat *et al.*, 2016). Gracias a este estudio, se podría estimar que esta secuencia tailandesa inició su diseminación hacia Egipto, ampliando su transmisión entre Asia y África, llegando finalmente a América de Norte. Cabe destacar, que la secuencia estadounidense más estrechamente relacionada con la secuencia de Tailandia, fue obtenida de frambuesas congeladas de las cuales no se conoce ni específica procedencia.

En el siguiente clado, se destaca que el 100% de las cepas descritas del genogrupo III son provenientes de Asia, con presencia en el continente hace más de 50 años (Endo *et al.*, 2007, Kulkarni *et al.*, 2009). Se observa una leve divergencia en las secuencias de Korea e Indonesia dada la ubicación de sus ramas, sin embargo, la variabilidad nucleotídica no supera el 3 %.

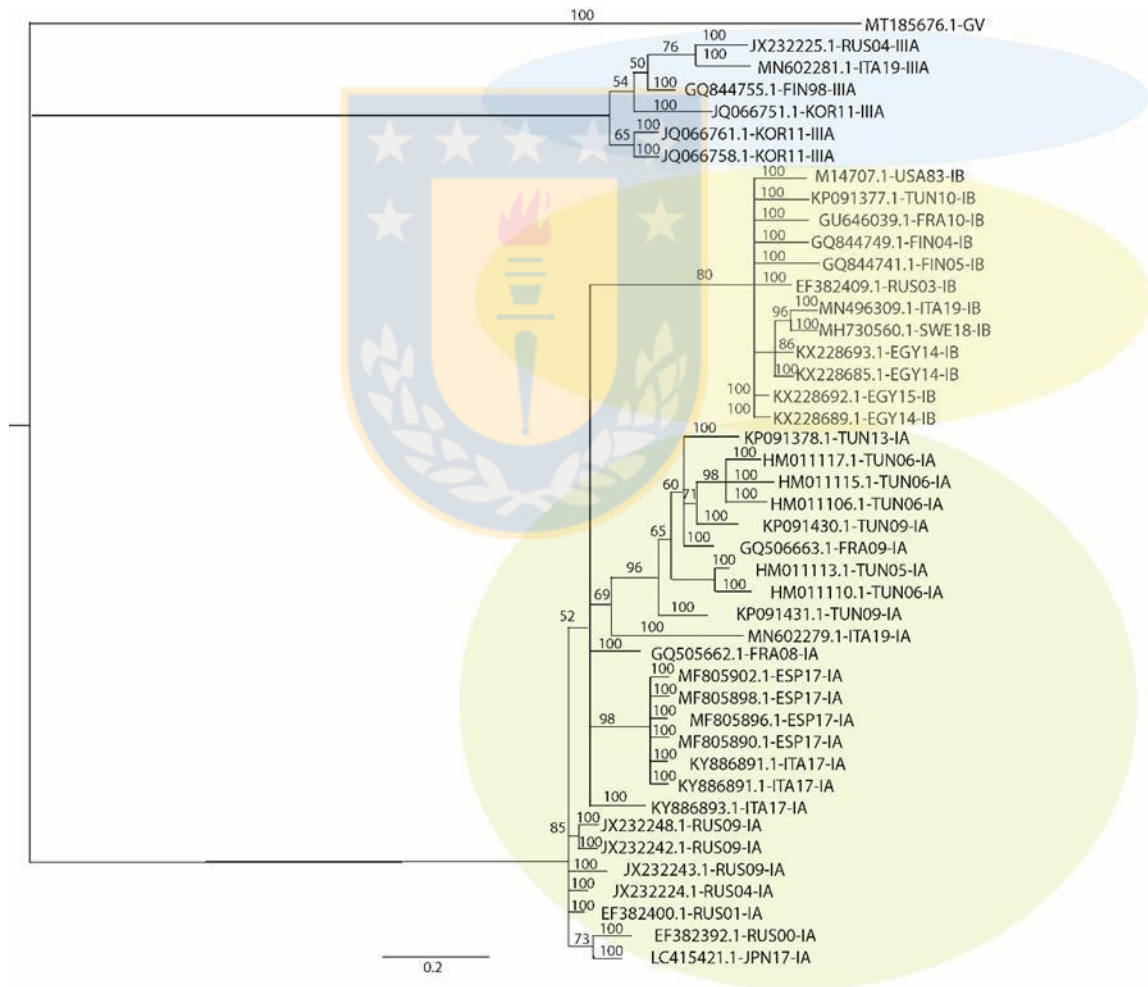
Para finalizar, se observa un último clado de genotipo IIIB, sólo con secuencias japonesas. Si bien se reconoce en bibliografía una secuencia IIIB de Dinamarca (año 1979) (Robertson *et al.*, 1992), ésta no está publicada ni se conoce su procedencia. En la actualidad, sólo Japón mantiene brotes de HAV IIIB (Yoneyama *et al.*, 2007).

5.2 Según secuencias de segmento VP1/2A

Para la caracterización genotípica de HAV, se ha denominado a la región genómica VP1 como la zona ideal para la amplificación, por su identidad nucleotídica del 75 a 85%, mayor a los porcentajes de otras regiones del virus

(Robertson *et al.*, 1992). Entre genotipos, la mayor variabilidad nucleotídica en la región VP1 es entre los genotipos IIIA y V con un promedio de diferencia del 23%. En tanto, los subgenotipos con menor diferencia observada es entre IA y IB de las cepas humanas, con un 9.7% de diferencia nucleotídica, y la menor diferencia interespecie es entre los subgenotipos IB y VII (1.05% en promedio) (Costa-Mattioli *et al.*, 2002).

Figura 7. Dendograma de HAV según segmento VP1/2A



Fuente: Elaboración Propia.

Los subgenotipos I, II y III se han aislado de muestras de origen humano, y las cepas IV, V y VI se han aislado de muestras de origen simio. Cabe destacar que el genotipo III es el único de los seis que se ha aislado tanto de simios como humanos (Navas y Báez, 2015).

Las secuencias disponibles de HAV, que comprendan la región VP1/2A, y que contengan como mínimo 200 pares de bases, excluyen el genotipo II y el subgenotipo IIIB de este análisis. Se observan 2 puntos de divergencia desde el clado raíz, identificando en un clado al genotipo III y en otro clado al genotipo I con ambos subgenotipos (A y B). El valor de escala es 0.2, indicando que existe un mínimo de variabilidad nucleotídica de 2% entre cepas. La bifurcación de los clados y la posición de cada rama tiene un porcentaje de confianza que oscila entre el 50% y 100%, teniendo mayor credibilidad a medida que las ramas se alejan del clado raíz, el cual fue enraizado con genotipo V. Se observa relación evolutiva entre las cepas IIIB descritas en Europa, reunidas en un clado diferente de las cepas descritas en Asia.

Se observan cepas del genotipo IIIA tanto europeas como asiáticas, estando agrupadas por continente en cada clado. Existe un bajo valor a posteriori de las secuencias agrupadas en el clado europeo, definiendo una probabilidad de estar correctamente agrupadas de un 50 a 70%. Estas secuencias no habían sido evaluadas en su conjunto anteriormente. Sin embargo, se encuentra relación filogenética entre Rusia y Japón en otros estudios (Mukomolov *et al.*, 2012).

En tanto respecto al genotipo IB, se observa que las secuencias de Francia, Tunisia, Rusia e incluso Finlandia, que posee dos secuencias publicadas, tienen sus ramas individualizadas en el clado de su genotipo, lo cual muestra una distancia nucleotídica mayor, respecto a las publicadas por Italia y Suecia, por ejemplo, que se agrupan en un mismo clado. Estas secuencias podrían ser endémicas de la zona, como declara Beji-Hamza *et al.*, (2015), quien estima que las secuencias de Tailandia se han transmitido entre afluentes de agua del mismo

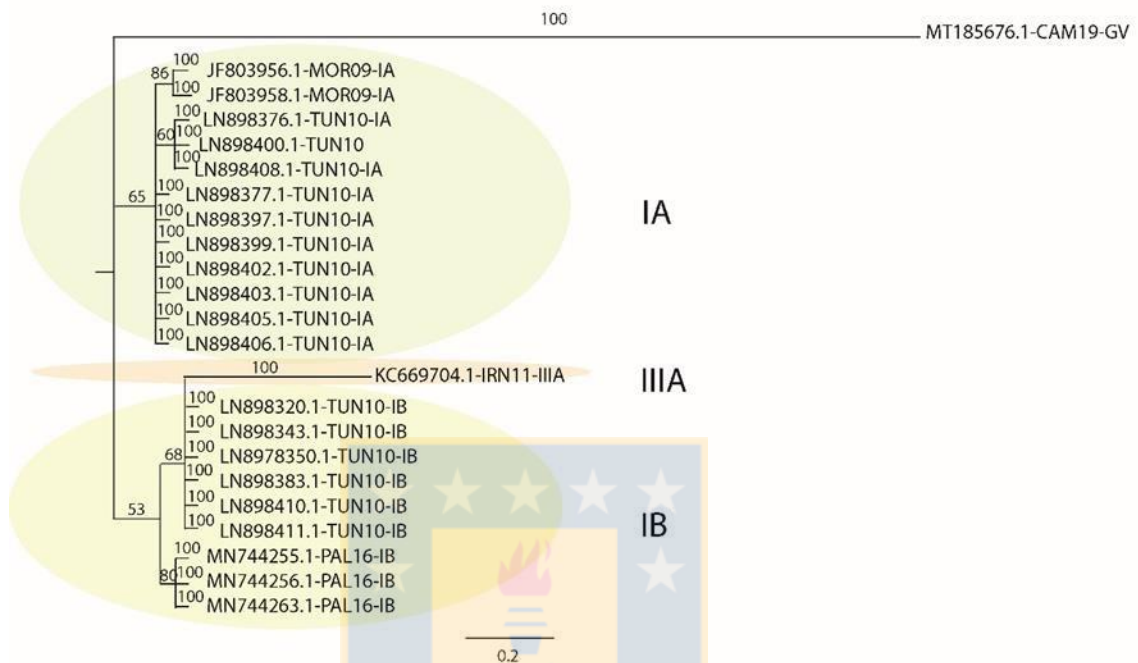
lugar. Lo mismo ocurre con las secuencias de Egipto, las cuales sólo han sido evaluadas con secuencias de la misma zona geográfica (Hamza *et al.*, 2017). En tanto Francia, estima que la secuencia publicada (AN: GQ844749), tiene relación filogenética con secuencias rusas, italianas y alemanas, sin embargo, son secuencias no utilizadas en este estudio, por ser secuencias publicadas antes del año 2000 (Broman *et al.*, 2010).

Al analizar las secuencias pertenecientes al clado que agrupa al genotipo IA, se observa una agrupación que determina una estrecha relación filogenética entre continentes. En tanto, más en detalle, se constata que Italia por ejemplo, a pesar de presentar secuencias publicadas hace menos de 3 años, tienen menor variabilidad nucleotídica que secuencias de HAV detectadas en Francia y África del Norte, aun cuando estas han sido publicadas en el primer decenio del siglo XXI. Esto ocurre al igual que en los resultados de la figura 6, porque la secuencia italiana mas distante nucleotídicamente de las restantes, fue obtenida de MSM, demostrando la cocirculación de cepas por vía alimentaria (AN: KY886891).

5.3 Según secuencias de segmento VP3/VP1

Mediante la clasificación y evaluación del segmento genómico perteneciente a la región VP3/VP1, se observa que la disponibilidad de secuencias bajo este foco de evaluación es escasa. El mayor número de secuencias publicadas corresponde a Túnez, dado por un estudio de aguas residuales en ese país, identificando partículas virales de HAV pertenecientes a los genotipos IA y IB (Ouardani *et al.*, 2016). La variabilidad nucleotídica expresada en este árbol es de un 2 %, y si bien los clados secundarios muestran un valor a posteriori 1, la primera divergencia muestra una probabilidad de estar correctamente ubicados menor a 65%.

Figura 8. Dendrograma de HAV según secuencias de segmento VP3/VP1



Fuente: Elaboración Propia.

El siguiente país que evidencia la presencia del genotipo IA es Marruecos, el cual detecta este genotipo en aguas residuales no tratadas (Hasna *et al.*, 2017). Por último, Palestina evidencia la presencia del genotipo IB, detectada en sangre humana. Estas secuencias por ser resultado de evaluaciones epidemiológicas del virus particulares y acotadas para el sector geográfico en cuestión, estas no habían sido evaluadas en su conjunto anteriormente.

El genotipo IIIA está representado por Irán, único país que ha publicado una secuencia de este genotipo con este segmento de estudio, la cual fue obtenida de ostras (artículo no publicado).

Al estudiar las secuencias genómicas disponibles de HAV en las plataformas de GenBank y HAVnet, se describe que las principales regiones del virus para su genotipificación son el final de 5' UTR (posición 734), la unión VP3/VP1 (entre las posiciones 1.470 y 3.107), y la unión VP1/2A (entre la posición 2.208 y 3.674)

(Kroneman *et al.*, 2018; Sánchez *et al.*, 2007). Esto se evidencia en este estudio, por el bajo número de secuencias disponibles para el segmento VP3/VP1, y más especialmente, por la ausencia de secuencias que representen correctamente al segundo genogrupo de estudio (GII).

Al evaluar dendogramas donde una variante de las secuencias a evaluar predomina en más del 90% sobre otras, los análisis estadísticos adoptan a la segunda variante de estudio como secuencias que enraizan el árbol, dejando a la vista una diferencia nucleotídica que puede no ser la correcta (Nei y Kumar, 2000).

Es necesario verificar los datos expresados en este trabajo mediante métodos de análisis que permitan estudiar al igual que aquí, la información genealógica, genética y geográfica, pero utilizando como ejes al tiempo y al espacio, como es en el caso de la filogeografía (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). Aunque sería interesante realizar un estudio dirigido, donde se realice pesquisa de HuNoV y HAV desde afluentes de agua, y, además, de moluscos bivalvos provenientes de otros países, para realizar análisis filogenéticos y obtener así otro método para justificar lo que propone este estudio.

Si bien se recomienda el uso de estadística bayesiana para estudios filogenéticos, especialmente la construcción de “árboles de horizonte” o skyline tree, últimos estudios estadísticos ponen a prueba la veracidad de estos datos al asegurar que “los estimadores generalmente convergerá al escenario más cercano a la clase de congruencia de la verdadera historia epidemiológica, pero no necesariamente al escenario más cercano a la verdadera historia epidemiológica misma (Louca *et al.*, 2021).

6. Pesquisa de HAV y HuNoV en Región del Biobio

De un total de 120 muestras, siendo 60 individuos de *Mytilus chilensis*, y 60 individuos de *Venus Antiqua*, se extrajeron 113 muestras de ARN viral. Se observó que la extracción de ARN con kit E.Z.NA muestra mejores índices de cuantificación en comparación con Triazol Reagent en muestras de *Venus Antiqua*.

Al agrupar los tipos de extracción de ARN viral según tipo de muestra, 53 muestras de *Mytilus chilensis* fueron extraídas mediante el protocolo de Trizol Reagent, y 60 muestras de *Venus antiqua* fueron extraídas con el protocolo Kit E.Z.N.A. de las 113 muestras virales correctamente extraídas de la matriz alimentaria, 79 muestras con cuantificación de ARN viral con valores >0.5 de concentración ug/ul, y una relación 260/280 mayor a 1.8, quienes fueron seleccionadas y procesadas mediante PCR transcriptasa reversa para obtener su ADNc y ser analizadas por nPCR.

7. RT-PCR y nPCR para HUNOV segmento RdRp

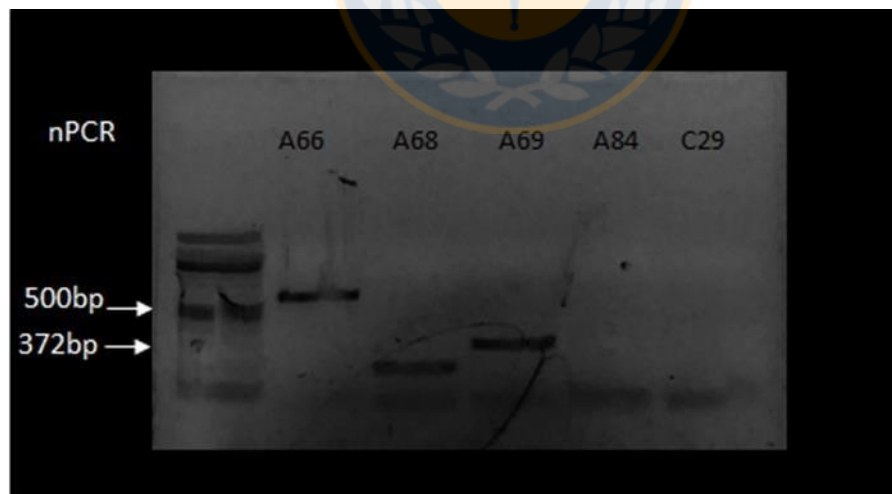
En la detección del segmento RdRp del virus Norovirus, con los cebadores utilizados, el resultado esperado en gel de agarosa es un ancho de banda de 469 pb para PCR, y 237 pb para nPCR (tabla 4). De un total de 43 muestras evaluadas, 7 muestras *Venus Antiqua* resultaron positivas mediante la técnica de PCR, las mismas muestras que resultaron positivas mediante la técnica de nPCR, representando el 16% del grupo estudio total (Figura 9). En tanto, 11 muestras de *Mytilus chilensis* resultaron positivas mediante las mismas técnicas, representando el 25% del grupo estudio total. Las muestras con marcaje en el gel de agarosa fueron extraídas para su secuenciación.

Tabla 4. Tamaño de banda esperado para el segmento RdRp en resultado nPCR.

		Segmento RdRp evaluado	Tamaño de banda
Partidor (PCR)	Externo	4485bp - 4954 bp	469 bp
Partidor (nPCR)	Interno	4505 bp - 4877 bp	372 bp

Fuente: Elaboración Propia.

Figura 9. Resultados en gel de agarosa al 2% de nPCR para el segmento RdRp de HUNOV.



Fuente: Elaboración Propia.

Se observan 5 muestras de *Venus Antiqua* de las cuales A68 y A69 se acercan al ancho de banda esperado (360 y 370 pb respectivamente). Por otro lado, se

observa una muestra de *Venus Antiqua* (A66), con un ancho de banda mayor a 500 pb, no siendo considerada positiva en este caso.

Figura 10. Resultados en gel de agarosa al 2% de PCR y nPCR para el segmento RdRP de HUNOV.



Fuente: Elaboración Propia.

Se observan 2 muestras de *Mytilus Chilensis* y 3 muestras de *Venus Antiqua*, de los cuales C27 presenta un resultado positivo.

En este caso la alta conservación del segmento RdRp permitió obtener resultados concluyentes. La detección de HUNOV mediante RT-PCR comúnmente falla dada la alta variabilidad de las regiones VP1 (Desdouits *et al.*, 2020).

8. RT-PCR y nPCR para HAV segmento VP1/2A

En la detección del segmento VP1/2A del virus Hepatitis A, con los cebadores utilizados (Tabla 3), el resultado esperado en gel de agarosa es un ancho de

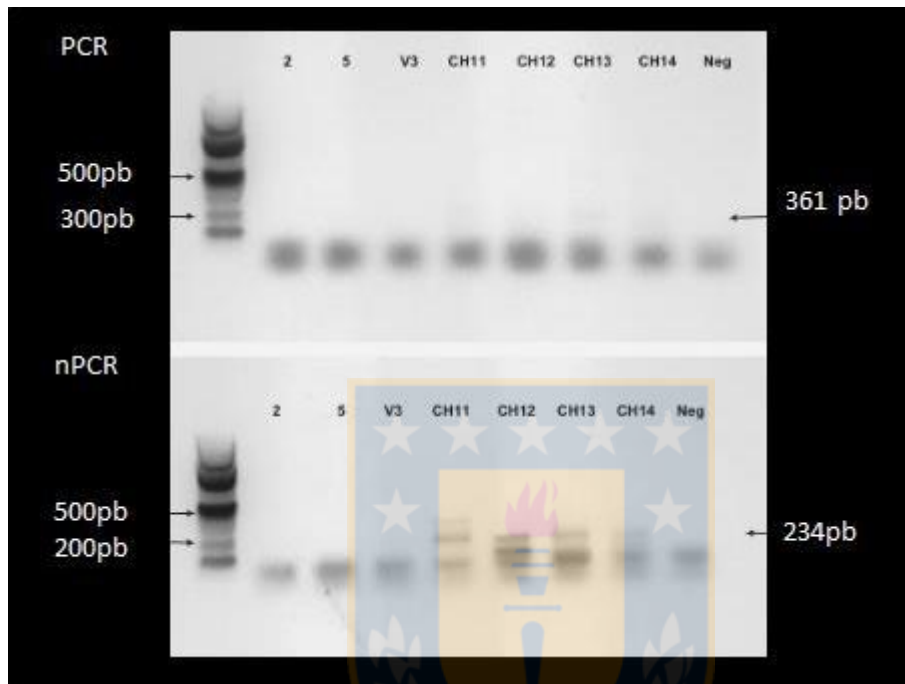
banda de 383 pb para PCR, y 256 pb para nPCR (tabla 6). De un total de 79 muestras evaluadas, 1 muestra de *Mytilus chilensis* resultó positiva mediante la técnica de PCR. En tanto, 4 muestras de *Mytilus chilensis* resultaron positivas mediante la técnica de nPCR (Figura 11), representado el 5% del grupo estudio total. Las 4 muestras con marcaje en el gel de agarosa fueron extraídas para su secuenciación. En muestras virales extraídas de *Venus antiqua*, no se obtuvieron resultados positivos.

Tabla 5. Tamaño de banda esperado para el segmento VP1/2A en resultado nPCR.

	Segmento evaluado	VP1/2A	Tamaño de banda
Partidor externo (PCR)	2950bp - 3333 bp		383 bp
Partidor Interno (nPCR)	2984 bp - 3240 bp		256 bp

Fuente: Elaboración Propia.

Figura 11. Resultados en gel de agarosa al 2% de PCR y nPCR para el segmento VP1/2A de HAV.



Fuente: Elaboración Propia.

De 79 muestras estudio, para el segmento VP1/2A se detectaron 4 muestras de chorito positivas, según el tamaño de banda esperado.

9. RT-PCR y nPCR para HAV segmento VP3/VP1

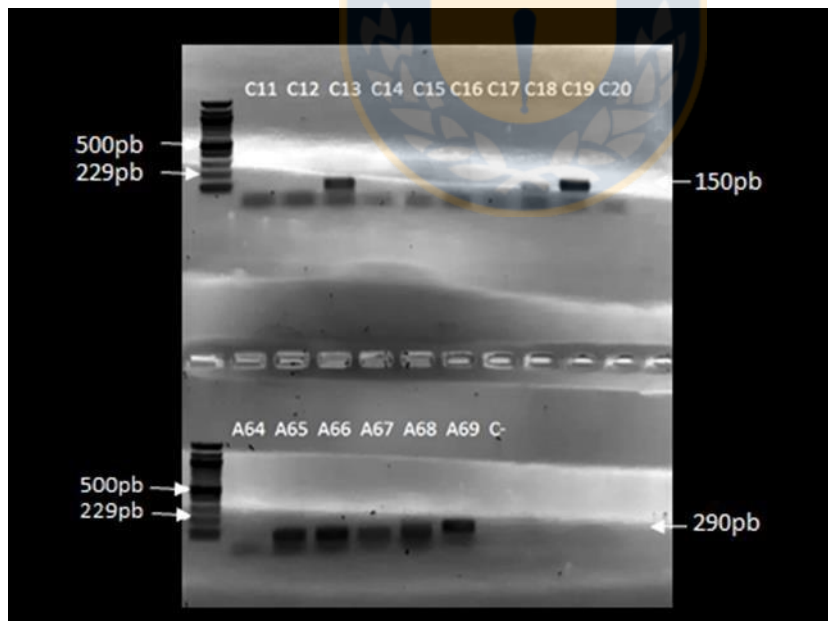
En la evaluación de un segundo segmento genómico del virus Hepatitis A, se utilizaron cebadores específicos para la región VP3/VP1 (tabla 6), con los cuales se espera un tamaño de banda de 319 bp para PCR, y 229 bp para nPCR (tabla 7). Para este segmento no se obtuvieron resultados positivos concluyentes.

Tabla 6. Tamaño de banda esperado para el segmento VP3/VP1 en resultado nPCR.

	Segmento evaluado	VP3/VP1	Producto de banda
Partidor externo (PCR)	2155bp - 2451 bp		319 bp
Partidor Interno (nPCR)	2186 bp - 2415 bp		229 bp

Fuente: Elaboración Propia.

Figura 12. Resultados PCR y nPCR para la región VP3/VP1 de HAV



Fuente: Elaboración Propia.

Se observa la amplificación de ADNc viral en las muestras C13, C18, C19, A65, A66, A67, A68, y A69. Todas las bandas que muestran un grado de positividad

no alcanzan la ubicación esperada para los partidores utilizados, a excepción de A69.

Si bien se describe que la detección de HUNOV y HAV en muestras de molusco suele expresarse con valores mínimos de cuantificación (Fusco *et al.*, 2019), en este estudio hubo dificultad en la detección. Entre las posibles causas está la ausencia de Proteinasa K, la cual está descrita como buen degradante de proteínas (El Moqri *et al.*, 2019), y con buenos resultados como parte del método de extracción de ARN desde ostras (Rajko-Nenow *et al.*, 2013). Otro punto posible a destacar, es que se percibe mejor la desnaturalización de muestras animales con centrifugación a 4° posterior a la homogenización (Hennechart-Collette *et al.*, 2020).

Es importante destacar que además en este estudio se realizó la homogeneización de un pool de glándulas digestivas, como describe la mayoría de los investigadores en esta área (Sincero *et al.*, 2006; Cromeans *et al.*, 1997; Atmar *et al.*, 1995), sin embargo, esto podría generar falsos positivos, por la degradación de ARN viral de moluscos positivos en glándulas digestivas de moluscos negativos, como describe Roda Husman *et al.*, (2006).

La prevalencia de gastroenteritis aguda por causa HuNoV puede verse reflejada por la mejora en el control de otros enteropatógenos. Como ocurre en EE. UU por ejemplo, que luego de implementar la vacuna contra Rotavirus, el primer causal viral de gastroenteritis aguda infantil es Norovirus (Ahmed *et al.*, 2014). Si bien es de suma importancia el desarrollo de una vacuna que permita el control clínico de la infección, el empleo de mejoras en las medidas de prevención sanitaria como el buen desecho y descontaminación de aguas residuales, podría disminuir considerablemente la transmisión a productos de consumo humano (Desdouits *et al.*, 2020). Se ha previsto que HUNOV puede ser detectado en mariscos congelados, hasta 19 días posterior a su comercialización (Polo *et al.*,

2016), por lo que el diagnóstico temprano de HUNOV en matrices alimentarias podría prevenir brotes de intoxicación alimentaria. La aplicación de herramientas epidemiológicas en la seguridad alimentaria podría abrir una nueva era de datos “predictivos” en lugar de “reactivos” para reducir la contaminación y brotes de patógenos (Wang *et al.*, 2016).



CONCLUSIONES

1. El análisis filogenético de HAV y HuNoV a nivel mundial sugieren una co-circulación geográfica.
2. Tanto HAV como HuNoV están presentes en moluscos bivalvos de la Región de BioBio.
3. La evaluación filogenética comprende mejores resultados cuando se utilizan secuencias de genoma completo.
4. Se recomienda ampliar el estudio mediante métodos de filogeografía como Reloj Molecular y Skyline Plot, para comprobar la veracidad de este trabajo y con ello crear programas y protocolos de Salud pública en prevención internacional.

PROYECCION

La información entregada sobre la co-circulación de HAV y HUNOV a nivel mundial, y la presencia de estos virus en matrices alimentarias chilenas, requiere mayor investigación para que se puedan establecer nuevas metodologías que apoyen estos hallazgos.

Se recomienda crear una plataforma de recopilación de datos de HAV y HUNOV sur americano, para evaluar así como en otros continentes, cuáles son las cepas más prevalentes en matrices alimentarias, y con ello realizar un verdadero seguimiento de los brotes epidémicos en nuestro continente, realizar correctos protocolos de inocuidad y seguridad alimentaria, obtener un correcto estudio epidemiológico de los brotes de intoxicación por alimentos, y tener mayor control sobre brotes epidémicos virales gastroentéricos.

BIBLIOGRAFIA

- ACHIPIA (2017). Norovirus, ficha de peligros/ACHIPIA N°02/2017. [Informe institucional] Recuperado de: <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-02-Norovirus-v01.pdf>
- Adefisoye, M. A., Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2016). Quantitative PCR Detection and Characterisation of Human Adenovirus, Rotavirus and Hepatitis A Virus in Discharged Effluents of Two Wastewater Treatment Facilities in the Eastern Cape, South Africa. *Food and Environmental Virology*, 8(4), 262-274. doi:10.1007/s12560-016-9246-4
- Adler, J. L., & Zickl, R. (1969). Winter Vomiting Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 119(6), 668-673. doi:10.1093/infdis/119.6.668
- Aguirre, S., Malirat, V., Scodeller, E., & Mattion, N. (2011). First full-length genomic sequence of a hepatitis A virus isolated in Argentina shows recombination between subgenotypes IA and IB. *Virus Research*, 155(1), 316-324. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.030>
- Ahmad, T., Adnan, F., Nadeem, M., Kakar, S. J., Anjum, S., Saad, A., Arshad, N. (2018). Assessment of the risk for human health of Enterovirus and Hepatitis A virus in clinical and water sources from three metropolitan cities of Pakistan. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(4), 708-713. doi:10.26444/aaem/99590
- Ahmed, S. M., Hall, A. J., Robinson, A. E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U. D., Lopman, B. A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 725-730. doi:10.1016/s1473-3099(14)70767-4
- Allen, O., Edhi, A., Hafeez, A., & Halalau, A. (2018). A Very Rare Complication of Hepatitis A Infection: Acute Myocarditis—A Case Report with Literature Review. *Case Reports in Medicine*, 2018, 1-6. doi:10.1155/2018/3625139

- Alonso, R., Aguilera, A., Córdoba, J., & Fuertes, A. (2015). Diagnóstico microbiológico de las hepatitis virales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(9), e53-e62. doi:10.1016/j.eimc.2014.08.002
- Arora, P., Boyne, D., Slater, J. J., Gupta, A., Brenner, D. R., & Druzdzal, M. J.. (2019). Bayesian Networks for Risk Prediction Using Real-World Data: A Tool for Precision Medicine. *Value in Health*, 22(4), 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2019.01.006>
- Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2001). Diagnosis of Noncultivable Gastroenteritis Viruses, the Human Caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), 15-37. doi:10.1128/cmr.14.1.15-37.2001
- Atmar, R. L., Neill, F. H., Romalde, J. L., Le Guyader, F., Woodley, C. M., Metcalf, T. G., & Estes, M. K. (1995). Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 3014. <http://aem.asm.org/content/61/8/3014.abstract>
- Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H., & Graham, D. Y. (2008). Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection. *Emerging Infectious Diseases*, 14(10), 1553-1557. doi:10.3201/eid1410.080117
- Báez, P. A., Jaramillo, C. M., Arismendi, L., Rendón, J. C., Cortés-Mancera, F., Peláez, D., . . . Navas, M. C. (2016). Evidencia de circulación del virus de la hepatitis A, subgenotipo IA, en muestras ambientales en Antioquia, Colombia. *Biomédica*, 36, 135-147. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572016000600015&nrm=iso
- Barardi, C. R. M., Yip, H., Emsile, K. R., Vesey, G., Raj Shanker, S., & Williams, K. L. (1999). Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. *International journal of food microbiology*, 49(1), 9-18. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00040-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00040-9)
- Beji-Hamza, A., Taffon, S., Mhalla, S., Lo Presti, A., Equestre, M., Chionne, P., Madonna, E., Cella, E., Bruni, R., Ciccozzi, M., Aouni, M., & Ciccaglione,

- A. R. (2015). Migration pattern of hepatitis A virus genotype IA in North-Central Tunisia. *Virology journal*, 12, 17. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0249-9>
- Beller, M. (1992). Hepatitis A outbreak in Anchorage, Alaska, traced to ice slush beverages. *The Western journal of medicine*, 156(6), 624-627. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1319626>
- Beran, J., Van Der Meeren, O., Leyssen, M., & D'Silva, P. (2016). Immunity to hepatitis A and B persists for at least 15 years after immunisation of adolescents with a combined hepatitis A and B vaccine. *Vaccine*, 34(24), 2686-2691. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.033>
- Bitencurt, E. L. R., Siqueira, J. A. M., Medeiros, T. B., Bandeira, R. D., Oliveira, D. D., Guimaraes, R., Gabbay, Y. B. (2019). Epidemiological and molecular investigation of norovirus and astrovirus infections in Rio Branco, Acre, Northern Brazil: A retrospective study. *Journal of Medical Virology*, 91(6), 997-1007. doi:10.1002/jmv.25395
- Biziagos, E., Passagot, J., Crance, J. M., & Deloince, R. (1988). Long-term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral water. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(11), 2705. <http://aem.asm.org/content/54/11/2705.abstract>
- Bloch, A. B., Stramer, S. L., Smith, J. D., Margolis, H. S., Fields, H. A., McKinley, T. W., Sikes, R. K. (1990). Recovery of hepatitis A virus from a water supply responsible for a common source outbreak of hepatitis A. *American Journal of Public Health*, 80(4), 428-430. doi:10.2105/ajph.80.4.428
- Bon, F., Ambert-Balay, K., Giraudon, H., Kaplon, J., Le Guyader, S., Pommepey, M., . . . Kohli, E. (2005). Molecular Epidemiology of Caliciviruses Detected in Sporadic and Outbreak Cases of Gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4659-4664. doi:10.1128/jcm.43.9.4659-4664.2005
- Bosch, A., Sánchez, G., Le Guyader, F., Vanaclocha, H., Haugarreau, L., & Pintó, R. M. (2001). Human enteric viruses in Coquina clams associated with a

large hepatitis A outbreak. *Water Science and Technology*, 43(0273-1223 (Print)), 61-65.

Broman, M., Jokinen, S., Kuusi, M., Lappalainen, M., Roivainen, M., Liitsola, K., & Davidkin, I. (2010). Epidemiology of hepatitis A in Finland in 1990-2007. *Journal of Medical Virology*, 82(6), 934-941. doi:10.1002/jmv.21759

Bull, R. A., Tanaka, M. M., & White, P. A. (2007). Norovirus recombination. *Journal of General Virology*, 88, 3347-3359. doi:10.1099/vir.0.83321-0

Cao, X., Xue, Y.-j., Du, J.-l., Xu, Q., Yang, X.-c., Zeng, Y., Ma, Z.-r. (2018). Induction and Suppression of Innate Antiviral Responses by Hepatitis A Virus. *Frontiers in microbiology*, 9(1865). doi:10.3389/fmicb.2018.01865

Cannon, J. L., Barclay, L., Collins, N. R., Wikswa, M. E., Castro, C. J., Magaña, L. C., Gregoricus, N., Marine, R. L., Chhabra, P., & Vinjé, J.. (2017). Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 2208-2221. <https://doi.org/10.1128/jcm.00455-17>

Carmona-Vicente, N., Fernández-Jiménez, M., Vila-Vicent, S., Rodríguez-Díaz, J., & Buesa, J. (2016). Characterisation of a household norovirus outbreak occurred in Valencia (Spain). *Bmc Infectious Diseases*, 16(1). doi:10.1186/s12879-016-1455-9

Casas, N., Amarita, F., & de Marañón, I. M. (2007). Evaluation of an extracting method for the detection of Hepatitis A virus in shellfish by SYBR-Green real-time RT-PCR. *International journal of food microbiology*, 120(1), 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.017>

Chhabra, P., De Graaf, M., Parra, G. I., Chan, M. C.-W., Green, K., Martella, V., Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*, 100(10), 1393-1406. doi:10.1099/jgv.0.001318

- Chan, M. C., Lee, N., Hung, T. N., Kwok, K., Cheung, K., Tin, E. K., Lai, R. W., Nelson, E. A., Leung, T. F., & Chan, P. K. (2015). Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nature communications*, 6, 10061. <https://doi.org/10.1038/ncomms10061>
- Ching, K. Z., Nakano, T., Chapman, L. E., Demby, A., & Robertson, B. H. (2002). Genetic characterization of wild-type genotype VII hepatitis A virus. *The Journal of general virology*, 83(Pt 1), 53-60. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-1-53>
- Chironna, M., Lopalco, P., Prato, R., Germinario, C., Barbuti, S., & Quarto, M. (2004). Outbreak of Infection with Hepatitis A Virus (HAV) Associated with a Foodhandler and Confirmed by Sequence Analysis Reveals a New HAV Genotype IB Variant. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2825-2828. doi:10.1128/jcm.42.6.2825-2828.2004
- Collier, M. G., Khudyakov, Y. E., Selvage, D., Adams-Cameron, M., Epton, E., Cronquist, A., Xu, F. (2014). Outbreak of hepatitis A in the USA associated with frozen pomegranate arils imported from Turkey: an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(10), 976-981. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70883-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70883-7)
- Colomba, C., Saporito, L., Giammanco, G. M., De Grazia, S., Ramirez, S., Arista, S., & Titone, L. (2007). Norovirus and gastroenteritis in hospitalized children, Italy. *Emerging infectious diseases*, 13(9), 1389-1391. <https://doi.org/10.3201/eid1309.061408>
- Conaty, S., Bird, P., Bell, G., Kraa, E., Grohmann, G., & McAnulty, J. M. (2000). Hepatitis A in New South Wales, Australia from consumption of oysters: the first reported outbreak. *Epidemiology and infection*, 124(1), 121-130. doi:10.1017/s0950268899003386
- Croci, L., De Medici, D., Ciccozzi, M., Di Pasquale, S., Suffredini, E., & Toti, L. (2003). Contamination of mussels by hepatitis A virus: a public-health problem in southern Italy. *Food Control*, 14(8), 559-563. doi:https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00133-0

- Cromeans, T. L., Nainan Ov Fau - Margolis, H. S., & Margolis, H. S. (1997). Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(0099-2240 (Print)), 4. doi:10.1128/aem.63.6.2460-2463.1997
- Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Romero, H. C., Perez-Bercof, R., Casane, D., Colina, R., Ferré, V. (2002). Molecular Evolution of Hepatitis A Virus: a New Classification Based on the Complete VP1 Protein. *Journal of Virology*, 76(18), 9516-9525. doi:10.1128/jvi.76.18.9516-9525.2002
- Costa, L., Teixeira, D. M., Portela, A. C. R., de Lima, I. C. G., Bandeira, R. D., Sousa, E. C., Gabbay, Y. B. (2019). Molecular and evolutionary characterization of norovirus GII.17 in the northern region of Brazil. *Bmc Infectious Diseases*, 19(1), 11. doi:10.1186/s12879-019-4628-5
- Costafreda, M. I., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2006). Development, Evaluation, and Standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Quantification of Hepatitis A Virus in Clinical and Shellfish Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3846-3855. doi:10.1128/aem.02660-05
- Cotten, M., Petrova, V., Phan, M. V., Rabaa, M. A., Watson, S. J., Ong, S. H., Kellam, P., & Baker, S. (2014). Deep sequencing of norovirus genomes defines evolutionary patterns in an urban tropical setting. *Journal of virology*, 88(19), 11056-11069. <https://doi.org/10.1128/JVI.01333-14>
- Coudray-Meunier, C., Fraise, A., Mokhtari, C., Martin-Latil, S., Roque-Afonso, A.-M., & Perelle, S. (2014). Hepatitis A virus subgenotyping based on RT-qPCR assays. *BMC Microbiology*, 14(1). doi:10.1186/s12866-014-0296-1
- Cuthbert, J. A. (2001). Hepatitis A: Old and New. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), 38-58. doi:10.1128/cmr.14.1.38-58.2001

- D'Andrea, L., Pérez-Rodríguez, F., De Castellarnau, M., Manzanares, S., Lite, J., Guix, S., Pintó, R. (2015). Hepatitis A Virus Genotype Distribution during a Decade of Universal Vaccination of Preadolescents. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 6842-6854. doi:10.3390/ijms16046842
- Dang Thanh, H., Than, V. T., Nguyen, T. H., Lim, I., & Kim, W. (2016). Emergence of Norovirus GII.17 Variants among Children with Acute Gastroenteritis in South Korea. *PloS one*, 11(5), e0154284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154284>
- Da Silva Poló, T., Peiró, J. R., Mendes, L. C. N., Ludwig, L. F., De Oliveira-Filho, E. F., Bucardo, F., Mauroy, A. (2016). Human norovirus infection in Latin America. *Journal of Clinical Virology*, 78, 111-119. doi:10.1016/j.jcv.2016.03.016
- Davidkin, I., Zheleznova, N., Jokinen, S., Gorchakova, O., Broman, M., & Mukomlov, S. (2007). Molecular epidemiology of hepatitis A in St. Petersburg, Russia, 1997-2003. *Journal of Medical Virology*, 79(6), 657-662. doi:10.1002/jmv.20843
- De Graaf, M., Van Beek, J., Vennema, H., Podkolzin, A., Hewitt, J., Bucardo, F., Koopmans, M. (2015). Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Eurosurveillance*, 20(26), 21178. doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.26.21178
- De Paula, V. S., Baptista, M. L., Lampe, E., Niel, C., & Gaspar, A. M. C. (2002). Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Virology*, 66(1), 22-27. doi:10.1002/jmv.2106
- Desbois, D., Couturier, E., Mackiewicz, V., Graube, A., Letort, M. J., Dussaix, E., & Roque-Afonso, A. M. (2010). Epidemiology and Genetic Characterization of Hepatitis A Virus Genotype IIA. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3306-3315. doi:10.1128/jcm.00667-10

- Desdouits, M., Wacrenier, C., Ollivier, J., Schaeffer, J., & Le Guyader, F. S.. (2020). A Targeted Metagenomics Approach to Study the Diversity of Norovirus GII in Shellfish Implicated in Outbreaks. *Viruses*, 12(9), 978. <https://doi.org/10.3390/v12090978>
- Díaz T, J., Solari G, V., Cáceres C, O., Mena A, J., Baeza P, S., Muñoz U, X., . . . Mamani M, N. (2012). Brote de gastroenteritis aguda en la Región de Antofagasta, Chile: 2010. *Revista chilena de infectología*, 29(1), 19-25. doi:10.4067/s0716-10182012000100003
- Dolin, R., Blacklow, N. R., DuPont, H., Formal, S., Buscho, R. F., Kasel, J. A., Chames, R. P., Hornick, R., & Chanock, R. M. (1971). Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *The Journal of infectious diseases*, 123(3), 307-312. <https://doi.org/10.1093/infdis/123.3.307>
- Dotzauer, A., Brenner, M., Gebhardt, U., & Vallbracht, A. (2005). IgA-coated particles of Hepatitis A virus are translocated antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *Journal of General Virology*, 86(10), 2747-2751. doi:10.1099/vir.0.81157-0
- Drexler, J. F., Corman, V. M., Lukashev, A. N., van den Brand, J. M., Gmyl, A. P., Brünink, S., Rasche, A., Seggewiß, N., Feng, H., Leijten, L. M., Vallo, P., Kuiken, T., Dotzauer, A., Ulrich, R. G., Lemon, S. M., Drosten, C., & Hepatovirus Ecology Consortium (2015). Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49), 15190-15195. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516992112>
- Echevarría, J. M., & Avellón, A. (2008). Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las hepatitis virales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26, 66-74. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(08\)76543-1](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(08)76543-1)
- El Moqri, N., El Mellouli, F., Hassou, N., Benhafid, M., Abouchoaib, N., & Etahiri, S. (2019). Norovirus Detection at Oualidia Lagoon, a Moroccan Shellfish

Harvesting Area, by Reverse Transcription PCR Analysis. *Food and Environmental Virology*, 11(3), 268-273. doi:10.1007/s12560-019-09386-0

Endo, K., Takahashi, M., Masuko, K., Inoue, K., Akahane, Y., & Okamoto, H. (2007). Full-length sequences of subgenotype IIIA and IIIB hepatitis A virus isolates: Characterization of genotype III HAV genomes. *Virus Research*, 126(1), 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.005>

Enriquez, R., Frösner, G. G., Hochstein-Mintzel, V., Riedemann, S., & Reinhardt, G. (1992). Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *Journal of Medical Virology*, 37(3), 174-179. doi:10.1002/jmv.1890370305

Estévez, A., Arvelo, W., Hall, A. J., López, M. R., López, B., Reyes, L., Lindblade, K. A. (2013). Prevalence and genetic diversity of norovirus among patients with acute diarrhea in Guatemala. *Journal of Medical Virology*, 85(7), 1293-1298. doi:10.1002/jmv.23578

Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K. L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., . . . Lemon, S. M. (2013). A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature*, 496(7445), 367-371. doi:10.1038/nature12029

Fernandez-Cassi, X., Martínez-Puchol, S., Silva-Sales, M., Cornejo, T., Bartolome, R., Bofill-Mas, S., & Girones, R. (2020). Unveiling Viruses Associated with Gastroenteritis Using a Metagenomics Approach. *Viruses*, 12(12), 1432. <https://doi.org/10.3390/v12121432>

Fernández, J. M. R., & Gómez, J. B. (2010). Infecciones por norovirus. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 51-55. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70009-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70009-4)

Fioretti, J. M., Fumian, T. M., Rocha, M. S., Dos Santos, I. D. A. L., Carvalho-Costa, F. A., De Assis, M. R., Miagostovich, M. P. (2018). Surveillance of Noroviruses in Rio De Janeiro, Brazil: Occurrence of New GIV Genotype

in Clinical and Wastewater Samples. *Food and Environmental Virology*, 10(1), 1-6. doi:10.1007/s12560-017-9308-2

Flannery, J., Keaveney, S., Rajko-Nenow, P., O'Flaherty, V., & Doré, W. (2012). Concentration of Norovirus during Wastewater Treatment and Its Impact on Oyster Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3400-3406. doi:10.1128/aem.07569-11

Flores, P. T., & Sanhueza, R. A. (2018). Resiliencia comunitaria frente a los desastres naturales: caleta Tumbes, región del Biobío, Chile. Cuadernos de Geografía: *Revista Colombiana de Geografía*, 27(1), 131-145. doi:10.15446/rcdg.v27n1.59904

FSANZ. (2017). Agents of Foodborne Illness: Norovirus, Food Standards Australia New Zealand. *FOOD STANDARDS*. Australia New Zealand, 2, 14. <https://www.foodstandards.gov.au/>

Fusco, G., Anastasio, A., Kingsley, D. H., Amoroso, M. G., Pepe, T., Fratamico, P. M., Boccia, F. (2019). Detection of Hepatitis A Virus and Other Enteric Viruses in Shellfish Collected in the Gulf of Naples, Italy. *International journal of environmental research and public health*, 16(14), 2588. doi:10.3390/ijerph16142588

Galeano, M. E., Martinez, M., Amarilla, A. A., Russomando, G., Miagostovich, M. P., Parra, G. I., & Leite, J. P. (2013). Molecular epidemiology of norovirus strains in Paraguayan children during 2004-2005: Description of a possible new GII.4 cluster. *Journal of Clinical Virology*, 58(2), 378-384. doi:10.1016/j.jcv.2013.07.008

Gharbi-Khelifi, H., Ben Salem Abid, N., Sdiri, K., Harrath, R., Beji, A., Bhiri, L., Billaudel, S., Ferre, V., & Aouni, M. (2011). Characterization of outbreak hepatitis A isolates in five Tunisian childcare centers. *Brazilian journal of microbiology*: 42(3), 1204-1212. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110003000046>

García-Aguirre, L., & Cristina, J. (2008). Analysis of the full-length genome of hepatitis A virus isolated in South America: heterogeneity and evolutionary

constraints. *Archives of Virology*, 153(8), 1473-1478. doi:10.1007/s00705-008-0151-5

Glass, R. I., Parashar, U. D., & Estes, M. K. (2009). Norovirus Gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 361(18), 1776-1785. doi:10.1056/nejmra0804575

González-Saldía, R. R., Pino-Maureira, N. L., Muñoz, C., Soto, L., Durán, E., Barra, M. J., Saavedra, A. (2019). Fecal pollution source tracking and thalassogenic diseases: The temporal-spatial concordance between maximum concentrations of human mitochondrial DNA in seawater and Hepatitis A outbreaks among a coastal population. *Science of The Total Environment*, 686, 158-170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.415>

Guadagnucci Morillo, S., & Sampaio Tavares Timenetsky, M. (2011). Norovírus: uma visão geral. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 57(4), 462-467. <https://doi.org/10.1590/s0104-42302011000400023>

Halliday, M. L., Kang, L.-Y., Zhou, T.-K., Hu, M.-D., Pan, Q.-C., Fu, T.-Y., Hu, S.-L. (1991). An Epidemic of Hepatitis A Attributable to the Ingestion of Raw Clams in Shanghai, China. *The Journal of Infectious Diseases*, 164(5), 852-859. doi:10.1093/infdis/164.5.852

Hamza, H., Abd-Elshafy, D. N., Fayed, S. A., Bahgat, M. M., El-Esnawy, N. A., & Abdel-Mobdy, E. (2017). Detection and characterization of hepatitis A virus circulating in Egypt. *Archives of virology*, 162(7), 1921-1931. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3294-4>

Hasna A. Amdiouni, Leena Maunula, Arwa M. Al-Shuwaikh, Jalal Nourlil. (2017). Comparison of two virus concentration methods for enteric viruses detection in Moroccan wastewater and treated effluent. *Iraqi JMS*. 2017; Vol. 15(1): 27-38. doi: 10.22578/IJMS.15.1.5

Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Devleeschauwer, B. (2015). World Health Organization Global Estimates

and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLOS Medicine*, 12(12), e1001923. doi:10.1371/journal.pmed.1001923

Henigman, U., Biasizzo, M., Vadnjal, S., Toplak, I., Gombač, M., Steyer, A., Poljšak Prijatelj, M., Ambrožič, M., Fonda, I., Kirbiš, A., & Barlič-Maganja, D. (2015). Molecular characterisation of noroviruses detected in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from harvesting areas in Slovenia. *The new microbiologica*, 38(2), 225-233.

Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Fraisse, A., Niveau, F., & Perelle, S.. (2020). Virological analyses in collective catering outbreaks in France between 2012 and 2017. *Food Microbiology*, 91, 103546. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103546>

Hu, Y., & Arsov, I. (2009). Nested real-time PCR for hepatitis A detection. *Letters in Applied Microbiology*, 49(5), 615-619. doi:10.1111/j.1472-765x.2009.02713.x

INE. (2017). Enfoque Desembarque Pesquero, Región del BioBio quinquenio 2012-2016. *Instituto Nacional de Estadísticas, Chile*. http://www.inebiobio.cl/archivos/files/pdf/ENFOQUES/Enfoque_pesca_2012-2016Biobio.pdf

Jeong, S. H., & Lee, H. S. (2010). Hepatitis A: Clinical Manifestations and Management. *Intervirolgy*, 53(1), 15-19. doi:10.1159/000252779

Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Kojima, S., Katayama, K. (2004). Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 2988-2995. doi:10.1128/jcm.42.7.2988-2995.2004

Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., & Chanock, R. M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis.

Journal of Virology, 10(5), 1075-1081. doi:10.1128/JVI.10.5.1075-1081.1972

Karst, S. M. (2010). Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. *Viruses*, 2(3), 748-781. doi:10.3390/v2030748

Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Gojobori, T., & Takeda, N. (2002). Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*, 299(2), 225-239. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1568>

Kim, A.-N., Park, S. Y., Bae, S.-C., Oh, M.-H., & Ha, S.-D. (2014). Survival of Norovirus Surrogate on Various Food-Contact Surfaces. *Food and Environmental Virology*, 6(3), 182-188. doi:10.1007/s12560-014-9154-4

Koek, A. G., Bovée, L. P. M. J., Hoek, J. A. R. v. d., Bos, A. J., & Bruisten, S. M. (2006). Additional value of typing Noroviruses in gastroenteritis outbreaks in Amsterdam, The Netherlands. *Journal of Clinical Virology*, 35(2), 167-172. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.05.014>

Koopmans, M., & Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International journal of food microbiology*, 90(1), 23-41. doi:10.1016/s0168-1605(03)00169-7

Kroneman, A., De Sousa, R., Verhoef, L., Koopmans, M. P. G., & Vennema, H. (2018). Usability of the international HAVNet hepatitis A virus database for geographical annotation, backtracing and outbreak detection. *Eurosurveillance*, 23(37). doi:10.2807/1560-7917.es.2018.23.37.1700802

Kulkarni, M. A., Walimbe, A. M., Cherian, S., & Arankalle, V. A. (2009). Full length genomes of genotype IIIA Hepatitis A Virus strains (1995-2008) from India and estimates of the evolutionary rates and ages. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1287-1294. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.009>

- Le Guyader, F. O. S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M., & Atmar, R. L. (2009). Detection and Quantification of Noroviruses in Shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 618-624. doi:10.1128/aem.01507-08
- Lebourgeois, S., Fraisse, A., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., & Martin-Latil, S. (2018). Development of a Real-Time Cell Analysis (RTCA) Method as a Fast and Accurate Method for Detecting Infectious Particles of the Adapted Strain of Hepatitis A Virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. doi:10.3389/fcimb.2018.00335
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D708-D717. doi:10.1093/nar/gkx932
- Lemon, S. M., Jansen, R. W., & Brown, E. A. (1992). Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. *Vaccine*, 10, S40-S44. doi:10.1016/0264-410x(92)90540-z
- Lemon, S. M., Ott, J., Van Damme, P., & Shouval, D. (2017). Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *Journal of Hepatology* (1600-0641 (Electronic)). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.034>
- León-Félix, J., Martínez-Bustillos, R. A., Báez-Sañudo, M., Peraza-Garay, F., & Chaidez, C. (2010). Norovirus Contamination of Bell Pepper from Handling During Harvesting and Packing. *Food and Environmental Virology*, 2(4), 211-217. doi:10.1007/s12560-010-9048-z
- Leshem, E., Wikswa, M., Barclay, L., Brandt, E., Storm, W., Salehi, E., Desalvo, T., Davis, T., Saupe, A., Dobbins, G., Booth, H. A., Biggs, C., Garman, K., Woron, A. M., Parashar, U. D., Vinjé, J., & Hall, A. J.. (2013). Effects and Clinical Significance of GII.4 Sydney Norovirus, United States, 2012-2013. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), 1231-1238. <https://doi.org/10.3201/eid1908.130458>

- Lin, K.-Y., Hsieh, S.-M., Sun, H.-Y., Lo, Y.-C., Sheng, W.-H., Chuang, Y.-C., Chang, S.-C. (2018). Serologic responses and effectiveness of hepatitis A vaccination among human immunodeficiency virus-positive individuals during the outbreak of acute hepatitis A. *Hepatology*, 68(1), 22-31. doi:10.1002/hep.29780
- Lindell, A. T., Grillner, L., Svensson, L., & Wirgart, B. Z. (2005). Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000 to 2003: association of the GGIIb genetic cluster with infection in children. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1086-1092. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1086-1092.2005>
- Lindesmith, L., Moe C Fau - Marionneau, S., Marionneau S Fau - Ruvoen, N., Ruvoen N Fau - Jiang, X., Jiang X Fau - Lindblad, L., Lindblad L Fau - Stewart, P., Baric, R. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature* (1078-8956 (Print)). doi:10.1038/nm860
- Londoñe-Bailon, P., & Sánchez-Robinet, C. (2018). Efficiency evaluation of the process control virus “Mengovirus” in real time RT-PCR viral detection in the bivalve mollusc *Donax* sp. *Journal of Virological Methods*, 262, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.09.006>
- Louca, S., McLaughlin, A., MacPherson, A., Joy, J. B., & Pennell, M. W. (2021). Fundamental Identifiability Limits in Molecular Epidemiology. *Molecular biology and evolution*, 38(9), 4010-4024. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab149>
- Lu, L., Ching, K. Z., de Paula, V. S., Nakano, T., Siegl, G., Weitz, M., & Robertson, B. H. (2004). Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *The Journal of general virology*, 85(Pt 10), 2943-2952. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80304-0>
- Maalouf, H., Pommepuy, M., & Le Guyader, F. S. (2010). Environmental Conditions Leading to Shellfish Contamination and Related Outbreaks.

Food and Environmental Virology, 2(3), 136-145. doi:10.1007/s12560-010-9043-4

- Maalouf, H., Zakhour, M., Le Pendu, J., Le Saux, J.-C., Atmar, R. L., & Le Guyader, F. O. S. (2010). Distribution in Tissue and Seasonal Variation of Norovirus Genogroup I and II Ligands in Oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5621-5630. doi:10.1128/aem.00148-10
- Mackiewicz, V., Cammas, A., Desbois, D., Marchadier, E., Pierredon, S., Beaulieux, F. D. R., Roque-Afonso, A.-M. (2010). Nucleotide Variability and Translation Efficiency of the 5' Untranslated Region of Hepatitis A Virus: Update from Clinical Isolates Associated with Mild and Severe Hepatitis. *Journal of Virology*, 84(19), 10139-10147. doi:10.1128/jvi.02598-09
- Manangeeswaran, M., Jacques, J., Tami, C., Konduru, K., Amharref, N., Perrella, O., Kaplan, G. G. (2012). Binding of Hepatitis A Virus to Its Cellular Receptor 1 Inhibits T-Regulatory Cell Functions in Humans. *Gastroenterology*, 142(7), 1516-1525. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.039
- Mans, J., Netshikweta, R., Magwalivha, M., Van Zyl, W. B., & Taylor, M. B. (2012). Diverse norovirus genotypes identified in sewage-polluted river water in South Africa. *Epidemiology and Infection*, 141(02), 303-313. doi:10.1017/s0950268812000490
- Marsh, Z., Shah, M. P., Wikswo, M. E., Barclay, L., Kisselburgh, H., Kambhampati, A., Hall, A. J. (2018). Epidemiology of Foodborne Norovirus Outbreaks – United States, 2009-2015. *Food Safety*, 6(2), 58-66. doi:10.14252/foodsafetyfscj.2017028
- Mathijs, E., Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., Thiry, E. (2012). A Review of Known and Hypothetical Transmission Routes for Noroviruses. *Food and Environmental Virology*, 4(4), 131-152. doi:10.1007/s12560-012-9091-z

- Matsushima, Y., Mizukoshi, F., Sakon, N., Doan, Y. H., Ueki, Y., Ogawa, Y., Kimura, H. (2019). Evolutionary Analysis of the VP1 and RNA-Dependent RNA Polymerase Regions of Human Norovirus GII.P17-GII.17 in 2013-2017. *Frontiers in microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.02189
- Mattison, C. P., Cardemil, C. V., & Hall, A. J. (2018). Progress on norovirus vaccine research: public health considerations and future directions. *Expert Review of Vaccines*, 17(9), 773-784. doi:10.1080/14760584.2018.1510327
- McKnight, K. L., & Lemon, S. M. (2018). Hepatitis A Virus Genome Organization and Replication Strategy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(12). doi:10.1101/cshperspect.a033480
- Medina D, B., Olea N, A., & Aguilera S, X. (2003). Situación epidemiológica de hepatitis A en Chile. *Revista chilena de infectología*, 20(4). doi:10.4067/s0716-10182003000400007
- Meghnath, K., Hasselback, P., McCormick, R., Prystajecky, N., Taylor, M., McIntyre, L., Galanis, E. (2019). Outbreaks of Norovirus and Acute Gastroenteritis Associated with British Columbia Oysters, 2016-2017. *Food and Environmental Virology*, 11(2), 138-148. doi:10.1007/s12560-019-09374-4
- MINSAL. (2006). Actualización circular de vigilancia y control de Hepatitis A (cie 9: 070.1; cie 10: b15) y Hepatitis E (cie9: 070.5; cie10 b17.2). [Short communication]. Departamento de Epidemiología. Subsecretaría de Salud Pública, Chile.
https://www.hhha.cl/transparencia/eno/circular_vigilancia/hepatitis_a_e2006.pdf
- MINSAL. (2016). Situación epidemiológica de la vigilancia centinela de diarrea en menores de 5 años. [Short communication] <http://epi.minsal.cl/diarreas-situacion-epidemiologica/>

- MINSAL. (2017). Situación epidemiológica de hepatitis A y viral sin especificación (CIE-10 B15 y B19). Chile, años 2007-2017. Informe epidemiológico anual. [Short communication]
- Montenegro, S., Pineda, S., Enríquez, I., Enríquez, N., Rivera, N., & Delgado, C. (2014). Detección de norovirus en niños con diarrea adquirida en la comunidad o nosocomial en el Hospital Guillermo Grant Benavente de Concepción, Chile. *Revista chilena de infectología*, 31(3), 298-304. doi:10.4067/s0716-10182014000300008
- Moore, M. D., Goulter, R. M., & Jaykus, L.-A. (2015). Human Norovirus as a Foodborne Pathogen: Challenges and Developments. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 411-433. doi:10.1146/annurev-food-022814-015643
- Mukomolov, S., Kontio, M., Zheleznova, N., Jokinen, S., Sinayskaya, E., Stalevskaya, A., & Davidkin, I. (2012). Increased circulation of hepatitis A virus genotype IIIA over the last decade in St Petersburg, Russia. *Journal of Medical Virology*, 84(10), 1528-1534. doi:10.1002/jmv.23378
- Mutreja, A., Dougan, G. (2020). Molecular epidemiology and intercontinental spread of cholera, *Vaccine*, Volume 38, Supplement 1, Pages A46-A51, ISSN 0264-410X, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.038>
- Munné, M. S., Vladimirsky, S., Otegui, L., Soto, S., Brajterman, L., Castro, R., González, J. E. (2007). Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from Argentina. *Journal of Medical Virology*, 79(7), 887-894. doi:10.1002/jmv.20818
- Nainan, O. V., Xia, G., Vaughan, G., & Margolis, H. S. (2006). Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 63-79. doi:10.1128/cmr.19.1.63-79.2006
- Navas, M. C., & Báez, P. A. (2015). Infección por el virus de la hepatitis A: epidemiología y diversidad genética. *Iatreia*, 28, 157-169. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932015000200006&nrm=iso

- Nei, M. and Kumar S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Neil. (2004). COMMENTARY: Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, et al. Transmission of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis to Volunteers by Oral Administration of Stool Filtrates. *J Infect Dis* 1971; 123:307-12. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(11), 2139-2147. <https://doi.org/10.1086/420887>
- Nenonen, N. P., Hannoun, C., Horal, P., Hernroth, B., & Bergström, T. (2008). Tracing of Norovirus Outbreak Strains in Mussels Collected near Sewage Effluents. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2544-2549. doi:10.1128/aem.02477-07
- O'Ryan, M., Riera-Montes, M., & Lopman, B. (2017). Norovirus in Latin America Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(2), 127-134. doi:10.1097/inf.0000000000001369
- Ouardani, I., Turki, S., Aouni, M., & Romalde, J. L. (2016). Detection and Molecular Characterization of Hepatitis A Virus from Tunisian Wastewater Treatment Plants with Different Secondary Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3834-3845. doi:10.1128/aem.00619-16
- Ozaki, K., Matsushima, Y., Nagasawa, K., Aso, J., Saraya, T., Yoshihara, K., Kimura, H. (2020). Molecular Evolution of the Protease Region in Norovirus Genogroup II. *Frontiers in microbiology*, 10(2991). doi:10.3389/fmicb.2019.02991
- Parra, G. I., Squires, R. B., Karangwa, C. K., Johnson, J. A., Lepore, C. J., Sosnovtsev, S. V., & Green, K. Y. (2017). Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLOS Pathogens*, 13(1), e1006136. doi:10.1371/journal.ppat.1006136

- Patel, M. M., Widdowson, M.-A., Glass, R. I., Akazawa, K., Vinjé, J., & Parashar, U. D. (2008). Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1224-1231. doi:10.3201/eid1408.071114
- Phumpholsup, T., Chieochansin, T., Vongpunsawad, S., Vuthitanachot, V., Payungporn, S., & Poovorawan, Y. (2015). Human norovirus genogroup II recombinants in Thailand, 2009-2014. *Archives of Virology*, 160(10), 2603-2609. doi:10.1007/s00705-015-2545-5
- Ping, L. H., & Lemon, S. M. (1992). Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *Journal of Virology*, 66(4), 2208. <http://jvi.asm.org/content/66/4/2208.abstract>
- Polo, D., Schaeffer, J., Fournet, N., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., McLeod, C., & Le Guyader, F. S. (2016). Digital PCR for Quantifying Norovirus in Oysters Implicated in Outbreaks, France. *Emerging Infectious Diseases*, 22(12), 2189-2191. doi:10.3201/eid2212.160841
- Purpari, G., Macaluso, G., Di Bella, S., Gucciardi, F., Mira, F., Di Marco, P., Guercio, A. (2019). Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. *International Journal of Infectious Diseases*, 80, 66-72. doi:10.1016/j.ijid.2018.12.011
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1253-1256. doi:10.1093/molbev/msn083
- Qi, Y., Zhang, F., Zhang, L., Harrison, T. J., Huang, W., Zhao, C., Wang, Y. (2015). Hepatitis E Virus Produced from Cell Culture Has a Lipid Envelope. *PLOS ONE*, 10(7), e0132503. doi:10.1371/journal.pone.0132503
- Qiao, N., Ren, H., & Liu, L. (2017). Genomic diversity and phylogeography of norovirus in China. *BMC medical genomics*, 10(Suppl 3), 51. <https://doi.org/10.1186/s12920-017-0287-9>

- Rajko-Nenow, P., Waters, A., Keaveney, S., Flannery, J., Tuite, G., Coughlan, S., O'Flaherty, V., & Doré, W.. (2013). Norovirus Genotypes Present in Oysters and in Effluent from a Wastewater Treatment Plant during the Seasonal Peak of Infections in Ireland in 2010. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2578-2587. <https://doi.org/10.1128/aem.03557-12>
- Razafimahefa, R. M., Ludwig-Begall, L. F., & Thiry, E. (2019). Cockles and mussels, alive, alive, oh—The role of bivalve molluscs as transmission vehicles for human norovirus infections. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi:10.1111/tbed.13165
- Reimering, S., Muñoz, S., & McHardy, A. C. (2020). Phylogeographic reconstruction using air transportation data and its application to the 2009 H1N1 influenza A pandemic. *PLoS computational biology*, 16(2), e1007101. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007101>
- Rajko-Nenow, P., Waters, A., Keaveney, S., Flannery, J., Tuite, G., Coughlan, S., O'Flaherty, V., & Doré, W. (2013). Norovirus genotypes present in oysters and in effluent from a wastewater treatment plant during the seasonal peak of infections in Ireland in 2010. *Applied and environmental microbiology*, 79(8), 2578-2587. <https://doi.org/10.1128/AEM.03557-12>
- Rendón-Macías, Mario Enrique, Riojas-Garza, Alberto, Contreras-Estrada, Daniela, & Martínez-Ezquerro, José Darío. (2018). Análisis bayesiano. Conceptos básicos y prácticos para su interpretación y uso. *Revista alergia México*, 65(3), 285-298. <https://doi.org/10.29262/ram.v65i3.512>
- Rivas, V., Barrera, A., Pino, K., Núñez, R., Caceres, C. J., Lopez-Lastra, M., & Soza, A. (2018). Hepatitis A outbreak since November 2016 affecting men who have sex with men (MSM) in Chile connected to the current outbreak in MSM in Europe, situation up to October 2017. *Eurosurveillance*, 23(9). doi:10.2807/1560-7917.es.2018.23.9.18-00060

- Rivera-Serrano, E. E., González-López, O., Das, A., & Lemon, S. M. (2019). Cellular entry and uncoating of naked and quasi-enveloped human hepatoviruses. *eLife*, 8. doi:10.7554/elife.43983
- Robertson, B. H., Jansen, R. W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O. V., Siegl, G., Lemon, S. M. (1992). Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology*, 73(6), 1365-1377. doi:10.1099/0022-1317-73-6-1365
- Robilotti, E., Deresinski, S., & Pinsky, B. A.. (2015). Norovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 134-164. <https://doi.org/10.1128/cmr.00075-14>
- Rohayem, J. (2009). Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(6), 524-527. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02846.x
- Rodin, A., Gogoshin, G., Litvinenko, A., Boerwinkle, E., (2012). Exploring Genetic Epidemiology Data with Bayesian Networks, Editor(s): Ranajit Chakraborty, C.R. Rao, Pranab Sen, Handbook of Statistics, Elsevier, Volume 28, Pages 479-510, ISSN 0169-7161, ISBN 9780444518750, <https://doi.org/10.1016/B978-0-44-451875-0.00018-X>
- Romalde, J. L., Area, E., Sánchez, G., Ribao, C., Torrado, I., Abad, X., Bosch, A. (2002). Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *International journal of food microbiology*, 74(1), 119-130. doi:https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00744-9
- Rosenblum, L. S., Mirkin, I. R., Allen, D. T., Safford, S., & Hadler, S. C. (1990). A multifocal outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *American Journal of Public Health*, 80(9), 1075-1079. doi:10.2105/ajph.80.9.1075

- Ruchusatsawat, K., Wongpiyabovorn, J., Kawidam, C., Thiemsing, L., Sangkitporn, S., Yoshizaki, S., Tatsumi, M., Takeda, N., & Ishii, K. (2016). An Outbreak of Acute Hepatitis Caused by Genotype IB Hepatitis A Viruses Contaminating the Water Supply in Thailand. *Intervirology*, 59(4), 197-203. <https://doi.org/10.1159/000455856>
- Sadahiro, A., Fukao, A., Kosaka, M., Funakami, Y., Takizawa, N., Takeuchi, O., Fujiwara, T. (2018). Translation of Hepatitis A Virus IRES Is Upregulated by a Hepatic Cell-Specific Factor. *Frontiers in Genetics*, 9. doi:10.3389/fgene.2018.00307
- Sánchez, G., Bosch, A., & Pintó, R. M. (2007). Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Letters in Applied Microbiology*, 45(1), 1-5. doi:10.1111/j.1472-765x.2007.02140.x
- Santiso-Bellón, C., Fuentes-Trillo, A., Da Silva Ribeiro De Andrade, J., Monzó, C., Vila-Vicent, S., Gozalbo Rovira, R., Rodríguez-Díaz, J. (2019). Nearly Complete Genome Sequence of a Human Norovirus GII.P17-GII.17 Strain Isolated from Brazil in 2015. *Microbiology Resource Announcements*, 8(5). doi:10.1128/mra.01376-18
- Shie, C., Monroe, S., Frankhauser R, L., Langlois, G., Burkhardt III, W., & Baric, R. (2000). Detection of Norwalk-like Virus in Shellfish Implicated in Illness. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(s2), S360-S366. doi:10.1086/315578
- Shukla, A., Padhi, A. K., Gomes, J., & Banerjee, M. (2014). The VP4 Peptide of Hepatitis A Virus Ruptures Membranes through Formation of Discrete Pores. *Journal of Virology*, 88(21), 12409-12421. doi:10.1128/jvi.01896-14
- Siebenga, J. J., Vennema, H., Zheng, D.-P., Vinjé, J., Lee, B. E., Pang, X.-L., Koopmans, M. (2009). Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001-2007. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(5), 802-812. doi:10.1086/605127

- Silva, A. J., Yang, Z., Wolfe, J., Hirneisen, K. A., Ruelle, S. B., Torres, A., Williams-Hill, D., Kulka, M., & Hellberg, R. S. (2021). Application of whole-genome sequencing for norovirus outbreak tracking and surveillance efforts in Orange County, CA. *Food microbiology*, 98, 103796. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103796>
- Symes, S. J., Gunesekere, I. C., Marshall, J. A., & Wright, P. J. (2007). Norovirus mixed infection in an oyster-associated outbreak: an opportunity for recombination. *Archives of virology*, 152(6), 1075-1086. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-0938-9>
- Simon, A., Schildgen, O., Maria Eis-Hübinger, A., Hasan, C., Bode, U., Buderus, S., Fleischhack, G. (2006). Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41(6), 693-699. doi:10.1080/00365520500421694
- Sincero, T. C. M., Levin, D. B., Simões, C. M. O., & Barardi, C. R. M. (2006). Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). *Water Research*, 40(5), 895-902. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.12.005>
- Sips, G. J., Dirven, M. J. G., Donkervoort, J. T., Kolfschoten, F. M., Schapendonk, C. M. E., Phan, M. V. T., Fanoy, E. B. (2020). Norovirus outbreak in a natural playground: A One Health approach. *Zoonoses and Public Health*, 67(4), 453-459. doi:10.1111/zph.12689
- Song, C., Liao, Y., Gao, W., Yu, S., Sun, Y., Qiu, X., . . . Ding, C. (2014). Virulent and attenuated strains of duck hepatitis A virus elicit discordant innate immune responses in vivo. *Journal of General Virology*, 95(12), 2716-2726. doi:10.1099/vir.0.070011-0
- Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., & Uyttendaele, M. (2012). Extraction of food-borne viruses from food samples: A review. *International journal of food microbiology*, 153(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.014>
- Subahir, M. N., Jeffree, M. S., Hassan, M. R., Razak, M. F. A., Mohamad, S. N. G., Fong, S. Y., & Ahmed, K. (2019). Norovirus outbreak among students

of a boarding school in Kluang, Johor, Malaysia. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(04), 274-277. doi:10.3855/jidc.11199

Summa, M., von Bonsdorff, C. H., & Maunula, L. (2012). Pet dogs--a transmission route for human noroviruses?. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 53(3), 244-247. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.12.014>

Tarantino, D., Pezzullo, M., Mastrangelo, E., Croci, R., Rohayem, J., Robel, I., Milani, M. (2014). Naphthalene-sulfonate inhibitors of human norovirus RNA-dependent RNA-polymerase. *Antiviral Research*, 102, 23-28. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.11.016

Theamboonlers, A., Jantaradsamee, P., Chatchatee, P., Chongsrisawat, V., Mokmula, M., & Poovorawan, Y. (2002). Molecular characterization of hepatitis-A-virus infections, in the context of two outbreaks in southern Thailand. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 96(7), 727-734. doi:10.1179/000349802125001898

Thorne, L., Bailey, D., & Goodfellow, I. (2012). High-resolution functional profiling of the norovirus genome. *Journal of Virology*, 86(21), 11441-11456. doi:10.1128/JVI.00439-12

Tickell, K. D., Sharmin, R., Deichsel, E. L., Lamberti, L. M., Walson, J. L., Faruque, A. S. G., Chisti, M. J. (2020). The effect of acute malnutrition on enteric pathogens, moderate-to-severe diarrhoea, and associated mortality in the Global Enteric Multicenter Study cohort: a post-hoc analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), e215-e224. doi:10.1016/s2214-109x(19)30498-x

Tjon, G. M. S., Wijkmans, C. J., Coutinho, R. A., Koek, A. G., Van Den Hoek, J. A. R., Leenders, A. C. A. P., Bruisten, S. M. (2005). Molecular epidemiology of hepatitis A in Noord-Brabant, The Netherlands. *Journal of Clinical Virology*, 32(2), 128-136. doi:10.1016/j.jcv.2004.03.008

Trivedi, T. K., Desai, R., Hall, A. J., Patel, M., Parashar, U. D., & Lopman, B. A. (2013). Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: A

systematic literature review. *American Journal of Infection Control*, 41(7), 654-657. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.08.002>

- Tsatsralt-Od, B., Baasanjav, N., Nyamkhuu, D., Ohnishi, H., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nagashima, S., Nishizawa, T., & Okamoto, H. (2016). Molecular analysis of hepatitis A virus strains obtained from patients with acute hepatitis A in Mongolia, 2004-2013. *Journal of medical virology*, 88(4), 622-630. <https://doi.org/10.1002/jmv.24380>
- Vale, F. F., Vítor, J., Marques, A. T., Azevedo-Pereira, J. M., Anes, E., & Goncalves, J. (2021). Origin, phylogeny, variability and epitope conservation of SARS-CoV-2 worldwide. *Virus research*, 304, 198526. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198526>
- Van Beek, J., De Graaf, M., Al-Hello, H., Allen, D. J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Koopmans, M. P. G. (2018). Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(5), 545-553. doi:10.1016/s1473-3099(18)30059-8
- Vázquez-Dominguez, Ella, Castañeda-Rico, Susette, Garrido-Garduño, Tania & Gutiérrez-García, Tania A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista chilena de historia natural*, 82(2), 277-297. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2009000200009>
- Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S. H., Lee, D., & Vinjé, J. (2014). Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *Journal of clinical microbiology*, 52(1), 147-155. <https://doi.org/10.1128/JCM.02680-13>
- Vidal, R., Roessler, P., Solari, V., Vollaire, J., Jiang, X., Matson, D. O., . . . O'Ryan, M. L. (2006). Novel Recombinant Norovirus Causing Outbreaks of Gastroenteritis in Santiago, Chile. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2271-2275. doi:10.1128/jcm.01890-05

- Villena, R., Wilhelm, J., Calvo, X., Cerda, J., Escobar, C., Moreno, G., . . . Potin, M. (2017). Opinión del Comité Consultivo de Inmunizaciones de la Sociedad Chilena de Infectología en relación a los brotes de hepatitis A en Chile. *Revista chilena de infectología*, 34(4), 371-373. doi:10.4067/s0716-10182017000400371
- Vinjé, J. (2015). Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 373-381. doi:10.1128/jcm.01535-14
- Wang, X., Ren, J., Gao, Q., Hu, Z., Sun, Y., Li, X., Fry, E. E. (2015). Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature*, 517(7532), 85-88. doi:10.1038/nature13806
- Wang S., Weller, D., Falardeau, J., Strawn, L., Mardones, O., Adell, A., Moreno, A. (2016). Food safety trends: From globalization of whole genome sequencing to application of new tools to prevent foodborne diseases, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 57, Part A, Pages 188-198, ISSN 0924-2244, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.016>
- Watanabe, S., Morimoto, N., Miura, K., Takaoka, Y., Nomoto, H., Tsukui, M., Isoda, N., Ohnishi, H., Nagashima, S., Takahashi, M., Okamoto, H., & Yamamoto, H. (2019). Full-genome characterization of the RIVM-HAV16-090-like hepatitis A virus strains recovered from Japanese men who have sex with men, with sporadic acute hepatitis A. *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 49(5), 521-530. <https://doi.org/10.1111/hepr.13313>
- Weinberg, G. A. (2018). Outbreak Epidemiology: One of Many New Frontiers of Norovirus Biology. *The Journal of Infectious Diseases*, 219(9), 1349-1352. doi:10.1093/infdis/jiy570
- Wollants, E., De Coster, S., Van Ranst, M., & Maes, P. (2015). A decade of norovirus genetic diversity in Belgium. *Infection, Genetics and Evolution*, 30, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.001>

- Yassin, M. A., Kirby, A., Mengistu, A. A., Arbide, I., Dove, W., Beyer, M., Cunliffe, N. A., & Cuevas, L. E. (2012). Unusual norovirus and rotavirus genotypes in Ethiopia. *Paediatrics and international child health*, 32(1), 51-55. <https://doi.org/10.1179/1465328111Y.0000000047>
- Yates, A. (2011). *Agents of Food borne Illness: A technical series summarising key information on microorganisms associated with foodborne illness (Vol. 2)*. Canberra, Australia.
- Yeargin, T., & Gibson, K. E.. (2019). Key characteristics of foods with an elevated risk for viral enteropathogen contamination. *Journal of Applied Microbiology*, 126(4), 996-1010. <https://doi.org/10.1111/jam.14113>
- Yoneyama, T., Kiyohara, T., Shimasaki, N., Kobayashi, G., Ota, Y., Notomi, T., Totsuka, A., & Wakita, T. (2007). Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of virological methods*, 145(2), 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.05.023>
- Zhang, J., Chen, Y., Shan, N., Wang, X., Lin, S., Ma, K., Li, B., Li, H., Liao, M., & Qi, W. (2020). Genetic diversity, phylogeography, and evolutionary dynamics of highly pathogenic avian influenza A (H5N6) viruses. *Virus evolution*, 6(2), veaa079. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa079>
- Zhou, Z., Tian, Z., Li, Q., Tian, P., Wu, Q., Wang, D., & Shi, X. (2017). In Situ Capture RT-qPCR: A New Simple and Sensitive Method to Detect Human Norovirus in Oysters. *Frontiers in microbiology*, 8, 554-554. doi:10.3389/fmicb.2017.00554
- Zhu, M., Shen, J., Zeng, Q., Tan, J. W., Klepbua, J., Chew, I., Law, J. X., Chew, S. P., Tangathajinda, A., Latthitham, N., & Li, L. (2021). Molecular Phylogenesis and Spatiotemporal Spread of SARS-CoV-2 in Southeast Asia. *Frontiers in public health*, 9, 685315. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.6853>

**Tabla 5. Evaluación p- distance, basado en 2.000.000 de bootstrap
HAV segmento VP1/2A**

MT185676.1_CMR.19.V_CLAM													
M14707.1_HAV	26,246%												
KP091378.1_TUN.13.IA	25,581%	8,638%											
KP091377.1_TUN.10.IB	26,246%	2,990%	10,299%										
JX232248.1_RUS.09.IA	24,585%	8,306%	4,983%	9,302%									
JX232242.1_RUS.09.IA	24,585%	8,306%	4,983%	9,302%	0,000%								
JX232243.1_RUS.09.IA	25,581%	8,638%	5,316%	8,970%	2,326%	2,326%							
JX232225.1_RUS.04.IIIA	24,585%	22,591%	20,598%	22,924%	19,934%	19,934%	21,262%						
JX232224.1_RUS.04.IA	24,252%	8,970%	5,648%	9,967%	1,329%	1,329%	2,326%	20,266%					
JQ066761.1_KOR.11.IIIA	24,585%	21,927%	20,598%	22,259%	19,269%	19,269%	20,598%	2,990%	19,269%				
JQ066758.1_KOR.11.IIIA	24,585%	21,927%	20,598%	22,259%	19,269%	19,269%	20,598%	2,990%	19,269%	0,000%			
JQ066751.1_KOR.11.IIIA	24,585%	22,591%	21,927%	23,588%	20,598%	20,598%	21,927%	4,319%	20,598%	1,993%	1,993%		
HM011117.1_TUN.06.IA	24,917%	9,302%	1,993%	10,963%	4,651%	4,651%	4,983%	21,262%	5,316%	19,934%	19,934%		
HM011115.1_TUN.06.IA	25,249%	9,635%	2,658%	11,296%	4,651%	4,651%	4,983%	21,595%	5,316%	20,266%	20,266%		
HM011113.1_TUN.06.IA	25,249%	9,302%	1,993%	10,299%	4,319%	4,319%	4,651%	20,598%	4,319%	18,937%	18,937%		
HM011110.1_TUN.06.IA	25,249%	9,967%	2,658%	10,963%	4,983%	4,983%	5,316%	21,262%	4,983%	19,601%	19,601%		
HM011106.1_TUN.06.IA	24,585%	8,970%	2,326%	10,631%	4,983%	4,983%	5,316%	21,595%	5,648%	20,266%	20,266%		
GU646039.1_FRA.10.IB	26,910%	3,322%	8,638%	3,654%	7,641%	7,641%	7,309%	21,595%	8,970%	20,930%	20,930%		
GQ844755.1_FIN.98.IIIA	24,585%	21,927%	20,598%	22,259%	19,269%	19,269%	20,598%	2,326%	19,269%	0,664%	0,664%		
GQ844749.1_FIN.04.IB	25,914%	3,322%	7,973%	2,990%	6,977%	6,977%	6,645%	22,259%	7,641%	21,595%	21,595%		
GQ844741.1_FIN.05.IB	24,585%	3,654%	8,970%	3,322%	7,973%	7,973%	7,641%	22,591%	7,973%	21,927%	21,927%		
GQ506663.1_FRA.09.IA	25,249%	8,306%	0,997%	9,967%	3,987%	3,987%	4,319%	20,930%	4,651%	19,601%	19,601%		
GQ506662.1_FRA.08.IA	26,578%	8,638%	5,648%	8,970%	3,654%	3,654%	3,987%	20,930%	3,654%	20,598%	20,598%		
EF382409.1_RUS.03.IB	26,246%	2,990%	8,306%	2,658%	7,309%	7,309%	6,977%	22,259%	8,638%	21,595%	21,595%		
EF382400.1_RUS.01.IA	24,585%	8,306%	4,983%	9,967%	0,664%	0,664%	2,326%	20,598%	1,329%	19,934%	19,934%		
EF382392.1_RUS.00.IA	24,252%	10,299%	6,312%	11,296%	2,658%	2,658%	4,319%	20,930%	3,322%	20,266%	20,266%		
MN602281.1_ITA.19.IIIA	24,585%	21,927%	20,598%	22,259%	20,598%	20,598%	21,262%	3,322%	20,266%	3,322%	3,322%		
MN602279.1_ITA.19.IA	26,910%	9,635%	6,977%	11,296%	5,648%	5,648%	5,648%	22,259%	5,648%	21,595%	21,595%		
MN496309.1_ITA.19.IB	26,246%	2,990%	9,635%	2,658%	8,638%	8,638%	7,973%	22,591%	9,967%	21,927%	21,927%		
MH730560.1_SWE.18.IB	26,000%	3,000%	9,667%	2,667%	8,667%	8,667%	8,000%	22,333%	10,000%	21,667%	21,667%		
MF805902.1_ESP.17.IA	25,581%	9,967%	6,645%	9,635%	2,990%	2,990%	3,987%	21,262%	3,654%	21,262%	21,262%		
MF805898.1_ESP.17.IA	25,581%	9,967%	6,645%	9,635%	2,990%	2,990%	3,987%	21,262%	3,654%	21,262%	21,262%		
MF805896.1_ESP.17.IA	25,249%	10,299%	6,977%	9,967%	3,322%	3,322%	4,319%	20,930%	3,987%	20,930%	20,930%		
MF805890.1_ESP.17.IA	25,581%	9,967%	6,645%	9,635%	2,990%	2,990%	3,987%	21,262%	3,654%	21,262%	21,262%		
KY886894.1_ITA.17.IA	25,249%	10,299%	6,977%	9,967%	3,322%	3,322%	4,319%	20,930%	3,987%	20,930%	20,930%		
LC415421.1_JPN.17.IA_CLAM	25,581%	9,302%	4,983%	10,299%	2,326%	2,326%	3,987%	21,595%	2,990%	20,266%	20,266%		
KY886893.1_ITA.17.IA	25,581%	8,638%	5,648%	9,635%	2,990%	2,990%	3,322%	20,266%	2,990%	19,601%	19,601%		
KY886891.1_ITA.17.IA	25,581%	9,967%	6,645%	9,635%	2,990%	2,990%	3,987%	21,262%	3,654%	21,262%	21,262%		
KX228693.1_EGY.14.IB	25,914%	2,326%	8,970%	1,993%	7,973%	7,973%	7,309%	22,259%	9,302%	21,595%	21,595%		
KX228692.1_EGY.2015.IB	27,055%	1,712%	8,562%	1,712%	7,534%	7,534%	7,192%	22,945%	8,904%	21,918%	21,918%		
KX228689.1_EGY.14.IB	26,246%	1,993%	8,638%	1,661%	7,641%	7,641%	7,309%	22,591%	8,970%	21,927%	21,927%		
KX228685.1_EGY.14.IB	25,914%	2,326%	8,970%	1,993%	7,973%	7,973%	7,309%	22,259%	9,302%	21,595%	21,595%		
KP091431.1_TUN.09.IA	26,246%	9,302%	2,326%	10,299%	3,987%	3,987%	4,319%	20,266%	4,651%	18,937%	18,937%		
KP091430.1_TUN.09.IA	24,585%	9,302%	1,993%	10,963%	4,319%	4,319%	5,316%	21,262%	4,983%	19,934%	19,934%		

Tabla 7. Secuencias utilizadas en análisis filogenético de HuNoV, genoma completo.

Número de acceso	País	Año publ.	Genog/ Genot.	Muestra extr.
EU004672*	USA	2007	GV	Ratón
KF039731	USA	2009	GI.1	Simio
KF039730	USA	2011	GI.1	Simio
KF039726	USA	2009	GI.1	Simio
M87661	USA	2013	GI.1	Simio
NC044854	JPN	2000	GI	Muestra fecal
MT732477	USA	2018	GI.6	Rata
MT008460	CHN	2018	GI	Hisopado nasal
MN938461	CHN	2019	GI.4	Hisopado nasal
MN938460	CHN	2019	GI	Hisopado nasal
JQ9115941	VNM	2010	GI	unpublished
MT451991	USA	2014	GI.3	Muestra fecal
MT008455	CHN	2018	GI.3	Muestra fecal
MT031988	USA	2019	GI.3	Muestra fecal
NC039897	JPN	2007	GI.3	Muestra fecal
MT372476	USA	2010	GI	Muestra fecal
NC044856	BGD	2011	GI.7	Muestra fecal

MT008459	CHN	2019	G1	Hisopado nasal
KF712498	USA	2013	GII.4	Simio
KF429790	USA	2012	GII.4	Simio
KF12491	USA	2013	GII.4	Simio
KF712505	USA	2012	GII.4	Simio
KC175408	VNM	2009	GII	Suero
KC175405	VNM	2009	GII	Suero
KC175393	VNM	2009	GII	Suero
KC409317	VNM	2009	GII	Suero
KF712510	USA	2010	GII.4	Suero
KC409299	VNM	2010	GII	Suero
KC409301	VNM	2010	GII	Suero
JX846924	CHN	1978	GII.3	
KY210980	RUS	2016	GII.4	Muestra fecal
MT031821	USA	2019	GII	Muestra fecal
MK073885	USA	2016	GII.4	Muestra fecal
MK483908	RUS	2018	GII.4	Muestra fecal
MT738527	USA	2019	GII	Muestra fecal
KT779557	RUS	2012	GII	Muestra fecal
NC039475	SKR	2015	GII	Muestra fecal
KT780416	HKG	2015	GII.17	No publicado
MK282256	SKR	2013	GII.17	Muestra fecal

KM198530	VNM	2010	GII	Muestra fecal
JX846927	USA	1984	GII.6	Muestra fecal

Tabla 8. Secuencias utilizadas en análisis filogenético de HuNoV, Segmento VP1.

EU085524	SWE	2010	GI.1	Mejillón
EU085523	SWE	2004	GI.1	Mejillón
EU085523	SWE	2004	GI.1	Mejillón
EF424500	JPN	2007	GI	Almeja
JN542688	BRA	2008	GI	ETA
KC954432	IRL	2012	GI	Ostra
EF424502	JPN	2007	GI	Almeja
JQ362594	IRE	2012	GI	Ostra
LC147092	JPN	2013	GI	ETA
HQ201649	ZAF	2009	GI	Agua
EF424504	JPN	2007	GI	Almeja
JN690232	SVN	2008	GI	Mejillón
DQ379714	AUS	1983	GII	Ostra
KT315715	HKG	2015	GII.17	ETA
KU720496	CAN	2015	GII.17	ETA
KT315715	HKG	2015	GII.17	ETA
JQ362542	IRE	2010	GII	Ostra
HM560944	TWN	2010	GII	Ostra

HM560939	TWN	2010	GII	Ostra
EF424532	JPN	2007	GII	Almeja
EF424537	JPN	2007	GII	Almeja
JF909054	ETH	2009	GII	ETA
JF909055	ETH	2009	GII	ETA
EF424540	JPN	2007	GII	Almeja
JN171568	ITA	2009	GII	ETA
JN171569	ITA	2009	GII	ETA
JN171566	ITA	2009	GII	ETA
JN171563	ITA	2009	GII	ETA
JN171565	ITA	2009	GII	ETA
LC147179	JPN	2010	GII	ETA
LC147180	JPN	2010	GII	ETA
KF199162	DNK	2013	GII	ETA
KF199163	DNK	2013	GII	ETA
LC147226	JPN	2012	GII	ETA
LC147233	JPN	2012	GII	ETA
JQ362539	IRE	2010	GII	Ostras
JF909047	ETH	2009	GII	ETA
AB262094	JPN	2002	GII	Ostra
JF909056	ETH	2009	GII	ETA

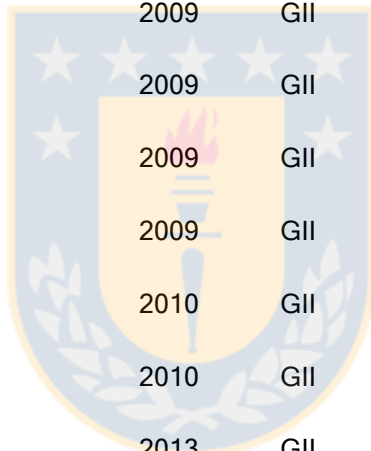


Tabla 9. Secuencias utilizadas en análisis filogenético de HuNoV, Segmento RdRp.

DQ440544	NLD	2006	GI.2	Ostras
JN040486	SVN	2008	GI	Mejillón
AJ626561	SWE	2002	GII	ETA
AJ626609	SWE	2002	GII	ETA
JN040477	SVN	2008	GII	Mejillón
EU085486	SWE	2004	GII	Mejillón
EU169447	MEX	2007	GII	Mat. Fecal
JN040478	SVN	2008	GII	Mejillón
KF953924	SVN	2010	GII	Mejillón
FF953825	SVN	2010	GII	Mejillón
DQ104022	SWE	1998	GII	ETA
DQ104018	SWE	1998	GII	ETA
EU085475	SWE	2004	GII	Mejillón
EU085476	SWE	2004	GII	Mejillón
JN040484	SVN	2008	GII	Mejillón
EU760380	CHN	2008	GII	Almeja
EU760385	CHN	2008	GII	Almeja
EU085489	SWE	2004	GII	Mejillón

EU085490	SWE	2004	GII	Mejillón
EU169443	MEX	2007	GII	Mat. Fecal
FJ268590	RUS	2006	GII	ETA
FJ268591	RUS	2006	GII	ETA
FJ268601	RUS	2006	GII	ETA
JQ362545	IRE	2010	GII	Ostra
JQ362594	IRE	2010	GII	Ostra
KC262663	KOR	2012	GII	Ostra
KC262666	KOR	2012	GII	Ostra
KC262667	KOR	2012	GII	Ostra
LC147180	JPN	2010	GII	ETA
LC147179	JPN	2010	GII	ETA
KF199162	DNK	2013	GII.4	ETA
KF199163	DNK	2013	GII.4	ETA
FF199165	DNK	2013	GII.4	ETA
LC147226	JPN	2012	GII	ETA
LC147233	JPN	2012	GII	ETA

*: Toda la filogenia de HuNoV tuvo como genogrupo outgroup a GV, Número de acceso EU004672

Tabla 10. Secuencias utilizadas en análisis filogenético de HAV, genoma completo.

*EU140838 IND 2009 GV Simio

LC435031	JPN	2018	IA	MSM
LC435032	JPN	2018	IA	MSM
LC416595	JPN	2018	IA	MSM
LC416593	JPN	2018	IA	MSM
LC416594	JPN	2018	IA	MSM
LC049341	MNG	2012	IA	Suero Humano
LC049342	MNG	2012	IA	Suero Humano
LC191189	JPN	2015	IA	Suero Humano
LC373510	JPN	2014	IA	Suero Humano
LC049340	MNG	2010	IA	Suero Humano
MN062166	USA	2018	IA	Suero Humano
MN062165	USA	2018	IA	Suero Humano
KX228694	EGY	2014	IB	Agua residual
MF621614	ETH	2016	IB	Muestra fecal
MK829707	USA	2013	IB	Frambuesas
LC128713	THA	2000	IB	ETA (agua)
AY644676	FRA	1979	IIA	Muestra fecal
AY644670	SLE	2004	IIB	Hígado
AB279734	JPN	1995	IIIA	Suero Humano
AB279733	JPN	1992	IIIA	Suero Humano
AB279732	JPN	1990	IIIA	Suero Humano
JQ655151	KOR	2011	IIIA	Muestra fecal

DQ991030	IND	2006	IIIA	Suero Humano
FJ360735	IND	1997	IIIA	Suero Humano
DQ991029	IND	2006	IIIA	Suero Humano
FJ350733	IND	1995	IIIA	Suero Humano
FJ360734	IND	1999	IIIA	Suero Humano
FJ360732	IND	2008	IIIA	Suero Humano
AB258387	JPN	1990	IIIB	Suero Humano
AB279735	JPN	1985	IIIB	Suero Humano
AB425339	JPN	1979	IIIB	No publicado
AB300205	JPN	1979	IIIB	Muestra fecal

Tabla 11. Secuencias utilizadas en análisis filogenético de HAV, segmento VP1/2A

MT185676	CMR	2019	V	Almeja
JX232225	RUS	2004	IIIA	Suero Humano
MN602281	ITA	2019	IIIA	Suero Humano
GQ844755	FIN	1998	IIIA	Suero Humano
JQ066751	KOR	2011	IIIA	No publicado
JQ066761	KOR	2011	IIIA	No publicado
JQ066758	KOR	2011	IIIA	No publicado
M14707	USA	1987	IIIA	
KP091377	TUN	2010	IB	Suero Humano
GU646039	FRA	2010	IB	Suero Humano

GQ844749	FIN	2004	IB	Suero Humano
GQ844741	FIN	2005	IB	Suero Humano
EF382409	RUS	2003	IB	Suero Humano, Agua Residual
MN496309	ITA	2019	IB	Suero Humano
MH730560	SWE	2018	IB	Frutilla, Suero Humano
KX228693	EGY	2014	IB	Agua Residual
KX228685	EGY	2014	IB	Agua Residual
KX228692	EGY	2015	IB	Agua Residual
KX228689	EGY	2014	IB	Agua Residual
KP091378	TUN	2013	IA	Suero Humano
HM011117	TUN	2006	IA	Agua, Suero Humano
HM011115	TUN	2006	IA	Agua, Suero Humano
HM011106	TUN	2006	IA	Agua, suero
KP091430	TUN	2009	IA	Suero Humano
GQ506663	FRA	2009	IA	Suero Humano
HM011113	TUN	2005	IA	Agua, suero
HM011110	TUN	2006	IA	Agua, suero
KP091431	TUN	2009	IA	Suero Humano
MN602279	ITA	2019	IA	Suero Humano
GQ505662	FRA	2008	IA	Suero Humano
MF805902	ESP	2017	IA	Suero Humano



MF805898	ESP	2017	IA	Suero Humano
MF805896	ESP	2017	IA	Suero Humano
MF805890	ESP	2017	IA	Suero Humano
KY886894	ITA	2017	IA	Muestra fecal
KY886891	ITA	2017	IA	Muestra fecal
KY886891	ITA	2017	IA	Muestra fecal
KY886893	ITA	2017	IA	Muestra fecal
KY886893	ITA	2017	IA	Muestra fecal
JX232248	RUS	2009	IA	Suero Humano
JX232242	RUS	2009	IA	Suero Humano
JX232224	RUS	2004	IA	Suero Humano
EF382400	RUS	2001	IA	Suero Humano, Agua Residual
EF382400	RUS	2001	IA	Suero Humano, Agua Residual
LC415421	JPN	2017	IA	Ostras ,Muestras fecales humanas

Tabla 12. Secuencias utilizadas en análisis filogenético de HAV, segmento VP3/VP1

MT185676	CAM	2019	V	Almeja
JF803958	MOR	2009	IA	Agua Residual
JF803958	MOR	2009	IA	Agua Residual
LN898376	TUN	2010	IA	Agua Residual
LN898400	TUN	2010	IA	Agua Residual

LN898408	TUN	2010	IA	Agua Residual
LN898377	TUN	2010	IA	Agua Residual
LN898399	TUN	2010	IA	Agua Residual
LN898402	TUN	2010	IA	Agua Residual
LN898403	TUN	2010	IA	Agua Residual
LN898405	TUN	2010	IA	Agua Residual
LN898406	TUN	2010	IA	Agua Residual
KC669704	IRN	2011	IIIA	Ostra
LN898320	TUN	2010	IB	Agua Residual
LN898343	TUN	2010	IB	Agua Residual
LN898350	TUN	2010	IB	Agua Residual
LN898383	TUN	2010	IB	Agua Residual
LN898410	TUN	2010	IB	Agua Residual
MN744255	PAL	2016	IB	Sangre Humana
MN744256	PAL	2016	IB	Sangre Humana
MN744263	PAL	2016	IB	Sangre Humana

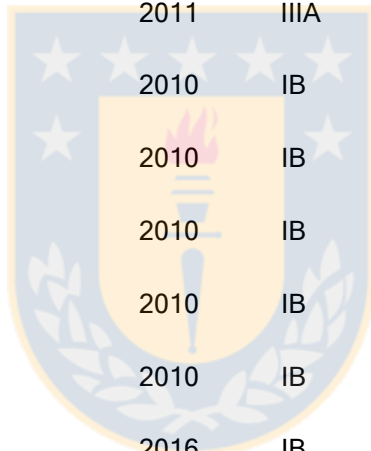


Tabla 13. Muestras utilizadas para extracción de ARN.

Las muestras con “*” fueron las seleccionadas para su estudio en nPCR.

N° ID	Muestra	Indice	promedio	N° ID	Muestra	Indice	promedio
1	c1	260/280	2,2705				
		ug/ul	6,0295	*21	CHT27	260/280	1,8405
2	c2	260/280	0,914			ug/ul	2922,1355
		ug/ul	0,92	*22	CHT28	260/280	1,4025
3	c3	260/280	1,453			ug/ul	2808,0635
		ug/ul	8,7495	*23	CHT29	260/280	1,463
4	c4	260/280	1,5045			ug/ul	2784,132
		ug/ul	3,7275	*24	CHT30	260/280	1,6525
5	c5	260/280	1,777			ug/ul	3021,971
		ug/ul	3,624	*25	CHT31	260/280	1,516
6	c6	260/280	1,781			ng/μL	3071,408
		ug/ul	1,9045	*26	CHT32	260/280	1,7635
7	c7	260/280	1,677			ug/ul	2936,248
		ug/ul	6,9735	*27	CHT33	260/280	1,4515
8	c8	260/280	1,6645			ug/ul	3121,0255
		ug/ul	5,115	*28	CHT34	260/280	1,522
9	c9	260/280	1,748			ug/ul	3082,8965
		ug/ul	5,53	*29	CHT35	260/280	1,6755
10	c10	260/280	1,723			ug/ul	3087,923
		ug/ul	4,385	*30	CHT36	260/280	1,4225
*11	CHT17	260/280	1,8985			ug/ul	2980,608
		ug/ul	2822,3975	*31	CHTR1	260/280	1,8
*12	CHT18	260/280	1,842			ug/ul	5,1365
		ug/ul	2975,0435	*32	CHTR2	260/280	1,78
*13	CHT19	260/280	1,6825			ug/ul	6,839
		ug/ul	3090,912	*33	CHTR3	260/280	1,795
*14	CHT20	260/280	1,912			ug/ul	8,5945
		ug/ul	2574,6475	*34	CHTR4	260/280	1,875
*15	CHT21	260/280	1,7945			ug/ul	8,176
		ug/ul	2843,6465	*35	CHTR5	260/280	1,885
*16	CHT22	260/280	1,609			ug/ul	11,49
		ug/ul	3063,1595	*36	CHTR6	260/280	1,845
*17	CHT23	260/280	1,9295			ug/ul	10,219
		ug/ul	2687,0775	*37	CHTR7	260/280	0,9
*18	CHT24	260/280	1,9585			ug/ul	2,4595
		ug/ul	1052,208	*38	CHTR8	260/280	1,745
*19	CHT25	260/280	1,82			ug/ul	4,3485
		ug/ul	2924,937	*39	CHTR9	260/280	1,39
*20	CHT26	260/280	1,6705			ug/ul	5,13
		ug/ul	3140,5125	*40	CHTR10	260/280	1,74
						ug/ul	4,577

N° ID	Muestra	Indice	promedio	N° ID	Muestra	Indice	promedio
*41	CHTR11	260/280	1,75	61	A8	260/280	1,855
		ug/ul	4,244			ug/ul	11,3285
*42	CHTR12	260/280	1,745	62	A9	260/280	1,638
		ug/ul	4,549			ug/ul	1,067
43	CHTR13	260/280	1,75	63	A10	260/280	1,3825
		ug/ul	2,9315			ug/ul	3,242
44	CHTR14	260/280	1,68	*64	ALK9	260/280	2,053
		ug/ul	2,153			ug/ul	1074,2265
45	CHTR15	260/280	1,78	*65	ALK10	260/280	2,066
		ug/ul	4,7665			ug/ul	717,207
46	CHTR16	260/280	1,765	*66	ALK11	260/280	2,0645
		ug/ul	4,632			ug/ul	1542,346
47	CHT37	260/280	0	*67	ALK12	260/280	2,1445
		ug/ul	0			ug/ul	1355,4825
48	CHT38	260/280	1,885	*68	ALK13	260/280	2,052
		ug/ul	3,97			ug/ul	849,409
49	CHT39	260/280	1,825	*69	ALK14	260/280	2,0815
		ug/ul	4,26			ug/ul	928,3645
50	CHT40	260/280	1,845	*70	ALK15	260/280	1,9575
		ug/ul	6,295			ug/ul	435,8455
51	CHT41	260/280	1,83	*71	ALK16	260/280	2,06
		ug/ul	5,14			ug/ul	1042,866
52	CHT42	260/280	1,84	*72	ALK17	260/280	2,087
		ug/ul	3,57			ug/ul	1450,194
53	CHT43	260/280	1,76	*73	ALK18	260/280	2,0345
		ug/ul	0,66			ug/ul	539,644
54	A1	260/280	1,9035	*74	ALK19	260/280	2,024
		ug/ul	9,2605			ug/ul	787,488
55	A2	260/280	1,8455	*75	ALK20	260/280	2,019
		ug/ul	4,9115			ug/ul	1147,056
56	A3	260/280	1,904	*76	ALK21	260/280	1,9895
		ug/ul	4,585			ug/ul	973,33
57	A4	260/280	2,069	77	ALK22	260/280	1,97
		ug/ul	8,9565			ug/ul	141,785
58	A5	260/280	1,915	78	ALK23	260/280	1,698
		ug/ul	7,229			ug/ul	14,0455
59	A6	260/280	1,9625	79	ALK24	260/280	2,0035
		ug/ul	4,9335			ug/ul	282,229
60	A7	260/280	1,988	80	ALK25	260/280	1,94
		ug/ul	19,576			ug/ul	45,183

N° ID	Muestra	Indice	promedio	N° ID	Muestra	Indice	promedio
81	ALK26	260/280	1,905	98	ALK42	260/280	1,545
		ug/ul	89,639			ug/ul	0,21
82	ALK27	260/280	2,0065	*99	ALK43	260/280	1,63
		ug/ul	238,516			ug/ul	1,285
83	ALK28	260/280	1,9795	*100	ALK44	260/280	1,645
		ug/ul	50,012			ug/ul	1,105
*84	ALK28	260/280	1,735	*101	ALK45	260/280	1,655
		ug/ul	2,655			ug/ul	1,145
*85	ALK29	260/280	1,715	*102	ALK46	260/280	1,71
		ug/ul	2,1065			ug/ul	2,155
*86	ALK30	260/280	1,7	*103	ALK47	260/280	1,64
		ug/ul	2,15			ug/ul	0,795
*87	ALK31	260/280	1,72	104	ALK48	260/280	1,375
		ug/ul	1,985			ug/ul	0,13
*88	ALK32	260/280	1,665	*105	ALK49	260/280	1,65
		ug/ul	1,525			ug/ul	0,945
*89	ALK33	260/280	1,7	106	ALK50	260/280	1,305
		ug/ul	2,0375			ug/ul	0,13
*90	ALK34	260/280	1,67	*107	ALK51	260/280	1,63
		ug/ul	1,79			ug/ul	1,17
*91	ALK35	260/280	1,69	*108	ALK52	260/280	1,725
		ug/ul	0,915			ug/ul	2,855
*92	ALK36	260/280	1,6	*109	ALK1	260/280	1,86
		ug/ul	0,61			ug/ul	0,493
*93	ALK37	260/280	1,7	*110	ALK2	260/280	1,72
		ug/ul	2,087			ug/ul	0,564
*94	ALK38	260/280	1,665	*111	ALK3	260/280	1,55
		ug/ul	1,47			ug/ul	0,964
*95	ALK39	260/280	1,58	112	ALK4	260/280	1,175
		ug/ul	0,655			ug/ul	0,339
*96	ALK40	260/280	1,6	113	ALK5	260/280	1,905
		ug/ul	0,4			ug/ul	0,1245
*97	ALK41	260/280	1,74	*114	ALK6	260/281	1,56
		ug/ul	1,995			ug/ul	3,24

AUTORIZACIÓN

Quien suscribe, Claudia Villanueva Olivos, Cédula N° 17.235.162-K, alumna del Programa Magíster en Ciencias Veterinarias mención en calidad e inocuidad de alimentos de origen animal, que imparte la Facultad de Medicina Veterinaria, de la Universidad de Concepción, declara ser autor de la Tesis “Análisis epidemiológico molecular de virus Hepatitis A y Norovirus; y pesquisa en la región del Biobio, Chile”, y conceder derecho de publicación, comunicación al público y reproducción de esa obra, en forma total o parcial en cualquier medio y bajo cualquier forma del mismo, a la Universidad de Concepción, Chile, para formar parte de la colección material o digital de cualquiera de las Bibliotecas de la Universidad de Concepción y del Repositorio Institucional UdeC. Esta autorización es de forma libre y gratuita, y considera la reproducción de la obra con fines académicos y de difusión tanto nacional como internacionalmente.

Asimismo, quien suscribe declara que dicha obra no infringe derechos de autor de terceros.



.....
06 Marzo, 2022